

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JAMILE BARBOSA

***Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.:**  
**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Alaíde Braga de Oliveira - UFMG

Co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Rachel Oliveira Castilho - UFMG.

Belo Horizonte - MG

2009

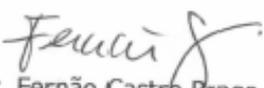
## FOLHA DE APROVAÇÃO

### "Campomanesia lineatifolia Ruiz & Pav.: estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante".

**Jamile Barbosa**

Dissertação aprovada em 04/06/2009 pela Comissão Examinadora  
constituída pelos seguintes membros:

  
Profa. Dra. Fabíola Dutra Rocha  
Centro Universitário UNIRG - Tocantins

  
Prof. Dr. Fernão Castro Braga  
Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG

  
Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho (Co-Orientadora)  
Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG

  
Profa. Dra. Alaide Braga de Oliveira (Orientadora)  
Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG

Dedico este trabalho àqueles que mais amo:  
minha família e meu noivo, Randel.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, Waldir e Ordália, por me ensinarem que o mais importante na vida é: a família, o caráter e os estudos.

Aos meus irmãos Cristiane e Wallace, pois mais do que irmãos, sempre foram amigos, ajudando no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu noivo Randel (Mozi), que sempre me incentivou a buscar meus objetivos. Agradeço por ter estado ao meu lado em todos os momentos do mestrado: nos estudos para a prova de seleção e no desenvolvimento do trabalho, com as minhas ausências e os momentos de estresse, sempre com um sorriso e uma palavra amiga.

À minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Rachel Oliveira Castilho, que assumiu o desafio de desenvolver o projeto mesmo sabendo das dificuldades que teríamos devido ao meu emprego. Ela foi, sem dúvida, a peça fundamental para que esse trabalho se concretizasse e a terei para sempre em meu coração.

À Prof.<sup>a</sup> Alaíde Braga de Oliveira, pela orientação e a confiança depositada em mim.

Ao botânico Sr. Marcos Sobral, pela identificação botânica e o zelo demonstrado.

Ao Prof. José Dias, pela obtenção dos espectros de RMN.

À Prof.<sup>a</sup> Fabíola Dutra Rocha, pelas valiosas contribuições nos testes antioxidantes.

À minha querida aluna de IC, Maria Rita (Ritinha), por ter me acompanhado no desenvolvimento desse trabalho, com competência e de maneira alegre e doce.

Às alunas de IC, Sônia (Soninha) e Priscila, que sempre foram interessadas e dispostas, ajudando a realizar diversas etapas da parte prática.

Ao meu amigo Magno, da Química Farmacêutica, pela troca de vivências e por sempre me ajudar, como na interpretação dos espectros de RMN.

À Priscila Valadares, pelo auxílio nos testes antioxidantes e no aparelho contracorrente.

Aos amigos da FUNED, em especial o Bruno, pela compreensão e pela convivência sempre enriquecedora.

Aos amigos do laboratório de Fitoquímica, Patrícia, Suzan, Cristiane, Célio, Jussara, Milton, Bruna, Raquel, Natália, Eliana, Leandro, Glauber, Fabiana, Ana Bárbara, Graça e Marcela, pois todos contribuíram de alguma forma para o meu trabalho, seja me ajudando com algum equipamento ou proporcionando momentos de confraternização.

A todos que me acompanharam no segundo turno e finais de semana no laboratório!  
Muito obrigada!

*“Eu ando pelo mundo prestando atenção  
Em cores que eu não sei o nome  
Cores de Almodóvar  
Cores de Frida Kahlo, cores  
Passeio pelo escuro,  
eu presto muita atenção no que meu irmão ouve  
E como uma segunda pele, um calo, uma casca,  
uma cápsula protetora  
eu quero chegar antes  
pra sinalizar o estar de cada coisa,  
filtrar seus graus  
Eu ando pelo mundo divertindo gente  
chorando ao telefone  
E vendo doer a fome nos meninos que tem fome (...)”*

Adriana Calcanhoto

## RESUMO

*Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav. pertence à família Myrtaceae Jussieu e é conhecida popularmente no Brasil como “gabiroba” ou “guabirabeira”. A espécie é uma árvore frutífera e a sua forma nativa pode ser encontrada no ocidente da Amazônia. As folhas e as cascas do caule de espécies de *Campomanesia* são usadas popularmente no tratamento da diarreia, úlcera gástrica e como cicatrizante. Foram pesquisados os metabólitos especiais majoritários de *Campomanesia lineatifolia* e foi avaliada sua potencial atividade antioxidante, *in vitro*, relacionada aos seus usos tradicionais. O pó das folhas da planta foi submetido à percolação em etanol e o extrato bruto obtido foi pré-purificado por partição líquido-líquido em solventes imiscíveis de polaridades crescentes, que deram origem a quatro frações: Fr. Hex., Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Fr. AcOEt e Fr. BuOH. A Fr. AcOEt, que apresentou melhor atividade antioxidante, foi fracionada utilizando-se cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) e CLAE-FR. Esses fracionamentos resultaram no isolamento de três substâncias. Duas delas foram identificadas por técnicas espectroscópicas como catequina e quercitrina. O extrato etanólico bruto e as frações, assim como as substâncias isoladas catequina e quercitrina, foram submetidos a quatro testes de atividade antioxidante *in vitro*: TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox); DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazila/Sequestrador de Radicais Livres); Capacidade Antioxidante (Método do Fosfomolibdênio); Poder Redutor (Método do Ferricianeto/Azul da Prússia). O conteúdo de fenóis totais, taninos e flavonóides foi determinado no pó das folhas, no extrato etanólico bruto e nas frações obtidas. *C. lineatifolia* mostrou-se rica em polifenóis, com grande quantidade de taninos (≈18% para o extrato etanólico) e flavonóides (≈9% para a Fr. AcOEt). O extrato etanólico apresentou atividade antioxidante em todos os testes realizados e os melhores resultados foram obtidos para as frações Fr. BuOH e Fr. AcOEt. No teste do DPPH, elas apresentaram CE<sub>50</sub> de 10,02±0,05 e 6,83±0,04 µg/mL e no ensaio de TEAC, 1,69±0,10 e 1,36±0,10, respectivamente. Dessa forma, sugere-se que a elevada concentração em fenóis no extrato e frações de *C. lineatifolia* e a atividade antioxidante estejam intimamente relacionadas às suas utilizações etnofarmacológicas.

**Palavras-chave:** *Campomanesia lineatifolia*, Myrtaceae, gabiroba, atividade antioxidante *in vitro*, DPPH, TEAC.

## ABSTRACT

*Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. is a fruit tree belonging to the Myrtaceae Jussieu family, popularly known in Brazil as “gabioba” or “guabirabeira”. Its native form can be found in the western Amazonia. The leaves and stem bark of *Campomanesia* species are popularly used as a healing agent or in the treatment of diarrhea and gastric ulcer. It was researched the major special metabolites of *Campomanesia lineatifolia* and was evaluated its potential *in vitro* antioxidant activity, related to their traditional uses. Leaf powder was submitted to percolation in ethanol and the obtained crude extract was pre-purified by liquid-liquid partition in immiscible solvents with increasing polarities, wich originated four fractions: Hex. Fr., CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Fr., EtOAc Fr. and BuOH Fr. The EtOAc fraction, wich showed the best antioxidant activity, was fractionated using high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) and reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). This fractionation resulted in the isolation of three substances. Two of them were identified by spectroscopic techniques as catechin and quercitrin. The crude ethanolic extract and the fractions, as well as the isolated substances catechin and quercitrin, were submitted to four *in vitro* antioxidant activity tests: TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity); DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl/Free Radicals Sequestrant); Antioxidant Capacity (Phosphomolybdenum method); Reducing Power (Ferricyanide method/Prussian Blue). The total phenols, tannins and flavonoids were determined in the leaf powder, crude extract and obtained fractions. *C. lineatifolia* is rich in phenols, with large amount of tannins (≈18% for crude extract) and flavonoids (≈9% for EtOAc Fr.). The crude ethanolic extract shown antioxidant activity in all performed tests and the best results were achieved in the BuOH Fr. and AcOEt Fr. Their DPPH test showed a EC<sub>50</sub> of 10.02±0.05 and 6.83±0.04 µg/mL and the TEAC assay 1.69±0.10 and 1.36±0.10, respectively. So, is suggested that high polyphenols concentration in *C. lineatifolia* extract and fractions and the antioxidant activity are closely related to their ethnopharmacological uses.

**Key-words:** *Campomanesia lineatifolia*, Myrtaceae, gabioba, *in vitro* antioxidant activity, DPPH, TEAC.

## LISTA DE FIGURAS

1 <i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz e Pav. em primeiro plano.....	23
2 <i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz e Pav.: A) e D) folhas e tronco; B) e C) frutos e flores (Fonte: LORENZI, 2006).....	24
3 Fórmula estrutural das champanonas A, B e C, isoladas de <i>C. lineatifolia</i> .....	25
4 Flavonóides isolados por Schmeda-Hirschmann (1995) em três espécies de <i>Campomanesia</i> : 1 Quercitrina; 2 Miricitrina; 3 Miricetina 3-O-rhamnoglucosídeo; 4 Rutina. Os flavonóides encontrados em cada espécie foram: <i>C.guazumaefolia</i> (1, 2, 3); <i>C. pubescens</i> (2); <i>C. xanthocarpa</i> (1, 2, 4).....	26
5 Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos de proteção celulares (adaptado de SILVA, 2003 e ORRENIUS, 1994).....	28
6 Esqueleto básico dos flavonóides: dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano oxigenado (APAK et al., 2007).....	30
7 Alguns dos cromóforos usados nos testes de capacidade antioxidante baseados no modelo ET (APAK et al., 2007).....	34
8 Fluxograma da obtenção do extrato etanólico bruto e das frações de <i>C. lineatifolia</i> , com as respectivas massas obtidas em cada etapa.....	42
9 Perfil cromatográfico em CCD da Fr. AcOEt após partição no sistema de solvente. À esquerda observa-se o perfil das bandas da fração em fase aquosa (F.A.) e à direita o perfil da fração em fase orgânica (F.O.). Revelador: Vanilina sulfúrica. Eluente: Fase orgânica superior.....	47
10 Cromatograma dos controles positivos quercetina e rutina em gradiente, conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44). $\lambda$ 210 nm.....	65
11 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR para as frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , AcOEt, BuOH e de EB das folhas de <i>C. lineatifolia</i> em gradiente, conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44). $\lambda$ 210 nm. ....	66
12 Espectros no U.V.obtidos “on line” para as frações A: Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , B: Fr. AcOEt, C: Fr. BuOH e D: EB; correspondentes aos picos predominantes obtidos nos cromatogramas em CLAE-FR.....	67
13 Perfil cromatográfico dos controles positivos quercetina e rutina e das frações Fr. Hex. e Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> das folhas de <i>C.lineatifolia</i> , em gradiente , conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44). $\lambda$ 210 nm.....	69
14 Espectros no U.V. obtidos “on line” para as frações A: Fr. Hexano e B: Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> correspondentes aos picos dos cromatogramas obtidos em CLAE-FR com tempos de retenção em Tr = 11,5, Tr = 13,6 e Tr = 60,0 min. ....	70
15 Fluxograma geral do fracionamento da fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de <i>C. lineatifolia</i> .....	71
16 Fluxograma dos fracionamentos da fração AcOEt, bem como as substâncias obtidas.....	72
17 Perfil cromatográfico em CCD apresentado pelas frações 67 a 104 de CCC2. A banda inferior apresenta Rf = 0,24 e a superior, Rf = 0,46. Revelador: Vanilina sulfúrica. Eluente: Fase orgânica superior do sistema de solvente.....	73
18 Perfil cromatográfico em CCD apresentado pelas frações FA a FJ, resultantes da reunião das frações de CCC1 a CCC4. O revelador indica a presença de flavonóides em FG, FH e FJ, todos com o mesmo Rf. Revelador: NP/PEG. Eluente: Fase orgânica superior do sistema de solvente.....	73

19	Cromatogramas das substâncias F, G e HH, em gradiente, conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44). $\lambda$ 210 nm. Detalhes: Espectros no U.V.obtidos “on line” .....	78
20	Espectro no I.V. obtido para a substância F.....	79
21	Fórmula estrutural da substância F (catequina).....	80
22	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para a substância F (catequina) (400 MHz, DMSO).....	81
23	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para a substância F (catequina) (100 MHz, DMSO).....	81
24	Subespectro DEPT-135 obtido para a substância F (catequina) (100 MHz, DMSO).....	82
25	Mapa de correlação COSY obtido para a substância F (catequina).....	82
26	Mapa de correlação HSQC obtido para a substância F (catequina).....	83
27	Cromatogramas da substância F, do padrão (+)-catequina e da co-Injeção de ambas. Gradiente conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44). $\lambda$ 210 nm. Detalhes: Espectros no U.V. obtidos “on line” .....	87
28	Perfil cromatográfico em CCD do carboidrato obtido por hidrólise ácida da substância G e do padrão ramnose. Volume de aplicação: 10 $\mu\text{L}$ . Revelador: Anisaldeído sulfúrico. Eluente: BuOH: Piridina: $\text{H}_2\text{O}$ (6: 4: 3).....	88
29	Espectros no U.V. da substância G com a utilização de reagentes de deslocamento. A: Espectros em MeOH e MeONa; B: Espectros após adição de $\text{AlCl}_3$ e $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ; C: Espectros após adição de AcONa e AcONa + $\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	90
30	Espectro no I.V. obtido para a substância G (quercitrina).....	91
31	Fórmula estrutural da substância G (quercitrina).....	92
32	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para substância G (quercitrina) (400 MHz, DMSO).....	92
33	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para substância G (quercitrina) – Expansão (400 MHz, DMSO).....	93
34	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para substância G (quercitrina) (100 MHz, DMSO).....	93
35	Subespectro DEPT-135 obtido para substância G (quercitrina) (100 MHz, DMSO).....	94
36	Mapa de correlação HSQC obtido para substância G (quercitrina).....	94
37	Mapa de correlação HMBC obtido para substância G (quercitrina).....	95
38	Gráfico comparativo das concentrações (% p/p) determinadas de flavonóides, taninos e polifenóis totais para <i>C. lineatifolia</i> : pó da planta, extrato etanólico bruto (EB), Fr. AcOEt e Fr. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n = 3).....	103
39	Gráfico comparativo das concentrações (% p/p) estimadas de taninos e flavonóides para <i>C. lineatifolia</i> : pó da planta, extrato etanólico bruto (EB), Fr. AcOEt e Fr. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .....	103
40	Gráfico da atividade seqüestradora de radicais livres medidos pelo teste do DPPH para o controle positivo quercetina e para EB, frações e substâncias isoladas de <i>C. lineatifolia</i> (folhas). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n = 3).....	106
41	Gráfico do comportamento cinético frente ao DPPH do extrato etanólico bruto (EB); Fr. AcOEt e Fr. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ de <i>C. lineatifolia</i> (folhas) e controle positivo quercetina.....	109
42	Gráficos do comportamento cinético frente ao DPPH de amostras de <i>C. lineatifolia</i> (folhas) em diferentes concentrações: A) extrato etanólico bruto (EB); B) Fr. AcOEt.....	110
43	Gráficos do teste de DPPH com tempo reacional de 30 minutos para amostras de <i>C. lineatifolia</i> (folhas) em diferentes concentrações: A) Fr. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; B) Fr. AcOEt. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n = 3).....	111

<b>44</b>	<b>Gráfico do poder redutor para a concentração de 50 µg/mL de EB e frações de <i>C. lineatifolia</i> e controles positivos . Resultados expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).....</b>	<b>114</b>
<b>45</b>	<b>Gráfico do poder redutor em diferentes concentrações de EB e frações de <i>C. lineatifolia</i> e controles positivos (rutina, quercetina, BHT). Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).....</b>	<b>115</b>
<b>46</b>	<b>Gráfico da capacidade antioxidante total para a concentração de 50 µg/mL de EB, frações e substâncias isoladas de <i>C. lineatifolia</i> e controles positivos . Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).....</b>	<b>117</b>
<b>47</b>	<b>Estabilização do radical ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. O termo ABTS <sup>•+</sup> nesta figura foi apresentado como ABTS <sup>•-</sup>. Adaptado de Huang <i>et al.</i> (2005) e van den Berg <i>et al.</i> (1999).....</b>	<b>118</b>
<b>48</b>	<b>Gráfico do valor de TEAC para EB e frações de <i>C. lineatifolia</i> e controles positivos. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).....</b>	<b>119</b>
<b>49</b>	<b>Gráficos das correlações entre os testes de atividade antioxidante: A) TEAC <i>versus</i> poder redutor; B) poder redutor <i>versus</i> seqüestrador de radicais livres (DPPH).....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE TABELAS

1	Massas (g) e rendimentos (%) das frações resultantes da partição do extrato etanólico de folhas de <i>C. lineatifolia</i> , bem como os volumes (L) de solventes imiscíveis utilizados.....	43
2	Sistema de eluição exploratório empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-FR do extrato etanólico bruto e das frações de <i>C. lineatifolia</i> .....	44
3	Série eluotrópica usada na coluna de sílica gel para fracionamento da Fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do extrato etanólico de <i>C. lineatifolia</i> .....	45
4	Grupos de frações reunidas resultantes da Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de <i>C. lineatifolia</i> e respectivas massas obtidas (mg).....	46
5	Fracionamentos em CCC realizados bem como as frações e volumes coletados em cada fracionamento.....	50
6	Preparo das diluições da SM de quercetina para obtenção das concentrações de trabalho da curva analítica.....	56
7	Concentrações (µg/mL) empregadas no teste do DPPH para EB e frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis de <i>C. lineatifolia</i> , substâncias F e G, além do controle positivo quercetina.....	58
8	Concentrações (µg/mL) empregadas no teste do Poder Redutor para EB e frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis de <i>C. lineatifolia</i> , além dos controles positivos (rutina, quercetina e BHT).....	60
9	Concentrações (µg/mL) empregadas no teste da Capacidade Antioxidante para EB, frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis e substâncias isoladas das folhas de <i>C. lineatifolia</i> , além dos controles positivos (rutina, quercetina e BHT).....	61
10	Reunião das frações obtidas nos fracionamentos CCC1 a CCC4.....	74
11	Reunião das frações obtidas na CCC de FH e cujo perfil em CCD apresentou as bandas correspondentes às substâncias F e G.....	75
12	Reunião das frações obtidas nos fracionamentos de CCC5 e CCC6 e cujos perfis em CCD apresentaram as bandas correspondentes a: Tr = 16,8 min., Tr = 30,4 min, substância F ou substância G.....	76
13	Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C obtidos para a substância F e dados da literatura para (+)-catequina.....	85
14	Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C obtidos para a substância G e dados da literatura para a quercitrina.....	97
15	Concentrações (% p/p) de polifenóis (C) e desvios padrões (DP) para determinação de taninos totais no pó, extrato etanólico bruto (EB) e frações de <i>C. lineatifolia</i> , expressos como pirogalol.....	99
16	Concentrações (% p/p) de taninos totais (TT), médias (M) e desvios padrões (DP) para o pó, extrato etanólico bruto (EB) e frações de <i>C. lineatifolia</i> .....	100
17	Concentrações de flavonóides totais(C), médias (M) e desvios padrões (DP) determinados para o pó, extrato etanólico bruto (EB) e frações de folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....	101
18	Valores de CE <sub>50</sub> obtidos no teste do seqüestrador de radicais livres DPPH para EB, frações e substâncias isoladas de <i>C. lineatifolia</i> e controle positivo quercetina.....	107
19	Equivalentes de ácido ascórbico em mmol/mg de amostra e seus respectivos desvios padrões, calculados pelo teste do Poder Redutor para a concentração de 50 µg/mL de cada amostra.....	113

<b>20</b>	<b>Equivalentes de Ácido Ascórbico mmol/mg de amostra e seus respectivos desvios padrões, calculados pelo teste da Capacidade Antioxidante para a concentração de 50 µg/mL de amostra.....</b>	<b>116</b>
<b>21</b>	<b>Comparação entre os valores de TEAC e a % Inibição da absorbância do radical ABTS<sup>•+</sup> para a concentração de 200 µg/mL das amostras.....</b>	<b>119</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AcOEt	Acetato de Etila
AcONa	Acetato de sódio
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
BuOH	n-Butanol
CCC	Cromatografia Contra Corrente
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa
COSY	HH correlation spectroscopy
CPC	Cromatografia Contra Corrente Centrífuga de Partição
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DP	Desvio Padrão
EM	Espectrometria de Massas
EtOH	Etanol
Ext.	Extrato
F.A.	Fase Aquosa
F.E.	Fase Estacionária
Fr.	Fração
Hex.	Hexano
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido Bórico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido Fosfórico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantun Correlation
LAREMAR	Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução
MeOH	Metanol
MeONa	Metóxido de sódio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H

Rf	Fator de Retenção
Tr	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Os fitoterápicos – breve histórico das ações e políticas nas últimas décadas.....	19
2.2 O gênero <i>Campomanesia</i> .....	21
2.3 Os radicais livres e a atividade antioxidante.....	27
2.4 Testes <i>in vitro</i> de atividade antioxidante.....	30
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1 Equipamentos.....	36
4.2 Material de consumo.....	37
4.3 Reveladores para cromatografia em camada delgada (CCD).....	39
4.4 Coleta e identificação.....	40
4.5 Preparo do material vegetal e extração.....	40
4.6 Pré-purificação do extrato etanólico bruto (EB).....	41
4.7 Perfil químico de <i>C. lineatifolia</i> obtido por cromatografia.....	43
4.8 Fracionamento da fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	44
4.9 Fracionamento da fração AcOEt.....	46
4.10 Hidrólise da Substância G.....	51
4.11 Doseamento de taninos.....	52
4.12 Doseamento de flavonóides.....	54
4.13 Testes <i>in vitro</i> de atividade antioxidante.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Perfis cromatográficos.....	64
5.2 Fitoquímica de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....	70
5.3 Doseamento de polifenóis.....	98
5.4 Testes <i>in vitro</i> de atividade antioxidante.....	105
6 CONCLUSÃO.....	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
ANEXO – ESPECTROS DE RMN DA SUBSTÂNCIA HH.....	133

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização o homem utiliza as plantas como fonte de tratamento e cura para as enfermidades. Com o desenvolvimento da química no início do século XX muitas substâncias novas foram sintetizadas, o que causou um grande impacto na medicina com o tratamento de doenças até então incuráveis. A utilização de plantas medicinais e seus extratos passaram a ser discriminados por profissionais da área de saúde, pois apresentavam pouca eficácia sobre as doenças e sintomas devido a problemas de qualidade quando comparados aos medicamentos sintéticos. Nas últimas décadas este quadro tem sido revertido, uma vez que muitas das expectativas criadas em torno dos medicamentos industrializados mostraram-se exageradas, tais como: a crença de que haveria um medicamento eficaz para cada tipo de doença; o grande número de efeitos adversos; os danos à saúde causados pelo uso incorreto e/ou abusivo e, principalmente, pela falta de acesso aos medicamentos pelas populações de baixa renda (SIMÕES *et al*, 1988).

Ainda hoje as plantas medicinais têm um papel importante nos sistemas de atenção básica à saúde de boa parcela da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. Nesses, em muitos casos elas são o único medicamento disponível para a população devido ao elevado custo dos tratamentos com produtos farmacêuticos modernos (MAHADY, 2001). Segundo Di Stasi (1996), cerca de 20% da população mundial vive nos países desenvolvidos e são responsáveis pelo consumo de 85% dos medicamentos industrializados disponíveis. De forma semelhante, no Brasil cerca de 20% da população é responsável pelo consumo de 63% dos medicamentos industrializados e o restante da população, na maioria das vezes, tem como único recurso terapêutico as plantas de uso tradicional.

Estima-se que em todo o mundo existam cerca de 350.000 a 550.000 espécies de plantas, sendo o Brasil detentor de cerca de 55.000 espécies, possuindo a maior diversidade genética vegetal do mundo (BRASIL, 2006a). As plantas medicinais são parte dessa diversidade, consistindo num grande aliado das políticas públicas em saúde no Brasil. O amplo acesso da população aos fitoterápicos e plantas medicinais com segurança, eficácia e qualidade pode contribuir para a ampliação das opções terapêuticas disponíveis aos usuários do

SUS, propiciando a melhoria da atenção à saúde da população e a inclusão social (BRASIL, 2006b).

A planta *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav. é utilizada popularmente para o tratamento de diarreias e problemas estomacais, dentre outros (CORREA, PENNA, 1984, CRAVO, 1994 (*apud* MARKMAN, 2004, p. 55)). Em relação a sua constituição química, diversos estudos indicaram a presença de polifenóis e flavonóides (THEODOLUZ *et al.*, 1988, SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995, MARKMAN *et al.*, 2000, 2004). Isto pode estar relacionado com as atividades medicinais descritas para a planta, pois os flavonóides apresentam comprovadas ações antioxidantes e antiinflamatórias (ZUANAZZI, MONTANHA, 2004; CAMPOS, 2005).

O presente trabalho se insere na linha de pesquisa de Farmacognosia e Fitoquímica Medicinal e os dados obtidos contribuirão para o conhecimento sobre a composição química e atividade antioxidante de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Os fitoterápicos – breve histórico das ações e políticas nas últimas décadas

No final da década de 1970 o uso de fitoterápicos passou a ser reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), quando foi criado o Programa de Medicina Tradicional. Esse programa recomendou aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a adoção de práticas tradicionais de comprovada eficácia. Em 1991, a OMS solicitou aos estados-membros a cooperação entre praticantes de medicina tradicional e da assistência sanitária moderna, principalmente no tocante aos remédios tradicionais de eficácia comprovada, com a finalidade de reduzir gastos com medicamentos. No período de 2002 a 2005, a OMS reforçou esse compromisso estimulando as políticas públicas que visassem à inclusão da medicina tradicional no sistema oficial de saúde de seus estados-membros. Nesse sentido, como parte integrante da medicina tradicional, a fitoterapia resgata a cultura tradicional do uso das plantas medicinais pela população, além de possibilitar o acesso a recursos para a manutenção das condições de saúde (BRASIL, 2006b).

No Brasil, as ações e políticas públicas no âmbito da fitoterapia foram intensificadas após a década de 1980, sendo elaboradas diversas resoluções, portarias e relatórios, tais como:

- Portaria nº 212, de 11 de setembro de 1981, do Ministério da Saúde, que definiu o estudo das plantas como uma das prioridades de investigação clínica (BRASIL, 2006a).
- Resolução CIPLAN (Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação) nº 08, de 08 de março de 1988 que, considerando a prática secular da fitoterapia no Brasil, resolveu implantá-la nos serviços de saúde como forma de baratear custos para os cofres públicos, além de propiciar uma maior auto-suficiência e menor necessidade de importação de matéria-prima (BRASIL, 2006a).

- Parecer nº 04/92 do Conselho Federal de Medicina, aprovado em 17 de janeiro de 1992, que reconheceu a fitoterapia como método terapêutico (BRASIL, 2006a).
- Portaria nº 06/SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária, de 31 de janeiro de 1995, que instituiu e normatizou o registro de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2006a).
- Relatório final da 10ª Conferência Nacional de Saúde, 1996, que recomendou a incorporação ao SUS das práticas de saúde como a fitoterapia, acupuntura e homeopatia (BRASIL, 2006a).
- Política Nacional de Assistência Farmacêutica, integrante da Política Nacional de Saúde (PNS) aprovada em 1998, que contemplou a definição de ações para a utilização das plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos no processo de atenção à saúde (BRASIL, 2006b).
- RDC/ANVISA nº 17 de 2000, que atualizou a regulamentação de registro de medicamentos fitoterápicos e definiu o medicamento fitoterápico tradicional (BRASIL, 2006a).
- RDC/ANVISA nº 48 de 2004, que revogou a RDC 17 e dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2006a).
- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, Portaria GM nº 971, de 03 de maio de 2006, cujo objetivo foi ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados a fitoterapia com segurança, eficácia e qualidade. Essa mesma política tratou ainda da elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos (BRASIL, 2006b).
- Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que estabeleceu diretrizes e linhas prioritárias voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos e ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, promovendo ainda o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006b).

A RDC nº 17 de 2000 trouxe o conceito de medicamento fitoterápico tradicional, cuja eficácia poderia ser validada através de levantamentos etnofarmacológicos e de utilização, documentações tecnocientíficas ou publicações

indexadas. Esta RDC determinou ainda que para o registro de medicamento fitoterápico novo, o fabricante deveria apresentar estudos científicos que comprovassem a eficácia e segurança, o que significava a exigência da realização de ensaios pré-clínicos e clínicos de fase 3. Felizmente na RDC nº 48, que revogou a RDC nº 17, os estudos clínicos de fase 3 não foram exigidos para todo medicamento fitoterápico, pois passaram a ser aceitas informações etnofarmacológicas e documentações tecnocientíficas em publicações. Com isso, a partir de 2004 houve uma redução nos custos para a validação da segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos, pois a realização dos ensaios clínicos exigidos na RDC nº 17 representava um grande empecilho financeiro para os fabricantes. Segundo Botsaris (2003), a validação das plantas medicinais brasileiras ficaria inviável com a RDC nº 17, já que os custos seriam muito elevados e não conseguiriam ser compensados nem mesmo pelo retorno financeiro com a comercialização do produto.

Muitas espécies vegetais de uso tradicional ainda não podem ser empregadas na produção de um fitoterápico. Isso ocorre devido a uma série de fatores, como as exigências para a validação da segurança e eficácia das plantas medicinais (citado anteriormente) além da necessidade de maior integração entre os pesquisadores, as instituições e o seguimento industrial (público e privado) e a ausência de uma política governamental para a exploração das riquezas biológicas existentes no Brasil (BRASIL, 2006a).

## 2.2 O gênero *Campomanesia*

O gênero *Campomanesia* pertence à família Myrtaceae Jussieu, que compreende 100 gêneros distribuídos em 3.000 espécies. A família é representada por plantas arbustivas ou arbóreas, com muitos representantes que produzem frutos comestíveis como o jambo, a pitanga e a goiaba. Essa família é subdividida em duas subfamílias: Leptospermoideae e Myrtoideae e o gênero *Campomanesia* pertence à subfamília Myrtoideae (HEYWOOD, 1993; LORENZI, 2006).

Segundo Landrum (1986), no Brasil o nome “guabiroba” ou alguma variação é comumente usado para a maioria das espécies do gênero *Campomanesia*, que está

distribuído do norte da Argentina a Trinidad, e da costa do Brasil até os Andes (Peru, Equador e Colômbia). As espécies desse gênero produzem frutos comestíveis, que são consumidos por várias espécies de pássaros e mamíferos, sendo também usados na produção de doces caseiros, sorvetes, aguardentes, licores e refrescos (VALLILO *et al.*, 2005).

A *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav. (**Figuras 1 e 2**) é conhecida popularmente no Brasil como guabirabeira, no Peru como palillo e na Colômbia como “guayavo de Anselmo” e “guayava de palo”. A espécie é uma árvore frutífera de florestas com elevação inferior a 2000 m do nível do mar, sendo distribuída na Colômbia, Equador, Peru e Brasil. Ela é pouco cultivada em pomares domésticos e a sua forma nativa pode ser encontrada na parte ocidental da região Amazônica, em matas primárias de terra firme. Floresce de setembro a novembro e os frutos amadurecem de fevereiro a abril, contendo polpa suculenta de sabor acidulado e poucas sementes (LANDRUM, 1986; LORENZI, 2006).

As folhas e as cascas do caule de espécies de *Campomanesia* são usadas popularmente na forma de decocto ou infuso, como antidiarréico, para tratamento de catarro da bexiga e da uretra e como adstringente (CORREA, PENNA, 1984). Segundo Alice *et al.*, 1995 (*apud* BIAVATTI *et al.*, 2004, p. 385), a espécie *Campomanesia xanthocarpa* é empregada como depurativo, purgativo, anti-reumático e para reduzir o colesterol do sangue. Segundo Cravo, 1994 (*apud* MARKMAN, 2004, p. 55), *Campomanesia xanthocarpa* é empregada contra desinteria, problemas estomacais e febre. Theodoluz *et al.* (1988), relata o uso tradicional no Paraguai de diversas espécies de *Campomanesia* para o tratamento da gota.



Figura 1: *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav. em primeiro plano.

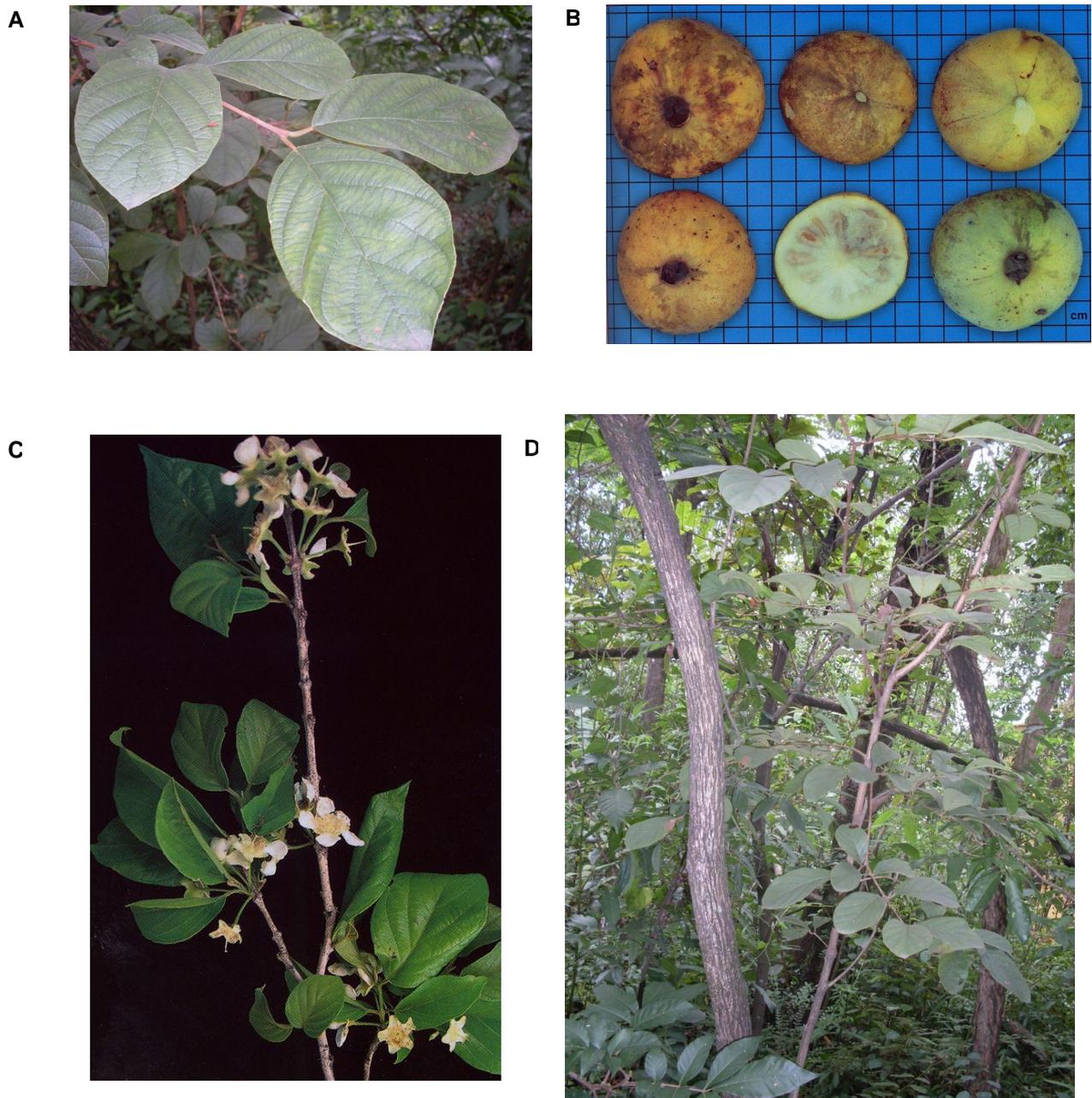


Figura 2: *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.: A) e D) folhas e tronco; B) e C) frutos e flores (Fonte: LORENZI, 2006).

Em relação aos aspectos fitoquímicos e/ou farmacológicos do gênero *Campomanesia*, estudos científicos já realizados mostram que a *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg apresenta em sua composição química flavonóides, saponinas e taninos e tem ação gastroprotetora, mas as substâncias e o mecanismo responsáveis pela atividade antiúlcera ainda são desconhecidos (MARKMAN *et al.*, 2004). Bonilla *et al.* (2005) isolaram e elucidaram a estrutura de três estilbenos, as champanonas (A, B e C), que são pigmentos amarelos presentes nas sementes de *Campomanesia lineatifolia* (Figura 3).

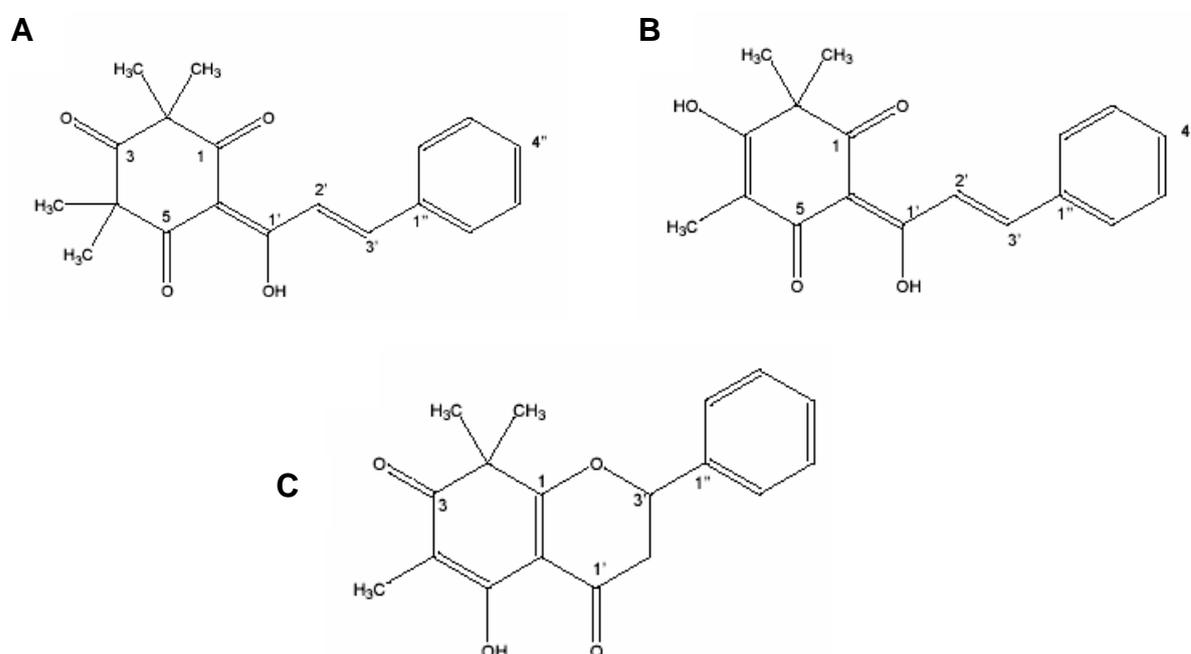
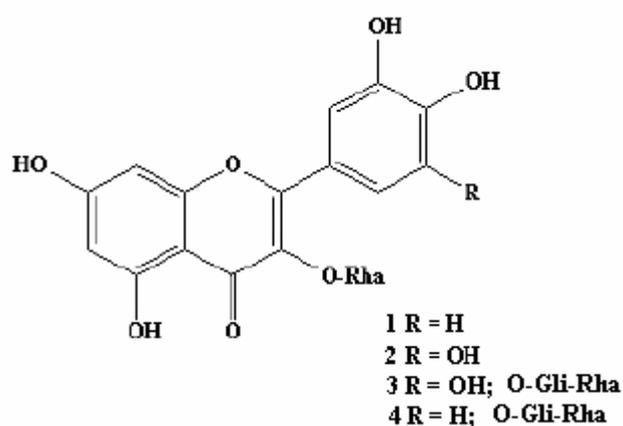


Figura 3: Fórmula estrutural das champanonas A, B e C, isoladas de *C. lineatifolia*.  
Fonte: Bonilla *et al.* (2005).

Já Biavatti *et al.* (2004) mostraram que a administração do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* em ratos levou ao controle de peso e a redução da glicemia. Osório *et al.* (2006) realizaram estudos com *Campomanesia lineatifolia*, fazendo a caracterização por cromatografia gasosa das substâncias voláteis desta espécie. Foram encontrados terpenóides, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, C<sub>13</sub>-norisoprenóides, compostos furânicos e β-tricetonas, sendo essas últimas os compostos majoritários. Limberger *et al.* (2001) conduziram estudos sobre a composição química do óleo essencial de quatro espécies de *Campomanesia* (*C.*

*guazumifolia*, *C. aurea*, *C. rhombea* e *C. xanthocarpa*) nos quais mostraram a presença considerável de sesquiterpenos e monoterpenos. Theodoluz *et al.* (1988) descreveram a atividade inibitória da enzima xantina oxidase *in vitro* por extratos das folhas de *C. guazumifolia* (Camb) Berg. Já Schmeda-Hirschmann (1995) estudou os tipos de flavonóides presentes em *C. xanthocarpa*, *C. guazumifolia* e *C. pubescens*, tendo verificado a presença dos flavonóides miricetina 3-O-rhamnoglucosídeo, miricitrina, rutina e quercitrina (**Figura 4**). Segundo Adati *et al.* (2000), o óleo essencial de *C. phaea* (O Berg) apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Markman *et al.* (2000) verificaram a atividade do extrato hidroalcolico de folhas de *C. xanthocarpa* frente a *Staphylococcus aureus* e *Salmonella cholergesuis*, na concentração de 500 mg/mL.



**Figura 4:** Flavonóides isolados por Schmeda-Hirschmann (1995) em três espécies de *Campomanesia*: 1 Quercitrina; 2 Miricitrina; 3 Miricetina 3-O-rhamnoglucosídeo; 4 Rutina. Os flavonóides encontrados em cada espécie foram: *C. guazumaefolia* (1, 2, 3); *C. pubescens* (2); *C. xanthocarpa* (1, 2, 4).

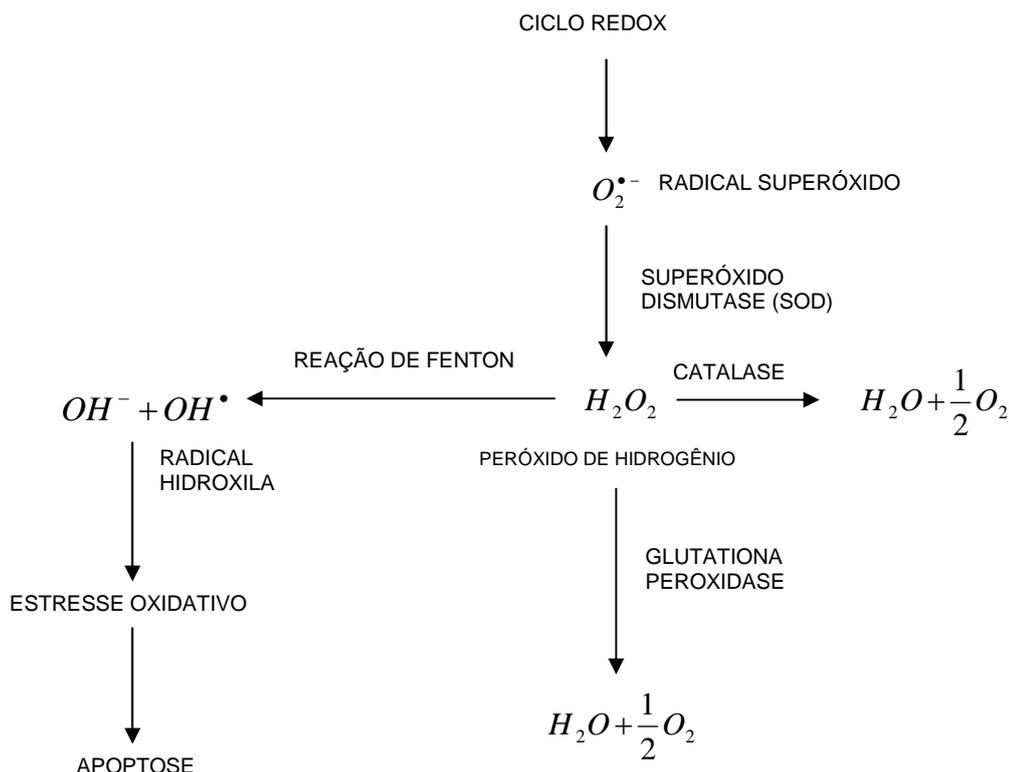
A família Myrtaceae caracteriza-se pela presença de óleos essenciais e polifenóis (GOTTLIEB *et al.*, 1996). Os estudos de Theodoluz *et al.* (1988), Schmeda-Hirschmann (1995), Markman *et al.* (2000, 2004) verificaram a presença de flavonóides em várias espécies de *Campomanesia*. A presença de flavonóides pode estar relacionada com várias das atividades medicinais descritas para a planta, pois apresentam comprovadas ações antioxidantes e antiinflamatórias. Além dessas atividades os flavonóides também têm sido relacionados com efeitos benéficos no

trato gastrointestinal, para o tratamento de úlceras gástricas e diarreias crônicas, sendo os flavonóis os mais ativos (ZUANAZZI, MONTANHA, 2004; CAMPOS, 2005).

### 2.3 Os radicais livres e a atividade antioxidante

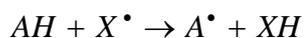
Os 36 moles de ATP produzidos durante o metabolismo aeróbico da glicose representam uma vantagem energética para os organismos que o realizam. Entretanto, durante o metabolismo aeróbico normal ocorre a formação de pequenas, mas significativas quantidades de radicais livres, também chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), os radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) e os radicais hidroxila ( $OH^\bullet$ ) são os exemplos mais expressivos de ROS que são formados nos organismos aeróbicos. Os radicais hidroxila são formados a partir das outras espécies reativas num processo conhecido como reação de Fenton, que é catalisada principalmente por  $Fe^{2+}$  e leva a danos celulares por estresse oxidativo (Figura 4) (AHMAD, 1995; WANG *et al.*, 2006; ORRENIUS, 1994).

As células precisam de defesas contra as ROS e para isso utilizam várias substâncias, como certas vitaminas e micronutrientes, as quais são necessárias nos processos de destoxicação enzimática. Além destas, existem as enzimas (**Figura 5**), como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidases (GPOXs) e as catalases (CATs) que atuam juntamente com as vitaminas e os micronutrientes, como a primeira linha de defesa contra as ROS, sendo geralmente denominados antioxidantes primários (AHMAD, 1995).



**Figura 5: Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos de proteção celulares (adaptado de SILVA, 2003 e ORRENIUS, 1994).**

Segundo Ahmad (1995), os antioxidantes primários atuam através da doação de um elétron (ou átomo de H, equivalente à doação de um elétron e de um  $H^+$ ) para uma espécie radicalar. Durante esta reação, a deficiência eletrônica é transferida para o antioxidante, transformando-o em um radical derivado do antioxidante ( $A^{\bullet}$ ), conforme mostra a equação:



Os antioxidantes secundários ou preventivos atuam reduzindo a taxa de oxidação e inibem, por exemplo, a formação de radicais hidroxila que ocorre nas reações de Fenton (AHMAD, 1995).

Em condições adversas ocorre uma superprodução das espécies reativas e as enzimas responsáveis pela decomposição dessas espécies não conseguem transformar todas as moléculas produzidas, deixando escapar algumas. Essas moléculas (ROS) quando reagem com uma molécula normal, desencadeiam imediatamente uma reação em cascata, originando um grande número de novos radicais livres que só terminam na presença de substâncias antioxidantes (CAMPOS, 2005).

Fatores ambientais, como poluentes do ar, radiação ionizante e produtos químicos industrializados, assim como o metabolismo de xenobióticos, contribuem para o aumento da concentração celular de ROS. Além disso, muitas células especializadas – p.ex. os eritrócitos – geram grandes quantidades de ROS pela auto-oxidação espontânea de substratos biológicos importantes tais como a hemoglobina (AHMAD, 1995).

Muitas são as condições patológicas e fisiológicas resultantes da formação de ROS e várias destas já foram bastante estudadas, havendo abundantes evidências experimentais que indicam estas espécies reativas como mediadoras de lesões e disfunções celulares. Assim, os radicais livres desempenham papel importante nas doenças degenerativas e crônicas inflamatórias, na carcinogênese, aterosclerose, isquemia cerebral e cardíaca, doenças inflamatórias intestinais crônicas e envelhecimento. Muitos pesquisadores acreditam que os efeitos cumulativos dos radicais livres têm grande importância no aparecimento de doenças tão diversas como o cancro, a artrite reumatóide e o mal de Parkinson (AHMAD, 1995; CAMPOS, 2005; VISIOLI *et al.*, 1994).

A geração de peróxidos lipídicos é particularmente citotóxica devido a seu impacto danoso na estrutura e função das biomembranas, tendo participação, por exemplo, na patogênese da aterosclerose. As lipoproteínas, em particular as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), são a fração usualmente exposta à oxidação na circulação sanguínea. O LDL oxidado tem reconhecido potencial aterogênico e desempenha um papel importante na formação de placas ateroscleróticas através de processos envolvendo a participação de células circulantes, tais como monócitos, linfócitos T e plaquetas, e células da parede dos vasos. Essa oxidação pode ser evitada pela presença de antioxidantes lipofílicos como a vitamina E, o betacaroteno e a ubiquinona (VISIOLI *et al.*, 1994; TOORU, 2002).

Como já mencionado, os radicais livres têm importante papel no desenvolvimento de muitas doenças e devido a isso a ação dos antioxidantes é importante no combate dessas espécies e na preservação da saúde. Neste aspecto, muita atenção tem sido dada às substâncias fenólicas, pois elas apresentam forte atividade antioxidante (ARTS *et al.*, 2003).

Os flavonóides, cujo esqueleto básico está mostrado na **Figura 6**, são uma importante classe de polifenóis e estão presentes em relativa abundância entre os

metabólitos secundários de vegetais. Sua conhecida atividade antioxidante se deve a um conjunto de propriedades, tais como: atividade quelante de ferro, ações antiinflamatórias, atividade seqüestradora de radicais livres, prevenção da peroxidação lipídica, inibição das enzimas cicloxigenase, lipoxigenase e xantina-oxidase, além de estimular enzimas com atividade antioxidante como a superóxido dismutase (ZUANAZZI, MONTANHA, 2004).

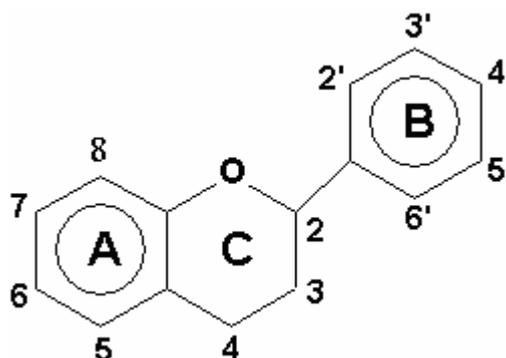


Figura 6: Esqueleto básico dos flavonóides: dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano oxigenado (APAK *et al.*, 2007).

## 2.4 Testes *in vitro* de atividade antioxidante

Existem diversos modelos experimentais *in vitro* para se determinar a atividade antioxidante das substâncias. Em geral, a concentração e a estrutura do antioxidante são mais bem definidas e controladas durante estudos *in vitro* quando comparadas a estudos *in vivo*. Assim, muito embora os estudos *in vivo* sejam mais realistas, eles também são multi-facetados, com fatores tais como o próprio metabolismo antioxidante, a instabilidade, sistema homeostático, etc. Desta forma, os estudos *in vitro* são mais simplesmente controlados, sendo importantes na dedução inicial de características de uma nova série de antioxidantes. Os dados encontrados através dos estudos *in vitro* podem ser posteriormente usados em estudos *in vivo*. Assim, os efeitos para a saúde e o modo de ação de diferentes antioxidantes podem ser elucidados (HAENEN *et al.*, 2006).

Existem muitos modelos para a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos compostos e eles são normalmente divididos em duas categorias: reações

baseadas na transferência de um hidrogênio (HAT) ou na transferência de um único elétron (ET).

A transferência de um hidrogênio (HAT) pode ser ilustrada pelo exemplo da peroxidação lipídica:



Após a geração do radical livre ( $R^{\bullet}$ ) as reações 2 e 3 ocorrem como uma reação em cadeia e, dessa mesma forma, muitas moléculas lipídicas (RH) são convertidas em peróxidos lipídicos (ROOH), resultando na oxidação e rancificação de óleos e gorduras (WRIGHT *et al.*, 2001).

Os antioxidantes fenólicos podem ser representados genericamente como ArOH e seu papel como antioxidante é interromper a reação em cadeia, como mostrado a seguir:



Para ser eficaz, o radical formado  $ArO^{\bullet}$  deve ser estável, reagindo lentamente com o substrato RH e rapidamente com  $RO_2^{\bullet}$ , sendo por isso conhecido como “antioxidante de quebra da cadeia”. No plasma humano, o mais efetivo antioxidante lipofílico de quebra da cadeia é o  $\alpha$ -tocoferol, o componente mais ativo da Vitamina E (WRIGHT *et al.*, 2001).

A reatividade relativa num método HAT é determinada principalmente pela entalpia de dissociação da ligação referente ao grupo doador de hidrogênio. A medida da capacidade antioxidante é baseada em competições cinéticas e as reações do tipo HAT são independentes do pH e do solvente, reagindo em geral muito rapidamente e terminando em segundos ou minutos. A presença de agentes redutores, incluindo metais, é uma complicação nos testes HAT e podem levar a reatividade aparente erroneamente alta (WRIGHT *et al.*; 2001; PRIOR *et al.*, 2005).

Para que um antioxidante seja eficaz ele precisa reagir mais rápido do que as biomoléculas com os radicais livres, protegendo-as da oxidação. Geralmente os testes baseados no modelo HAT são compostos por uma fonte de radicais livres, uma sonda molecular oxidável e um antioxidante. Como nesses testes tanto a sonda fluorescente como o antioxidante reagem com a espécie radicalar ( $ROO^{\bullet}$ ), a atividade do antioxidante será determinada a partir da competição cinética entre

ambos. Dessa forma, será medido o decaimento da fluorescência da curva da sonda na ausência e na presença de antioxidantes, com posterior integração da área sob estas curvas (PRIOR *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2005).

São exemplos de testes baseados no modelo HAT: ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”), TRAP (“Total Radical Trapping Antioxidant Parameter”), Inibição da Oxidação do Ácido Linoléico (HUANG *et al.*, 2005).

O outro mecanismo de desativação de radicais livres se dá pela transferência de um único elétron (ET), modelo no qual primeiramente se forma um cátion radical, o qual é rápida e reversivelmente desprotonado em solução, de acordo com as seguintes reações (WRIGHT *et al.*, 2001):



A equação resultante das reações acima é:



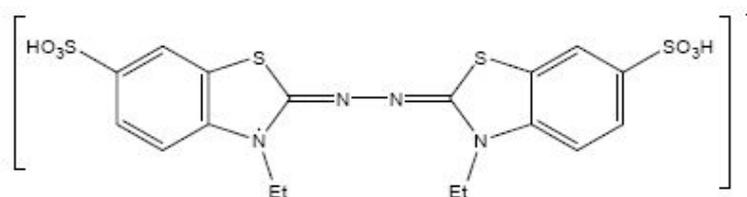
As reações baseadas no modelo ET são normalmente lentas e podem precisar de longos períodos para ser completadas. Por isso, os cálculos da capacidade antioxidante são baseados na redução da porcentagem do produto ao invés da cinética, como no modelo HAT. Os mecanismos ET e HAT quase sempre podem ocorrer juntos em todas as amostras, mas o balanço entre ambos é determinado pela estrutura e pH. Dessa forma, a reatividade relativa do método ET é baseada primariamente na desprotonação e no potencial de ionização (IP) do grupo funcional reativo, com isso as reações ET são pH dependentes. Em geral, os valores de IP diminuem com o aumento do pH, refletindo um aumento na capacidade doadora de elétrons com a desprotonação. Além disso, é importante ressaltar que traços de contaminantes (principalmente metais) interferem com o método ET e podem contribuir para a alta variabilidade e pobre reprodutibilidade e consistência dos resultados (PRIOR *et al.*, 2005).

Os métodos baseados na transferência de elétron (ET) envolvem dois componentes na mistura reacional, o antioxidante e o oxidante (uma sonda). A sonda retira um elétron do antioxidante, fato que gera uma alteração na coloração da mesma. O grau de mudança na coloração é proporcional à concentração do antioxidante e o ponto final da reação é alcançado quando não mais ocorrem

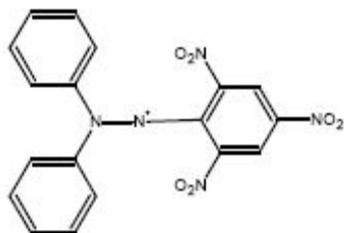
alterações na cor. Como não há uma reação competitiva e nem um radical oxigenado nesses testes, questiona-se como o resultado do teste se relaciona com a capacidade antioxidante de uma amostra. Entretanto, muito embora a capacidade redutora não seja diretamente relacionada à capacidade seqüestradora de radicais, é um importante parâmetro dos antioxidantes. Assim, para estabelecer essa correlação assume-se que a capacidade antioxidante é igual à capacidade redutora (HUANG *et al.*, 2005).

São exemplos de testes baseados no modelo ET: TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”), FRAP (“Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter”), DPPH (“Diphenyl-1-picrylhydrazyl”), Teste de Fenóis Totais pelo Reagente Folin Ciocalteau (FC), CUPRAC (“Cupric Reducing Antioxidant Capacity”), Poder Redutor (Método Original do Ferricianeto/Azul da Prússia), Capacidade Antioxidante (Teste do Fosfomolibdênio). A **Figura 7** mostra alguns dos cromóforos usados nesses testes (HUANG *et al.*, 2005; BERKER *et al.*, 2007; PRIETO *et al.*, 1999).

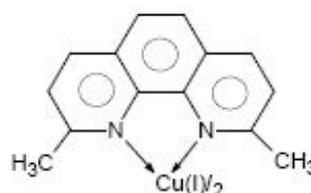
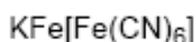
Alguns trabalhos têm apontado a falta de padronização dos testes antioxidantes *in vitro*, o que torna difícil a comparação entre os resultados relatados por diferentes grupos de pesquisadores (HUANG *et al.*, 2005; PRIOR *et al.*, 2001; FRANKEL *et al.*, 2000). Além disso, muitos métodos *in vitro* produzem resultados inconsistentes, com aplicação e interpretação inapropriada dos testes e especificação imprópria da capacidade antioxidante. A abertura de uma discussão sobre os prós e os contras de vários testes de capacidade antioxidante é necessária de modo que a validade dos métodos possa ser identificada. Assim será possível a evolução para um método geral e amplamente aplicável nas pesquisas de compostos antioxidantes.



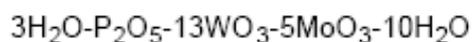
Cátion radical ABTS



Radical DPPH

CUPRAC: Bis(neocuproina)cobre(I)  
cátion quelado.

Método do Ferricianeto: Azul  
da Prússia



Folin: Reagente heteropoliânion  
molibdofosfotungstato, no qual Mo(VI) é  
reduzido a Mo(V) com um elétron doado por um  
antioxidante.

**Figura 7: Alguns dos cromóforos usados nos testes de capacidade antioxidante baseados no modelo ET (APAK et al., 2007).**

A atividade antioxidante e o nível de atividade obtido podem ser confirmados pela utilização de mais de um teste de atividade antioxidante *in vitro*. Assim, no presente trabalho optou-se por utilizar 4 testes, sendo todos baseados no modelo de transferência de um único elétron (ET). Os testes foram: TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity); DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), também chamado de Sequestrador de Radicais Livres; Capacidade Antioxidante (Teste do Fosfomolibdênio); Poder Redutor (Método Original do Ferricianeto/Azul da Prússia).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Isolar os metabólitos especiais majoritários de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav. e avaliar a potencial atividade antioxidante, *in vitro*, relacionada ao seu uso tradicional.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obtenção de extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*;
- Pré-purificação do extrato etanólico bruto por partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes;
- Avaliação da atividade antioxidante, por modelos *in vitro*, no extrato e frações;
- Isolamento dos metabólitos especiais majoritários da fração com melhor atividade antioxidante;
- Elucidação da estrutura química das substâncias isoladas utilizando métodos espectrométricos (UV, IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e EM);
- Avaliação da atividade antioxidante da(s) substância(s) isolada(s).

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipamentos

- Agitador com plataforma, New Brunswick Scientific, Modelo Innova 2100.
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB204.
- Balança semi-analítica, Núcleo.
- Banho-maria , Fanem, modelo 100.
- Centrífuga refrigerada Hermle, modelo Z 323 K.
- Cromatógrafo com sistema contracorrente de alta velocidade (HSCCC), modelo MKII CCC (P.C. Inc., Potomac, MD, USA) com movimento planetário centrífugo e bobina em várias camadas de PTFE. Injetor manual com “loop” de 5 mL e bomba de fluxo contínuo Dynamax modelo SD-200 (Rainin, Woburn, MA, USA).
- Cromatógrafo com sistema para cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, em escala preparativa, bombas modelo LC-8A, detector UV-VIS, modelo SPD-6A e integrador CR-4A.
- Cromatógrafo com sistema para cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica Waters modelo 2695, constituído de bomba quaternária; injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD), modelo 2996. O software Empower (Waters) foi utilizado para o processamento dos dados.
- Espectrofotômetro Perkin Elmer, UV-VIS, modelo Lambda 20.
- Espectrômetro de RMN de alta resolução Bruker, modelo AVANCE DRX 400.
- Espectrômetro de infravermelho médio (FT-IR) PerkinElmer, modelo Spectrum One.
- Estufa ventilada para secagem de material vegetal, Fanem, modelo 315 SE.
- Estufa para esterilização, Icamo, Modelo 3.
- Evaporador rotatório, Büchi, modelo B 480.
- Medidor de pH, Marconi, modelo PA200.
- Microcentrífuga, Cientec, modelo 14000 D.
- Micropipetas, volume ajustável de 10 - 100 µL e 100 – 1000 µL, Labmate.

- Moinho de facas, Marconi, modelo MA 680.
- Sistema de filtração de água Millipore, Milli-Q Plus.
- Soprador serigráfico, Sternel, modelo HL 500.
- Ultra-som, Thornton, modelo T14 e VWR, modelo 50HT.

## 4.2 Material de consumo

### 4.2.1 Reagentes

- Ácido acético glacial P.A., Merck.
- Ácido L-ascórbico , P.A., Synth.
- Ácido clorídrico, P.A., Quimex.
- Ácido difenilbórico 2-aminoetil éster, Sigma.
- Ácido fosfomolibdico, Vetec.
- Ácido fosfórico, Merck.
- Ácido sulfúrico P.A., Merck.
- Ácido tricloroacético (TCA), Synth.
- Anisaldeído, Merck.
- Carbonato de sódio anidro, Merck.
- (+)-Catequina hidratada, Sigma
- Cloreto de alumínio hexa-hidratado P.A., Synth.
- Cloreto férrico, Vetec.
- Coluna para CLAE LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), Merck.
- Coluna preparativa para CLAE, Agilent prep. - C18, 212 x 250 mm, 10 µm.
- Coluna semi-preparativa para CLAE Zobrax® SB-C18 (5 µm), 94 x 250 mm, Agilent.
- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), Fluka.
- Ferricianeto de potássio P.A., Reagen.
- Fosfato de potássio monobásico, Synth.
- Fosfato de sódio monobásico, Synth.

- Hidróxido de sódio P.A., Quimex.
- Metenamina, Merck.
- Molibdato de amônio, Synth.
- Pirogalol, Merck.
- Pó de pele, Sigma Aldrich.
- Polietilenoglicol 4000, Merck.
- Quercetina diidratada, Sigma-Aldrich.
- Rutina, Max Pharma e Sigma-Aldrich.
- Sulfato cérico tetra-hidratado P.A., Vetec.
- Tungstato de sódio di-hidratado, Sigma-Aldrich.
- Vanilina, Riedel.

#### **4.2.2 Solventes**

- Acetato de etila P.A., Quimex.
- Acetona P.A., Quimex.
- Acetonitrila, grau CLAE, Merck.
- Álcool etílico 96° GL, Quimex.
- n-Butanol P.A., Quimex.
- Diclorometano P.A., Quimex.
- DMSO-d6; CIL – Cambridge Isotope Laboratories.
- Hexano, Quimex.
- Metanol P.A., Quimex.
- Metanol, grau CLAE, Merck.

#### **4.2.3 Materiais e Vidrarias**

- Bastão de vidro;
- Béqueres de 10, 50, 100, 500, 1000 mL;
- Cápsulas de porcelana, 190, 150, 5 – 140, 5 – 65, 5 – 50, Chiarotti.

- Colunas cromatográficas de vidro.
- Cromatoplasmas de alumínio com 0,2 mm de espessura da Merck contendo gel de sílica 60 F<sub>254</sub>.
- Cromatoplasmas de vidro 10 x 5; 10 x 10 cm.
- Cubas de vidro Pirex.
- Espátulas de metal;
- Frascos Eppendorf Netheler e Hinz.
- Funis de separação de 250 mL e 2000 mL;
- Papel alumínio comercial.
- Pipetas de Pasteur de vidro, VWR.
- Pipetas graduadas de vidro de 1, 5, 10, 20 mL, Normax e Pirex.
- Pipetas volumétricas de 10 e 20 mL, Vidrolabor.
- Ponteiras, 20 – 200 µL, Corning.
- Ponteiras, universal, VWR.
- Sephadex® lipofílico (LH20), malha 25 – 100 µm, Sigma-Aldrich.
- Seringa de vidro de 5 mL e agulha.
- Sílica gel 60 G para cromatografia em camada delgada, Merck.
- Sílica gel 60 (0,040 – 0,063 mm) para coluna cromatográfica, Merck.
- Sílica gel 60, (0,063 – 0,200 mm) para coluna cromatográfica, Merck.
- Frascos de vidro (*vials*) com tampas e septos de silicone e politetrafluoretileno, Merck.

### 4.3 Reveladores para cromatografia em camada delgada (CCD)

*Anisaldeído* (Wagner *et al.*, 1984)

Misturar 0,5 mL de anisaldeído com 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico 98 % v/v, nesta ordem, sob resfriamento.

Armazenar a solução sob refrigeração (2-8°C).

*NP/PEG* (Wagner *et al.*, 1984)

Dissolver 0,1 g de ácido difenilbórico 2-aminoetil éster (NP) em 10 mL de metanol. Armazenar sob refrigeração (2-8°C).

Preparar solução de polietilenoglicol pela dissolução de 0,5 g de polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) em 10 mL de etanol e armazenar em temperatura ambiente.

Para a revelação, borrifar a placa com NP e, em seguida, com PEG.

*Sulfato cérico* (Wagner *et al.*, 1984)

Pesar 0,1 g de sulfato cérico. Adicionar 2,75 mL de ácido sulfúrico concentrado. Completar o volume para 50 mL com água, sob resfriamento.

*Vanilina sulfúrica* (Wagner *et al.*, 1984)

Solução 1: 1% de vanilina em etanol.

Solução 2: 10% de ácido sulfúrico em etanol.

Misturar as soluções 1 e 2 na proporção de 1:1 no momento do uso.

#### **4.4 Coleta e identificação**

A coleta das folhas de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. foi realizada num remanescente de mata, no *campus* da Universidade Federal de Minas Gerais, em abril de 2007. O material vegetal foi identificado pelo Dr. Marcos Sobral e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número BHCB 122238.

#### **4.5 Preparo do material vegetal e extração**

Após coleta, as folhas de *Campomanesia lineatifolia* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar e temperatura de 40°C, por 72 horas. As folhas secas foram então trituradas em moinho de facas, obtendo-se 959 g de pó das folhas. Posteriormente, 400 g desse material vegetal foi extraído por percolação

com etanol 96° GL e concentrado até resíduo em evaporador rotatório com temperatura máxima de 50° C. O extrato etanólico obtido foi transferido para uma cápsula de porcelana previamente pesada e tarada, que foi mantida em dessecador, sob vácuo, até completa eliminação do solvente. Posteriormente, o extrato etanólico bruto (EB) foi pesado e obteve-se 94,4 g, o que correspondeu a um rendimento extrativo de 23,6 %.

#### **4.6 Pré-purificação do extrato etanólico bruto (EB)**

O extrato etanólico bruto (40 g), em suspensão com água (400 mL), foi submetido a partições sucessivas com hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol (**Figura 8**). Os volumes totais utilizados de cada solvente estão mostrados na **Tabela 1**.

As frações obtidas foram secas em evaporador rotatório, com temperatura máxima de 50° C. Posteriormente, essas frações foram transferidas para cápsulas de porcelana previamente taradas e deixadas em dessecador sob vácuo até completa evaporação dos solventes. As frações secas foram então pesadas. As massas obtidas e os rendimentos estão descritos na **Tabela 1**.

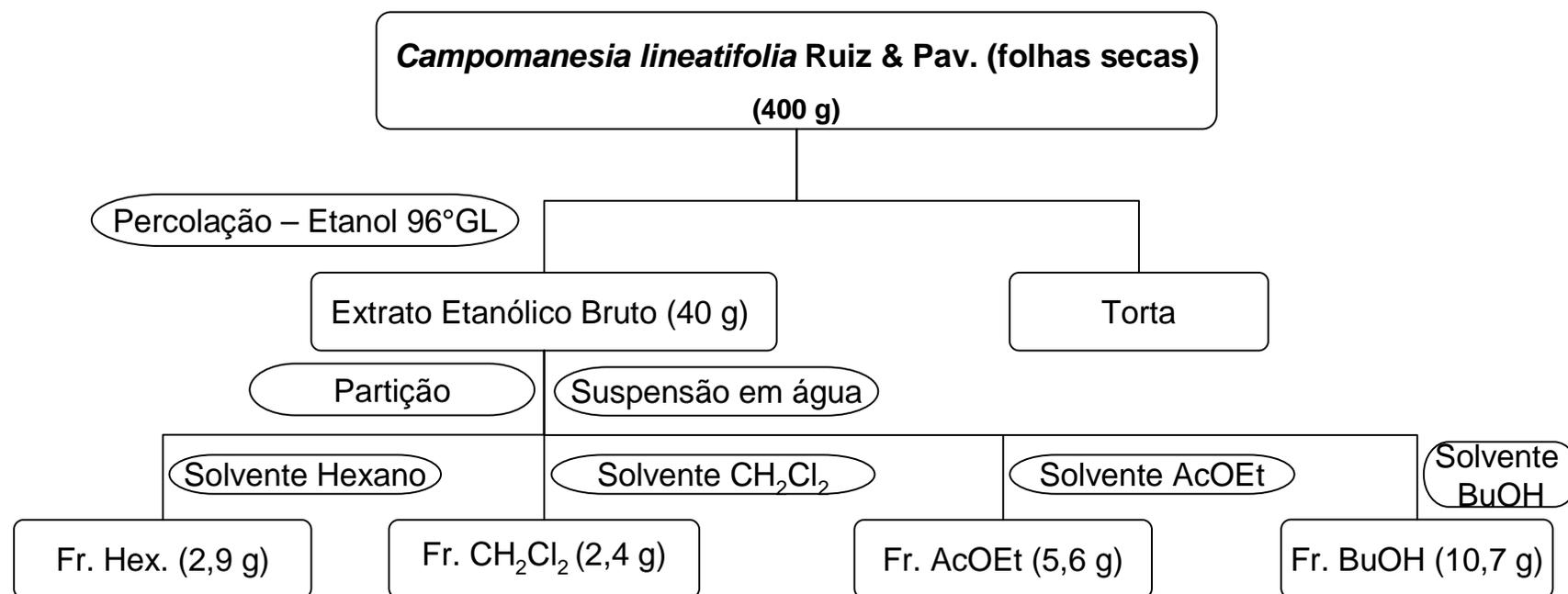


Figura 8: Fluxograma da obtenção do extrato etanólico bruto e das frações de *C. lineatifolia*, com as respectivas massas obtidas em cada etapa.

**Tabela 1: Massas (g) e rendimentos (%) das frações resultantes da partição do extrato etanólico de folhas de *C. lineatifolia*, bem como os volumes (L) de solventes imiscíveis utilizados.**

FRAÇÃO	VOLUME (L)	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
Fr. Hex.	1,9	2,9	7,2
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2,5	2,4	6,1
Fr. AcOEt	0,9	5,6	14,0
Fr. BuOH	0,6	10,7	26,7

**Legenda:** Hex.: hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: diclorometano, AcOEt: acetato de etila, BuOH: n-butanol.

#### 4.7 Perfil químico de *C. lineatifolia* obtido por cromatografia

Os perfis cromatográficos do extrato etanólico bruto e das frações de *C. lineatifolia* foram obtidos por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).

##### Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD)

Para a avaliação em CCD foram utilizados diversos eluentes. O volume de aplicação foi de 5-10 µL. Os cromatogramas foram revelados sob luz visível e ultravioleta à  $\lambda$  365 nm, antes e após a revelação com os diversos reveladores químicos descritos previamente: anisaldeído, NP/PEG, sulfato cérico e vanilina sulfúrica. As placas empregadas para as análises foram preparadas manualmente por espalhador ou usou-se cromatoplasmas do fabricante Merck, já descritas anteriormente.

##### Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

Para a avaliação em CLAE-FR foi utilizado cromatógrafo Waters com sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, modelo 2695. Os perfis cromatográficos exploratórios foram obtidos empregando-se coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), detecção no U.V. em  $\lambda$  210 nm, fluxo de 1 mL/min e temperatura de 40°C.

Empregou-se um sistema de eluição utilizando acetonitrila e água contendo 0,1% de ácido fosfórico (**Tabela 2**). Manteve-se um intervalo de 10 minutos após cada corrida do programa de eluição, para retorno às condições iniciais do gradiente, antes da injeção de nova amostra.

**Tabela 2: Sistema de eluição exploratório empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-FR do extrato etanólico bruto e das frações de *C. lineatifolia*.**

MATERIAL ANALISADO	TEMPO (min.)	ÁGUA/ÁCIDO (%)*	ACETONITRILA/ÁCIDO* (%)
EB; Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Fr. AcOEt, Fr. BuOH.	0	95	5
	60	60	40
	70	95	5
Fr. Hex.	0	95	5
	60	5	95
	70	95	5

\*ÁCIDO (%): corresponde à adição de 0,1% de ácido fosfórico aos solventes água e acetonitrila.

#### 4.8 Fracionamento da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Uma massa de 1,5 g da Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi cromatografada em coluna aberta de sílica gel (0,063-0,200 mm), na proporção 1:50 (Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:sílica). Utilizou-se como eluente misturas de hexano, acetato de etila e metanol em gradientes de polaridades crescentes (**Tabela 3**). Obtiveram-se 217 frações, as quais foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD, resultando em 30 grupos de frações (**Tabela 4**).

As frações obtidas foram sucessivamente recromatografadas utilizando-se coluna *flash* de sílica gel (cromatografia relâmpago) ou coluna aberta com sephadex LH-20. Os refractionamentos em coluna *flash* de sílica gel resultaram em frações contendo misturas complexas e em quantidades insuficientes para prosseguir.

**Tabela 3: Série eluotrópica usada na coluna de sílica gel para fracionamento da Fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> do extrato etanólico de *C. lineatifolia*.**

FRAÇÃO	ELUENTE	FRAÇÃO	ELUENTE
2 – 18*	Hex.: AcOEt (95:5)	174 – 182	Hex.: AcOEt (70:30)
19 – 31	Hex.: AcOEt (90:10)	183 – 190	AcOEt (100)
32 – 50	Hex.: AcOEt (85:15)	191 – 194	AcOEt : MeOH (95:5)
51 – 73	Hex.: AcOEt (80:10)	195 – 201	AcOEt : MeOH (85:15)
74 – 123	Hex.: AcOEt (70:30)	202 – 210	AcOEt : MeOH (70:30)
124 – 135	Hex.: AcOEt (65:35)	211 – 214	AcOEt : MeOH (50:50)
136 – 144	Hex.: AcOEt (60:40)	215 – 217	MeOH (100)
145 – 173	Hex.: AcOEt (95:5)	---	---

**Legenda:** Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol. \*A fração 1 foi eluída em hexano 100% e por isso não foi avaliada.

A fração Fr. 199-204 (416 mg) foi selecionada para ser refracionada porque a massa obtida foi em quantidade suficiente. O seu refracionamento foi feito em coluna aberta com sephadex LH-20 e resultou em 22 frações. Destas, 3 frações foram cromatografadas em aparelho cromatógrafo Shimadzu, escala semi-preparativa, coluna Zobrax® SB-C18 (5 µm), Agilent.

O processo de separação das 3 frações em escala semi-preparativa resultou na coleta de frações referentes a 3 picos que, após análise por CLAE-FR, revelaram a presença de substâncias possivelmente puras. As frações foram denominadas P1/Fr.16-21, P2/Fr.16-21 e P3/Fr.9-12 e as massas obtidas foram, respectivamente: 5,4 mg, 5,7 mg e 0,6 mg. Essas massas foram enviadas para análise espectroscópica (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), no Laboratório de RMN de Alta Resolução (LAREMAR), do Departamento de Química, ICEX, UFMG.

**Tabela 4: Grupos de frações reunidas resultantes da Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *C. lineatifolia* e respectivas massas obtidas (mg).**

FRAÇÃO	MASSA (mg)	FRAÇÃO	MASSA (mg)
2-12	9	136	7
13-17	46	137-139	4
18-40	22	140-145	8
41-50	24	146-154	8
51-55	20	155-167	7
56-68	34	168-173	7
69-70	6	174-182	23
71-74	6	183-185	7
75-80	9	186-195	13
81-94	86	196-198	7
95-105	12	199-204	416
106	3	205-208	150
107-114	11	209-211	102
115-130	13	212-215	80
131-135	5	216-217	60
MASSA TOTAL (mg)	1205	RECUPERAÇÃO (%)	80,3

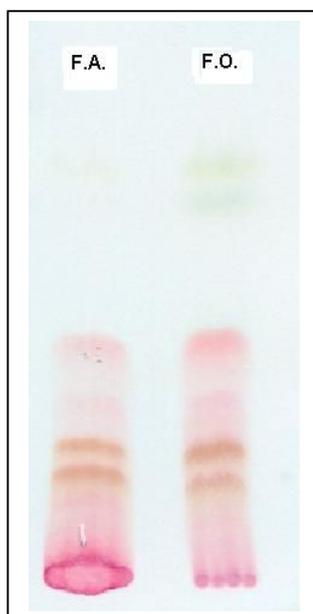
#### 4.9 Fracionamento da fração AcOEt

A Fr. AcOEt obtida do extrato etanólico bruto de *C. lineatifolia* foi cromatografada, utilizando-se a técnica de cromatografia contracorrente centrífuga de partição (CPC) do tipo em espiral (High-Speed Countercurrent Chromatography – HSCCC). Trabalhou-se com o modo de eluição isocrático e sistema de solvente bifásico, o qual foi obtido da mistura Hex: AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O, na proporção 0,6: 4,0: 0,7: 1,0 (LEITÃO *et al.*, 2005). A fase orgânica superior desse sistema foi usada como fase móvel e a fase aquosa inferior foi usada como fase estacionária.

A eficiência de separação do sistema de solvente foi testada da seguinte forma: pesou-se 1-2 mg da Fr. AcOEt, que foi transferida para um béquer contendo 1,2 mL de uma mistura 1:1 das fases orgânica e aquosa do sistema de solventes.

Em seguida agitou-se vigorosamente com auxílio de um bastão de vidro. Após a separação, foi aplicado 10  $\mu$ L de cada uma das fases em placa cromatográfica. Utilizou-se a fase orgânica como fase móvel para a eluição.

O sistema apresentou coeficiente de distribuição adequado, com K próximo de 1 para as substâncias de interesse e separação adequada entre as bandas (MARSTON, HOSTETTMANN, 1994). A **Figura 9** mostra o perfil em CCD das bandas encontradas para as fases orgânica e aquosa. As substâncias de interesse correspondem às 4 bandas inferiores (duas de coloração amarronzada e duas de coloração rósea), que se espera serem substâncias fenólicas.



**Figura 9:** Perfil cromatográfico em CCD da Fr. AcOEt após partição no sistema de solvente. À esquerda observa-se o perfil das bandas da fração em fase aquosa (F.A.) e à direita o perfil da fração em fase orgânica (F.O.). Revelador: Vanilina sulfúrica. Eluente: Fase orgânica superior.

#### **4.9.1 Preparo do sistema de solvente**

Os solventes hexano, acetato de etila, metanol e água foram medidos separadamente em provetas de volume adequado, de acordo com a proporção citada no item 4.9, para um volume total de 2000 mL. Em seguida foram vertidos em um funil de separação de capacidade adequada, o qual foi agitado vigorosamente.

O sistema de solvente assim preparado foi deixado em repouso por cerca de 12 horas para ocorrer saturação entre as fases formadas (orgânica e aquosa) e o conseqüente equilíbrio do sistema. Imediatamente antes da introdução do sistema de solvente na coluna do aparelho contracorrente, ambas as fases – orgânica e aquosa – foram desaeradas sob vácuo em ultra-som por 20 min.

O volume de 2000 mL do sistema de solvente é suficiente para a realização de uma análise nas condições descritas no item 4.9.3.

#### **4.9.2 Preparo da amostra**

Após ser pesada (de 250 a 350 mg), a amostra foi transferida para um béquer contendo 5 mL de uma mistura 1:1 das fases orgânica e aquosa. Em seguida a amostra foi vigorosamente agitada com auxílio de um bastão de vidro e então transferida para tubos “ependorf” de 2 mL, sendo centrifugada a 10.000 rpm por 10 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para uma seringa de vidro e injetado no “loop” de injeção do CCC. A coleta das frações iniciou-se 5 min após a injeção.

### **4.9.3 Condições cromatográficas**

- Sentido de rotação: anti-horário (FWD – *forward*);
- Direção: cauda → cabeça;
- Rotação: 850 rpm;
- Fluxo: 2 mL/min;
- Volume de injeção: 5 mL;
- Volume da coluna: 330 mL;
- Sangria média: 18,5%.

### **4.9.4 Injeção da amostra**

A fase estacionária (fase aquosa) foi bombeada para o interior da coluna até o seu total preenchimento. Em seguida foi iniciada a rotação de 850 rpm para que a fase móvel (fase orgânica) fosse bombeada para o interior da coluna, a um fluxo de 2 mL/min. A retenção média da fase estacionária foi de 81,5%. A Fr. AcOEt já preparada (item 4.9.2) foi então injetada através de uma válvula de injeção para o interior da coluna. As frações foram recolhidas manualmente com volumes que variaram de 2 a 5 mL. A fase estacionária foi totalmente recolhida em um único frasco, já com a rotação desligada, e não foi utilizada.

### **4.9.5 Fracionamentos realizados**

Foram realizados 6 fracionamentos da Fr. AcOEt, denominados CCC1, CCC2, CCC3, CCC4, CCC5 e CCC6. As quantidades de amostra injetadas em cada fracionamento foram: 250 mg para CCC1, 300 mg para CCC2 e 350 mg para as demais. As frações foram coletadas manualmente conforme descrito na **Tabela 5**.

**Tabela 5: Fracionamentos em CCC realizados bem como as frações e volumes coletados em cada fracionamento.**

FRACIONAMENTO	FRAÇÕES	VOLUME/FRAÇÃO (mL)	OBS
CCC1	1-63	5,0	A
	1-10FE	5,0	B
CCC2	1-21	5,0	C
	22-35	5,0	A
	36-106	3,0	A
CCC3	1-24	5,0	C
	25-29	5,0	A
	30-109	3,0	A
CCC4	1-24	5,0	C
	25-95	5,0	A
CCC5	1-24	5,0	C
	25-109	3,0	A
CCC6	1-25	5,0	C
	26-30	5,0	A
	31-80	2,0	A
	81-100	5,0	A
	101-113	3,0	A
	114-129	5,0	A

**Legenda:** **A:** frações coletadas em frascos individuais, de acordo com o volume/fração; **B:** frações coletadas no mesmo frasco, sem rotação e com volume final correspondente ao somatório dos volumes/fração; **C:** mesmo de B, porém coletadas com rotação.

A Fase Estacionária (FE) de cada um dos fracionamentos foi coletada sem rotação em um único frasco, exceto 1-10FE de CCC1, que foi coletada sob rotação de 850 rpm

#### 4.10 Hidrólise da Substância G

Conforme posteriormente descrito, uma das substâncias purificadas no presente trabalho foi inicialmente denominada de substância G. Para a caracterização dessa substância, foi necessária a realização de sua hidrólise, análises em CCD e por espectroscopia no U.V. com reagentes de deslocamento, de acordo com as metodologias descritas a seguir.

##### Hidrólise e CCD

Em tubo de ensaio com tampa de rosca, 2 mg de G foram dissolvidos em 2 mL de HCl 2N, sendo tampado em seguida. A mistura foi então aquecida em banho-maria a 60°C por 60 min. Após o resfriamento, a mistura foi submetida à partição com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A fase aquosa foi concentrada em evaporador rotatório até resíduo, o qual foi posteriormente solubilizado em 100 µL de MeOH. Também foram preparadas soluções dos padrões glicose e ramnose (0,5 mg/300 µL de MeOH). Para a identificação dos açúcares a amostra foi aplicada em duas cromatoplas e em cada uma foi aplicado um dos padrões (glicose ou ramnose). Utilizou-se como eluente uma mistura de BuOH, piridina e água, na proporção 6: 4: 3. As cromatoplas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico.

##### Espectroscopia no U.V. com reagentes de deslocamento

###### *Preparo dos reagentes*

- Solução de AlCl<sub>3</sub>: 5 g do reagente em 100 mL de água purificada.
- Solução de HCl: 50 mL de HCl concentrado em 100 mL de água.
- Solução de MeONa: 2,5 g de sódio metálico em 100 mL de MeOH (adicionar cuidadosamente).
- AcONa: reagente anidro.
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: reagente anidro.

###### *Metodologia*

- As leituras no espectrofotômetro foram todas efetuadas no modo "Scan", com varredura nos comprimentos de onda de 220 a 400 nm.

- Preparou-se uma solução de G (0,5 mg/50 mL de MeOH) e procedeu-se à leitura em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.
- Na mesma cubeta adicionaram-se 3 gotas de solução de MeONa, a qual foi tampada e agitada, procedendo-se à leitura imediatamente após. Aguardou-se 5 min e procedeu-se novamente à leitura. A solução foi então descartada.
- Limpou-se a cubeta e novamente adicionou-se a solução metanólica de G e, em seguida, 6 gotas de solução de  $\text{AlCl}_3$ . A cubeta foi tampada e agitada, procedendo-se à leitura imediatamente após.
- Adicionaram-se então 3 gotas de solução de HCl. A cubeta foi tampada e agitada, procedendo-se à leitura imediatamente após. A solução foi descartada.
- Limpou-se a cubeta e novamente adicionou-se a solução metanólica de G. Excesso de AcONa foi adicionado. Agitou-se e depois se aguardou a decantação, deixando-se pelo menos 2 mm de camada de AcONa no fundo. Aguardou-se 2 min para se fazer a leitura. Nova leitura foi feita após 5 minutos e observou-se possível decomposição.

#### 4.11 Doseamento de taninos

O pó da planta, o extrato etanólico bruto (EB) e as frações Fr. AcOEt, Fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e Fr. BuOH foram submetidos ao doseamento de taninos. Utilizou-se metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> ed. (2002), na monografia do Barbatimão, com algumas adequações para o doseamento de taninos no extrato bruto e nas frações de *Campomanesia lineatifolia*.

##### Preparo do reagente Folin-Denis

Adicionar 10 g de tungstato de sódio, 2 g de ácido fosfomolibdico e 5 mL de ácido fosfórico em 75 mL de água.

Manter a mistura em refluxo por 2 horas, resfriar e diluir a 100 mL com água. A solução apresenta coloração esverdeada.

Preparo da solução de carbonato de sódio

Dissolver 10,6 g de carbonato de sódio em 100 mL de água.

Pó das folhas da planta

- *Solução-mãe (SM)*: Pesou-se 750 mg do pó das folhas da planta, em triplicata, e transferiu-se para balão de 250 mL. Adicionou-se 150 mL de água e aqueceu-se em banho-maria, sob refluxo, por 30 minutos, a temperatura de 80°C - 90°C. Depois, transferiu-se a mistura para um balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água. Filtrou-se, desprezando-se os primeiros 50 mL do filtrado. O restante constituiu a solução-mãe (SM).
- *Doseamento dos polifenóis totais*: 5 mL da SM foram diluídos para 25 mL em balão volumétrico, com água. A seguir, 5 mL da solução diluída foi acrescida de 2 mL de reagente de Folin-Denis e diluída para 50 mL com solução de carbonato de sódio, em balão volumétrico.
- *Doseamento dos polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele*: a 20 mL da SM adicionou-se 0,2 g de pó de pele. A mistura foi agitada em agitador mecânico com plataforma por 60 minutos. Posteriormente, filtrou-se e diluiu-se 5 mL da mistura para 25 mL com água, em balão volumétrico. A seguir, a 5 mL da solução diluída acrescentou-se 2 mL de Reagente de Folin-Denis, procedendo-se exatamente como descrito anteriormente para doseamento de polifenóis totais.

Extrato etanólico bruto (EB) e frações AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e BuOH

- *Solução-mãe (SM)*: pesaram-se 18,7 mg da Fr. BuOH e 37,5 mg de EB, Fr.AcOEt e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, em triplicata, e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água. Filtrou-se. O filtrado obtido foi nomeado de solução-mãe (SM).
- Procedeu-se então ao doseamento dos polifenóis totais e dos polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele, exatamente como descrito anteriormente para o pó das folhas da planta.

Branco

Utilizou-se água como branco.

### Curva analítica

Dissolveram-se 50 mg de pirogalol para 100 mL, em balão volumétrico, com água. Diluíram-se alíquotas desta solução (0,625 mL, 1,25 mL, 2,5 mL, 5 mL e 7,5 mL) para 100 mL com água. Cada diluição foi feita em triplicata. Em balão volumétrico de 50 mL adicionaram-se 5 mL da diluição, acrescentaram-se 2 mL de reagente de Folin-Denis, procedendo-se exatamente como descrito anteriormente para doseamento de polifenóis totais.

### Leituras de absorvância

A absorção das soluções (polifenóis totais, polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele e curva analítica) foi determinada após exatamente 3 minutos da adição da solução de carbonato de sódio, no comprimento de onda de 715 nm, contra o branco.

### Cálculos

Os teores de polifenóis foram calculados utilizando-se a equação da curva analítica obtida para o pirogalol e os resultados foram expressos em g de pirogalol / 100 g de amostra (% p/p).

Os taninos totais correspondem a:

$$\text{Taninos Totais} = \text{Polifenóis Totais} - \text{Polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele}$$

## **4.12 Doseamento de flavonóides**

O pó das folhas da planta, o extrato etanólico bruto (EB) e as frações AcOEt e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram submetidos ao doseamento de flavonóides. Utilizou-se metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> ed. (2001), na monografia da Calêndula, com algumas adequações.

### Pó das folhas da planta

- *Solução-mãe (SM)*: pesou-se 400 mg do material vegetal, em triplicata, e transferiu-se para balão de fundo redondo de 100 mL. Adicionou-se 1 mL de solução de metenamina (0,5 g/100 mL de água), 20 mL de acetona e 7 mL de solução de

HCl a 25% (p/v). Deixou-se em ebulição, sob refluxo, por 30 minutos. Depois, filtrou-se através de pequena quantidade de algodão para um balão volumétrico de 100 mL. O algodão e o material vegetal foram colocados novamente no balão de fundo redondo de 100 mL e extraídos sob refluxo com 20 mL de acetona por 10 minutos, por mais duas vezes. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente. Filtrou-se em papel de filtro para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com acetona, lavando-se o frasco e o papel de filtro. Deste extrato foram transferidos 20 mL para funil de separação e adicionados 20 mL de água. A solução foi, então, extraída uma vez com 15 mL e três vezes com 10 mL de acetato de etila. As fases em acetato de etila foram reunidas e lavadas duas vezes com 50 mL de água. A fase acetato de etila resultante foi então filtrada através de papel de filtro no qual foi adicionado, imediatamente antes da filtração, 10 g de sulfato de sódio anidro para adsorver resíduos de água. O filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetato de etila. A solução resultante constituiu a solução-mãe (SM).

- *Solução de Análise:* transferiu-se 10,0 mL da SM para um balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado (2 g/100 mL de solução metanólica de ácido acético glacial 5% v/v). Completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético glacial 5% v/v.

#### Extrato etanólico bruto (EB) e frações AcOEt e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

- *Solução-mãe (SM):* Pesou-se 95 mg de EB, 47,5 mg de Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 23,7 mg de Fr. AcOEt, em triplicata, e transferiu-se para balão de fundo redondo de 100 mL. Prosseguiu-se então como descrito acima para o pó da planta.
- *Solução de Análise:* procedeu-se como descrito acima para o pó da planta.

A quantidade de EB pesada (95 mg) corresponde a 23,6% da quantidade usada do pó da planta (400 mg). O valor de 23,6% refere-se ao rendimento obtido de EB após a percolação do pó da planta. Com isso, foi possível trabalhar com quantidades proporcionais de extrato e pó da planta. Da mesma forma, a proporcionalidade foi mantida para as massas pesadas das frações, tendo-se utilizado 50% da massa de EB para a Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (47,5 mg) e 25% para a Fr. AcOEt (23,7 mg).

### Branco

Transferiu-se uma alíquota de 10,0 mL da SM para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético glacial 5 % v/v.

### Curva Analítica

Dissolveu-se 10 mg de quercetina para 100 mL, em balão volumétrico, com solução metanólica de ácido acético glacial 5 % v/v, obtendo-se a solução-mãe (SM) em concentração de 100 µg/mL. Procedeu-se então à diluição descrita na **Tabela 6**, em triplicata. Posteriormente, retirou-se 10 mL de cada diluição, procedendo-se como descrito para o preparo da solução de análise.

### Leituras de Absorbância

A absorção das soluções de análise (problema e curva analítica) foi determinada após 30 minutos, no comprimento de onda de 425 nm, contra o branco.

### Cálculos

O teor de flavonóides foi calculado utilizando-se a equação da curva analítica obtida para a quercetina. Os resultados foram expressos em g de quercetina / 100 g de amostra (% p/p).

**Tabela 6:** Preparo das diluições da SM de quercetina para obtenção das concentrações de trabalho da curva analítica.

VOLUME DA SM (mL)	BALÃO VOLUMÉTRICO (mL)	CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO (µg/mL)
1	100	1
1	50	2
1	25	4
2	25	8
3	25	12

#### 4.13 Testes *in vitro* de atividade antioxidante

O extrato etanólico e as frações foram avaliadas quanto à sua atividade antioxidante. Para isso, foram utilizados os seguintes modelos de testes *in vitro*: Seqüestrador de Radicais Livres (DPPH), Poder Redutor, Capacidade Antioxidante e Ensaio de TEAC.

##### 4.13.1 Sequestrador de radicais livres (DPPH)

###### Construção da Curva Analítica

Primeiramente foram preparados 50 mL de uma solução em etanol de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) na concentração de 100 µg/mL (solução-mãe). Foram feitas diluições em triplicata da solução-mãe para as concentrações de trabalho de 40, 30, 20, 10, 5, 1 µg/mL. A curva analítica foi construída a partir dos valores de absorbância a  $\lambda$  515 nm de todas as soluções, medidas em cubeta de quartzo com percurso óptico de 1 cm e tendo como branco o etanol. Iniciaram-se as leituras de absorbância logo após o preparo das diluições.

###### Teste de DPPH em 30 minutos

Uma solução de DPPH a 0,3 mM (34,3 µg/mL) em etanol e soluções etanólicas do extrato bruto (EB), das frações (Fr. Hex., Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Fr. AcOEt, Fr. BuOH) e das substâncias isoladas foram preparadas conforme as concentrações descritas na **Tabela 7**. O teste foi realizado em triplicata e o controle positivo foi a quercetina. Para a realização da leitura adicionou-se uma alíquota de 1,0 mL da solução de DPPH a 2,5 mL da solução da amostra. A absorbância foi lida a  $\lambda$  515 nm após 30 minutos da adição da solução de DPPH, nas mesmas condições da curva analítica. A capacidade de reduzir o radical DPPH (% de Atividade Antioxidante) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \left( \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \times 100, \text{ onde:}$$

$A_{\text{Controle}}$  é a absorbância da solução de DPPH sem a amostra;

$A_{\text{Amostra}}$  é a absorbância da amostra com o DPPH.

Com os percentuais da atividade antioxidante (%AAO) das amostras foi construído o gráfico da %AAO *versus* concentração para cada amostra (SIES, 1993; LEE *et al.*, 1998).

A quantidade de antioxidante necessária para provocar a diminuição da concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), também chamada de concentração inibitória a 50% ( $CI_{50}$ ). Para se obter a  $CE_{50}$  os percentuais de DPPH remanescente (% DPPH<sub>REM</sub>) no meio reacional foram calculados conforme a equação:

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}]_{T=t}}{[\text{DPPH}]_{T=0}} \times 100, \text{ onde:}$$

$[\text{DPPH}]_{T=t}$  é a concentração de DPPH no meio após a reação com a amostra;

$[\text{DPPH}]_{T=0}$  é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 34,3 µg/mL.

Os valores da concentração de DPPH no meio após a reação com a amostra ( $[\text{DPPH}]_{T=t}$ ) foram calculados substituindo-se os valores das leituras obtidas para absorbância (A) na equação da curva analítica. Para possibilitar a utilização da equação da curva analítica, trabalhou-se com as concentrações de amostras na faixa linear dos gráficos de % DPPH<sub>REM</sub> *versus* concentração da amostra (µg/mL).

**Tabela 7: Concentrações (µg/mL) empregadas no teste do DPPH para EB e frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis de *C. lineatifolia*, substâncias F e G, além do controle positivo quercetina.**

AMOSTRA	Concentrações (µg/mL)
EB	1; 2,5; 10; 15
Fr. BuOH	1; 2,5; 7,5; 10
Fr. AcOEt	1; 2,5; 5; 10
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1; 5; 10; 25
Fr. Hex.	5; 10; 25; 50
substância F	2,5; 5; 10; 15
substância G	1; 2,5; 5; 10
quercetina	1; 2,5; 5; 7,5

### Comportamento cinético frente ao DPPH

O comportamento cinético do extrato etanólico bruto (EB), das frações Fr. AcOEt e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, bem como do controle positivo quercetina frente ao DPPH foram avaliados. Para isso foram preparadas soluções etanólicas, em triplicata, de cada uma das amostras na concentração de 10 µg/mL. A absorbância foi lida a  $\lambda$  515 nm nas mesmas condições da curva analítica. As leituras foram feitas nos tempos 0,1; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 90 minutos após a adição da solução de DPPH.

Os percentuais de DPPH remanescente (% DPPH<sub>REM</sub>) no meio reacional foram calculados conforme a equação já descrita anteriormente e construíram-se os gráficos da % DPPH<sub>REM</sub> versus a concentração das amostras. O perfil de cada amostra no gráfico indicou o comportamento cinético das mesmas.

### 4.13.2 Poder redutor

Utilizou-se a metodologia descrita por Oyaizu (1986). A partir do extrato etanólico bruto (EB) e frações (Fr. Hex., Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Fr. AcOEt, Fr. BuOH) das folhas de *C. lineatifolia* foram preparadas soluções em etanol com diferentes concentrações, em triplicata. Prepararam-se também, em triplicata, soluções dos controles positivos (quercetina, rutina, BHT). As concentrações empregadas estão mostradas na **Tabela 8**. Posteriormente, a 1,0 mL das diferentes soluções foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6), e as soluções resultantes foram incubadas com 2,5 mL de solução aquosa de ferricianeto de potássio (1% p/v) a 50° C, por 20 minutos. Uma alíquota de 2,5 mL de ácido tricloracético a 10% (p/v) foi adicionada a essa mistura, que foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 2,5 mL, à qual foram adicionados 2,5 mL de água e 0,5 mL de solução de cloreto férrico (0,1% p/v). A absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de  $\lambda$  700 nm, em cubeta de quartzo com 2 cm de caminho óptico, após 15 minutos da adição do cloreto férrico. O branco foi preparado utilizando-se etanol no lugar da amostra.

**Tabela 8: Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) empregadas no teste do Poder Redutor para EB e frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis de *C. lineatifolia*, além dos controles positivos (rutina, quercetina e BHT).**

AMOSTRA	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )
EB, Fr. Hex., Fr. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Fr. AcOEt, Fr. BuOH	12,5; 25; 50; 75; 100
Rutina, BHT	50, 100, 150, 200, 250
Quercetina	50, 75, 100, 125, 150

A curva analítica foi construída com soluções em etanol de ácido ascórbico nas concentrações de 1, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$ .

A partir da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtida utilizando-se a equação da curva analítica, calculou-se a concentração equivalente de ácido ascórbico para a amostra, em mmol de ácido ascórbico/mg de amostra. Para a realização desse cálculo, considerou-se a massa molecular do ácido ascórbico,  $\text{MM} = 176,13 \text{ g/mol}$  ou  $0,17613 \text{ mg/mmol}$ .

Uma maior absorvância da mistura de reação indica maior poder redutor da amostra. Os resultados foram expressos pela construção de um gráfico de absorvância *versus* concentração, além de um gráfico de equivalentes de ácido ascórbico mmol/mg de EB ou frações.

#### **4.13.3 Capacidade antioxidante**

A capacidade antioxidante foi avaliada pela formação do complexo de fosfomolibdênio conforme método padronizado por PRIETO *et al.* (1999). A partir do extrato etanólico bruto (EB), frações (Fr. Hex., Fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Fr. AcOEt, Fr. BuOH) e substâncias isoladas das folhas de *C. lineatifolia* foram preparadas soluções em etanol com diferentes concentrações, em triplicata. Prepararam-se também, em triplicata, soluções dos controles positivos (quercetina, rutina, BHT). As concentrações empregadas estão mostradas na **Tabela 9**.

**Tabela 9: Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) empregadas no teste da Capacidade Antioxidante para EB, frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis e substâncias isoladas das folhas de *C. lineatifolia*, além dos controles positivos (rutina, quercetina e BHT).**

AMOSTRA	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )
EB, frações e controles positivos	10, 30, 50, 70, 90, 110
Substância F e Substância G	10, 15, 25, 50, 70, 90

Uma alíquota de 0,3 mL da solução contendo a amostra foi adicionada a 2,7 mL da solução reagente (0,6 M ácido sulfúrico, 28 mM fosfato de sódio e 4 mM molibdato de amônio). A mistura foi incubada a  $95^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos e, após resfriamento, a leitura da absorbância foi realizada em  $\lambda$  695 nm, em cubeta de quartzo com 2 cm de caminho óptico.

A curva analítica foi construída com soluções em etanol de ácido ascórbico nas concentrações de 1, 5, 15, 25, 50, 75  $\mu\text{g/mL}$ .

A partir da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtida utilizando-se a equação da curva analítica, calculou-se a concentração equivalente de ácido ascórbico para a amostra, em mmol de ácido ascórbico/mg de amostra. Para a realização desse cálculo, considerou-se a massa molecular do ácido ascórbico,  $MM = 176,13\text{ g/mol}$  ou  $0,17613\text{ mg/mmol}$ . A capacidade antioxidante total foi expressa como equivalentes de ácido ascórbico em mmol/mg de EB, frações ou substâncias isoladas.

#### **4.13.4 Ensaio de TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)**

Para a realização do ensaio se utiliza o cátion radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , que apresenta coloração azul-esverdeada forte e pode ser formado pela oxidação do sal diamônio do ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) com persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) (Re *et al.*, 1999).

A uma solução teste contendo o composto ou substância antioxidante é adicionada uma solução contendo o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Por sua vez, esse composto ou substância antioxidante promove a redução do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pré-formado pela doação de elétron ao radical (recebe  $\text{H}^{\bullet}$ ), o que causa a descoloração da solução e provoca a

diminuição na absorbância em  $\lambda$  734 nm. A intensidade dessa inibição é dependente da capacidade antioxidante, da concentração e do tempo de reação (Re *et al.*, 1999).

A extensão da descoloração é proporcional à capacidade antioxidante da amostra e pode ser expressa como porcentagem de inibição (% Inibição) do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>. O Trolox é um análogo hidrossolúvel da vitamina E e apresenta potente atividade antioxidante, sendo utilizado como padrão, nas mesmas condições da amostra, para a determinação da reatividade relativa. Assim, tem-se que a unidade de atividade do ensaio é TEAC, a qual pode ser obtida construindo-se um gráfico com os valores de % Inibição em função da concentração das amostras e do Trolox. O valor de TEAC corresponde à razão entre as inclinações dos gráficos da amostra e do Trolox, obtidos nas mesmas unidades de concentração.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_{\text{branco}} - A_{\text{teste}}}{A_{\text{branco}}} \times 100, \text{ onde:}$$

$A_{\text{branco}}$  é a absorbância em  $\lambda$  734 nm da solução de ABTS<sup>•+</sup>;

$A_{\text{teste}}$  é a absorbância em  $\lambda$  734 nm da solução de ABTS<sup>•+</sup> após 5 min. da adição de 30  $\mu$ L da solução da amostra em diferentes concentrações.

A atividade antioxidante da amostra também pode ser expressa em termos da contribuição total da atividade antioxidante numa faixa de tempo pelo cálculo da área sob a curva (AUC). Essa é derivada do gráfico obtido pela razão entre a % Inibição e a concentração da amostra ou Trolox em função do tempo de reação. A taxa entre a área sob a curva para a reação da amostra e aquela para o Trolox fornece a atividade antioxidante relativa ao Trolox levando-se em consideração o fator tempo (Re *et al.*, 1999).

No presente estudo, o cátion radical ABTS<sup>•+</sup> foi preparado a partir da mistura de uma solução do sal diamônio do ABTS a 7 mM com uma solução de persulfato de potássio (concentração final de 2,45 mM), ambas preparadas em tampão fosfato salino (pH 7,2). A solução resultante (solução estoque) foi mantida em frasco âmbar à temperatura ambiente por 12 -16 horas para a formação do ABTS<sup>•+</sup>.

A solução estoque de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída com tampão fosfato salino (pH 7,2) até o valor de absorbância de  $0,70 \pm 0,02$ , determinado em  $\lambda$  734 nm. A uma alíquota de 2970  $\mu$ L dessa solução foram adicionados 30  $\mu$ L da solução etanólica de EB ou frações (Fr. Hex., Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Fr. AcOEt, Fr. BuOH) de *C. lineatifolia* e dos

controles positivos (quercetina e rutina) nas concentrações de 50; 100; 125; 150; 200 e 250 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata e as leituras foram efetuadas 5 minutos após o início da reação, em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

A curva do padrão Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) foi preparada utilizando-se as concentrações de 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 e 0 mM as quais, para fins de cálculo do TEAC, foram convertidas para a unidade de µg/mL.

#### **4.13.5 Análise estatística**

Os testes de atividade antioxidante foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $M \pm DP$ ) ( $n = 3$ ). Utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 4.0, foram realizadas análises de variância pelo teste ANOVA, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey, onde foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Além desses, também foi usado o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) para análise correlacional de linearidade entre os testes de atividade antioxidante realizados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfis cromatográficos

Os perfis cromatográficos por CCD foram obtidos com reveladores químicos específicos para flavonóides (p. ex. NP/PEG). Foram observadas bandas amarelas e alaranjadas nas cromatoplasmas reveladas com NP/PEG, o que confirmou a presença de flavonóides nas folhas de *C. lineatifolia*.

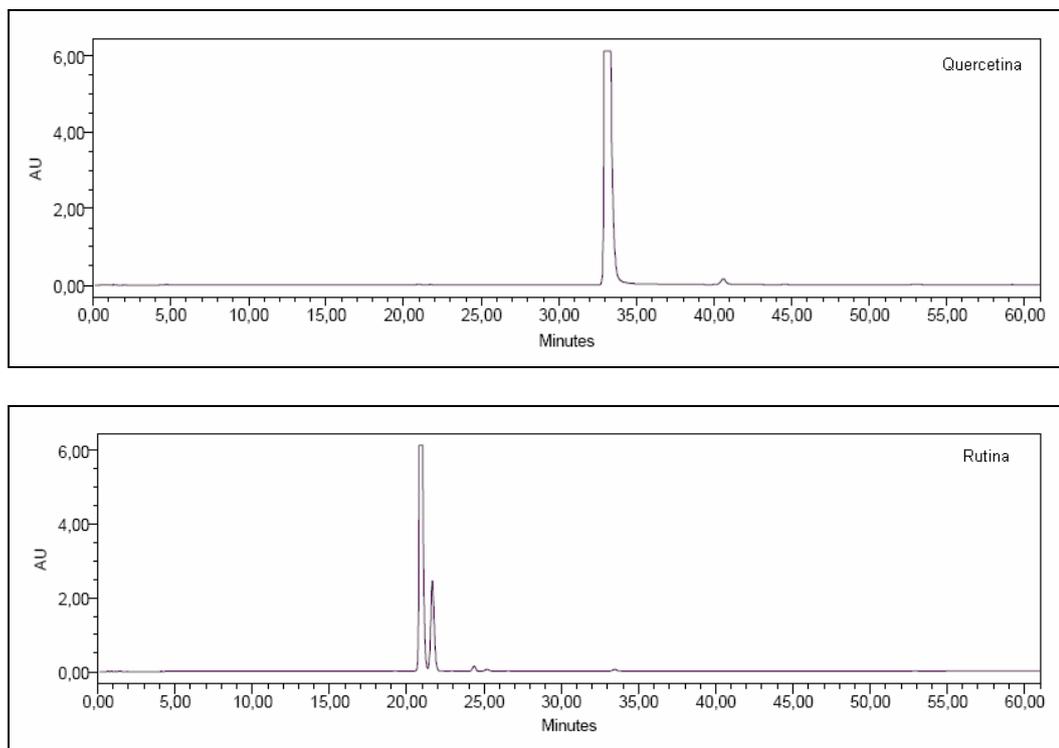
Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR dos controles positivos rutina e quercetina, bem como do extrato etanólico bruto e das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e BuOH encontram-se apresentados a seguir (**Figuras 10 e 11**).

#### 5.1.1 Análise dos perfis do extrato bruto e das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e BuOH

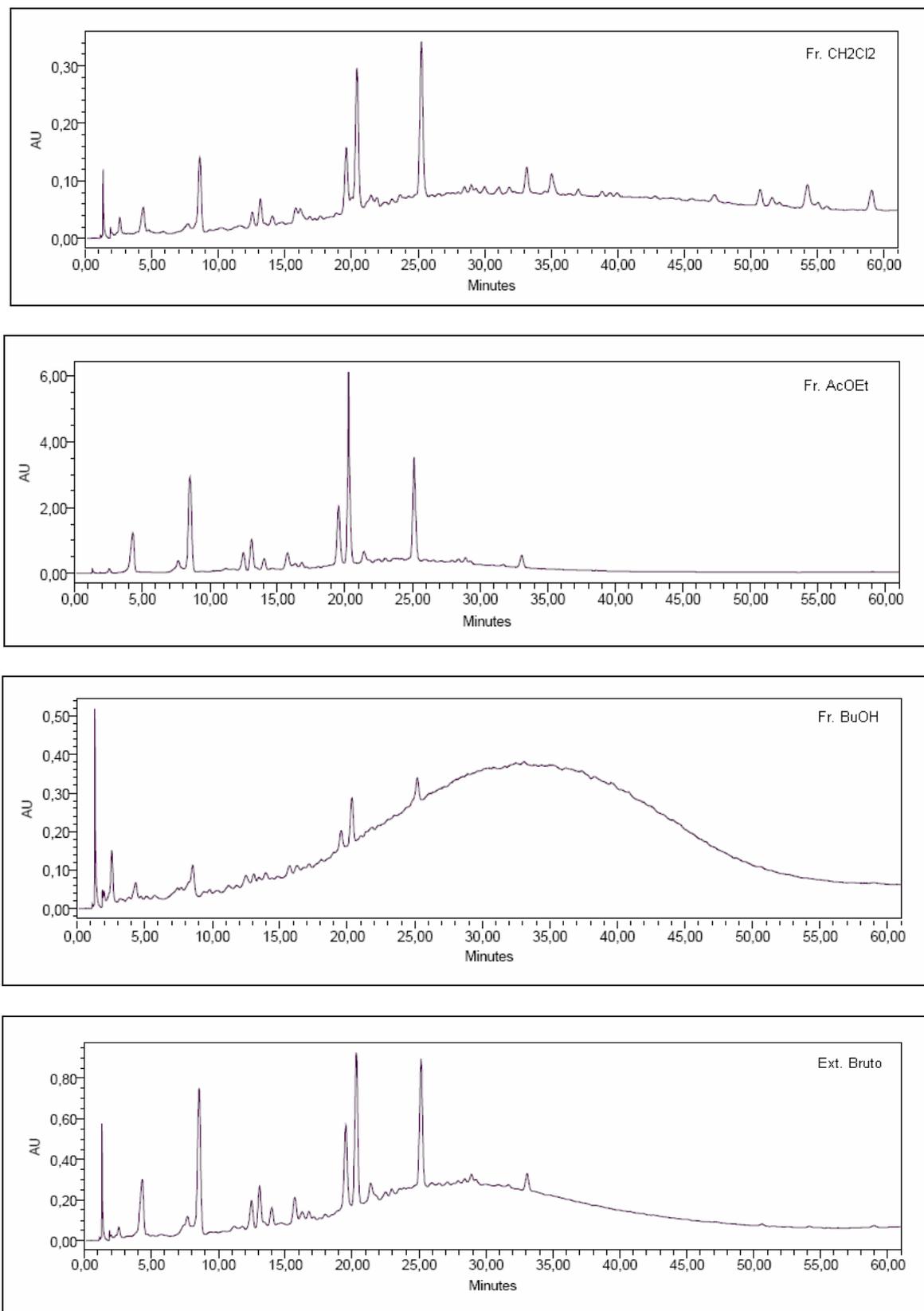
Analisando-se a **Figura 11** pode-se perceber a ocorrência de picos comuns entre os diversos cromatogramas de *C. lineatifolia*, identificando-se assim os seus marcadores químicos.

Quatro picos muito intensos estão presentes no cromatograma do extrato etanólico bruto (EB) e naqueles das frações Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Fr. AcOEt e Fr. BuOH. Os tempos de retenção destes picos foram: Tr = 8,5, Tr = 19,5, Tr = 20,3 e Tr = 25,1 min. Outro pico de menor intensidade, no tempo de retenção Tr = 33,1 min também é comum ao cromatograma do extrato e das frações citadas anteriormente. Os espectros no U.V. das substâncias referentes aos picos com os tempos de retenção (Tr) citados apresentaram padrão de bandas semelhante ao de flavonóides: presença de duas bandas, sendo a primeira entre  $\lambda$  250 e 280 nm e a segunda entre  $\lambda$  340 e 380 nm (**Figura 12**).

É importante ressaltar que os picos mais intensos foram registrados na mesma região dos picos dos controles positivos rutina e quercetina, Tr = 20,8 e Tr = 33,3 min (**Figura 10**), indicando novamente a possível presença de flavonóides.



**Figura 10: Cromatograma dos controles positivos quercetina e rutina em gradiente, conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44).  $\lambda$  210 nm.**



**Figura 11:** Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR para as frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, BuOH e de EB das folhas de *C. lineatifolia* em gradiente, conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44). λ 210 nm.

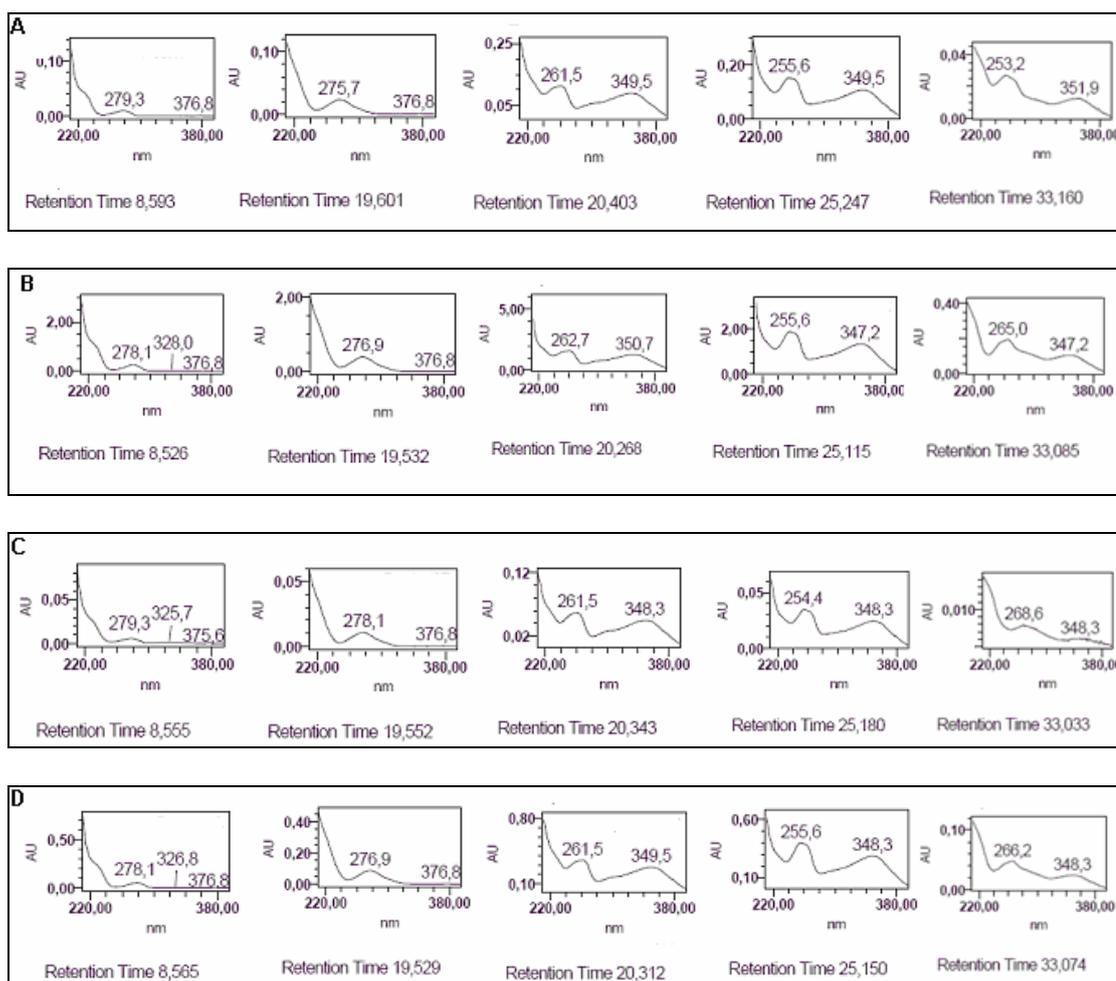


Figura 12: Espectros no U.V.obtidos “on line” para as frações A: Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: Fr. AcOEt, C: Fr. BuOH e D: EB; correspondentes aos picos predominantes obtidos nos cromatogramas em CLAE-FR.

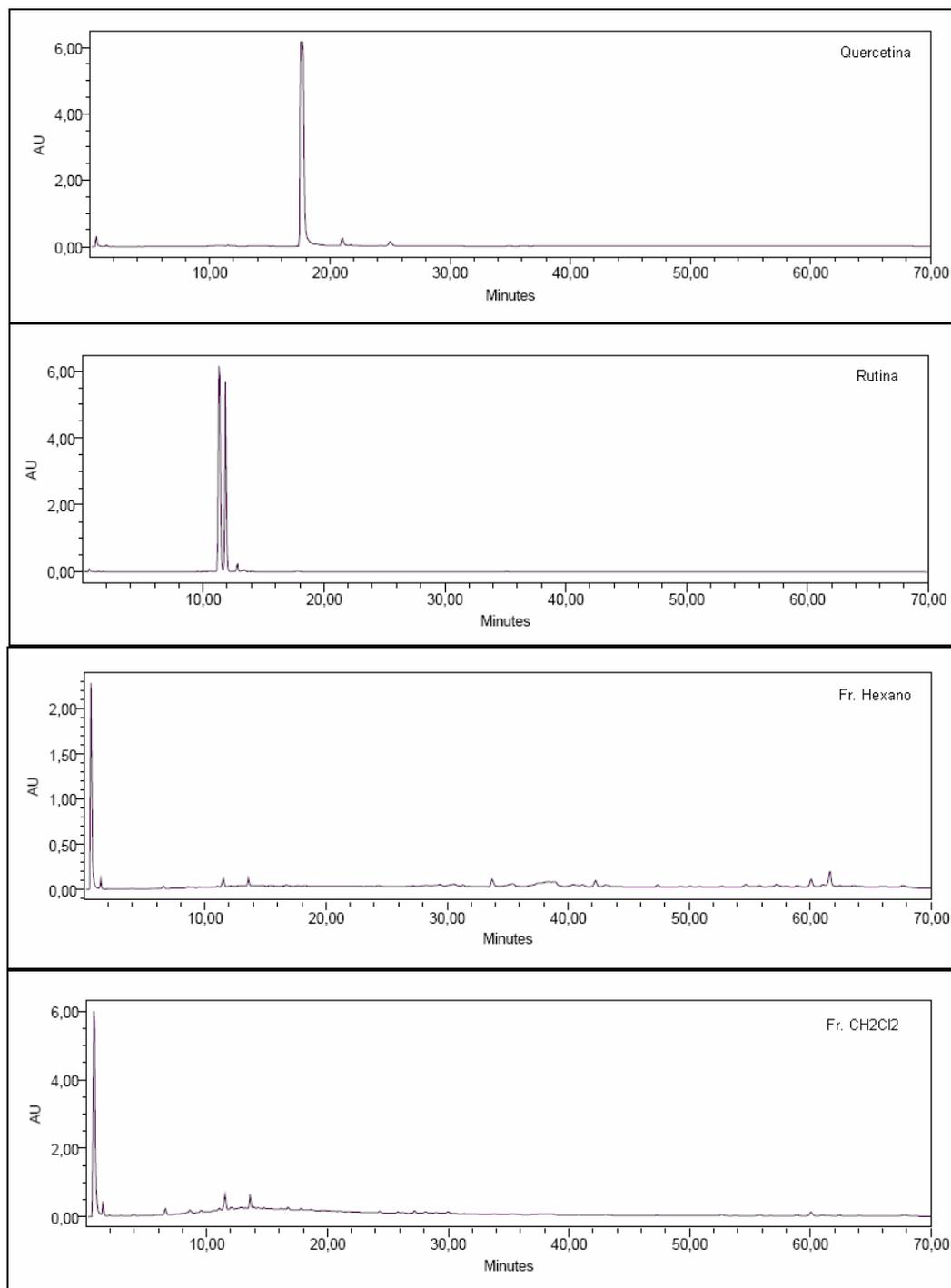
### **5.1.2 Análise do perfil da fr. Hex.**

O perfil obtido por CLAE-FR da Fr. Hex. foi o que mais se diferenciou. O melhor cromatograma para esta fração foi obtido em sistema eluotrópico diverso dos demais (Tabela 2, pág. 44).

O pico mais intenso de ambas as frações, Fr. Hex. e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ocorreu em Tr = 0,6 min. e os perfis das bandas no U.V. mostraram o mesmo padrão de absorção (**Figura 14**).

Além deste, os outros picos desta fração ocorreram nos tempos de retenção Tr = 11,5, Tr = 13,6 e Tr = 60,0 min. Já os controles tiveram seus principais picos nos tempos de retenção Tr = 11,3 e Tr = 17,9 min, para os flavonóides rutina e quercetina, respectivamente (**Figura 13**).

O cromatograma da Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> eluída no mesmo sistema eluotrópico que a Fr. Hex, foi mostrado na **Figura 13**. Os tempos de retenção encontrados para os picos mais intensos foram os mesmos nos dois cromatogramas (11,5; 13,6; 60,0 min). Além disto, os perfis das bandas de absorção no U.V. para os picos nestes tempos de retenção também mostraram o mesmo padrão, com bandas em mesmo comprimento de onda ( $\lambda$ ) (**Figura 14**). Assim, os perfis cromatográficos de ambas as frações são muito parecidos, sugerindo que elas apresentam as mesmas substâncias principais.



**Figura 13: Perfil cromatográfico dos controles positivos quercetina e rutina e das frações Fr. Hex. e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> das folhas de *C. lineatifolia*, em gradiente, conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44).  $\lambda$  210 nm.**

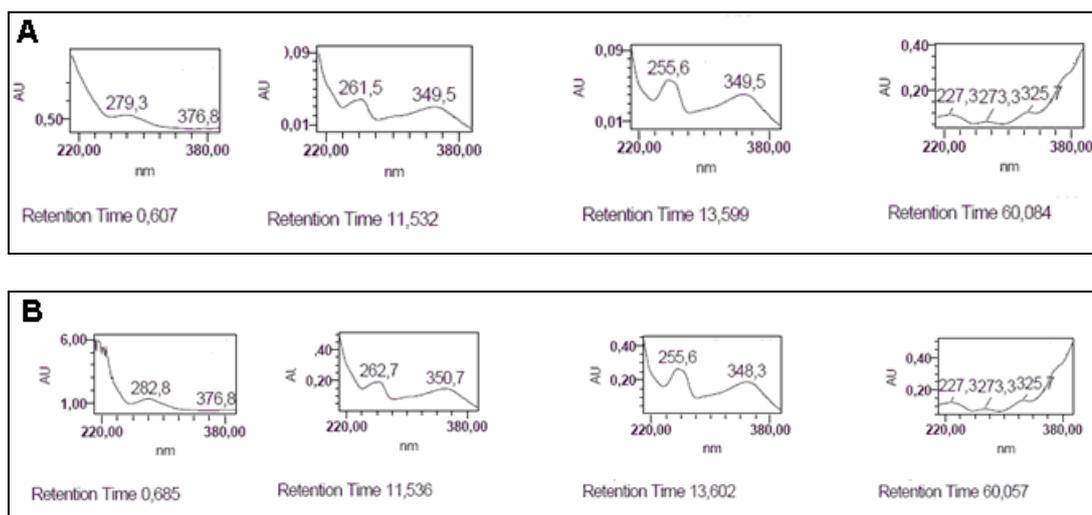


Figura 14: Espectros no U.V. obtidos “on line” para as frações A: Fr. Hexano e B: Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> correspondentes aos picos dos cromatogramas obtidos em CLAE-FR com tempos de retenção em Tr = 11,5, Tr = 13,6 e Tr = 60,0 min.

## 5.2 Fitoquímica de *Campomanesia lineatifolia*

### 5.2.1 Fracionamento da fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

A partir do fracionamento de Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> não foi possível a purificação de substâncias (**Figura 15**). Apesar de 3 amostras terem sido enviadas para análise espectroscópica por RMN, os seus espectros evidenciaram que elas ainda não se encontravam puras.

Os espectros de <sup>1</sup>H e COSY foram obtidos para as três amostras e os sinais observados ocorreram com deslocamentos químicos característicos de flavonóides glicosilados. Entretanto, foi possível visualizar a presença de mais de uma substância em cada espectro, pela grande quantidade de sinais.

Não foi possível obter os espectros de <sup>13</sup>C e DEPT 135. Também não foi possível a obtenção dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC.

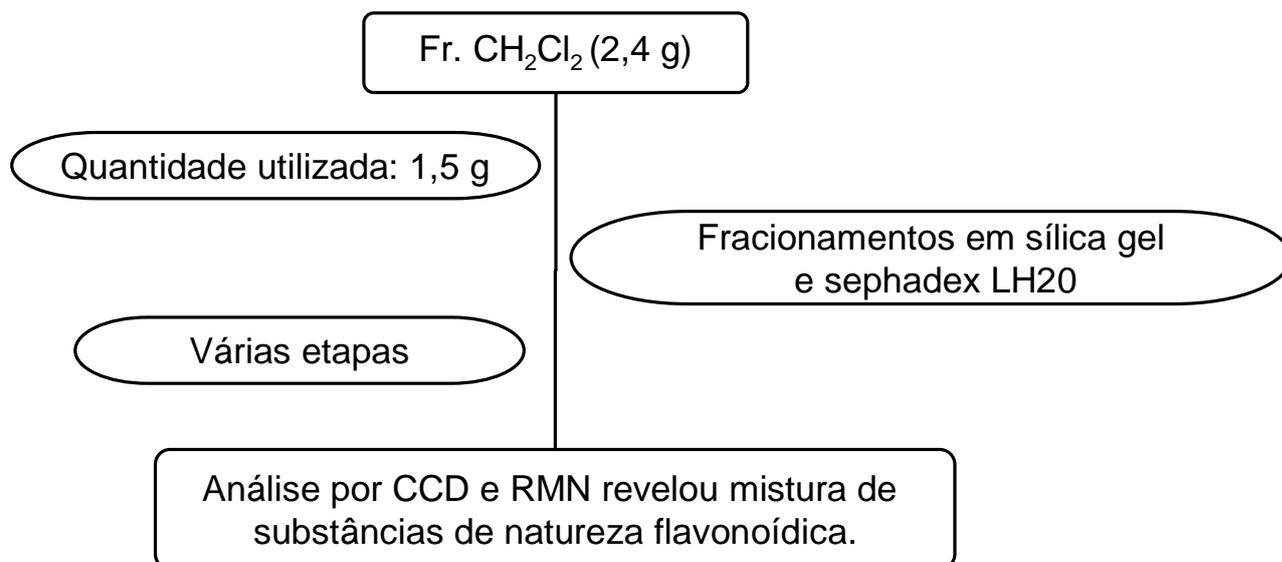


Figura 15: Fluxograma geral do fracionamento da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *C. lineatifolia*.

### 5.2.2 Fracionamento da fr. AcOEt

Foram realizados 6 fracionamentos (CCC1 a CCC6) da Fr. AcOEt utilizando-se a técnica de cromatografia em contracorrente centrífuga de partição do tipo espiral (HSCCC) e sistema de solvente Hex:AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (0,6:4,0:0,7:1,0). Os 6 fracionamentos realizados, bem como outros que se fizeram necessários e as substâncias obtidas estão apresentados no fluxograma da **Figura 16**.

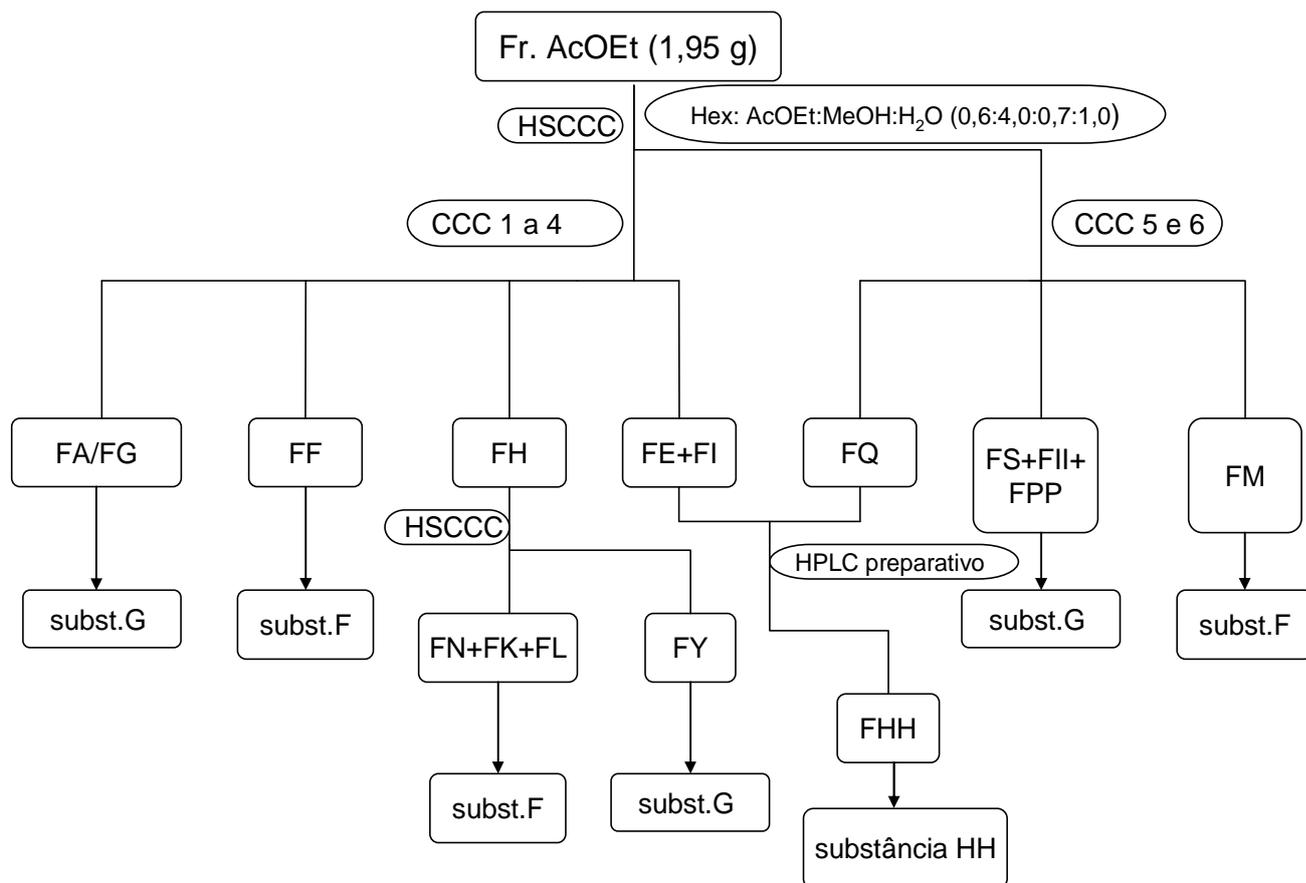


Figura 16: Fluxograma dos fracionamentos da fração AcOEt, bem como as substâncias obtidas.

Fracionamento de CCC1 a CCC4

As frações obtidas em CCC1 a CCC4 foram avaliadas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança do perfil de bandas apresentado, como mostra a **Figura 17**. As frações resultantes dessa reunião receberam novas denominações, de FA a FJ.

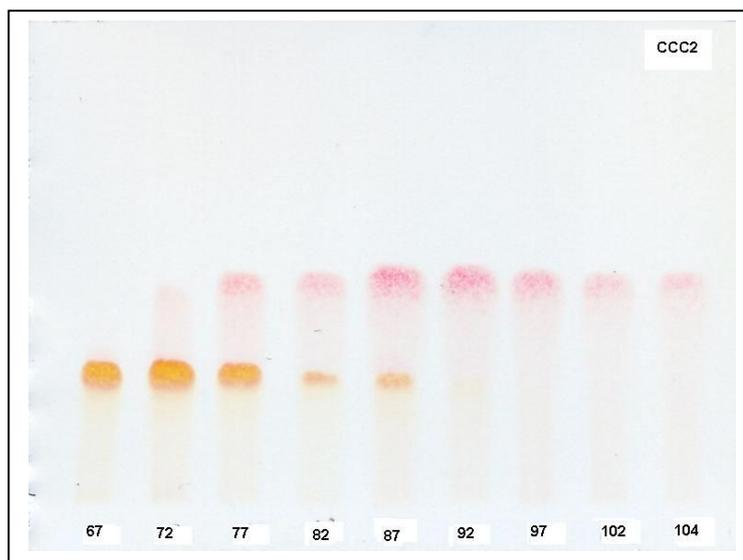


Figura 17: Perfil cromatográfico em CCD apresentado pelas frações 67 a 104 de CCC2. A banda inferior apresenta  $R_f = 0,24$  e a superior,  $R_f = 0,46$ . Revelador: Vanilina sulfúrica. Eluente: Fase orgânica superior do sistema de solvente.

A **Figura 18** mostra o perfil em CCD das frações reunidas e reveladas com NP/PEG – revelador específico para flavonóides. Essa revelação mostrou a presença de flavonóides em FG, FH e FJ, todos com  $R_f = 0,24$ . FE e FI também mostraram a presença de flavonóides, ambos com  $R_f = 0,33$ , entretanto as bandas apresentaram coloração bem fraca, indicando uma baixa concentração. A **Tabela 10** mostra a reunião das frações e as massas obtidas para cada uma.

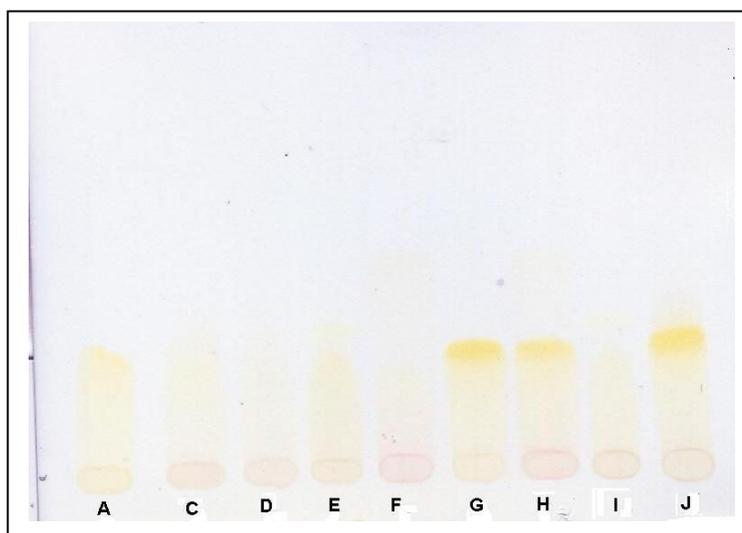


Figura 18: Perfil cromatográfico em CCD apresentado pelas frações FA a FJ, resultantes da reunião das frações de CCC1 a CCC4. O revelador indica a presença de flavonóides em FG, FH e FJ, todos com o mesmo  $R_f$ . Revelador: NP/PEG. Eluente: Fase orgânica superior do sistema de solvente.

**Tabela 10:** Reunião das frações obtidas nos fracionamentos CCC1 a CCC4.

FRAÇÕES	FRAÇÕES REUNIDAS (NÚMERO DO CCC)	MASSA (mg)
FA	58-60(1)	10,3
FB	42-44(1)	1,6
FC	47-50(2)	2,8
FD	48-51(3)	4,1
FE	28-47(3)	10,1
FF	91-104(2) e 95-109(3)	20,9
FG	62-72(2) e 71-80(3)	29,1
FH	61-5FE(1) e 73-90(2) e 81-94(3) e 68-77(4)	52,6
FI	31-41(1) e 29-42(2) e 34-40(4)	14,0
FJ	45-57(1) e 51-60(2) e 52-70(3) e 51-67(4)	69,6

As frações reunidas foram avaliadas por CLAE-FR utilizando-se as condições descritas no item 4.7, página 43. FC e FD apresentaram pico predominante em  $T_r = 16,8$  min, mas havia também outros picos de menor intensidade, indicando que ainda estavam impuras. FJ apresentou principalmente picos em  $T_r = 16,8$  min e  $T_r = 22,6$  min. FE e FI apresentaram o mesmo perfil, com um pico predominante em  $T_r = 30,4$  min, além de vários outros com menor intensidade, demonstrando que ainda estavam impuras.

Os cromatogramas das frações FF e FG apresentaram um único pico cada, em  $T_r = 6,6$  min e  $T_r = 22,6$  min, respectivamente, além de pureza espectral e por isso foram enviadas para análises espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ). As substâncias das frações FF e FG foram denominadas substâncias F e G, respectivamente, como as frações de origem.

#### Análise e Fracionamento de FH

FH apresentou dois picos no cromatograma por CLAE-FR, sendo um deles correspondente ao da substância G e outro correspondente ao da substância F. A massa obtida desta fração foi submetida a novo fracionamento com o objetivo de se obter maior quantidade das substâncias F e G. Utilizaram-se as mesmas condições descritas no item 4.9 (pág. 46).

A análise em CCD das frações obtidas na CCC de FH resultou na reunião das frações descritas na **Tabela 11**.

**Tabela 11:** Reunião das frações obtidas na CCC de FH e cujo perfil em CCD apresentou as bandas correspondentes às substâncias F e G.

FRAÇÕES	FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
FY	55-79	19,1
FN	80-91	6,5
FK	92-99	3,4
FL	100-104	1,7

As frações reunidas foram avaliadas por CLAE-FR, utilizando-se as condições descritas no item 4.7, pág. 43. Os cromatogramas das frações FK, FL, FN apresentaram um único pico cada, em  $T_r = 6,6$  min, correspondente ao pico da substância F. Já o cromatograma de FY apresentou pico em  $T_r = 22,6$  min, correspondente ao pico da substância G. Todos apresentaram pureza espectral.

#### Fracionamentos de CCC5 e CCC6

As CCC 5 e 6 foram realizadas com o objetivo de se conseguir o isolamento das substâncias correspondentes às duas outras bandas, cujos picos foram detectados nos cromatogramas obtidos por CLAE-FR de CCC1 a CCC4. Estas correspondem a  $T_r = 16,8$  min (FC, FD e FJ) e  $T_r = 30,4$  min (FE e FI). Como essas frações não se encontravam puras, apresentando outros picos em seus cromatogramas, os fracionamentos de CCC5 e CCC6 foram realizados coletando-se volumes menores para cada fração, na tentativa de se conseguir o isolamento das respectivas substâncias.

As frações foram avaliadas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança do perfil apresentado. A reunião das frações e as massas obtidas encontram-se descritas na **Tabela 12**.

**Tabela 12:** Reunião das frações obtidas nos fracionamentos de CCC5 e CCC6 e cujos perfis em CCD apresentaram as bandas correspondentes a:  $Tr = 16,8$  min.,  $Tr = 30,4$  min, substância F ou substância G.

FRAÇÕES	FRAÇÕES REUNIDAS (NÚMERO DO CCC)	MASSA (mg)
FQ	41-61(5)	5,5
FP	62-64(5)	0,4
FS	69-92(5)	27,5
FII	93-103(5)	11,1
FM	104-109(5)	3,3
FCC	67-89(6)	5,1
FBB	91-94(6)	1,1
FPP	101-121(6)	30,7

Após a reunião, as frações obtidas foram analisadas por CLAE-FR utilizando-se as condições descritas no item 4.7, pág. 43. Os cromatogramas das frações FS, FII e FPP mostraram a presença da substância G com bom grau de pureza. FM apresentou cromatograma com um único pico, o qual correspondeu à substância F. As frações FQ e FCC apresentaram pico no cromatograma correspondente a  $Tr = 30,4$  min, mas elas apresentaram outros picos, demonstrando que não estavam puras. Já FP e FBB apresentaram pico no cromatograma correspondente a  $Tr = 16,8$  min, mas essas frações também apresentaram outros picos, demonstrando que ainda estavam impuras.

#### Fracionamento de FE+FI+FQ

Por apresentarem em comum o pico em  $Tr = 30,4$  min, as frações FE, FI e FQ foram reunidas e a massa obtida foi 29,6 mg. A fração obtida foi então recromatografada em cromatógrafo Shimadzu, em escala preparativa, coluna Agilent prep. - C18, (10  $\mu$ m). Utilizou-se o sistema de solvente Acetonitrila: Água (30:70), em modo de eluição isocrático.

Foram coletadas 48 frações, referentes a 5 picos, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD. Apenas a fração FHH, resultante da união das frações 29 a 36, apresentou uma única banda quando analisada em CCD. A utilização do revelador específico NP/PEG indicou que FHH apresenta natureza flavonoídica. Ao se analisar por CLAE-FR, utilizando-se as condições descritas no

item 4.7, pág. 43, FHH apresentou um único pico ( $T_r = 27,0$  min), mas com pequenas impurezas. Por apresentar pureza espectral, FHH foi enviada para análise espectroscópica, mas como a massa obtida foi muito pequena (0,5 mg), realizou-se apenas RMN  $^1\text{H}$ .

A substância da fração FHH foi denominada substância HH, como a fração de origem.

#### Análise geral dos resultados dos fracionamentos

A partir do fracionamento da Fr. AcOEt por cromatografia contracorrente foram purificadas três substâncias, denominadas de F, G e HH. As análises realizadas por CCD indicaram a natureza flavonoídica das substâncias G e HH. Já as análises em CCD da substância F apresentaram manchas únicas, de coloração avermelhada após revelação com vanilina sulfúrica, o que é característico de proantocianidinas. As análises por CLAE-FR das frações F, G e HH mostraram um pico muito intenso e picos fracos devidos a pequenas impurezas. Os picos das substâncias F, G e HH, quando analisados por UV-DAD, mostraram pureza espectral e seus cromatogramas estão mostrados na **Figura 19**.

A análise comparativa dos espectros no U.V. obtidos *on line* mostra que o pico correspondente ao tempo de retenção em  $T_r = 8,5$  min do cromatograma da Fr. AcOEt (Figuras 11 e 12, pág. 66 e 67) e apresenta os mesmos máximos de absorção que o pico da substância F ( $\lambda_{\text{máx}} = 278,1$  e  $376,8$  nm). Os tempos de retenção são próximos, sendo  $T_r = 6,6$  min para o pico da substância F.

A substância G mostra pico correspondente ao tempo de retenção em  $T_r = 22,6$  min e apresenta máximos de absorção em  $\lambda = 254,4$  e  $349,5$  nm. No cromatograma da Fr. AcOEt não foi encontrado qualquer pico correspondente à substância G. O pico com espectro de U.V. ( $\lambda = 255,6$  e  $347,2$  nm) mais próximo da substância G apresenta tempo de retenção em  $T_r = 25,1$  min. Para a confirmação seria necessário a realização de uma co-injeção da substância G com a Fr. AcOEt em CLAE-FR, o que não foi feito.

A substância HH mostra pico correspondente ao tempo de retenção em  $T_r = 20,7$  min e apresenta máximos de absorção em  $\lambda = 262,7$  e  $342,4$  nm. No cromatograma da Fr. AcOEt não foi encontrado qualquer pico correspondente à substância HH.

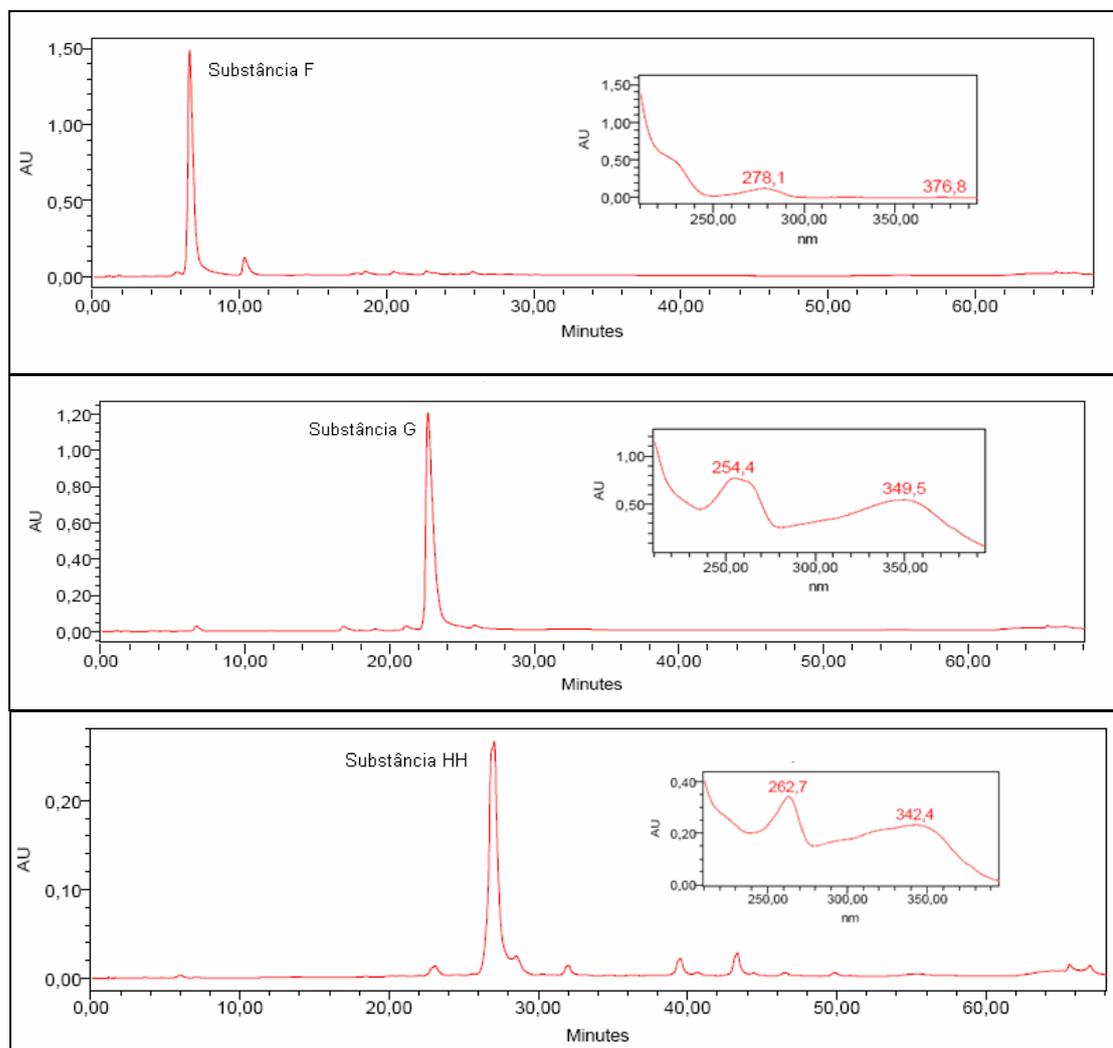
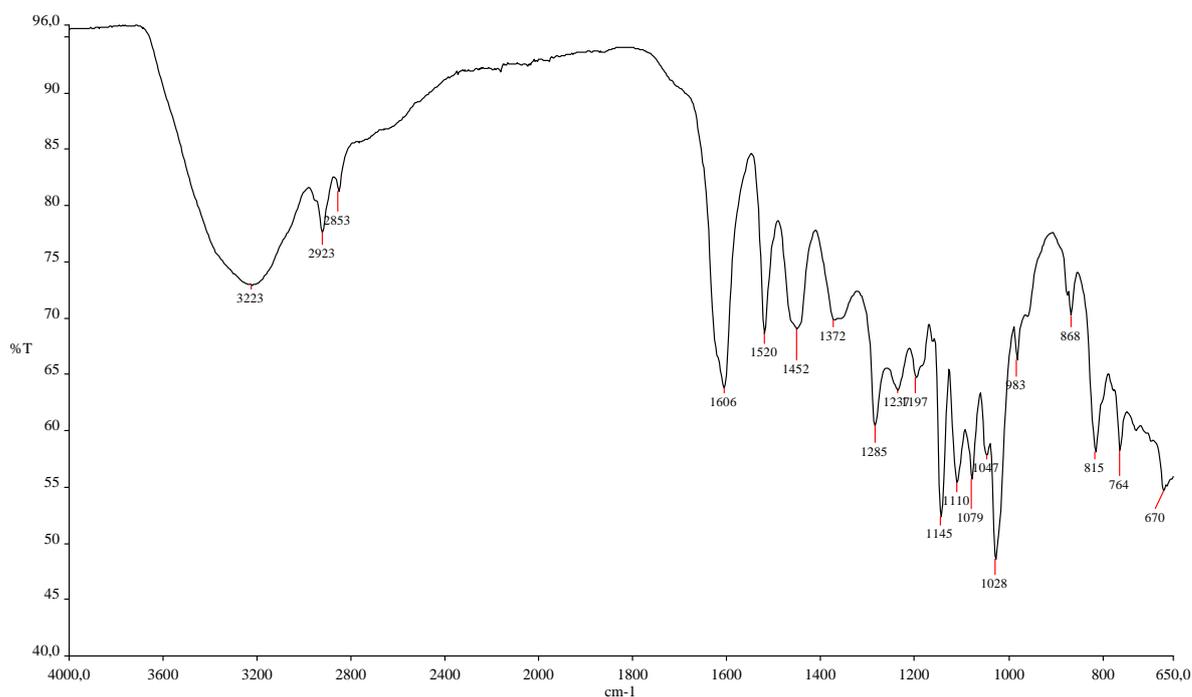


Figura 19: Cromatogramas das substâncias F, G e HH, em gradiente, conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44).  $\lambda$  210 nm. Detalhes: Espectros no U.V.obtidos “on line”.

### **5.2.3 Elucidação estrutural da substância F**

#### **5.2.3.1 Espectroscopia no I.V.**

O espectro no I.V. (**Figura 20**) obtido para a substância F apresenta uma banda larga em  $3223\text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de hidroxila de álcoois e fenóis. A presença de bandas de deformação axial de C-O na região entre  $1260$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$  também é um indicativo da presença desses grupos funcionais. As bandas em  $2923$  e  $2853\text{ cm}^{-1}$  indicam, respectivamente, deformação axial de C-H e estiramento simétrico de  $\text{CH}_2$ . O caráter aromático ficou evidenciado pela presença de três bandas na região entre  $1606$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento  $\text{C}=\text{C}$  de aromáticos.



**Figura 20: Espectro no I.V. obtido para a substância F.**

### 5.2.3.2 Espectroscopia RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , sua comparação com dados de artigos científicos e dados obtidos nesse trabalho permitiram a elucidação estrutural da substância F.

A fórmula estrutural da substância F está apresentada na **Figura 21**. Os espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135) e os mapas de correlação COSY e HSQC estão nas **Figuras 22 a 26**.

Na **Tabela 13** estão apresentadas as atribuições dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância F e os dados encontrados na literatura para a (+)-catequina ((2R,3S)-5,7,3',4'- tetra-hidroxilflavan-3-ol) (DAVIS *et al.*, 1996; MARTINEZ-RICHA, 2003).

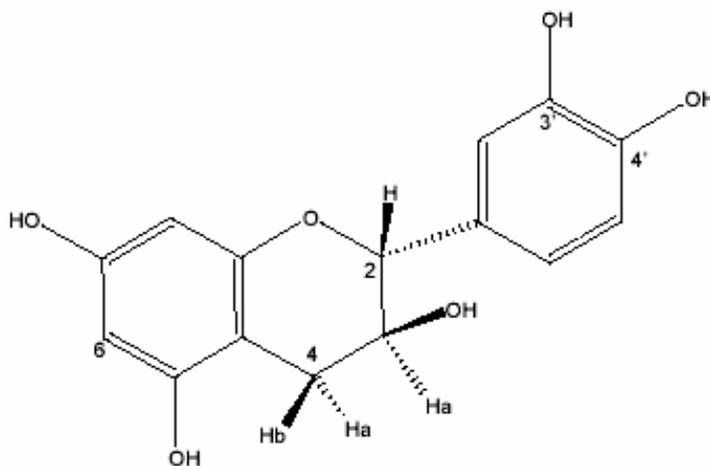


Figura 21: Fórmula estrutural da substância F (catequina).

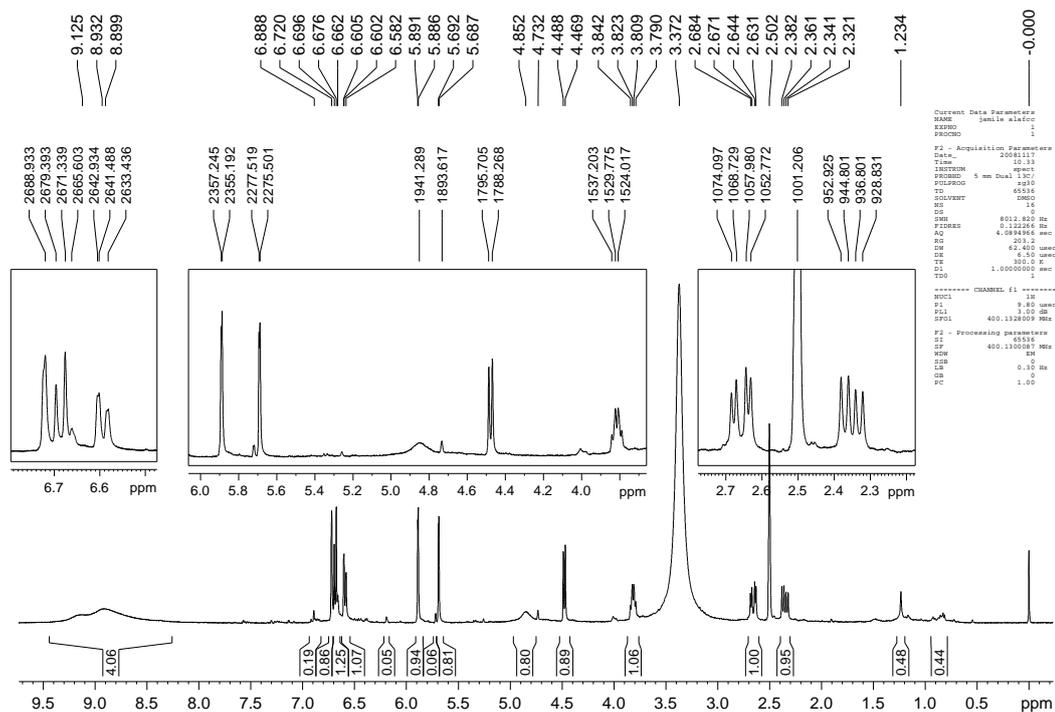


Figura 22: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtido para a substância F (catequina) (400 MHz, DMSO).

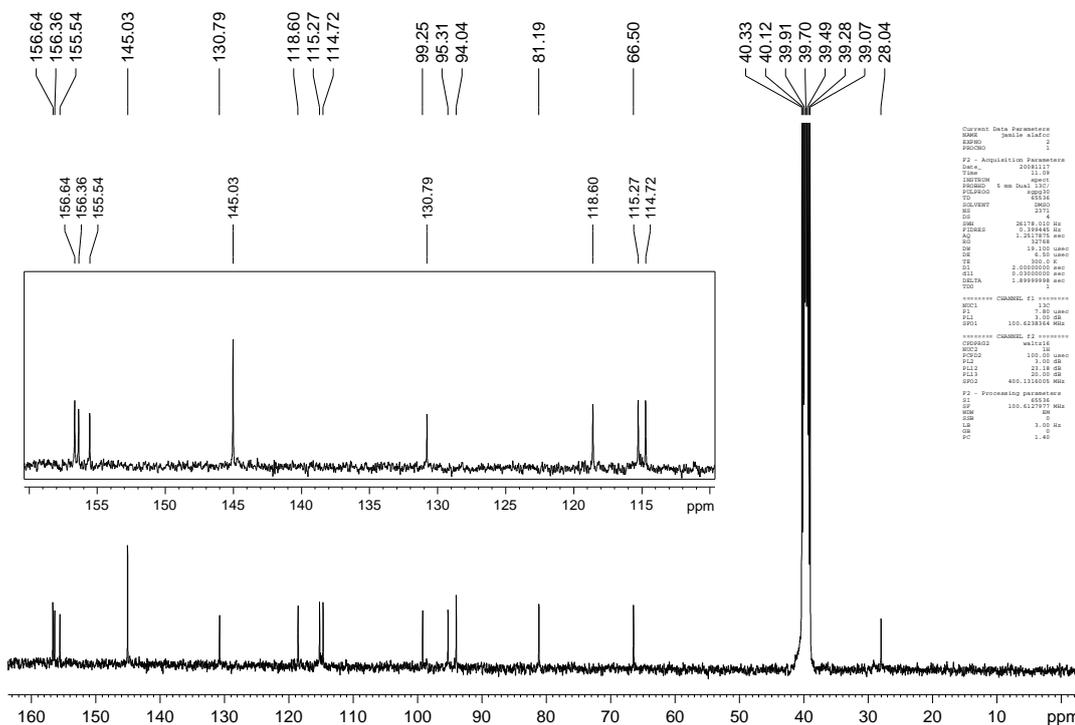


Figura 23: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C obtido para a substância F (catequina) (100 MHz, DMSO).

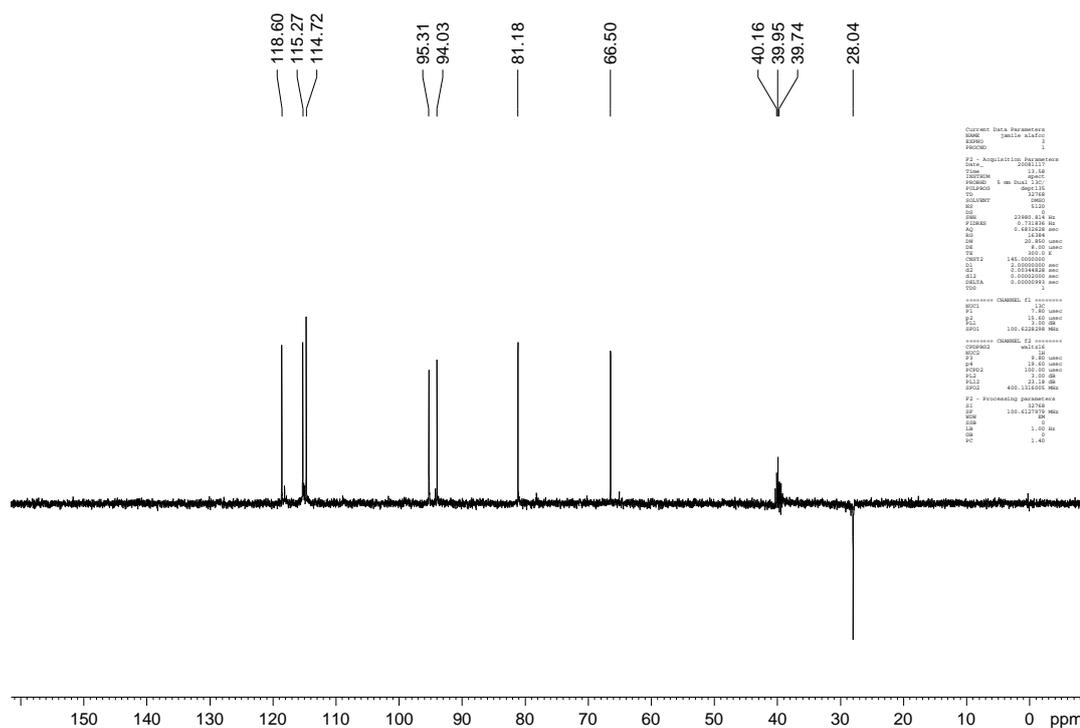


Figura 24: Subespectro DEPT-135 obtido para a substância F (catequina) (100 MHz, DMSO).

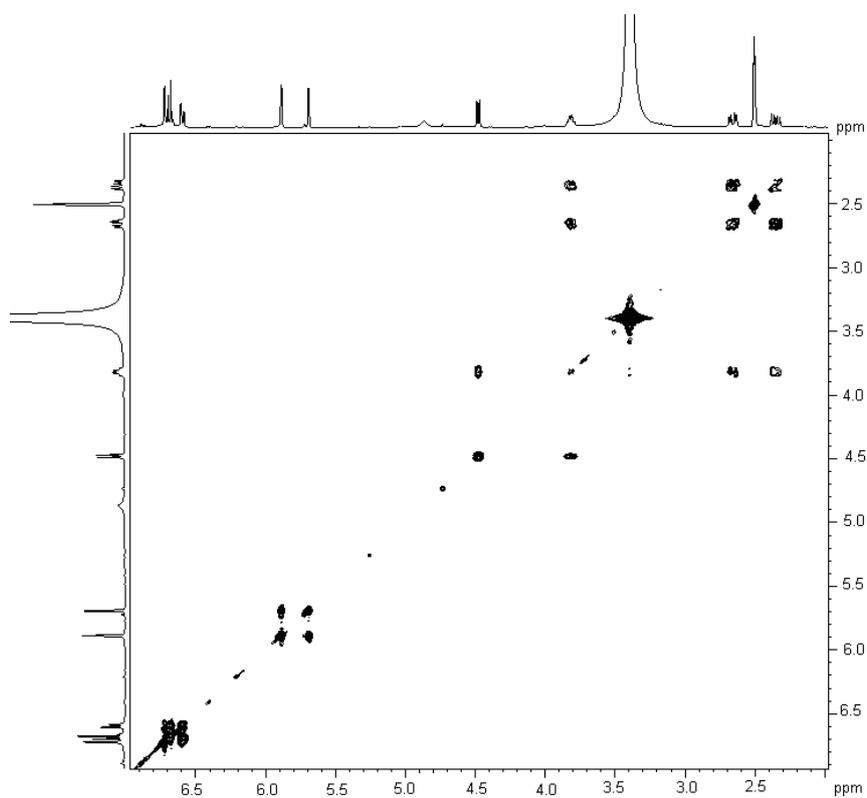


Figura 25: Mapa de correlação COSY obtido para a substância F (catequina).

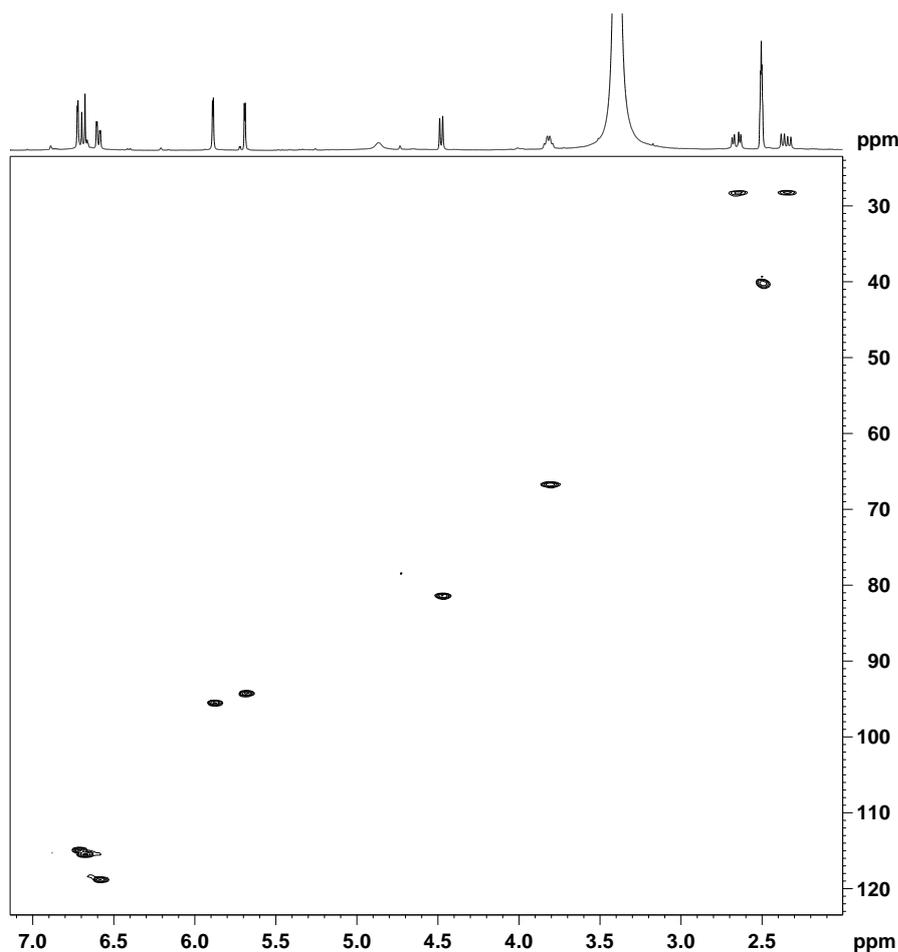


Figura 26: Mapa de correlação HSQC obtido para a substância F (catequina).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado foram observados 14 sinais, sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  145,03 ppm refere-se a 2 carbonos com o mesmo valor de deslocamento químico, portanto perfazendo um total de 15 carbonos. O subespectro DEPT-135 indicou a presença de 1 carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  28,04 ppm e 7 carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$  156,64; 156,36; 155,54; 145,03 (02 carbonos); 130,79; 99,25 ppm, todos em região de carbonos aromáticos.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicou a presença de um sistema aromático 1, 3, 4 - trissubstituído no anel B, devido aos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,72 (sl, 1H), 6,68 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H) e 6,59 (dd,  $J = 8,1$  e 1,4 Hz; 1H) ppm. Os sinais centrados em  $\delta_{\text{H}}$  6,68 e 6,59 ppm ( $J = 8,0$  Hz e 8,1 Hz, respectivamente), indicam acoplamento *orto* entre os hidrogênios 5' e 6'. Já o simpleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  6,72 ppm é referente ao hidrogênio mais desprotegido (posição 2'). Entretanto, é possível verificar o acoplamento *meta* com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,59 ppm (dd,  $J = 8,1$  e 1,4 Hz; 1H) devido à constante de acoplamento característica ( $J = 1,4$  Hz). Os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,89 e 5,69 ppm ( $J = 2,0$  Hz para ambos) indicam a presença de acoplamento *meta* entre os hidrogênios 6 e

8. Já a alta constante de acoplamento ( $J = 7,4$ ) do hidrogênio na posição 2 (H2,  $\delta_H$  4,48 ppm) com H3 ( $\delta_H$  3,82 ppm) é característico de configuração *trans*.

O espectro COSY mostrou a existência de correlação entre os 03 hidrogênios em  $\delta_H$  6,72; 6,68 e 6,59 ppm. Indicou também o acoplamento entre o hidrogênio em  $\delta_H$  3,82 ppm (dd; 13,2; 7,6; 1H) e os hidrogênios em  $\delta_H$  4,48 ppm (d; 7,4 Hz; 1H),  $\delta_H$  2,66 ppm (dd; 16,0 e 5,3 Hz; 1H) e 2,35 ppm (dd; 16,1 e 8,0 Hz; 1H). O espectro HSQC mostrou a correlação entre os hidrogênios em  $\delta_H$  2,66 ppm e 2,35 ppm e com o carbono em  $\delta_C$  28,04 ppm, confirmando a localização do carbono metilênico. O hidrogênio em  $\delta_H$  3,82 ppm apresentou correlação com o carbono em  $\delta_C$  66,50 ppm, confirmando a posição do carbono hidroxilado no anel C. O espectro HSQC evidenciou a correlação entre o sinal do hidrogênio em  $\delta_H$  6,59 ppm e o sinal do carbono em  $\delta_C$  118,60 ppm, confirmando tratar-se do carbono em C6'. Já a atribuição dos carbonos com deslocamentos em  $\delta_C$  115,27 e 114,72 ppm foi evidenciada pelas suas respectivas correlações com os sinais dos hidrogênio em  $\delta_H$  6,68 e 6,72 ppm. Esses deslocamentos químicos foram, então, atribuídos a C5' e C2', respectivamente.

**Tabela 13: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a substância F e dados da literatura para (+)-catequina.**

H/C	SUBSTÂNCIA F <sup>a1</sup>		(+)-CATEQUINA	
			(DAVIS <i>et al.</i> , 1996) <sup>b</sup>	(MARTINEZ-RICHA, 2003) <sup>a2</sup>
	$\delta$ H (ppm) (m, J em Hz)	$\delta$ C (ppm) (multiplicidade)	$\delta$ H (ppm) (J em Hz)	$\delta$ C (ppm)
2	4,48 (d; 7,4)	81,19 (CH)	4,563 (7,8)	81,0
3	3,82 (dd; 13,2; 7,6)	66,50 (CH)	3,994 (7,8)	66,3
4	4a 2,66 (dd; 16,0; 5,3)	28,04 (CH <sub>2</sub> )	2,912 (16,1; 5,5)	27,8
	4b 2,35 (dd; 16,1; 8,0)		2,531 (16,1; 8,4)	
5	—	156,36 (C)	—	156,2
6	5,89 (d; 2,0)	95,31 (CH)	6,024 (2,3)	95,1
7	—	156,64 (C)	—	156,4
8	5,69 (d; 2,0)	94,04 (CH)	5,881 (2,3)	93,8
9	—	155,54 (C)	—	155,3
10	—	99,25 (C)	—	99,0
1'	—	130,79 (C)	—	130,6
2'	6,72 (sl)	114,72 (CH)	6,898 (1,9)	114,5
3'	—	145,03 (C)	—	144,8
4'	—	145,03 (C)	—	144,8
5'	6,68 (d; 8,0)	115,27 (CH)	6,798 (8,1)	115,0
6'	6,59 (dd; 8,1; 1,4)	118,60 (CH)	6,758 (8,1)	118,4

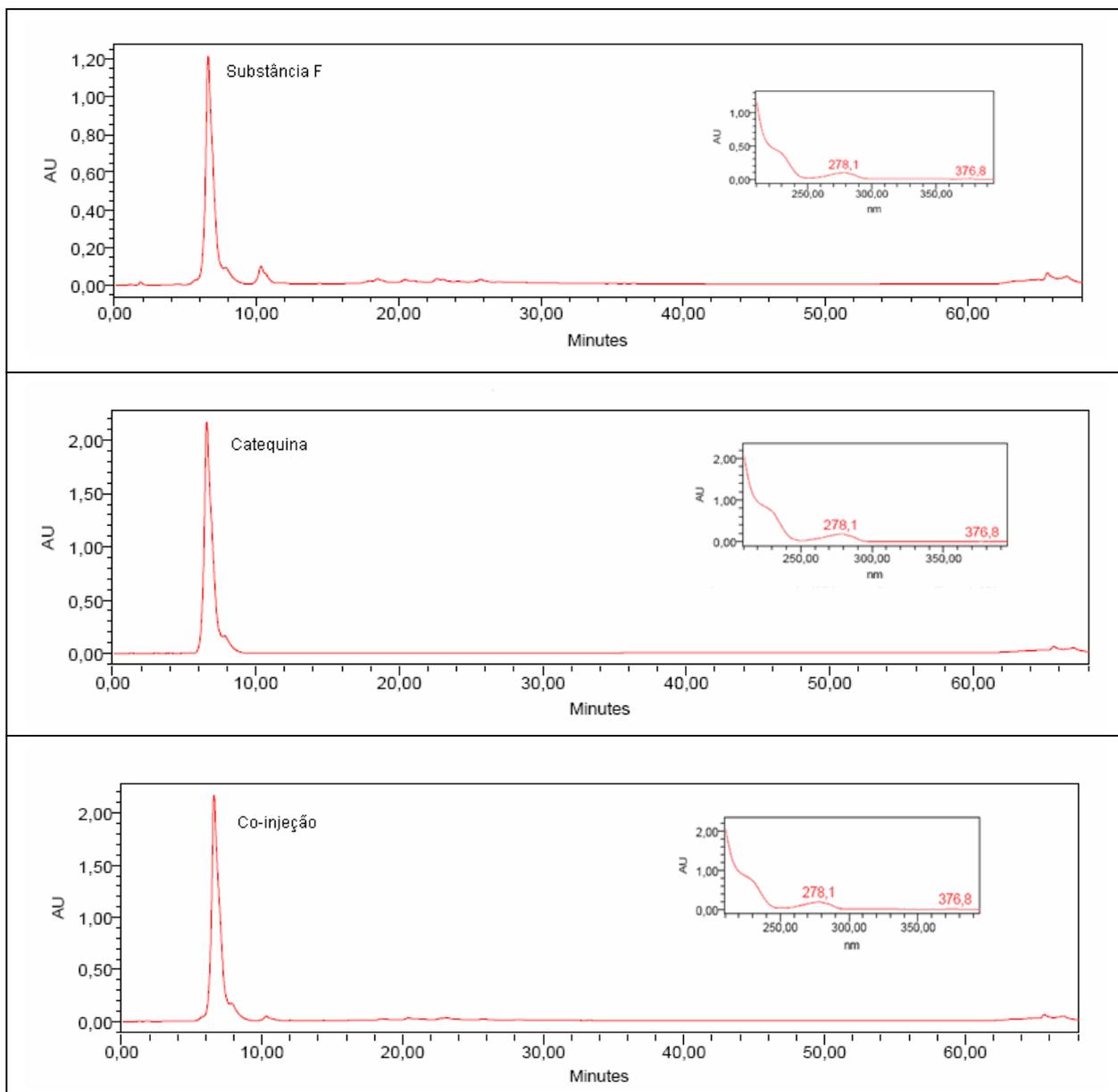
<sup>a</sup> Espectros obtidos em DMSO-d<sub>6</sub>; <sup>a1</sup> 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ); <sup>a2</sup> 50 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

<sup>b</sup> Espectros obtidos em acetona-d<sub>6</sub>; 400 MHz ( $^1\text{H}$ ).

### **5.2.3.3 Identificação da substância F por co-injeção com padrão de (+)-catequina em CLAE-FR**

A identificação da substância F como (+)-catequina foi confirmada pela co-injeção com o padrão da (+)-catequina. A co-injeção confirmou que a substância F é a (+)-catequina, pois, como pode ser observado nos cromatogramas mostrados na **Figura 27**, registrou-se um único pico com  $T_r = 6,6$  min. Além disso, os espectros no U.V. obtidos “on-line” também são iguais, apresentando exatamente os mesmos máximos de absorção ( $\lambda$  278,1 e 376,8 nm). As condições de análise por CLAE-FR foram as mesmas descritas anteriormente no item 4.7, pág. 43.

Assim, com as análises de IV, RMN e CLAE-FR, a substância F ficou caracterizada como a (+)-catequina ((2R,3S)-5,7,3',4'- tetra-hidroxi flavan-3-ol).

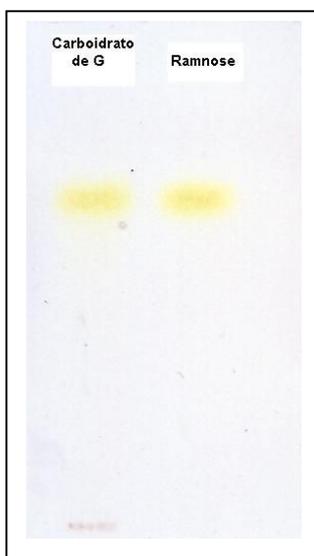


**Figura 27: Cromatogramas da substância F, do padrão (+)-catequina e da co-Injeção de ambas. Gradiente conforme descrito na Tabela 2 (pág. 44).  $\lambda$  210 nm. Detalhes: Espectros no U.V. obtidos "on line".**

### **5.2.4 Elucidação estrutural da substância G**

Após uma primeira análise dos dados físicos e químicos da substância G, verificou-se sua natureza flavonoídica e a presença de um resíduo de açúcar. Assim, a substância G foi hidrolisada para se verificar qual carboidrato faz parte de sua estrutura.

A hidrólise ácida e a CCD realizadas revelaram a presença do carboidrato ramnose e ausência de glicose na substância G (**Figura 28**).



**Figura 28:** Perfil cromatográfico em CCD do carboidrato obtido por hidrólise ácida da substância G e do padrão ramnose. Volume de aplicação: 10 µL. Revelador: Anisaldeído sulfúrico. Eluente: BuOH: Piridina: H<sub>2</sub>O (6: 4: 3).

#### **5.2.4.1 Espectroscopia no U.V. com reagentes de deslocamento**

Devido à natureza flavonoídica da substância G, procedeu-se à análise por espectroscopia no U.V. com o uso de reagentes de deslocamento (item 4.10, pág. 51) (MABRY, 1970). Os espectros obtidos e que apresentaram deslocamento estão mostrados na **Figura 29**.

O espectro no U.V. da substância G em metanol (**Figura 29 – A**) mostrou máximos de absorção em 272 (Banda II) e 351 nm (Banda I), típico de flavonas ou flavonóis (SCOTT, 1964).

Como pode ser observado na **Figura 29 – A**, ocorreu deslocamento batocrômico da Banda I (351 nm) para 393 nm quando se adicionou o reagente MeONa. A ocorrência de deslocamento batocrômico com a adição desse reagente indica a presença de hidroxilas fenólicas na estrutura do composto (SCOTT, 1964).

Quando se adicionou o reagente  $\text{AlCl}_3$  (**Figura 29 – B**) ocorreu deslocamento batocrômico em relação à curva em MeOH, com novos máximos em  $\lambda$  275 e 362 nm. A adição de HCl resultou em nova modificação, com ocorrência de deslocamento hipsocrômico em relação a curva com  $\text{AlCl}_3$  e máximos de absorção em  $\lambda$  272 e 361 nm, sem regeneração da curva em MeOH. A alteração da curva na presença de  $\text{AlCl}_3$  é um indicativo da presença de hidroxila quelatogênica ( $-\text{OH}$  em  $-\text{C}3$  ou  $-\text{C}5$  vizinho à carbonila em  $-\text{C}4$ ) e/ou sistema *orto*-di-hidroxi. Ao se adicionar HCl e ocorrer modificação da curva em  $\text{AlCl}_3$  sem regenerar a curva em MeOH, confirma-se a presença de ambos: hidroxila quelatogênica e sistema *orto*-di-hidroxi (SCOTT, 1964).

As curvas obtidas em AcONa e AcONa +  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (**Figura 29 – C**) confirmaram a presença de hidroxila fenólica de caráter ácido acentuado (posições 7 e 4') além da presença de sistema *orto*-di-hidroxi. A curva em AcONa, com máximos em  $\lambda$  222, 272 e 389 nm, apresentou deslocamento batocrômico em relação à curva em MeOH, cujos máximos foram  $\lambda$  220, 266 e 351 nm. Esse deslocamento é indicativo da presença de hidroxila fenólica de caráter ácido acentuado, como as hidroxilas localizadas nos carbonos  $-\text{C}7$  e  $-\text{C}4'$ . Já a curva em AcONa +  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (máximos em  $\lambda$  221, 264 e 366 nm) apresentou deslocamento hipsocrômico em relação à curva em AcONa e deslocamento batocrômico em relação à curva em MeOH. Esse deslocamento indica a presença de sistema *orto*-di-hidroxi na estrutura do composto, o qual forma um quelato em presença de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (SCOTT, 1964).

Assim, a análise dos espectros no ultravioleta indicou que a substância G é um flavonol, apresenta sistema *orto*-di-hidroxi e hidroxila quelatogênica, além de hidroxila fenólica de caráter ácido acentuado (localizadas nos carbonos C7 e C4').

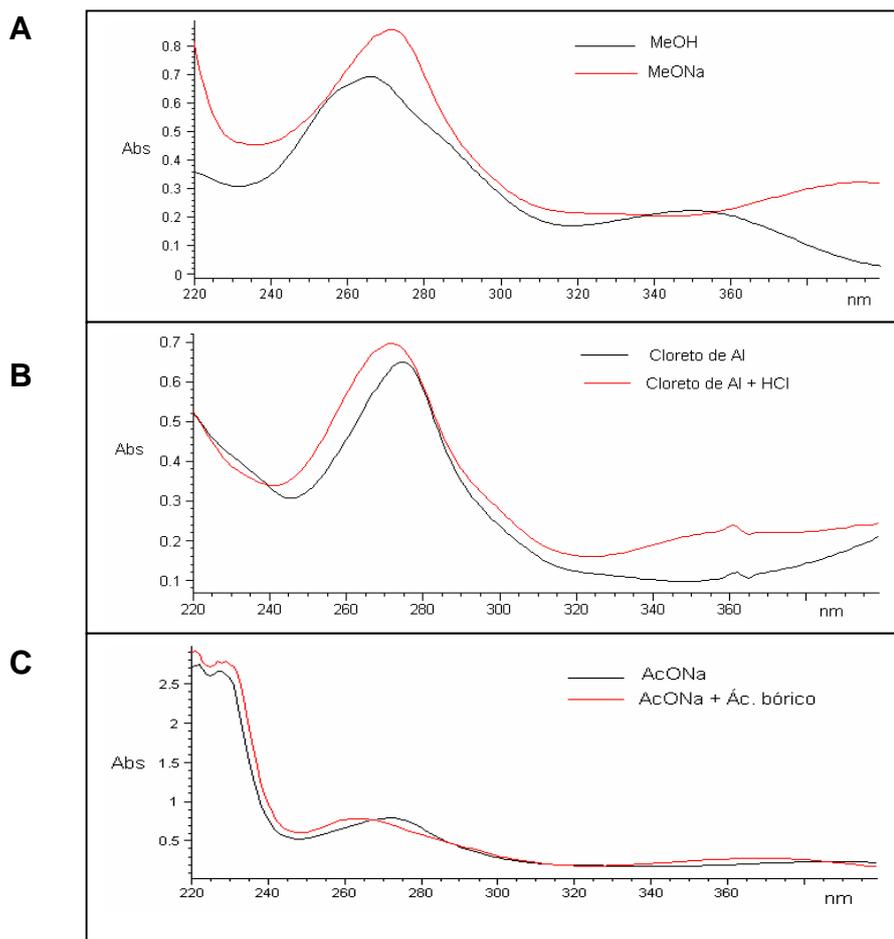


Figura 29: Espectros no U.V. da substância G com a utilização de reagentes de deslocamento. A: Espectros em MeOH e MeONa; B: Espectros após adição de  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ; C: Espectros após adição de AcONa e AcONa +  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

#### 5.2.4.2 Espectroscopia no I.V.

O espectro no I.V. (**Figura 30**) obtido para a substância G apresenta uma banda larga em  $3222\text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de hidroxila de alcoóis e fenóis. A presença de bandas de deformação axial de C-O na região entre  $1260$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$  também é um indicativo da presença desses grupos funcionais. O caráter aromático ficou evidenciado pela presença de 4 bandas na região entre  $1600$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento C=C de aromáticos. A banda de absorção em  $1652\text{ cm}^{-1}$  é indicativa da presença carbonila conjugada (estiramento C=O), pois a conjugação desloca a banda para menor número de onda. Já a presença de bandas na região entre  $1020 - 1075\text{ cm}^{-1}$  e  $1085 - 1150\text{ cm}^{-1}$  é indicativa de grupo éter.

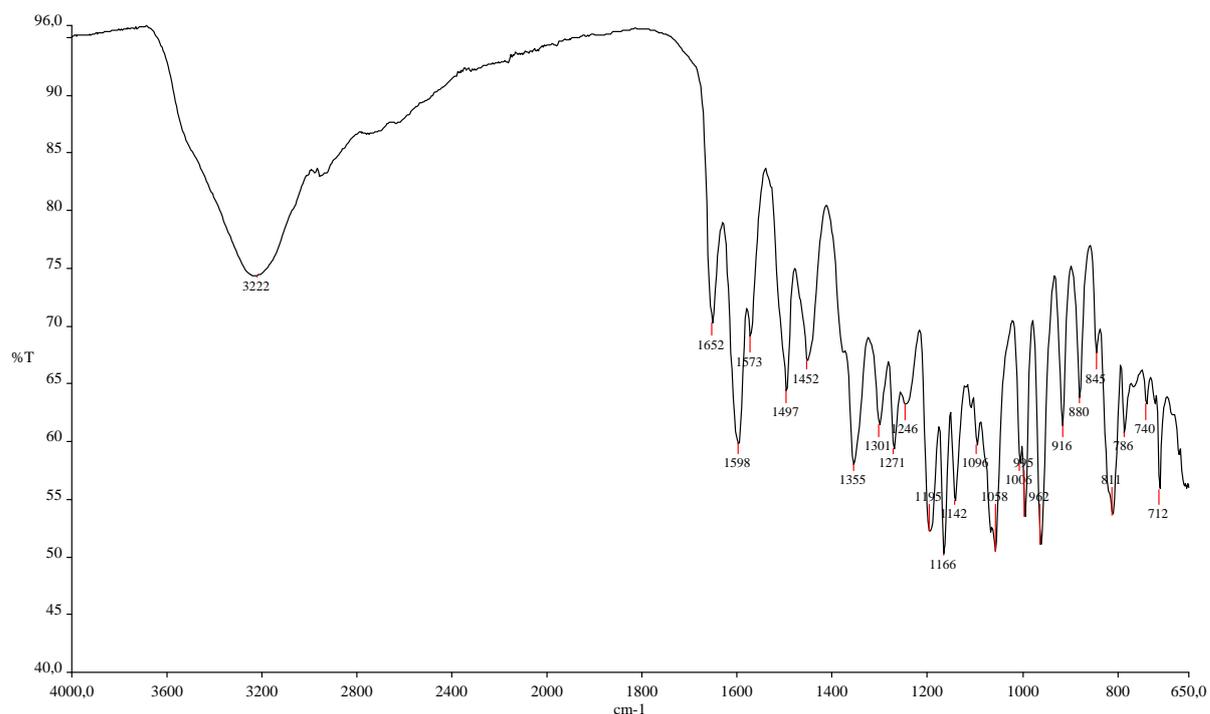


Figura 30: Espectro no I.V. obtido para a substância G (quercitrina).

#### **5.2.4.3 Espectroscopia RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$**

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , sua comparação com a literatura e os dados anteriormente obtidos nesse trabalho permitiram a elucidação estrutural da substância G.

A fórmula estrutural da substância G está apresentada na **Figura 31** e os espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135) assim como os mapas de correlação HSQC e HMBC estão apresentados nas **Figuras 32 a 37**.

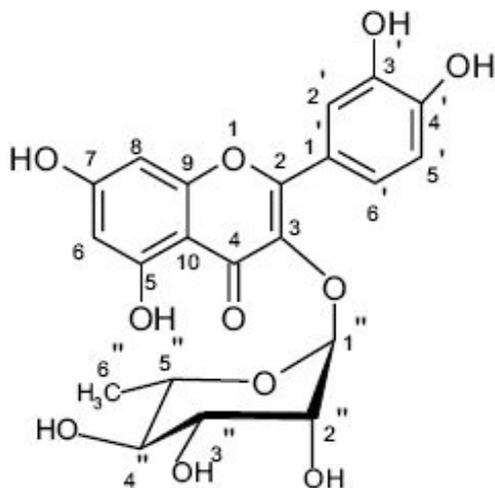


Figura 31: Fórmula estrutural da substância G (quercitrina).

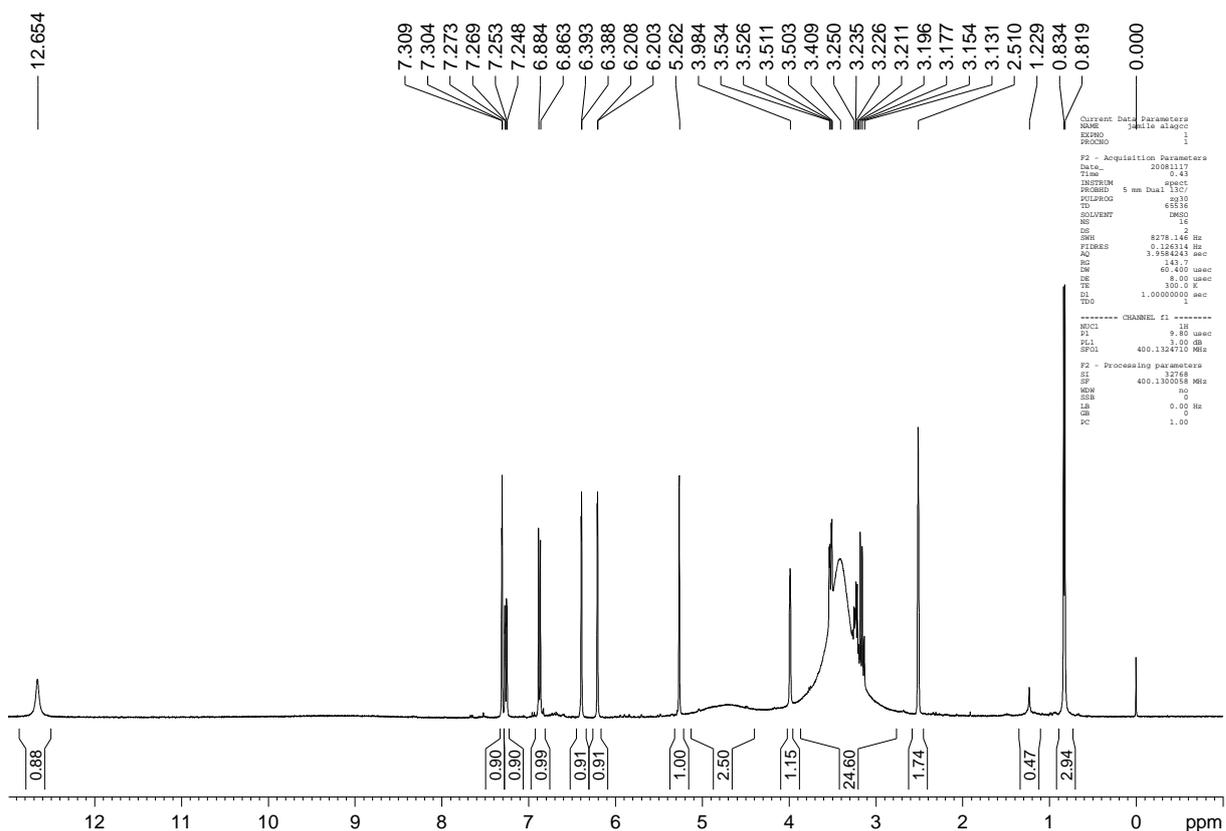


Figura 32: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para substância G (quercitrina) (400 MHz, DMSO).

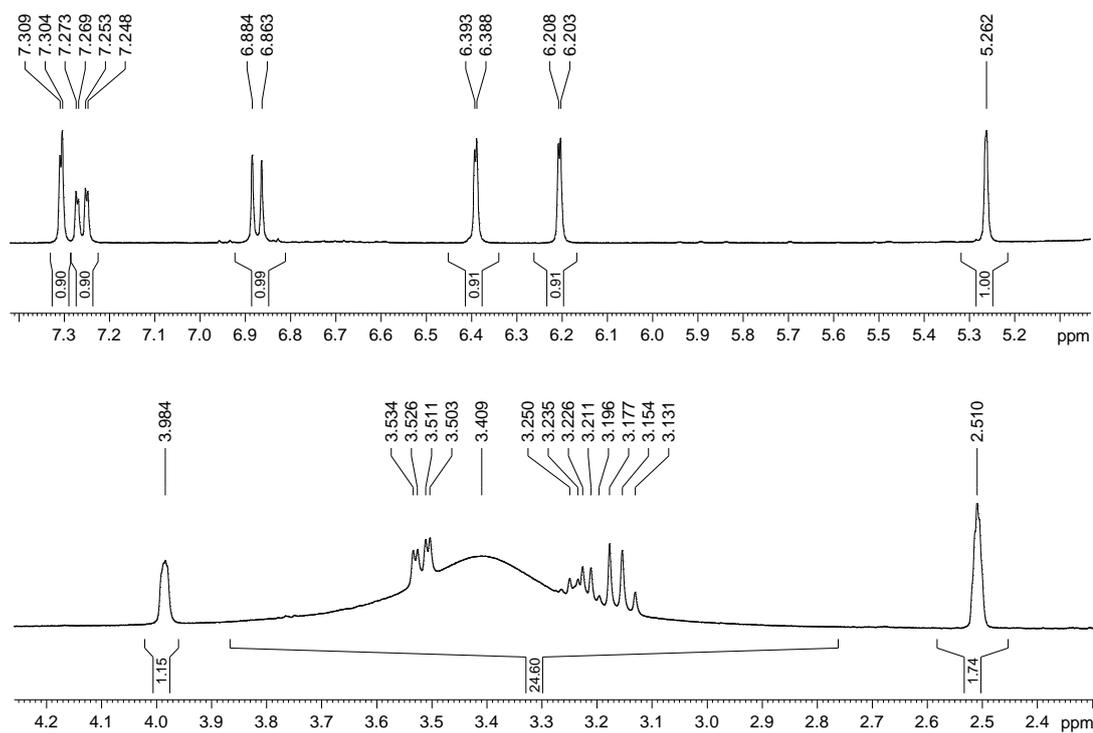


Figura 33: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para substância G (quercitrina) – Expansão (400 MHz, DMSO).

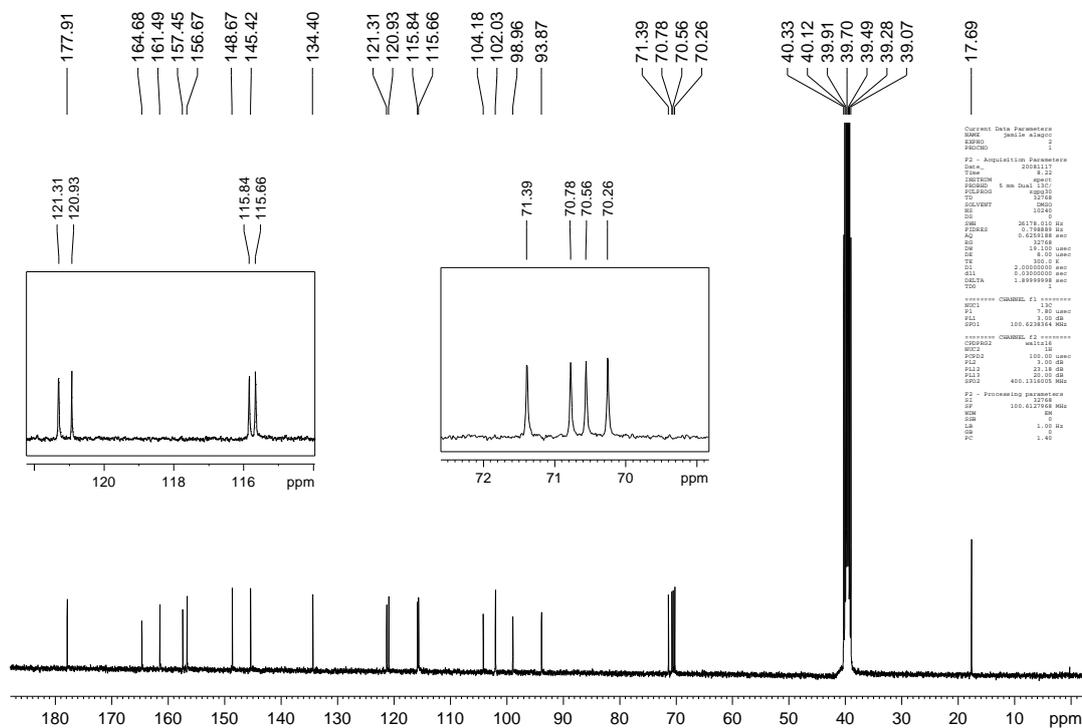


Figura 34: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para substância G (quercitrina) (100 MHz, DMSO).



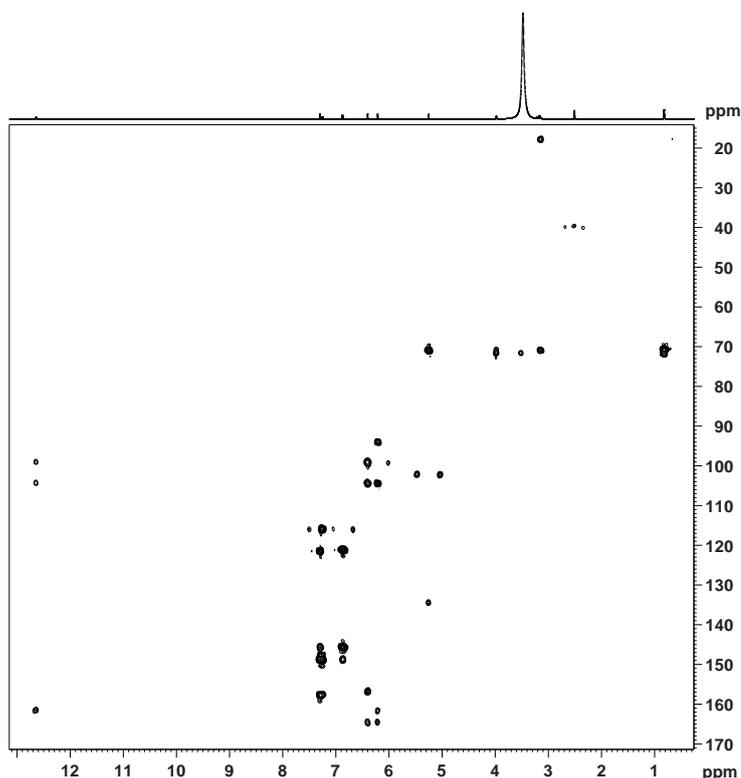


Figura 37: Mapa de correlação HMBC obtido para substância G (quercitrina).

Na **Tabela 14** estão apresentadas as atribuições dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância G e os dados encontrados na literatura para a quercitrina (quercetina 3-O- $\alpha$ -ramnosídeo).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado foram observados 15 sinais referentes à aglicona, além de seis sinais relativos à ramnose. O subespectro DEPT-135 indicou a ausência de carbonos metilênicos e a presença de 10 carbonos quaternários.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicou a presença de um sistema aromático 1, 3, 4 - trissubstituído no anel B do flavonol, devido aos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,31 (d;  $J = 2,0$  Hz; 1H), 7,26 (dd,  $J = 8,2$  e 1,8 Hz, 1H) e 6,87 (d,  $J = 8,4$  Hz; 1H) ppm. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,87 e 7,26 ppm ( $J = 8,4$  Hz, 1H e 8,2 Hz, 1H, respectivamente), indicam acoplamento *orto* entre os hidrogênios 5' e 6'. Já os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,31 ( $J = 2,0$  Hz, 1H) e 7,26 ppm ( $J = 1,8$  Hz, 1H) indicam acoplamento *meta* entre os hidrogênios 2' e 6'. Os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,39 e 6,20 ppm ( $J = 2,0$  Hz, 1H para ambos) indicam a presença de acoplamentos *meta* entre os hidrogênios 6 e 8.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicou, também, a presença da ramnose, apresentando sinal correspondente ao grupo metila em  $\delta_{\text{H}}$  0,82 ppm (d;  $J = 6,0$  Hz,

3H) além de sinais com valores de deslocamento químico característicos de glicosídeo em  $\delta_H$  3,98 – 3,13 ppm. O mapa de correlações HSQC mostrou a existência de correlações entre os hidrogênios em  $\delta_H$  3,98 – 3,13 ppm e os carbonos em  $\delta_C$  70,56 – 70,26 ppm, confirmando a presença de uma unidade glicosídica. Esse espectro apresentou também correlação entre os hidrogênios do grupo metila ( $\delta_H$  0,82 ppm) e o carbono metílico ( $\delta_C$  17,69 ppm), além de indicar a correlação entre o hidrogênio anomérico em  $\delta_H$  5,26 ppm e o carbono anomérico em  $\delta_C$  102,03 ppm.

O mapa de correlações HMBC indicou os acoplamentos à longa distância entre os hidrogênios metílicos ( $\delta_H$  0,82 ppm) e os carbonos glicosídicos 2'', 3'', 4'' e 5'' ( $\delta_C$  71,39 – 70,26 ppm). A localização do açúcar no flavonol em C3 também foi indicada pelo experimento HMBC, o qual mostrou correlação entre o hidrogênio anomérico em  $\delta_H$  5,26 ppm e o carbono olefínico em  $\delta_C$  134,40 ppm. A configuração *alfa* para a unidade ramnosídica foi definida com base no hidrogênio anomérico, que apresentou um sinal largo e sem uma constante de acoplamento alta. Para a configuração *beta* a constante de acoplamento seria  $J = 6 - 14$  Hz, que é característica de um acoplamento di-axial entre 1'' e 2''. Assim confirmou-se que a substância G é a quercitrina (quercetina 3-O- $\alpha$ -ramnosídeo).

**Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos para a substância G e dados da literatura para a quercitrina.**

H/C	SUBSTÂNCIA G <sup>a1</sup>		QUERCITRINA (CERUKS, 2007) <sup>a2</sup>		QUERCITRINA (SDBS/AIST) <sup>a3</sup>	
	$\delta$ H (ppm) (m, J em Hz)	$\delta$ C (ppm) (multiplicidade)	$\delta$ H (ppm) (m, J em Hz)	$\delta$ C (ppm)	$\delta$ H (ppm)	$\delta$ C (ppm)
2		156,67 (C)		156,9		156,36
3		134,40 (C)		134,6		134,14
4		177,91 (C)		178,1		177,66
5		157,45 (C)		161,7		157,21
6	6,39 (d; 2,0)	98,96 (CH)	6,38 (d; 1,9)	99,2	6,22	98,61
7		164,68 (C)		164,7		164,08
8	6,20 (d; 2,0)	93,87 (CH)	6,19 (d; 1,9)	94,1	6,41	93,55
9		161,49 (C)		157,8		161,21
10		104,18 (C)		104,5		104,01
1'		120,93 (C)		121,1		120,66
2'	7,31 (d; 2,0)	115,66 (CH)	7,21 (d; 1,7)	115,9	7,32	115,37
3'		145,42 (C)		145,6		145,11
4'		148,67 (C)		148,9		148,35
5'	6,87 (d; 8,4)	115,84 (CH)	6,86 (dd; 8,2 e 1,7)	116,0	6,88	115,58
6'	7,26 (dd; 8,2 e 1,8)	121,31 (CH)	7,20 (sl)	121,6	7,27	121,04
1''	5,26 (sl)	102,03 (CH)	5,23 (d; 1,0)	102,2	5,27	101,75
2''	3,98 (s)	70,56 (CH)	3,10 – 3,90 (m)	70,5	3,99	70,29
3''	3,13 – 3,53 (m)	70,78 (CH)		70,8	3,52	70,51
4''		71,39 (CH)		71,6	3,16	71,10
5''		70,26 (CH)		71,0	3,52	69,98
6''	0,82 (d; 6,0)	17,69 (CH <sub>3</sub> )	0,79 (d; 5,2)	17,7	0,83	17,42

<sup>a</sup>Dados obtidos em DMSO-d<sub>6</sub>; <sup>a1</sup> 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ); <sup>a2</sup> 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ); <sup>a3</sup> 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 50 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

### **5.2.5 Elucidação estrutural da substância HH**

A natureza flavonoídica de HH foi confirmada através de análise em CCD utilizando-se o revelador específico NP/PEG.

Não foi possível a obtenção dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  devido à pequena quantidade obtida de HH (0,5 mg). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e COSY foram obtidos para as três amostras e estão mostrados no Anexo A. Os sinais observados ocorreram com deslocamentos químicos característicos de flavonóides glicosilados: região de hidrogênios aromáticos, açúcares e grupos metilênicos.

## **5.3 Doseamento de polifenóis**

### **5.3.1 Doseamento de taninos**

O método para dosagem de taninos empregado no presente trabalho, método de Folin-Denis, baseia-se no caráter redutor dos compostos fenólicos e na capacidade seletiva dos taninos de precipitar proteínas, como o colágeno presente no pó de pele.

A adição do reagente carbonato de sódio promove a formação do íon fenolato, que posteriormente é oxidado por uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico (reagentes Folin-Denis ou Folin-Ciocalteu). Esses últimos, ao serem reduzidos, dão origem a um complexo azul que é quantificado por espectrofotometria de absorção no U.V.. Nesse método inicialmente faz-se a determinação de todos os compostos fenólicos presentes. Numa segunda etapa, os taninos são retirados da solução contendo o extrato através de uma complexação com pó de pele (substrato protéico). Como os taninos precipitam as proteínas presentes no pó de pele é possível avaliar a quantidade de taninos do extrato pela diferença entre os valores encontrados para polifenóis totais (PT) e polifenóis não-adsorvidos pelo pó de pele (PNPP) (CUNHA, BATISTA, 2005).

Existem outros métodos para doseamento de taninos relacionados com a precipitação protéica, os quais utilizam a hemoglobina ou a albumina sérica bovina (CUNHA, BATISTA, 2005).

Empregou-se o pirogalol, um composto fenólico trihidroxilado, para a construção da curva analítica. A equação da curva analítica obtida foi:

$$A = 235,31 C + 0,0641, \text{ onde:}$$

$A$  é a absorbância lida em  $\lambda$  715 nm;

$C$  é a concentração mg/mL, que posteriormente foi convertida para %p/p.

O coeficiente de correlação foi  $r^2 = 0,998$ .

As concentrações encontradas para o doseamento de polifenóis totais e polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele estão apresentadas na **Tabela 15**. Já as concentrações de taninos totais estão apresentadas na **Tabela 16**.

**Tabela 15:** Concentrações (% p/p) de polifenóis (C) e desvios padrões (DP) para determinação de taninos totais no pó, extrato etanólico bruto (EB) e frações de *C. lineatifolia*, expressos como pirogalol.

AMOSTRA/ANÁLISE		CONCENTRAÇÃO (% p/p)			MÉDIA (% p/p) ± DP
		C1	C2	C3	
Pó da Planta	PT	3,881	3,689	3,867	3,812 ± 0,107
	PNPP	0,757	0,708	0,715	0,727 ± 0,027
EB	PT	25,240	25,014	25,382	25,212 ± 0,186
	PNPP	6,655	6,400	6,542	6,532 ± 0,128
Fr. BuOH	PT	19,883	19,656	19,430	19,656 ± 0,227
	PNPP	-0,516	-0,232	-1,876	-0,875 ± 0,878
Fr. AcOEt	PT	24,815	25,099	25,070	24,995 ± 0,156
	PNPP	8,468	8,865	8,298	8,544 ± 0,291
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PT	2,859	2,915	3,142	2,972 ± 0,150
	PNPP	1,442	1,414	1,385	1,414 ± 0,028

**Legenda:** os resultados foram expressos em g de pirogalol / 100 g de amostra (% p/p).  
PT: polifenóis totais; PNPP: polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele.

**Tabela 16:** Concentrações (% p/p) de taninos totais (TT), médias (M) e desvios padrões (DP) para o pó, extrato etanólico bruto (EB) e frações de *C. lineatifolia*.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (% p/p)			M (% p/p)	DP
	TT1	TT2	TT3		
Pó da Planta	3,124	2,982	3,152	3,086	0,091
EB	18,585	18,614	18,840	18,680	0,140
Fr. BuOH	NA	NA	NA	NA	NA
Fr. AcOEt	16,347	16,234	16,772	16,451	0,284
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1,417	1,502	1,757	1,558	0,177

**Legenda:** os resultados foram expressos em g de pirogalol / 100 g de amostra (% p/p).

NA: não aplicável, pois os resultados apresentados na Tabela 15 para polifenóis totais e não adsorvidos pelo pó de pele foram incoerentes.

### **5.3.2 Doseamento de flavonóides**

O doseamento de flavonóides pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio, usado no presente trabalho, se baseia na formação de complexos ácidos estáveis com o grupo cetona em C4 e os grupos hidroxilas em C3 e C5. Além desses, ocorre ainda a formação de complexos com os grupos orto-di-hidroxi presentes nos anéis A ou B. Com a formação dos complexos, ocorre um desvio da absorção para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Com isso, é possível se determinar a quantidade de flavonóides evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos. Esses últimos, mesmo os que formam complexos com o cloreto de alumínio, absorvem em comprimentos de onda bem inferiores, não havendo interferência nas medidas de absorbância dos flavonóides (CAMPOS, 2005; CHANG *et al.*, 2002).

A leitura é feita em espectrofotômetro a  $\lambda$  425 nm, utilizando-se solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%. Flavonóis que possuem grupos hidroxila em C3 e C5, como a galangina, morina e canferol, assim como aqueles com grupos adicionais orto-di-hidroxi, tais como a rutina, quercetina, quercitrina e miricetina, formam complexos com um máximo de absorbância em  $\lambda$  415-440 nm. Entretanto, complexos formados com compostos que possuem apenas grupo hidroxila em C5 e ceto grupo em C4, tais como as flavonas crisina e apigenina, absorvem

respectivamente em  $\lambda$  395 e 385 nm. Outra flavona, a luteolina, que apresenta grupo hidroxila em C5 e grupo orto-di-hidroxi no anel B forma um complexo que apresenta uma forte absorção em  $\lambda$  415 nm. Assim, um problema apresentado pelo doseamento baseado na formação do complexo flavonóide-Al, é o fato de que ele pode causar uma subestimativa em amostras muito ricas em flavonas, dado que os complexos formados por esse grupo podem absorver em comprimentos de onda mais baixos do que  $\lambda$  425 nm. Assim, o emprego desse método resulta numa técnica muito precisa, mas nem sempre exata, dado que pode resultar em determinação do conteúdo de flavonóides abaixo do real (CAMPOS, 2005; CHANG *et al.*, 2002).

Empregou-se a quercetina, um flavonol, para a construção da curva analítica. A equação da curva analítica obtida foi:

$$A = 0,0766 C + 0,0006, \text{ onde:}$$

A é a absorbância lida em  $\lambda$  425 nm;

C é a concentração  $\mu\text{g/mL}$ , que posteriormente foi convertida para %p/p.

O coeficiente de correlação foi  $r^2 = 0,9998$ .

As concentrações encontradas para o doseamento de flavonóides estão apresentadas na **Tabela 17**.

**Tabela 17: Concentrações de flavonóides totais(C), médias (M) e desvios padrões (DP) determinados para o pó, extrato etanólico bruto (EB) e frações de folhas de *C. lineatifolia*.**

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (% p/p)			M (% p/p)	DP
	C1	C2	C3		
Pó da Planta	0,964	0,990	0,992	0,982	0,015
EB	3,946	3,971	3,954	3,957	0,013
Fr. AcOEt	9,378	9,309	9,206	9,298	0,087
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6,277	6,036	6,002	6,105	0,150

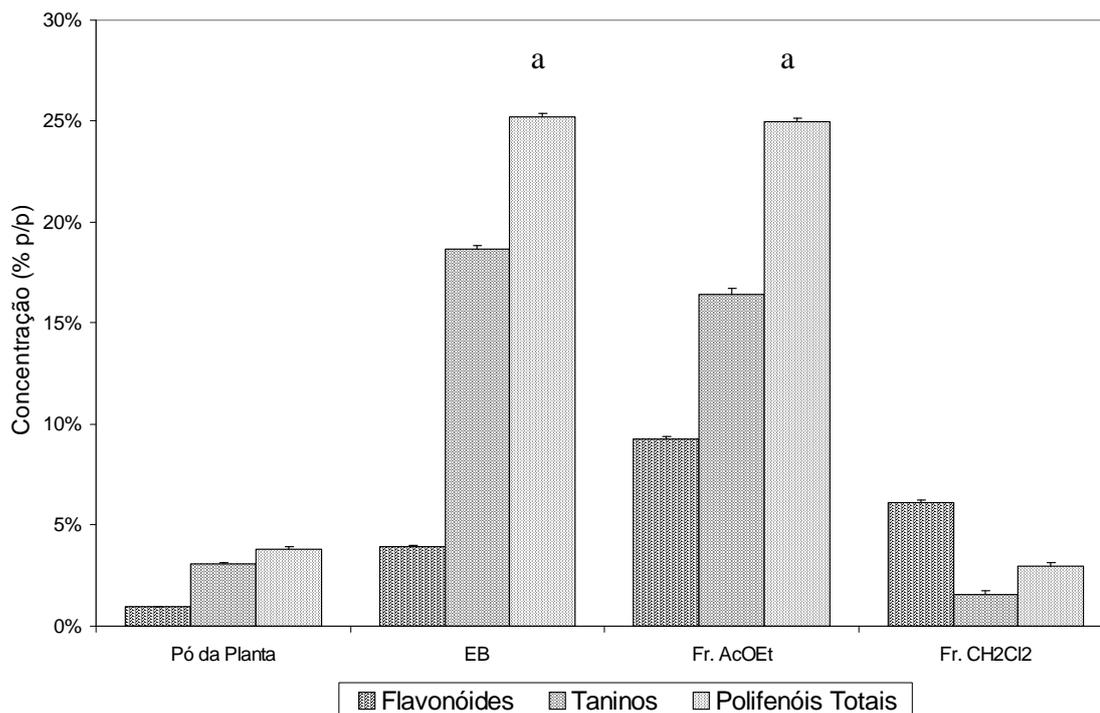
**Legenda:** os resultados foram expressos em g de quercetina / 100 g de amostra (% p/p).

### **5.3.3 Avaliação das concentrações obtidas de polifenóis totais, taninos totais e flavonóides**

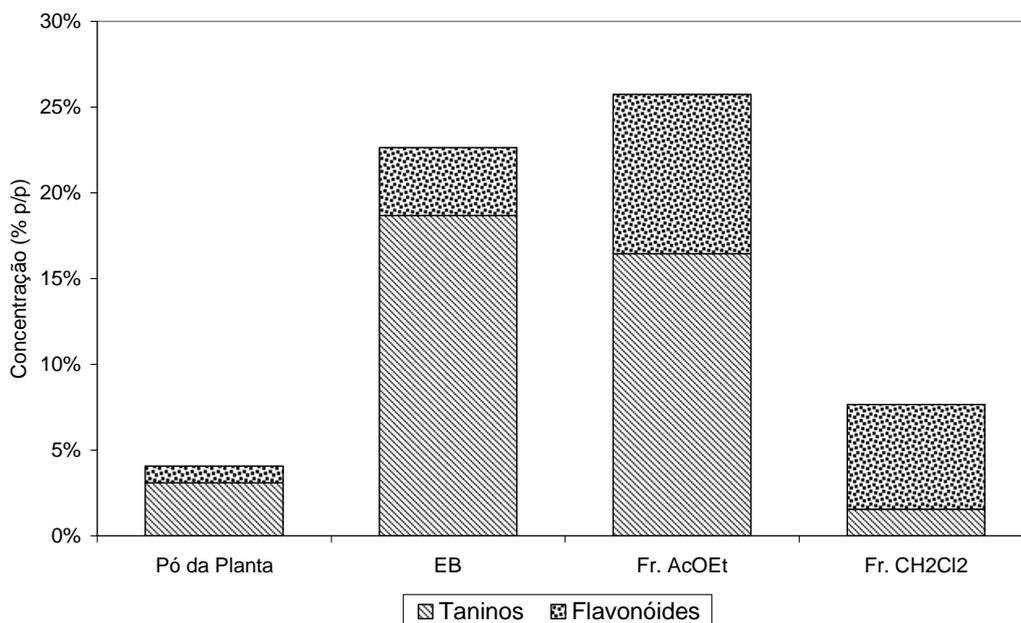
Os resultados encontrados nos doseamentos de taninos e flavonóides são uma estimativa do conteúdo destes compostos em termos de seus equivalentes químicos, pirogalol e quercetina, respectivamente.

Pelos doseamentos realizados, percebe-se que *C. lineatifolia* é rica em compostos fenólicos, apresentando uma maior proporção de taninos em relação aos flavonóides (**Figuras 38 e 39**). EB apresentou concentrações bem mais elevadas de polifenóis totais, taninos totais e flavonóides do que o pó da planta. Isso mostra que a metodologia empregada (percolação com etanol 96° GL) foi eficiente na extração desses componentes a partir das folhas de *C. lineatifolia*.

No presente trabalho, inicialmente tentou-se fazer o isolamento de substâncias a partir da Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, utilizando-se técnicas clássicas de fracionamento, como a coluna aberta de sílica gel. Entretanto, como pode ser visto nos gráficos das **Figuras 38 e 39**, essa fração apresenta concentrações muito baixas de polifenóis quando comparada a Fr. AcOEt, por exemplo. Assim, é justificável que as tentativas de isolamento tenham sido mais bem sucedidas quando se trabalhou com Fr. AcOEt. Um outro fator que contribuiu para isso foi a técnica empregada para os fracionamentos da Fr. AcOEt (cromatografia contracorrente), que evitou problemas como a adsorção na sílica, por exemplo. Essa fração foi a mais rica em flavonóides dentre todas as amostras e a partir dela é que se conseguiu o isolamento de três flavonóides de *C. lineatifolia* (quercitrina, catequina e substância HH).



**Figura 38:** Gráfico comparativo das concentrações (% p/p) determinadas de flavonóides, taninos e polifenóis totais para *C. lineatifolia*: pó da planta, extrato etanólico bruto (EB), Fr. AcOEt e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).  
<sup>a</sup> Resultados estatisticamente equivalentes (p > 0,05).



**Figura 39:** Gráfico comparativo das concentrações (% p/p) estimadas de taninos e flavonóides para *C. lineatifolia*: pó da planta, extrato etanólico bruto (EB), Fr. AcOEt e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Pela análise da **Figura 38**, a Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> apresenta maior concentração de flavonóides do que de polifenóis totais. Entretanto, a concentração de polifenóis totais deveria ser maior que a de flavonóides, uma vez que os flavonóides são uma classe de polifenóis. Possivelmente essa discrepância é devida à metodologia empregada para o doseamento dos polifenóis e taninos totais, que parte de uma solubilização da amostra em água. Como a Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> teve origem na partição com o solvente diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), a solubilização em água foi incompleta, o que gerou um resultado abaixo do esperado para o doseamento de polifenóis e taninos desta fração.

A Fr. BuOH apresentou resultados incoerentes para o doseamento de taninos. As concentrações encontradas de polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele (PNPP) foram negativas, o que impossibilitou o cálculo de taninos totais. Como essa fração teve origem na partição com o solvente n-butanol (BuOH), que apresenta uma alta polaridade, existe a possibilidade de que ela seja a mais rica em taninos dentre as frações obtidas. Os dados experimentais, cujas leituras de absorvâncias obtidas para PNPP foram muito baixas ( $A = 0,055; 0,060; 0,031$ ), corroboram essa hipótese. Entretanto, como esses valores estão fora da curva analítica obtida para o pirogalol e como a metodologia de cálculo para estimativa da concentração é baseada na equação da curva analítica, pode-se explicar porque foram obtidas concentrações negativas para PNPP.

A Fr. Hex. não pôde ser avaliada pelo doseamento de polifenóis e taninos totais, visto que não ocorreu solubilização da amostra no solvente empregado (água).

Todos os doseamentos realizados (polifenóis totais, taninos totais e flavonóides) foram avaliados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey. Levando-se em consideração essa análise estatística dos dados das amostras, verificou-se que a concentração (% p/p) de polifenóis totais foi estatisticamente equivalente entre a Fr. AcOEt e EB ( $p > 0,05$ ). Para as outras frações e para o pó da planta, as concentrações encontradas foram estatisticamente diferentes quando se compararam os dados do mesmo doseamento. Ao se avaliar estatisticamente os doseamentos de taninos totais e flavonóides, conclui-se que as concentrações encontradas foram estatisticamente diferentes entre si. Assim, por exemplo, a

concentração obtida de taninos totais foi estatisticamente diferente para a Fr. AcOEt e EB ( $p < 0,001$ ).

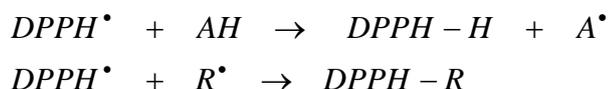
A planta estudada pertence à família Myrtaceae, que é rica em taninos (GOTTLIEB, 1996). Portanto, era esperado que *C. lineatifolia* apresentasse quantidades expressivas de taninos, fato que foi confirmado pelo doseamento de taninos totais no presente trabalho.

Vários estudos envolvendo plantas da família Myrtaceae atestam a presença expressiva de fenóis totais e flavonóides. Entretanto, não foram encontrados estudos desta natureza para *C. lineatifolia*.

#### 5.4 Testes *in vitro* de atividade antioxidante

##### 5.4.1 Seqüestrador de radicais livres (DPPH)

A redução do DPPH pode ser acompanhada pela diminuição na absorbância lida no comprimento de onda característico do radical DPPH. Na sua forma radicalar, o DPPH absorve em  $\lambda$  515-517 nm, mas após sua redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar ( $R^\bullet$ ), a absorção desaparece (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995): As reações radicalares envolvidas podem ser representadas pelas seguintes equações:



A equação da curva analítica do DPPH foi

$$A = 0,0274C + 0,012 ; \text{ onde:}$$

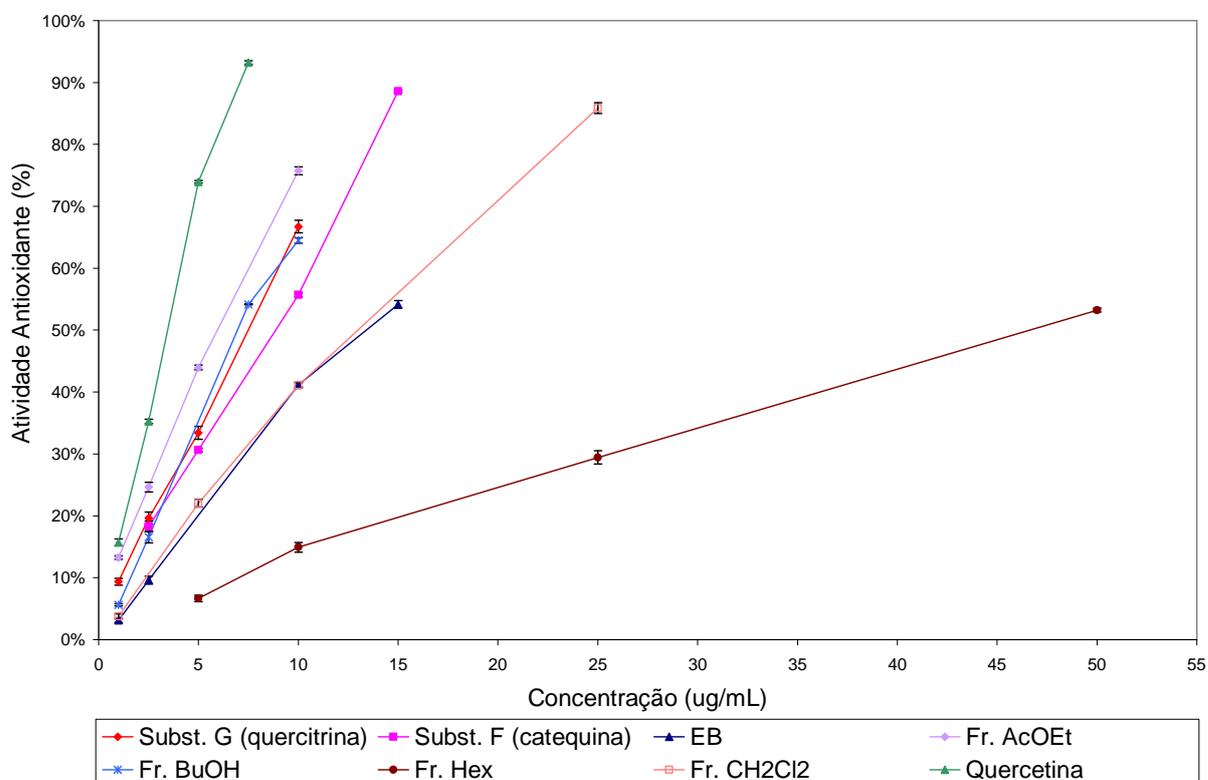
A é a absorbância medida no comprimento de onda de  $\lambda$  515 nm;

C corresponde à concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) de DPPH no meio.

O coeficiente de correlação obtido para a curva analítica foi  $r^2 = 0,9997$ .

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AAO) de *C. lineatifolia* e do controle positivo, em concentrações que variaram de 1 a 15  $\mu\text{g/mL}$  (EB, Fr. AcOEt, Fr. BuOH, substâncias isoladas e quercetina) e de 1 a 50

$\mu\text{g/mL}$  (Fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e Fr. Hex.) determinados pelo ensaio do DPPH, estão apresentados na **Figura 40**. Esses resultados mostram que todas as amostras têm atividade seqüestradora do radical DPPH, contudo a Fr. Hex. é a menos ativa. Essa fração, mesmo quando se testou a concentração de  $50 \mu\text{g/mL}$ , que é bem superior às demais concentrações, alcançou uma atividade de apenas  $53,24 \pm 0,31\%$ . Por outro lado, na concentração de  $15 \mu\text{g/mL}$ , Fr. BuOH, Fr. AcOEt e as substâncias isoladas (catequina e quercitrina) atingiram atividade antioxidante superior a  $80\%$ , com um máximo de  $92,07 \pm 0,12\%$  para a Fr. AcOEt contra  $95,23 \pm 0,01\%$  da quercetina (controle positivo).



**Figura 40:** Gráfico da atividade seqüestradora de radicais livres medidos pelo teste do DPPH para o controle positivo quercetina e para EB, frações e substâncias isoladas de *C. lineatifolia* (folhas). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

Ao se avaliar a atividade antioxidante para a concentração de  $15 \mu\text{g/mL}$ , empregando-se ANOVA e teste de Tukey, obteve-se a seguinte ordem decrescente de AAO%: quercetina ( $95,23 \pm 0,01\%$ ) > Fr. AcOEt ( $92,07 \pm 0,12\%$ ) > substância F - catequina ( $88,57 \pm 0,20\%$ ) > Fr. BuOH ( $84,49 \pm 0,49\%$ ) > substância G - quercitrina ( $83,07 \pm 0,04\%$ ) > EB ( $54,15 \pm 0,61$ ) ( $p < 0,01$ ). As frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e Hex. não foram

avaliadas nessa concentração, mas os valores de AAO% obtidos para a concentração de 50 µg/mL foram, respectivamente,  $91,08 \pm 0,17\%$  e  $53,24 \pm 0,31\%$ .

A massa de cada amostra (EB, frações e substâncias isoladas) necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%,  $CE_{50}$  (**Tabela 18**), variou de  $6,83 \pm 0,04$  a  $37,05 \pm 0,03$  µg/mL. A Fr. AcOEt foi a que apresentou melhor atividade antioxidante, com o menor valor de  $CE_{50}$  e a pior atividade foi a da Fr. Hex. As substâncias isoladas F e G apresentaram boa atividade, com  $CE_{50}$  respectivamente de  $8,20 \pm 0,03$  e  $7,01 \pm 0,20$  µg/mL. Comparativamente, o controle positivo quercetina apresentou  $CE_{50}$  de  $2,34 \pm 0,02$  µg/mL, valor similar ao encontrado por Chua *et al* (2008), que foi de  $2,2 \pm 0,1$  µg/mL. Levando-se em consideração a análise estatística dos dados das amostras feita por ANOVA e teste de Tukey, verificou-se a seguinte ordem crescente nos valores de  $CE_{50}$ : quercetina ( $2,34 \pm 0,02$  µg/mL) < Fr. AcOEt ( $6,83 \pm 0,04$  µg/mL) = substância G -quercitrina ( $7,01 \pm 0,20$  µg/mL) ( $p > 0,05$ ) < substância F - catequina ( $8,20 \pm 0,03$  µg/mL) < Fr. BuOH ( $10,02 \pm 0,05$  µg/mL) < Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( $11,22 \pm 0,10$  µg/mL) < EB ( $13,87 \pm 0,08$  µg/mL) < Fr. Hex. ( $37,05 \pm 0,31$  µg/mL) ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 18:** Valores de  $CE_{50}$  obtidos no teste do seqüestrador de radicais livres DPPH para EB, frações e substâncias isoladas de *C.lineatifolia* e controle positivo quercetina.

AMOSTRA	$CE_{50}$ (µg/mL)
EB	$13,87 \pm 0,08$
Fr. BuOH	$10,02 \pm 0,05$
Fr. AcOEt	$6,83 \pm 0,04^a$
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	$11,22 \pm 0,10$
Fr. Hex.	$37,05 \pm 0,31$
Substância F (catequina)	$8,20 \pm 0,03$
Substância G (quercitrina)	$7,01 \pm 0,20^a$
Quercetina	$2,34 \pm 0,02$

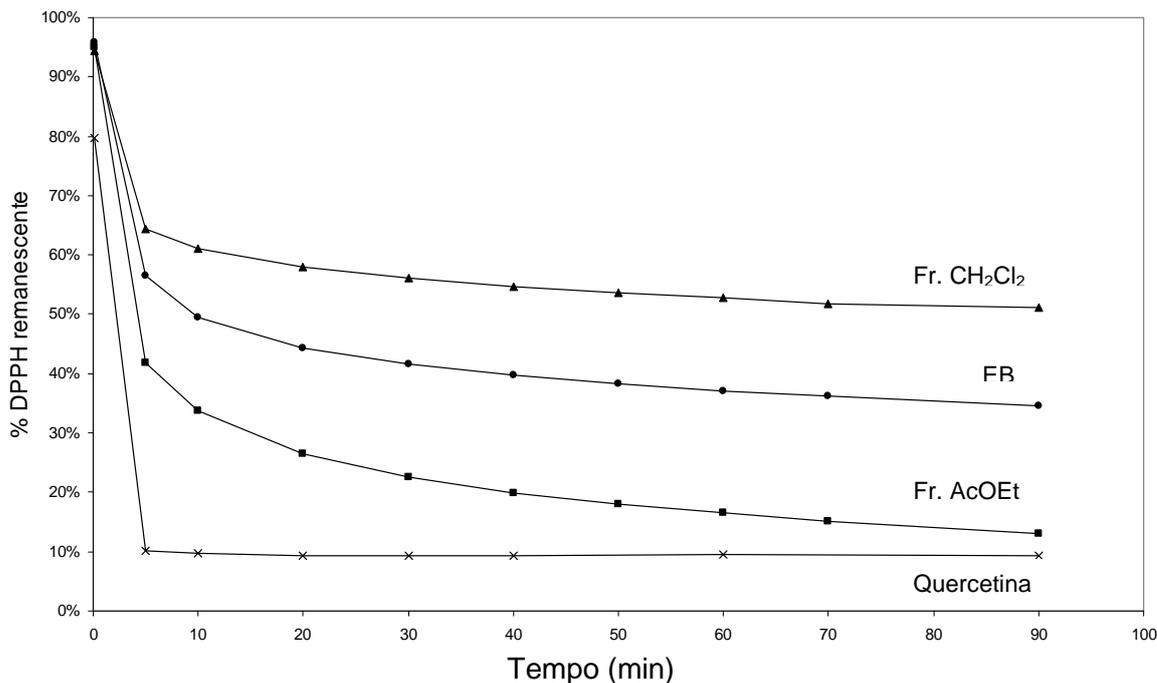
**Legenda:** os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio (n = 3).

<sup>a</sup>Resultados estatisticamente equivalentes ( $p > 0,05$ ).

Comparando-se os resultados de AAO% e de  $CE_{50}$  percebe-se que a Fr. AcOEt foi a que apresentou a melhor atividade frente ao teste do DPPH (Seqüestrador de Radicais Livres), sendo fonte potencial de substâncias sequestradoras de radicais livres. Os flavonóides constituem uma importante classe de metabólitos secundários dos vegetais e são conhecidos por apresentarem

significativa atividade antioxidante. As substâncias isoladas a partir da Fr. AcOEt, catequina (substância F) e quercitrina (substância G) pertencem à classe dos flavonóides, sendo respectivamente um flavanol e um flavonol. Além dessas, isolou-se ainda a substância HH, um flavonóide cuja estrutura não foi elucidada. Dessa forma, os resultados obtidos no teste de DPPH para a Fr. AcOEt são coerentes com a natureza dos constituintes das folhas de *C. lineatifolia* encontrados no presente estudo.

A avaliação do comportamento cinético da Fr. AcOEt, Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e EB das folhas de *C. lineatifolia* indicou uma cinética intermediária, pois as amostras atingiram praticamente o máximo de consumo de DPPH (estado estacionário) no intervalo compreendido entre 1 e 60 minutos (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995). Como descrito por Sánchez-Moreno *et al* (1998), o tempo necessário para alcançar o estado estacionário depende da concentração do antioxidante, assim, uma avaliação da cinética em diferentes concentrações é importante para se definir o comportamento cinético. A **Figura 41** apresenta o comportamento cinético de EB, Fr. AcOEt, Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e do controle positivo quercetina, todos na concentração de 10 µg/mL. Avaliando-se apenas esse gráfico o comportamento da Fr. AcOEt parece ser de cinética lenta, entretanto, ao se avaliar frente a diversas concentrações e com intervalo de tempo até 120 min, como mostrado na **Figura 42 B**, fica evidenciada a cinética intermediária. O mesmo pode ser visto na **Figura 42 A**, que apresenta o comportamento cinético de EB em diferentes concentrações e mostra sua cinética intermediária. A Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e a quercetina apresentam o mesmo comportamento, mas seus gráficos em diferentes concentrações não foram apresentados. O controle positivo quercetina alcança o estado estacionário rapidamente, entretanto, ainda assim deve ser considerado de cinética intermediária, visto que para isso necessita de mais do que 1 minuto.



**Figura 41:** Gráfico do comportamento cinético frente ao DPPH do extrato etanólico bruto (EB); Fr. AcOEt e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *C. lineatifolia* (folhas) e controle positivo quercetina.

Brand-Williams *et al* (1995) relatou que, para amostras com cinética lenta, as quais atingem o estado estacionário em tempos superiores a 60 minutos, a determinação com 30 minutos pode ocasionar erros, uma vez que a reação ainda estará ocorrendo de maneira significativa. Os mesmos autores não fazem menção nesse sentido para as substâncias que apresentam cinética intermediária, ou seja, que atingem o estado estacionário entre 1 e 60 minutos de reação. Assim, como não ocorreram decaimentos significativos na %DPPH<sub>REM</sub> após 30 minutos de reação, pode-se dizer que o teste de DPPH com leituras de absorbância neste tempo não ocasionou erros significativos.

Como mostrado na **Figura 41**, nem todas as amostras atingiram a CE<sub>50</sub> em 30 minutos de reação para a concentração de 10 µg/mL. Assim, para possibilitar a correta determinação, várias concentrações foram testadas até se conseguir aquelas que originavam: a) gráficos lineares de % DPPH<sub>REM</sub> *versus* a concentração das amostras (**Figura 43**); b) uma faixa de % DPPH<sub>REM</sub> que contemplasse a CE<sub>50</sub>. A linearidade e a faixa de % DPPH<sub>REM</sub> conseguidos permitiram o cálculo de CE<sub>50</sub> a partir das equações desses gráficos e da curva analítica de DPPH (metodologia descrita no item 4.13.1, pág. 57). É importante ressaltar que em concentrações mais

elevadas atinge-se o estado estacionário antes dos 30 minutos de reação e o comportamento da amostra deixa de ser linear.

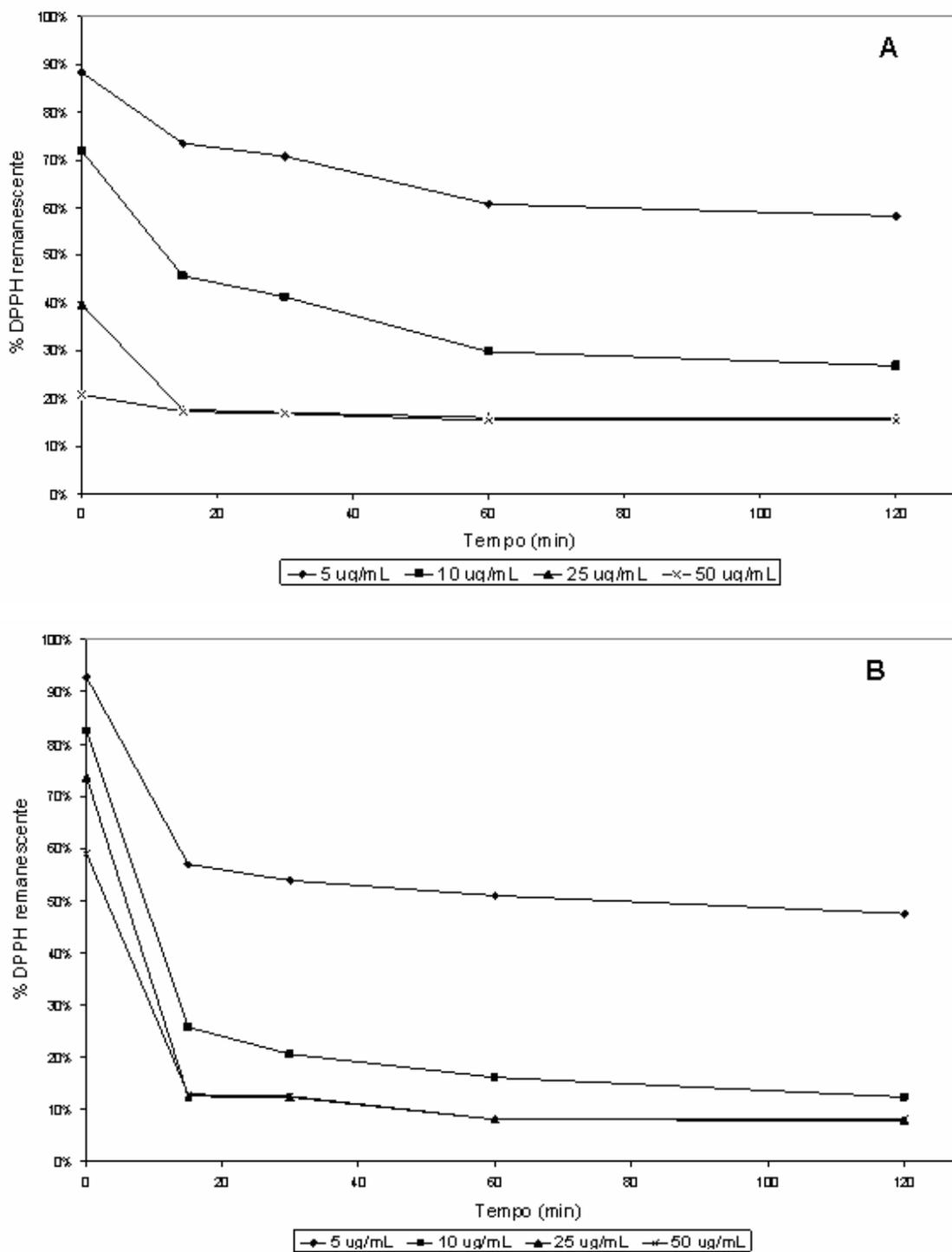


Figura 42: Gráficos do comportamento cinético frente ao DPPH de amostras de *C. lineatifolia* (folhas) em diferentes concentrações: A) extrato etanólico bruto (EB); B) Fr. AcOEt.

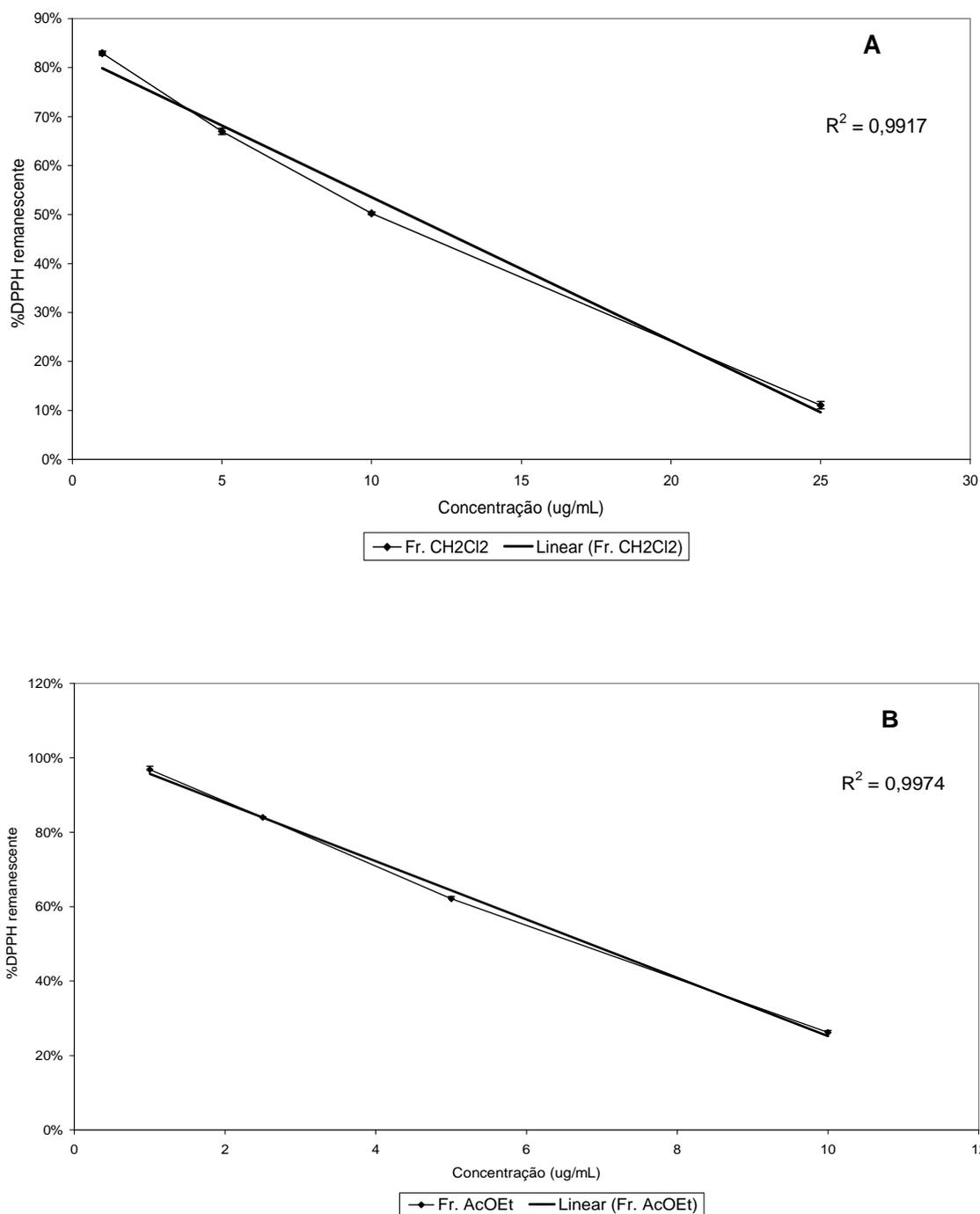
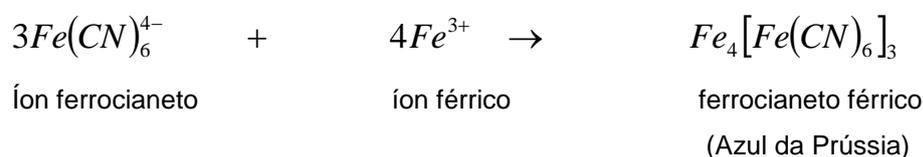


Figura 43: Gráficos do teste de DPPH com tempo reacional de 30 minutos para amostras de *C. lineatifolia* (folhas) em diferentes concentrações: A) Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; B) Fr. AcOEt. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).

### 5.4.2 Poder redutor

O teste do poder redutor baseia-se na redução do íon ferricianeto e formação do complexo ferrocianeto férrico (Azul da Prússia), como descrito por Graham (1992) e mostrado a seguir:



Na primeira equação, PP representa substâncias polifenólicas, as quais participam como agentes redutores na reação de oxidação-redução mostrada. O polifenol (PP) reage com o íon ferricianeto  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  e é oxidado, enquanto  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  é reduzido ao íon ferrocianeto  $[Fe(CN)_6]^{4-}$ . O íon  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  então reage com o íon férrico ( $Fe^{3+}$ ) para formar ferrocianeto férrico ( $Fe_4 [Fe(CN)_6]_3$ ), conhecido como Azul da Prússia (GRAHAM, 1992).

Quando a reação se estende além de 15 minutos, podem ocorrer precipitações devido à coalescência de partículas no complexo Azul da Prússia. Desta forma, é recomendável interromper a reação, com a utilização de reagente específico, após 15 minutos (GRAHAM, 1992). Entretanto, no presente trabalho não se interrompeu a reação, mas optou-se por efetuar as leituras de absorvância exatamente após este tempo.

O poder redutor do extrato bruto etanólico e das frações BuOH, AcOEt,  $CH_2Cl_2$  e Hex., além dos controles positivos (rutina, quercetina e BHT), foram determinados segundo a metodologia descrita por Oyaizu (1986).

A equação da curva analítica de ácido ascórbico foi:

$$A = 0,0148C - 0,0131 ; \text{ onde:}$$

A é a absorvância medida no comprimento de onda de  $\lambda$  700 nm;

C corresponde à concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ácido ascórbico.

O coeficiente de correlação obtido para a curva analítica foi  $r^2 = 0,9932$ .

O padrão ácido ascórbico foi utilizado para se calcular o poder redutor em número de equivalentes-grama de ácido ascórbico em mmol/mg de amostra (**Tabela 19 e Figura 44**). Neste caso, tomou-se o ácido ascórbico como substância de referência em termos de poder redutor, ou seja, uma substância conhecida e que apresenta elevada ação antioxidante através da doação de elétrons.

**Tabela 19:** Equivalentes de ácido ascórbico em mmol/mg de amostra e seus respectivos desvios padrões, calculados pelo teste do Poder Redutor para a concentração de 50 µg/mL de cada amostra.

AMOSTRA	E (mmol/mg)
EB	4,20 ± 0,22
Fr. Hex.	1,15 ± 0,07
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2,60 ± 0,04 <sup>b</sup>
Fr. AcOEt	5,69 ± 0,20 <sup>a</sup>
Fr. BuOH	5,38 ± 0,15 <sup>a</sup>
Rutina	2,93 ± 0,05 <sup>b</sup>
Quercetina	8,19 ± 0,07
BHT	4,98 ± 0,02

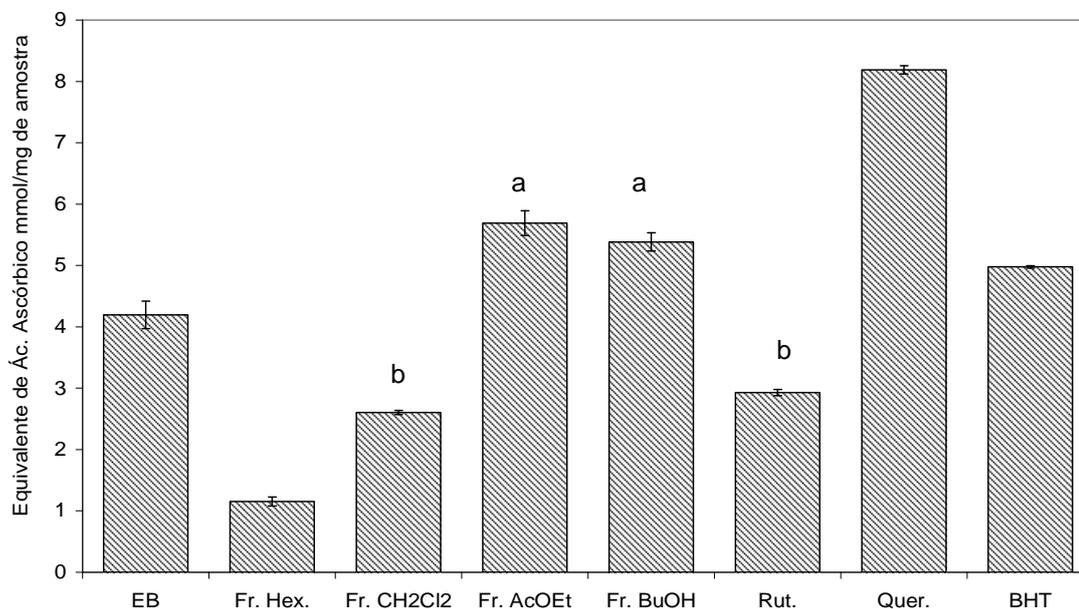
**Legenda:** E: equivalentes de ácido ascórbico. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).

<sup>a,b</sup>Resultados estatisticamente equivalentes (p > 0,05).

No gráfico da **Figura 45** o poder redutor foi apresentado em termos do aumento da absorvância, pela formação de Azul da Prússia, em relação ao aumento da concentração. Todas as equações do poder redutor (y) *versus* concentração da amostra (x) apresentaram coeficientes de correlação ( $r^2$ ) acima de 0,99. Isto indicou que a habilidade redutora se correlacionou bem com as concentrações de cada amostra analisada e, portanto, o poder redutor é proporcional à concentração.

Os valores encontrados para as triplicatas das amostras na concentração de 50 µg/mL foram analisados estatisticamente pelo teste de variância ANOVA e pelo teste de Tukey. Encontrou-se a seguinte ordem decrescente de poder redutor: quercetina (8,19 ± 0,07) > Fr. AcOEt (5,69 ± 0,20) = Fr. BuOH (5,38 ± 0,15) > BHT (4,98 ± 0,02) > EB (4,20 ± 0,22) > rutina (2,93 ± 0,05) = Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,60 ± 0,04) > Fr. Hex. (1,15 ± 0,07). A quercetina apresentou o maior poder redutor (p < 0,001), seguida pelas frações Fr. AcOEt e Fr. BuOH, que foram estatisticamente equivalente (p >

0,05). O poder redutor do controle positivo rutina foi estatisticamente equivalente ao da Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( $p > 0,05$ ) e esta, por sua vez, foi superior à Fr. Hex. ( $p < 0,001$ ).



**Figura 44:** Gráfico do poder redutor para a concentração de 50 µg/mL de EB e frações de *C. lineatifolia* e controles positivos. Resultados expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).

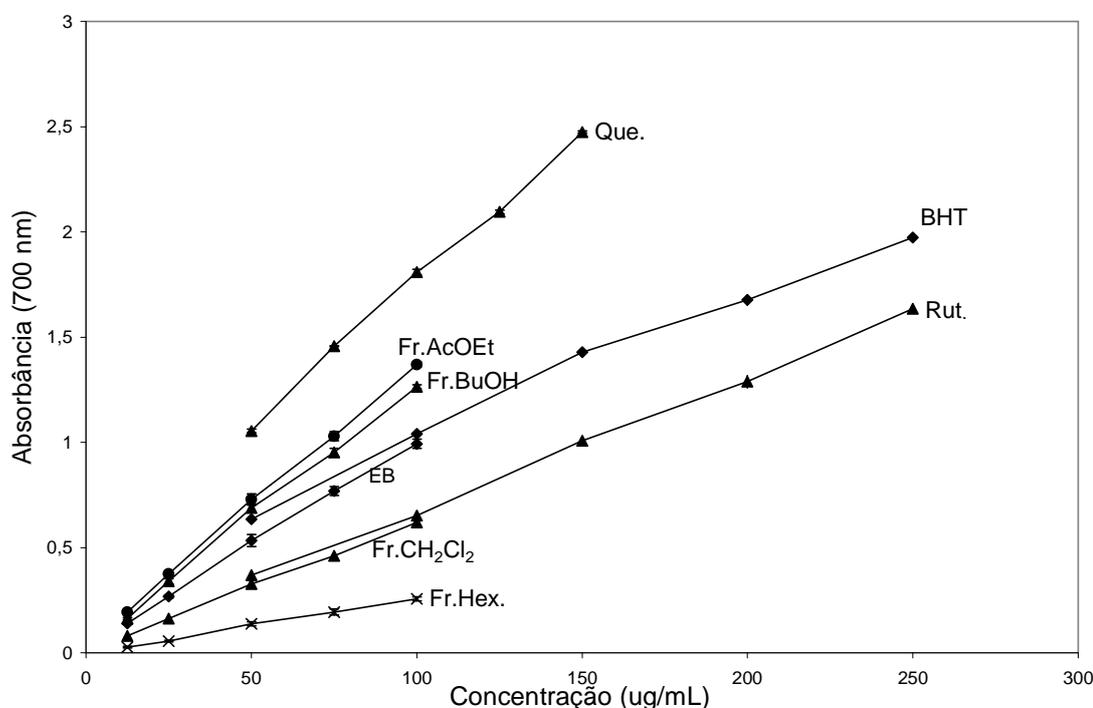
<sup>a,b</sup> Resultados estatisticamente equivalentes ( $p > 0,05$ ).

No gráfico da **Figura 44** o poder redutor foi avaliado para a concentração de 50 µg/mL de EB, frações e controles positivos. Foi observado que as frações mais polares, Fr. BuOH e Fr. AcOEt, apresentaram maior poder redutor. Já as frações menos polares, Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e Fr. Hex, apresentaram menor poder redutor. EB apresentou atividade intermediária, como era esperado, uma vez que ele contém as substâncias presentes em todas as frações. As frações Fr. BuOH e Fr. AcOEt apresentaram atividade superior à dos controles positivos rutina e BHT e inferior à quercetina. Estas observações foram corroboradas pela análise estatística anteriormente apresentada.

O padrão de atividade antioxidante constatado na **Figura 44** é o mesmo verificado na **Figura 45**, com as frações mais polares apresentando maior poder redutor em relação às de menor polaridade. Foi verificado ainda que o poder redutor aumentou com o aumento da concentração, conforme mostrado no gráfico da **Figura 45**.

Comparando-se os resultados do extrato e das frações com os controles positivos, percebeu-se ainda que *Campomanesia lineatifolia* apresenta bom poder

reductor, estimando-se que as principais substâncias com atividade antioxidante por doação de elétrons se encontram nas frações mais polares.



**Figura 45:** Gráfico do poder redutor em diferentes concentrações de EB e frações de *C. lineatifolia* e controles positivos (rutina, quercetina, BHT). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

### 5.4.3 Capacidade Antioxidante

Este teste é baseado na redução de Mo (VI) a Mo (V) pelo analito e na subsequente formação de um complexo verde de fosfato/Mo (V) em pH ácido. A absorbância máxima do complexo ocorre em  $\lambda$  695 nm (PRIETO *et al.*, 1999).

O tempo de reação preconizado é de 90 minutos, pois é o adequado para que ocorra um máximo na produção do complexo de fosfomolibdênio. A reação mostra ainda uma dependência positiva da temperatura, havendo um significativo aumento na formação de complexo em altas temperaturas. A 95°C ocorre a formação de complexo tanto a partir de antioxidantes fortes (vitamina E e ácido ascórbico) quanto daqueles mais fracos (BHT e glutatona reduzida). Isto já não ocorre em

temperaturas mais baixas, como 25-37°C, onde a formação de complexo é seletiva, ocorrendo apenas em presença de antioxidantes fortes (PRIETO *et al.*, 1999).

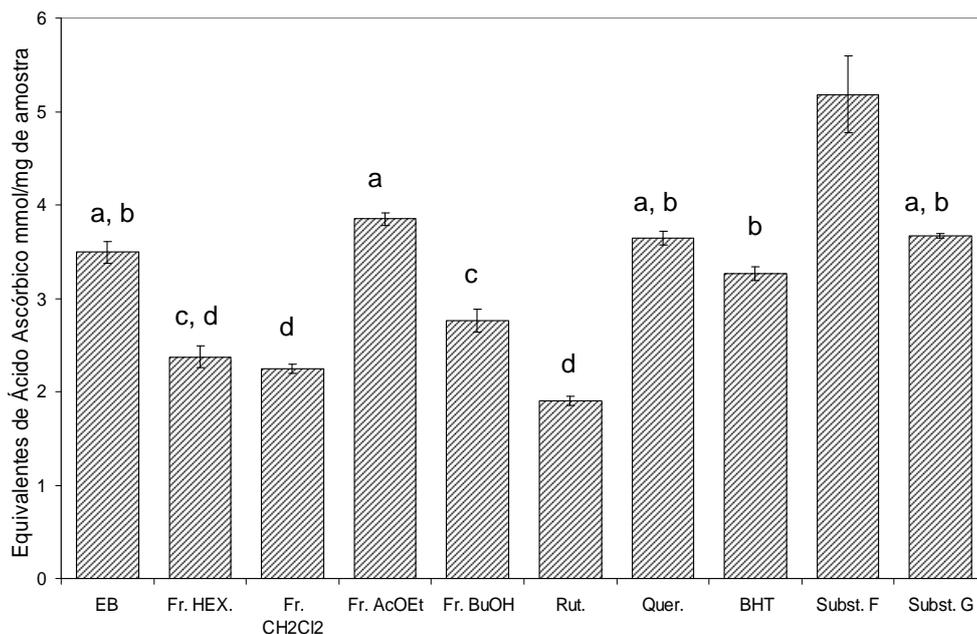
O padrão ácido ascórbico foi utilizado para se calcular a capacidade antioxidante em número de equivalentes-grama de ácido ascórbico em mmol/mg de amostra (**Tabela 20 e Figura 46**). Neste caso, tomou-se o ácido ascórbico como substância de referência em termos de capacidade antioxidante, similarmente ao que foi feito para o teste do Poder Redutor.

**Tabela 20:** Equivalentes de Ácido Ascórbico mmol/mg de amostra e seus respectivos desvios padrões, calculados pelo teste da Capacidade Antioxidante para a concentração de 50 µg/mL de amostra.

AMOSTRA	E (mmol/mg)
EB	3,49 ± 0,12 <sup>a, b</sup>
Fr. Hex.	2,37 ± 0,12 <sup>c, d</sup>
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2,25 ± 0,05 <sup>d</sup>
Fr. AcOEt	3,85 ± 0,06 <sup>a</sup>
Fr. BuOH	2,76 ± 0,12 <sup>c</sup>
Substância F (catequina)	5,18 ± 0,41
Substância G (quercitrina)	3,67 ± 0,02 <sup>a, b</sup>
Rutina	1,91 ± 0,05 <sup>d</sup>
Quercetina	3,64 ± 0,07 <sup>a, b</sup>
BHT	3,26 ± 0,07 <sup>b</sup>

**Legenda:** E: equivalentes de ácido ascórbico. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).

<sup>a, b, c, d</sup>Resultados estatisticamente equivalentes (p > 0,05).



**Figura 46: Gráfico da capacidade antioxidante total para a concentração de 50 µg/mL de EB, frações e substâncias isoladas de *C. lineatifolia* e controles positivos. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 3).**

a, b, c, d Resultados estatisticamente equivalentes ( $p > 0,05$ ).

A equação da curva analítica de ácido ascórbico foi:

$$A = 0,007 C + 0,0838 ; \text{ onde:}$$

A é a absorbância medida no comprimento de onda de  $\lambda$  695 nm;

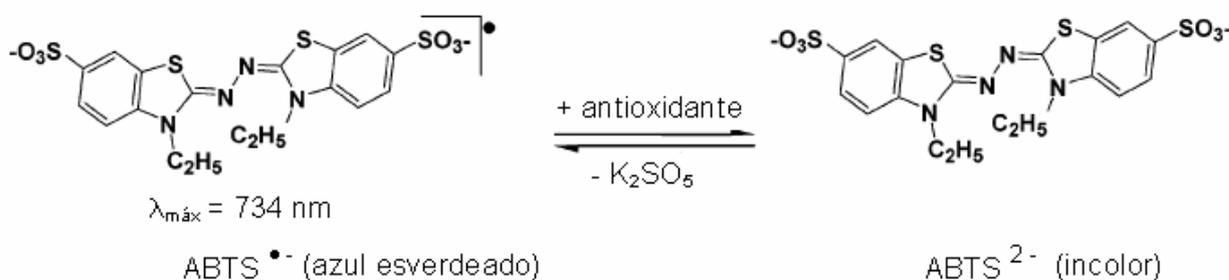
C corresponde à concentração (µg/mL) do ácido ascórbico.

O coeficiente de correlação obtido para a curva analítica foi  $r^2 = 0,9982$ .

Os valores encontrados para as triplicatas das amostras na concentração de 50 µg/mL foram analisados estatisticamente pelo teste de variância ANOVA e teste de Tukey. Com essa análise percebe-se que várias amostras são estatisticamente equivalentes, não sendo possível estabelecer uma ordem decrescente de todas as amostras, pois as equivalências algumas vezes se cruzam e outras não, como poderá ser visto a seguir. Assim tem-se que a substância F (catequina) tem maior capacidade antioxidante do que as outras amostras ( $p < 0,001$ ); a Fr. AcOEt = substância G (quercitrina) = quercetina = EB ( $p > 0,05$ ) e Fr. AcOEt > BHT ( $p < 0,01$ ). Já a substância G (quercitrina), quercetina e EB são estatisticamente equivalentes ao BHT ( $p > 0,05$ ) e estas são maiores que a Fr. BuOH ( $p < 0,05$ ). A Fr. BuOH = Fr. Hex. ( $p > 0,05$ ) e a Fr. Hex. = Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = rutina, mas a Fr. BuOH > Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e rutina ( $p < 0,05$ ). Avaliando-se os controles positivos isoladamente tem-se a seguinte ordem: quercetina = BHT ( $p > 0,05$ ) > rutina ( $p < 0,001$ ).

#### 5.4.4 Ensaio de TEAC

O ensaio de TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) é baseado na descoloração do radical pré-formado  $ABTS^{\bullet+}$ , sendo aplicável a compostos antioxidantes lipofílicos ou hidrofílicos, incluindo flavonóides, hidroxicinamatos e carotenóides. O cátion radical pré-formado é reduzido na presença de compostos antioxidantes (Figura 47) e a concentração de antioxidante e a duração da reação devem ser considerados para determinar a atividade antioxidante (Re *et al.*, 1999).



**Figura 47: Estabilização do radical  $ABTS^{\bullet+}$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. O termo  $ABTS^{\bullet+}$  nesta figura foi apresentado como  $ABTS^{\bullet+}$ . Adaptado de Huang *et al.* (2005) e van den Berg *et al.* (1999).**

A equação da curva do padrão Trolox foi:

$$I = 0,0015C + 0,0037 ; \text{ onde:}$$

$I$  corresponde a % Inibição do  $ABTS^{\bullet+}$ ;

$C$  é a concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) do Trolox.

O coeficiente de correlação obtido para a curva do Trolox foi  $r^2 = 0,9981$ .

As leituras de absorbância foram feitas a  $\lambda$  734 nm, após 5 min. de reação da amostra com a solução de  $ABTS^{\bullet+}$ . Foram utilizadas amostras em várias concentrações, o que permitiu a construção da curva de % Inibição em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ). O valor de TEAC foi obtido pela razão entre os valores das inclinações das curvas de % Inibição das amostras e do padrão Trolox .

Os valores de % Inibição encontradas para a concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  das amostras e os valores de TEAC foram coerentes entre si: os maiores valores de TEAC também foram os que apresentaram maiores % Inibição. A seguinte ordem decrescente de % Inibição foi definida: quercetina ( $93,83\% \pm 0,59$ ) > Fr. BuOH

(50,03%  $\pm$  0,49) > Fr. AcOEt (43,85%  $\pm$  2,32) = rutina (41,33%  $\pm$  2,04) > EB (31,21%  $\pm$  0,49) > Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25,37%  $\pm$  0,41) > Fr. Hex. (9,31%  $\pm$  0,50). As amostras foram consideradas estatisticamente equivalentes quando  $p > 0,05$ . Os resultados de % Inibição obtidos se encontram descritos na **Tabela 21**, assim como os valores de TEAC. A **Figura 48** apresenta um gráfico comparativo dos valores de TEAC.

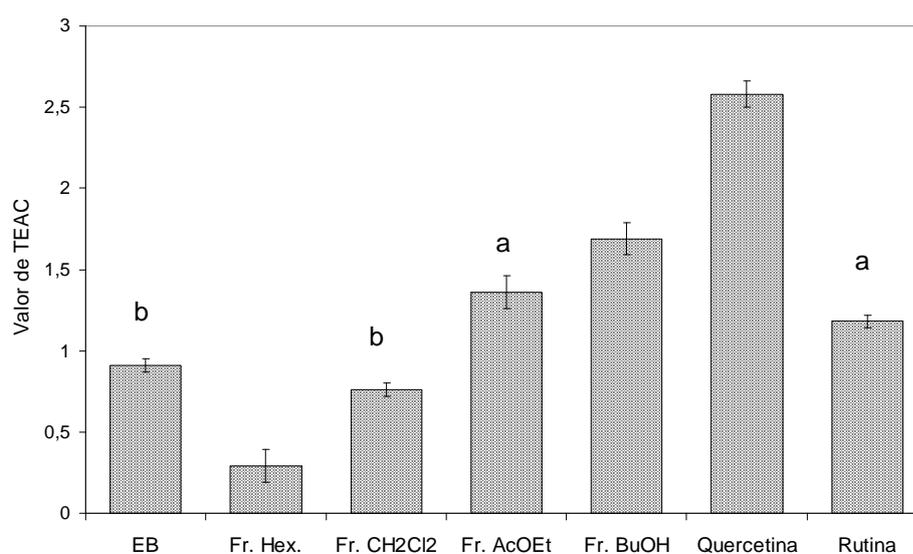
O valor de TEAC encontrado para o controle positivo quercetina é semelhante ao descrito por Re *et al.* (1999), que obteve valor de TEAC = 3,03 para o tempo de 4 minutos de reação com o cátion radical ABTS<sup>•+</sup>.

**Tabela 21: Comparação entre os valores de TEAC e a % Inibição da absorbância do radical ABTS<sup>•+</sup> para a concentração de 200  $\mu$ g/mL das amostras.**

AMOSTRA	Valor de TEAC	% Inibição
EB	0,91 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	31,21 $\pm$ 0,49
Fr. Hex.	0,29 $\pm$ 0,10	9,31 $\pm$ 0,50
Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,76 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	25,37 $\pm$ 0,41
Fr. AcOEt	1,36 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	43,85 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>
Fr. BuOH	1,69 $\pm$ 0,10	50,03 $\pm$ 0,49
Quercetina	2,58 $\pm$ 0,08	93,83 $\pm$ 0,59
Rutina	1,18 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	41,33 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>

**Legenda:** os resultados de % Inibição foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

<sup>a,b</sup> Resultados estatisticamente equivalentes ( $p > 0,05$ ).



**Figura 48: Gráfico do valor de TEAC para EB e frações de *C. lineatifolia* e controles positivos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).**

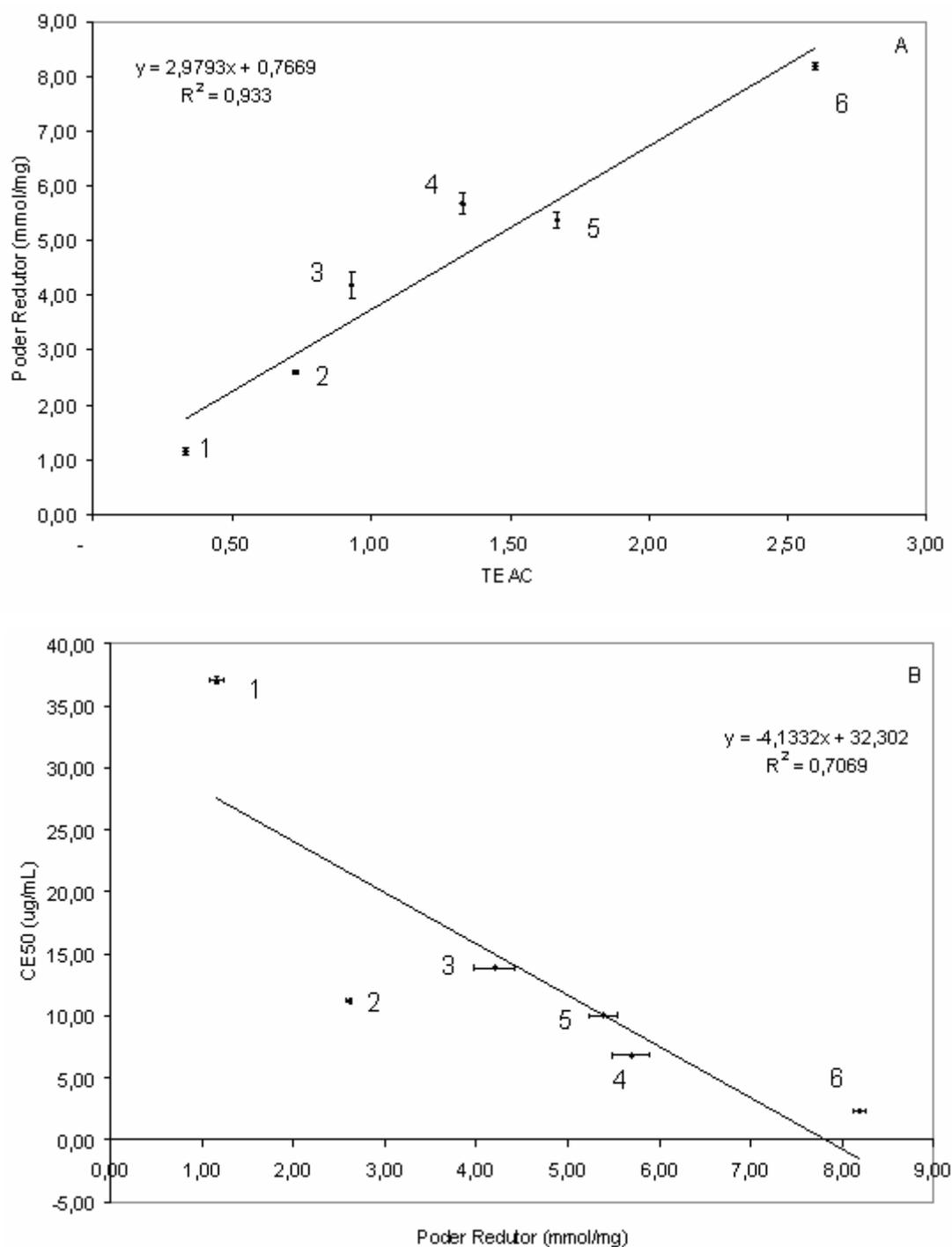
<sup>a,b</sup> Resultados estatisticamente equivalentes ( $p > 0,05$ ).

#### **5.4.5 Atividade Antioxidante de *C. lineatifolia***

Para se verificar a existência de relação linear entre os testes antioxidantes realizados foi aplicado o teste de Pearson, cujo coeficiente de correlação  $r$  pode variar de +1 a -1. Quanto mais próximo de -1 ou 1, mais forte é a relação linear entre as variáveis. O valor de  $r$  próximo de -1 indica relação inversa entre as variáveis, mas se for próximo de 1, a relação é direta. Valores tendendo a zero indicam correlação muito fraca (MOTULSKY, 2003).

Avaliou-se a correlação entre os quatro testes, sendo que para Seqüestrador de Radicais Livres (DPPH) e Capacidade Antioxidante os resultados relativos às substâncias isoladas F e G também foram considerados. As seguintes correlações de Pearson foram obtidas: TEAC *versus* Poder Redutor ( $r = 0,97$ ), DPPH *versus* Poder Redutor ( $r = -0,84$ ), TEAC *versus* DPPH ( $r = -0,77$ ), Capacidade Antioxidante *versus* Poder Redutor ( $r = 0,77$ ), TEAC *versus* Capacidade Antioxidante ( $r = 0,59$ ), DPPH *versus* Capacidade Antioxidante ( $r = -0,51$ ). A **Figura 49** apresenta alguns dos gráficos de correlação entre os testes de atividade antioxidante, bem como o coeficiente de correlação  $r^2$  obtido após regressão linear da curva.

Foram obtidas correlações fortes entre os testes TEAC e Poder Redutor; DPPH e Poder Redutor; TEAC e DPPH; Capacidade Antioxidante e Poder Redutor. Assim, pode-se perceber que o teste do Poder Redutor se correlacionou bem com todos os outros testes, já os testes TEAC e DPPH *versus* Capacidade Antioxidante não apresentaram correlação linear forte.



**Figura 49:** Gráficos das correlações entre os testes de atividade antioxidante: A) TEAC versus poder redutor; B) poder redutor versus seqüestrador de radicais livres (DPPH). 1 - fr. Hex., 2 - fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 3 - EB, 4 - fr. AcOEt, 5 - fr. BuOH, 6 - quercetina. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

Para todos os testes realizados foi possível perceber uma elevada atividade antioxidante para as frações mais polares (Fr. BuOH e Fr. AcOEt) e uma menor atividade para as frações menos polares (Fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e Fr. Hex.), o que indica que as

substâncias com maior atividade antioxidante se encontram nas frações mais polares. De modo geral EB apresentou atividade intermediária em todos os testes, mostrando que as substâncias antioxidantes ainda não estavam concentradas, fato que ocorreu após a partição em solventes de diferentes polaridades, resultando em atividades mais expressivas das frações mais polares, como já mencionado.

O doseamento de flavonóides foi realizado para o pó da planta, EB e as frações Fr. AcOEt e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Como não foram realizados testes de Atividade Antioxidante para o pó da planta, não foi possível a realização do teste de Pearson. Este necessita de pelo menos quatro grupos de dados e havia apenas três grupos para serem comparados (EB, Fr. AcOEt e Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Desta forma, avaliou-se a relação entre o doseamento de flavonóides e os testes antioxidantes utilizando-se o coeficiente de correlação  $r^2$ . Conseguiu-se boa correlação entre a concentração de flavonóides e o teste DPPH, com  $r^2 = 0,9992$ ; já para o teste TEAC o  $r^2$  foi 0,5408, não podendo ser considerada uma correlação forte. Para todos os outros testes as correlações obtidas foram menores. NEERGHEEN *et al.*, (2006) relataram correlação fraca entre o teste de TEAC e a concentração obtida de flavonóides.

Não foi encontrada correlação entre os testes realizados e as concentrações obtidas de taninos e polifenóis totais. Além disso, o resultado do doseamento de flavonóides foi superior ao de polifenóis totais para a fração Fr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, contrariando a lógica esperada. O doseamento de taninos e polifenóis totais possivelmente deveria ter sido realizado com alguma modificação, tal como a solubilização do extrato e das frações em etanol, ou ainda pelo emprego da técnica com o reagente Folin-Ciocalteu.

Da fração Fr. AcOEt resultante da partição de EB de *C. lineatifolia* no solvente acetato de etila foram isoladas as substâncias F e G que, após elucidação estrutural, foram identificadas como sendo, respectivamente, a catequina (flavanol) e a quercitrina (flavonol). Realizaram-se os testes de Capacidade Antioxidante e DPPH para essas substâncias, que apresentaram resultados bastante satisfatórios em ambos os testes.

De acordo com Rice-Evans *et al.* (1996), os polifenóis derivados de plantas são substâncias multifuncionais, podendo atuar como agentes redutores e doadores de hidrogênio (H<sup>\*</sup>), pela transferência de elétron. A estrutura catecol (orto-dihidroxila), a qual possui dois grupos hidroxila em posições vizinhas é marcadamente mais eficiente que as demais posições em doar elétrons, assim, os

flavonóides que apresentam a estrutura catecol podem exercer uma poderosa atividade antioxidante. Ainda segundo os mesmos autores, a glicosilação dos flavonóides reduz sua atividade antioxidante quando comparado com a aglicona correspondente. Tais fatos explicam as elevadas atividades antioxidantes obtidas no presente trabalho tanto para a quercetina (controle positivo) quanto para a quercitrina. Explicam também porque a atividade da quercetina foi maior que a atividade obtida para a quercitrina (Substância G), seu derivado glicosilado. Assim, no teste Sequestrador de Radicais Livres (DPPH) o valor de  $CE_{50}$  para a quercetina foi  $2,34 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$  e para a quercitrina foi de  $7,01 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ .

A catequina (substância F) por sua vez apresentou resultados muito expressivos de atividade antioxidante nos testes de Capacidade Antioxidante e DPPH. Comparando-se os valores de  $CE_{50}$  da quercetina, quercitrina e da catequina percebe-se que essa última apresentou uma menor atividade antioxidante. Para o teste do DPPH o valor de  $CE_{50}$  encontrado foi de  $8,20 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ , o que é condizente com sua estrutura, a qual não apresenta a carbonila na posição 4 do anel C e nem ligação dupla entre os carbonos das posições 2 e 3. A saturação do anel heterocíclico é responsável pela ausência de deslocalização dos elétrons entre os anéis A e B e uma conseqüente menor atividade antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Não foram encontrados estudos de atividade antioxidante para *Campomanesia lineatifolia*. Entretanto, existem diversos estudos de plantas da família Myrtaceae os quais apresentaram resultados promissores de atividade antioxidante. TACHAKITTIRUNGROD *et al.* (2007) estudaram a atividade antioxidante do extrato etanólico de 24 diferentes espécies comumente encontradas na Tailândia. Dentre todas as espécies analisadas, de diferentes famílias, a maior atividade antioxidante foi encontrada para a espécie *Psidium guajava*, da família Myrtaceae. Avaliando-se a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas das diversas espécies pelo teste de TEAC, o menor valor obtido foi  $0,397 \pm 0,022 \text{ mM/mg}$ , para *Andrographis paniculata* (família Acanthaceae). Já o maior valor foi  $4,91 \pm 0,050 \text{ mM/mg}$ , para *Psidium guajava*. NEERGHEEN *et al.* (2006) avaliaram a atividade antioxidante de 11 espécies das famílias Rubiaceae e Myrtaceae, sendo 3 espécies da primeira família e 8 da última. As espécies da família Myrtaceae apresentaram as maiores atividades antioxidantes, de acordo com diferentes testes de atividade *in vitro*. Para o teste de TEAC, o menor valor foi obtido para a espécie

*Fernelia buxifolia*, da família Rubiaceae:  $309 \pm 7,07$   $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox/g de planta fresca. Já o maior valor foi obtido para a espécie *Syzygium commersonii*, da família Myrtaceae:  $1485 \pm 40,71$   $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox/g de planta fresca. Já Silva *et al.* (2007) conduziram estudos de atividade antioxidante de 15 espécies de plantas encontradas na região amazônica e utilizadas na medicina popular. Dentre as espécies avaliadas, *Eugenia patrisii* pertence à família Myrtaceae. A atividade antioxidante do extrato das folhas foi avaliado para 11 das 15 espécies, segundo o teste de TEAC, dentre outros. O resultado encontrado para a espécie foi de  $100,4 \pm 2,5$   $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox/g de planta fresca. Dentre as 11 espécies avaliadas, o menor valor encontrado foi de  $35,9 \pm 22,6$  e o maior foi  $347,1 \pm 0,7$ , ambos os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox/g de planta fresca. Observa-se que o resultado de atividade antioxidante para *Eugenia patrisii* foi maior ou similar ao resultado obtido para 6 das 11 espécies estudadas.

Segundo Campos (2005) a substância isolada quercitrina apresenta reconhecida atividade antidiarréica, o que vem a corroborar a utilização etnofarmacológica como antidiarréico descrita para o gênero *Campomanesia* por Correa (1984). A outra substância isolada, catequina, é um dos componentes do chá verde e um contribuidor da reconhecida atividade antioxidante desse chá (RICE-EVANS, 1996).

## 6 CONCLUSÃO

A planta *Campomanesia lineatifolia* é rica em polifenóis, com quantidades expressivas tanto de taninos ( $\approx 18\%$  para o extrato etanólico) quanto de flavonóides ( $\approx 9\%$  para a Fr. AcOEt). A presença de flavonóides foi confirmada não apenas no doseamento realizado, mas também pelas análises fitoquímicas das frações Fr. AcOEt e Fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

*Campomanesia lineatifolia* apresentou elevada atividade antioxidante em todos os quatro testes antioxidantes *in vitro*. Os melhores resultados foram obtidos para as frações Fr. BuOH e Fr. AcOEt. No teste do DPPH, elas apresentaram  $\text{CE}_{50}$  de  $10,02 \pm 0,05$  e  $6,83 \pm 0,04$   $\mu\text{g/mL}$  e no ensaio de TEAC,  $1,69 \pm 0,10$  e  $1,36 \pm 0,10$ , respectivamente.

Duas substâncias foram isoladas e identificadas por técnicas espectroscópicas, a catequina (flavanol) e a quercitrina (flavonol). Ambas apresentaram atividade antioxidante. Para o teste de DPPH obteve-se  $\text{CE}_{50}$  de  $8,20 \pm 0,03$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $7,01 \pm 0,20$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente para a catequina e quercitrina.

Como a planta estudada se mostrou rica em fenóis e os estudos desenvolvidos até o momento mostraram boa atividade antioxidante, sugere-se que estes dois fatores estejam relacionados às suas utilizações etnofarmacológicas como antidiarréico, antiúlcera gástrica e cicatrizante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATI, R. T.; OHARA, M. T.; FERRO, V. C. Óleo Essencial de *Campomanesia phaea* (Myrtaceae): Avaliação de Atividade Antimicrobiana. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 36, supl. 1, p. 56, 2000.

AHMAD, S. (Ed.). *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. New York: Chapman & Hall, 1995. 457 p.

ARTS, M. J. T. J.; DALLINGA, J. S.; VOSS, H.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry*, v. 80, p. 409-414, 2003.

APAK, R.; GÜÇLÜ K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S. E.; BEKTAŞOĞLU, B.; BERKER, K. I.; ÖZYURT, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, v. 12, 1496-1547, 2007.

BERKER, K. I., GÜÇLÜ, K.; TOR, I.; APAK, R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, v. 72, p. 1157–1165, 2007.

BIAVATTI, M. W., FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, p. 385-389, 2004.

BONILLA, A.; DUQUE, C.; GARZÓN, C.; TAKAISHI, Y.; YAMAGUCHI, K.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Phytochemistry*, v. 66, p. 1736-1740, 2005.

BOTSARIS, A. S. Pesquisa e Produção de Fitoterápicos pela Indústria. In: BRANDÃO, M. G. L. (Org.). *Plantas Medicinais e Fitoterapia*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. p. 67-74.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. *A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006a. 147 p.

BRASIL. *Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006b. 59 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 17 de 24/02/2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, seção 1, 25, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 48 de 16/03/2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, seção 1, 39, 2004.

CAMPOS, M. G. Flavonóides. In: CUNHA, A. P. *et al.* (Org.). *Farmacognosia e Fitoquímica*. 1. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. Cap. 13, p. 238-289.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 10, p.178-182, 2002.

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

CHUA, M.; TUNG, Y.; CHANG, S.. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1918–1925, 2008.

CORREA, M. P., PENNA, L. A.. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 6v.

CUNHA, A. P.; BATISTA, M. T. Taninos. In: CUNHA, A. P. *et al.* (Org.). *Farmacognosia e Fitoquímica*. 1. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. Cap. 14, p. 290-316.

DAVIS, A. L.; CAI, Y.; DAVIES, A. P.; LEWIS, J. R.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 34, p. 887-890, 1996.

DI STASI, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Universidade Estadual Paulista - Campus Marília, 1996. 230 p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4<sup>a</sup> ed.. Parte II. Quarto fascículo. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 176.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4<sup>a</sup> ed.. Parte II. Terceiro fascículo. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 134.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal Science of Food Agriculture*, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 801-805, 1992.

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R.M.B. *Biodiversidade – Um Enfoque Químico Biológico*. Rio de Janeiro: Editora da UFRJ, 1996.

HAENEN, G. R. M. M.; ARTS, M. J. T. J.; BAST, A.; COLEMAN, M. D. Structure and activity in assessing antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*: A critical appraisal illustrated with the flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 21, p. 191-198, 2006.

HEYWOOD, V.H. *Flowering Plants of the World*. London:Oxford University Press , 1993. 335 p.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53 (6), p. 1841-1856, 2005.

LANDRUM, L. R. *Flora Neotropica*; monograph 45. New York: The New York Botanical Garden, 1986. 178 p.

LEITÃO, G. G.; EL-ADJI, S. S.; MELO, W. A. L.; LEITÃO, S. G.; BROWN, L. Separation of free and glycosylated flavonoids from *Siparuna guianensis* by gradient and isocratic CCC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 28 (12&13), p. 2041-2051, 2005.

LORENZI, H. *Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas: (de consumo in natura)*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2006. 670p.

LEE, S. K.; MBWAMBO, Z. H.; CHUNG, H.; LUYENGI, L.; GAMEZ, E. J.; MEHTA, R. G.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High-Throughput Screening*, v. 1, p. 35-46, 1998.

LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; SOBRAL, M.; MORENO, P. R. H.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C. Aromatic plants from Brazil. XI. Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia lineatifolia* species (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 13, p. 113-115, 2001.

MABRY, Tom J; MARKHAM, K. R; THOMAS, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. New York: 1970. 354p.

MAHADY, G. B. Global harmonization of herbal health claims. *The Journal of Nutrition*, v 131, p. 1120S-1123S, 2001.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 55-57, 2004.

MARKMAN, B. E. O.; BUGNO, A.; OHARA, M. T.; KATO, E. T. M.. Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico de *Campomanesia xanthocarpa* (Martius) Berg. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 36, n. 1, p. 55, 2000.

MARTÍNEZ-RICHA, A.; JOSEPH-NATHAN, P. Carbon-13 CP-MAS nuclear magnetic

resonance studies of teas. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, v. 23, p. 119-135, 2003.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. *Journal of Chromatography*, v. 658, p. 315-341, 1994.

MOTULSKY, H. Statistics guide: Statistical analyses for laboratory and clinical researches. San Diego: GraphPad Software, 2003. 146 p.

NEERGHEEN, V. S.; SOBRATTEE, M. A.; BAHORUN, T.; ARUOMA, O. I. Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities *in vitro*. *Journal of Plant Physiology*, v. 163, p. 787-799, 2006.

OSORIO, C.; ALARCON, M.; MORENO, C.; BONILLA, A.; BARRIOS, J.; GARZON, C.; DUQUE, C. Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 509-516, 2006.

ORRENIUS, S. Mechanisms of oxidative cell damage: an overview. In: PAOLETTI, R. *et al.* (Org.). *Oxidative Processes and Antioxidants*. 1 ed. New York: Raven Press, 1994, p. 53-71.

OYAIZU, M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon ShoKuhin Kogyo Gakkaishi*, v. 35, p. 771–775, 1986.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, p. 337–341, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53 (10), 4290-4302, 2005.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v.26, p.1231–1237, 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20 (7), p. 933-956, 1996.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of Science and Food Agricultural*, v. 76, p. 270-276, 1998.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia*, v. 66 (4), p. 373-374, 1995.

SCOTT, A. I. *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products*. London: Pergamon Press, 1964. 443 p.

SDBS, Spectral Database for Organic Compounds / AIST, Advanced Industrial Science and Technology. Disponível em <[http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)>, acesso em 18 de janeiro de 2009.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, S. L. *Modelagem molecular de derivados fenilpirazólicos e flavonóides inibidores da xantina oxidase*. Tese de Doutorado. Campinas, SP: [s.n], 2003. 173 p.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from Amazonian region. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. *Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Ed. da Universidade/UFRGS, 1988. 174p.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOJI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, v. 103, p. 381-388, 2007.

THEODOLUZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of paraguayan Myrtaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 27, p 179-183, 1988.

TOORU, K. Oxidized LDL and atherosclerosis. *Journal of Japanese College of Angiology*, v. 42 (12), p. 931-936, 2002.

VALLILO, M. I.; GARBELOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L. C. A.. Características Físicas e Químicas dos Frutos do Cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 27 (2), p. 241-244, 2005.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, v. 66, p. 511-517, 1999.

VISIOLI, F.; PETRONI, A.; GALLI, C. Phenolic compounds extracted from olive oil prevent oxidation of low-density lipoproteins and inhibit platelet function and platelet and leukocyte eicosanoid production *in vitro*. In: PAOLETTI, R. *et al.* (Org.). *Oxidative Processes and Antioxidants*. 1 ed. New York: Raven Press, 1994. p. 199-206.

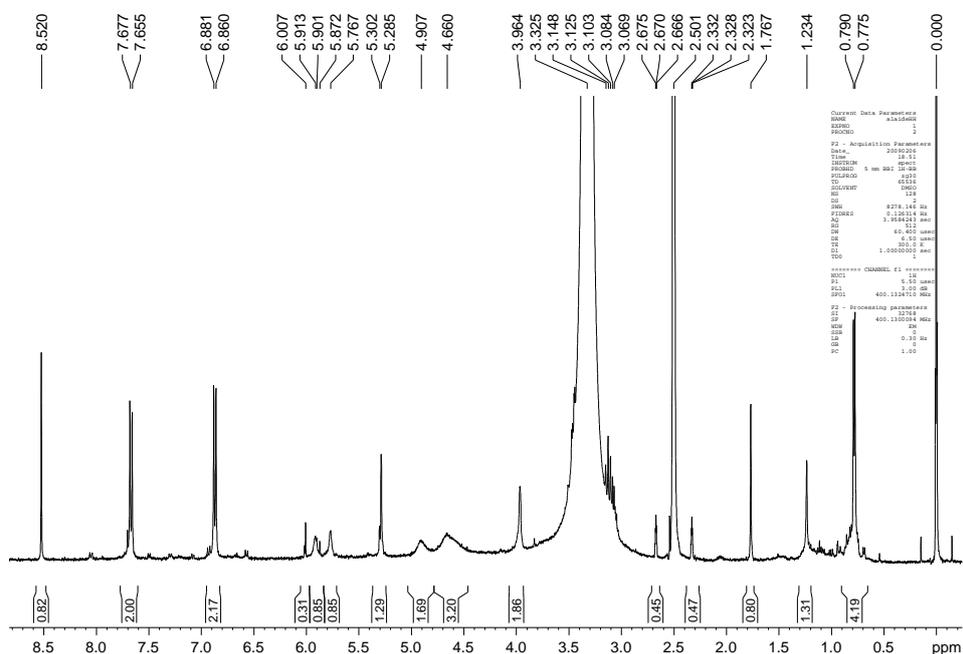
WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. M.. *Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer, 1984. 320 p.

WANG, L.; TU, Y.; LIAN, T.; HUNG, J.; YEN, J.; WU, M. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 9798-9804, 2006.

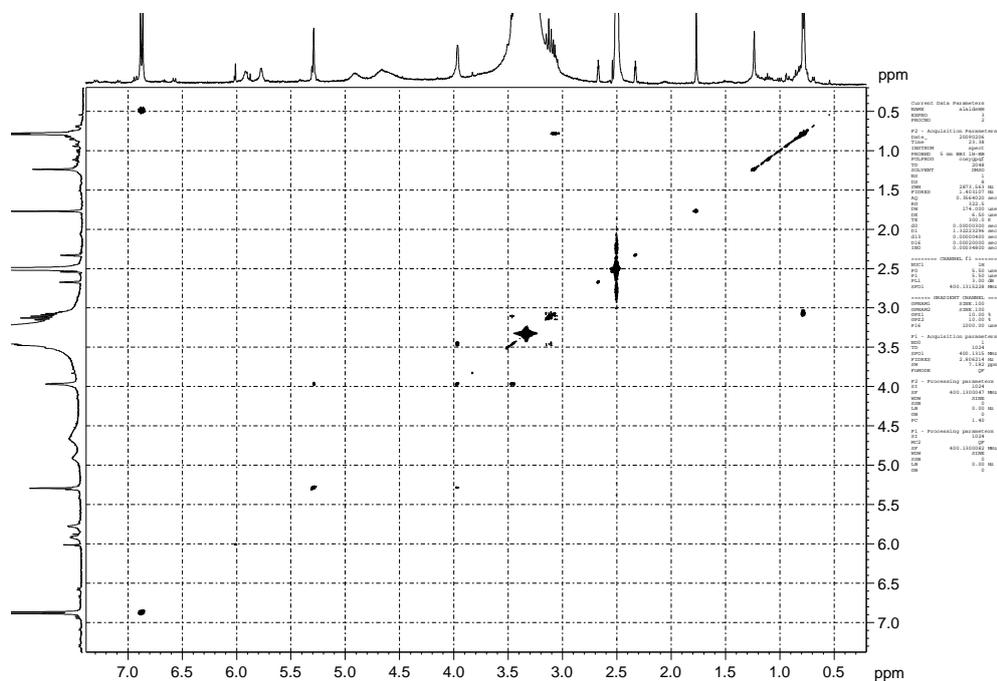
WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Societ.*, v. 123, p. 1173-1183, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. Cap. 23, p. 577-609.

## ANEXO – Espectros de RMN da substância HH



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para substância HH, (400 MHz, DMSO).



Mapa de correlação COSY obtido para a substância HH.