



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

NÚCLEO DE PESQUISA DE PRODUTOS NATURAIS

FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Cassia australis* (Fabaceae, Leguminosae)

Kassia Cristina Vieira Waldhelm

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Cassia australis* (Fabaceae, Leguminosae)

Kassia Cristina Vieira Waldhelm

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais
Programa de Química de Produtos Naturais**

Orientadores

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (UFRJ)

Profa. Dra. Naomi Kato Simas

Faculdade de Farmácia (UFRJ)

**Rio de Janeiro
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais – NPPN
Mestrado em Química de Produtos Naturais
Bloco H, CCS, Cidade Universitária
CEP 21941-590 Rio de Janeiro
Fax 55-21-2562-6512

FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Cassia australis*
(Fabaceae, Leguminosae)

Kassia Cristina Vieira Waldhelm

Dissertação submetida ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da
Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos à
obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro, 22 de setembro de 2010.

Aprovada por:

Prof. Dr. Leandro Machado Rocha

Prof. Dr. Jan Schripsena

Prof. Dr. José Paz Parente

Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva

Rio de Janeiro
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Waldhelm, Kassia Cristina Vieira

FLAVONÓIDES e ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Cassia australis*
(Fabaceae, Leguminosae) / Kassia Cristina Vieira Waldhelm.
Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, 2010.
100 f.:il.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ NPPN/ Programa de Pós-
graduação em Química de Produtos Naturais, 2010.

Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
Profa. Dra. Naomi Kato Simas

1. *Cassia australis*. 2. Caesalpiniaceae. 3. Flavonóides. 4.
Atividade antioxidante. I. Kuster, R.M. II. Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais,
Programa de Pós-graduação em Química de Produtos
Naturais. III. Título.

Dedico aos meus pais, Manoel e Milza, por serem sempre o meu alicerce e a minha irmã Mônica por ser muito mais que uma irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me manter viva e inteira pra continuar correndo atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais, Milza Vieira Waldhelm e Manoel Argemiro Waldhelm, por todo amor, carinho, paciência e o imenso apoio (mental, espiritual e financeiro) a mim dedicado. Se não fosse vocês eu não teria saído dessa. e se não fosse a dedicação de vocês e os valores que me foram passados, hoje eu não estaria aqui. Obrigada por serem o meu modelo ideal de família. Amo vocês.

À minha irmã Mônica pelo amor, pelas conversas, pelas idéias, pelo apoio (de todos os tipos) diário, pelo exemplo e por tudo mais que fazem de você muito mais que uma irmã. Obrigada, por juntamente com papai e mamãe, ter sido meu suporte sem tamanho após o atropelamento. E obrigada por revisar a dissertação.

Aos meus irmãos Waldeck, Wagner e Wanderson pelo apoio, pelo amor e por todas as experiências vividas juntos. Aos meus sobrinhos Victor, Pamella e Günter por me mostrarem que o tempo passa, mas não tão rápido quanto parece.

Ao meu orientador Prof. Ricardo Machado Kuster por ter aberto as portas pra mim há seis anos e ter me dado uma segunda casa e uma segunda família. Obrigada pelo carinho, por todos os ensinamentos, pela paciência e por transmitir o entusiasmo frente à pesquisa. Obrigada por não podar os nossos sonhos e sim mostrar que sempre é possível ir além. Não posso deixar de agradecer por confiar na gente e permitir que caminhemos sozinhos. O Richard's Lab só é do jeito que é por que você o faz assim.

À minha orientadora Prof. Naomi Kato Simas pelo espírito de mãe. Obrigada por entender cada uma de nós, pelo carinho, pelas conversas, por se adaptar ao nosso jeito e por ficar ao nosso lado. Obrigada pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho. Seu apoio e suporte ultrapassam os limites da pesquisa.

Ao técnico Celso pela ajuda, pelo cuidado, pelo carinho e pelo apoio. Sem você muita coisa não andaria. MUITÍSSIMO obrigada por escolher o nosso laboratório como “casa”.

Ao meu namorado Álvaro pelo amor, pela paciência, pelo incentivo, pelo apoio e por me fazer uma pessoa melhor. Seu amor me acalma, me conforta, me anima e me incentiva. Te amo.

Às amigas Anne Caroline e Cristiane Pereira pela caminhada ao longo de todos esses anos, repletos de carinho. Obrigada pelo suporte e pelo apoio nos vários momentos difíceis, pela ajuda diária, pelas horas de estudo, pelo ouvido e pelos puxões de orelha durante todos esses anos. Uma entrou na minha vida lá antes do primeiro dia de aula da graduação e a outra já lá no final, mas se não fosse por vocês duas os dias dentro do laboratório demorariam muito mais para passar – e com certeza seriam bem menos divertidos.

Aos meus amigos da faculdade de Farmácia, por tornarem a UFRJ um lugar maravilhoso, e em especial Luzia, Mariana, Fernando, Patrícia Vieira, Anne Cris e Patrícia

Santana. Obrigada pelo carinho, pela amizade e principalmente pela imensa ajuda e paciência na minha recuperação pós-atropelamento. Vocês tornaram os dias melhores e sem isso, talvez, essa dissertação não existisse.

À amiga Halliny pelo carinho desde meu início no laboratório, pelas inúmeras conversas e por toda ajuda sempre.

À amiga Meriane pela ida à Campos, pela paciência pra ensinar a usar o MestReNova e por todas as conversas.

Aos outros amigos do Richard's Lab: Michelle, Kátia, Danielle, Letícia, Jéssica, Karen, Alda, Palloma, Tatiana, Lívia, Ivaldo, Leandro e Paulo. Obrigada pelo carinho, pela ajuda e por ajudarem a compor este laboratório tão "família".

Aos companheiros da turma de mestrado do NPPN Ana Paula, Rafael, Thiago, Júlio, Carol, Vanessa e Isabel pelo dia-a-dia destes 2 anos.

Aos amigos da Cripta Sidnei, Fábio, Karla, Ângelo e Elis por tornarem o subsolo um lugar menos estranho. E em especial aos amigos Daniel, Bruno, Cléber e Leandro pela imensa amizade, pelo carinho, pelas inúmeras conversas, por todas as aulas de química durante a preparação pra prova do mestrado e durante as disciplinas do mestrado, pela ajuda com os espectros de RMN, pelas caronas e por tornarem os dias no NPPN bem mais leves.

Às famílias Puppín e Spíndola por sempre terem me acolhido, me ajudado e me proporcionado momentos ótimos.

Aos técnicos Ari e Nívea por toda a ajuda e paciência na realização do CLAE.

Aos técnicos Francisco e Camila pela ajuda na obtenção dos espectros de RMN.

Ao professor Jan Schripsena pela realização dos espectros de RMN.

A professora Alice Sato pela ajuda para obtenção do material vegetal e pelo depósito da exsicata.

Aos docentes do NPPN por todo os ensinamentos ao longo destes dois anos de mestrado.

À Coordenação de Pós-graduação, à Direção e à administração do NPPN, por todo o trabalho que garantiu a possibilidade de realização desta dissertação.

Aos profs. Drs. Jan Schripsena, José Paz Parente, Leandro Machado Rocha e Antônio Jorge Ribeiro da Silva por aceitarem compor a banca.

A CNPQ pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

“Eu nunca fiz tese brilhante, mas eu sempre trabalhei muito. e aprendi muito também. e é isso que importa.”

R.M.K.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	XII
Lista de Gráficos	XIV
Lista de Esquemas	XIV
Lista de Equações	XV
Lista de Tabelas	XV
Lista de Espectros	XV
Lista de Siglas e Abreviaturas	XVIII
Resumo	XXI
Abstract	XXII
I – Introdução	1
1 – O Gênero <i>Cassia</i>	1
1.1 – Características Químicas e Farmacológicas do Gênero	3
1.2 – A espécie <i>Senna australis</i> (Vell.) Irwin & Barneby.	8
1.2.1 – Botânica e Sistemática	8
a) Sinonímia	9
b) Descrição	9
c) Distribuição	10
d) Estudos químicos da espécie <i>Senna australis</i>	10
2 – Flavonóides	10
2.1 – Classificação e Variedade Estrutural	10
2.2 – Ocorrência, Distribuição e Papel no Metabolismo Vegetal	13
2.3 – Biossíntese	14
2.4 – Isolamento e identificação estrutural	20
2.5 – Atividade Biológica	21
a) Atividade anti-inflamatória	22
b) Atividade antiviral	22
c) Atividade antibacteriana	23
d) Atividade cardioprotetora	23

e) Atividade antitumoral	23
3 – Atividade Antioxidante	24
3.1 – Flavonóides e atividade antioxidante	24
3.2 – Estrutura x atividade antioxidante	25
II – Objetivos	27
Objetivos específicos	27
III – Material e Métodos	28
1 – Material	28
1.1 – Material vegetal	28
1.2 – Fases Estacionárias utilizadas para Cromatografia	28
1.3 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	28
1.4 – Solventes	28
1.5 – Reagentes	28
1.6 – Equipamentos	29
2 – Análise fitoquímica	30
2.1 – Preparação do Extrato Hidrometanólico	30
2.2 – Análise do perfil cromatográfico por CLAE	30
2.3 – Isolamento e caracterização de substâncias	30
2.3.1 – Partição em Acetato de Etila	32
2.3.1.1 – Cromatografia Líquida Utilizando XAD-2	32
2.3.1.2 – Filtração a Vácuo Utilizando Gel de Sílica	37
2.3.1.3 – Hidrólise	38
2.3.2 – Partição Butanólica	39
2.3.2.1 – Cromatografia Líquida Utilizando XAD-2	40
2.3.2.2 – Hidrólise	41
3 – Determinação do teor de fenóis totais	42
a) Preparo das amostras	42
b) Preparo do padrão	42

4 – Avaliação da atividade antioxidante	43
a) Preparo das amostras	43
b) Preparo da solução em branco	44
c) Preparo da solução de controle negativo	44
d) Preparo da solução de controle positivo	44
e) Leitura das amostras	44
f) Determinação da atividade antioxidante	44
IV – Resultados e discussão	46
1 – Análise Fitoquímica por CLAE/UV	46
2 – Elucidação estrutural da substância KCW140	48
3 – Elucidação estrutural da substância KCW158	62
4 – Elucidação estrutural da aglicona KCW001	73
5 – Determinação do teor de fenóis totais	74
6 – Determinação da atividade antioxidante	75
V – CONCLUSÃO	82
VI – Referências	83
VII – Anexos	93
1 – RMN ¹ H KCW140	93
2 – HMQC KCW140	94
3 – HMBC KCW140	95
4 – RMN ¹ H KCW158	96
5 – COSY ¹ H- ¹ H KCW158	97
6 – HSQC KCW158	98
7 – HMBC KCW158	99
8 – RMN ¹ H KCW001	100

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1 - 1,8-diidroxí-antraquinona isolada de <i>S. occidentalis</i>	4
Figura 2 - a e b: Antraquinonas isoladas de <i>S. alata</i> ; c: Acetato de 8-hidroximetilidenotrieicosanila isolado de <i>S. villosa</i>	4
Figura 3 - Antraquinonas isoladas de <i>S. reticulata</i>	5
Figura 4 - Bisantraquinona glicosilada de <i>C. Torosa</i>	5
Figura 5 - Antraquinonas isoladas de <i>C. torosa</i> com atividade anti-alergênica	6
Figura 6 - Flavonas, ésteres e cromona isolados de <i>C. spectabilis</i>	6
Figura 7 - Alcaloides piperidínicos isolados de <i>C. spectabilis</i>	7
Figura 8 - C-glicosídeos de <i>S. Occidentalis</i>	7
Figura 9 - Taninos condensados de <i>C. noname</i> e <i>C. petersiana</i>	8
Figura 10 - <i>Cassia australis</i> (arquivo pessoal)	9
Figura 11 - Flores de <i>Cassia australis</i> (retirado de http://farm1.static.flickr.com/184 em 18/08/10)	9
Figura 12 - Esqueleto fundamental de um flavonoide	10
Figura 13 - Classes dos flavonoides	11
Figura 14 - Exemplo de O-glicosídeo e C-glicosídeo	12
Figura 15 - Estrutura dos açúcares mais comuns em flavonoides	12
Figura 16 - CCD Partição em Acetato de Etila	32
Figura 17 - CCD das frações da partição em acetato de etila em XAD-2	33
Figura 18 - CCD do fracionamento da fração [10% H ₂ O - Partição Acetato de Etila]	33
Figura 19 - CCD do fracionamento da fração [50% H ₂ O - Part. Acetato de Etila]	34
Figura 20 - CCD do refracionamento da fração 8-10 vinda da [50% H ₂ O - Partição Acetato de Etila]	34
Figura 21 - CCD do refracionamento da fração 11-13 vinda da [50% H ₂ O - Part. Acetato de Etila]	35
Figura 22 - CCD do fracionamento da [60-90% H ₂ O - Partição Acetato de Etila]	35
Figura 23 - CCD da purificação da amostra ppp 13-15 + 15EF	36
Figura 24 - CCD da purificação da amostra 13-15	37

Figura 25 - CCD da Filtração à vácuo da partição em acetato de etila	37
Figura 26 - CCD da hidrólise da partição em acetato de etila	38
Figura 27 - CCD da partição butanólica	39
Figura 28 - CCD da XAD-2 da Partição em Butanol	40
Figura 29 - CCD da hidrólise da partição em butanol	41
Figura 30 - Radical DPPH	43
Figura 31 - Cromatograma da partição em acetato de etila em 254nm	45
Figura 32 - Cromatograma da partição em acetato de etila em 365nm	45
Figura 33 - UV dos principais sinais do cromatograma da partição em acetato de etila	46
Figura 34 - Cromatograma da partição em butanol em 254nm	46
Figura 35 - Cromatograma da partição em butanol em 365nm	46
Figura 36 - UV dos principais sinais do cromatograma da partição em butanol	47
Figura 37 - Representação da hidroxila quelatogênica (12.82 ppm)	48
Figura 38 - Representação do hidrogênio anomérico	50
Figura 39 – Confirmação da presença de Glicose – KCW140	50
Figura 40 – Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140	57
Figura 41 – Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140	57
Figura 42 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140	58
Figura 43 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140	58
Figura 44 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140	60
Figura 45 - Estrutura proposta para KCW140 – Tricetin-4'-metoxi-3'-β-D-glucosídeo	60
Figura 46 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW158	70
Figura 47 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW158	70
Figura 48 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW158	71
Figura 49 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW158	72
Figura 50 – Estrutura proposta para KCW158 – Isoscutelareina-6-C-β-glucosídeo	72
Figura 51 - Comparação da KCW001 e Padrão autêntico de Quercetina	75
Figura 52 - Estrutura da tricetina	90

Figura 53 – Tricetin-4'-metoxi-3'-β-D-glucosídeo – Tricetina di-substituída	80
Figura 54 - Isoscutelareina-6-C-β-glucosídeo	80

LISTA DE GRÁFICOS

	Pag
Gráfico 1 - Curva de calibração do Ácido Gálico	42
Gráfico 2 - Atividade antioxidante frente ao radical DPPH da partição em acetato de etila	76
Gráfico 3 - Atividade antioxidante frente ao radical DPPH da partição em butanol	77

LISTA DE ESQUEMAS

	Pag
Esquema 1 - Biossíntese do Acetil-CoA e do Malonil-CoA	14
Esquema 2 - Biossíntese do Ácido Chiquímico	15
Esquema 3 - Biossíntese da L- Fenilalanina	16
Esquema 4 - Biossíntese do <i>p</i> -Coumaroil-CoA	16
Esquema 5 - Biossíntese da Flavanona e do diidroflavonol	17
Esquema 6 - Biossíntese da Isoflavona	18
Esquema 7 - Biossíntese dos derivados flavonoídicos	19
Esquema 8 - Oxidação de um flavonoide (Onde R• é um radical livre e O• é o oxigênio radical do flavonoide)	25
Esquema 9 - Esquema resumido da análise fitoquímica do extrato hidrometanólico de <i>Cassia australis</i>	31
Esquema 10 - Fracionamento da partição em Acetato de etila	32
Esquema 11 - Fracionamento da partição em Butanol	39

LISTA DE EQUAÇÕES

	Pag
Equação 1 - Determinação da Atividade Antioxidante	44

LISTA DE TABELAS

	Pag
Tabela 1 - Correlações $^1J_{CH}$, $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ no HMQC e HMBC – KCW140	56
Tabela 2 - Confirmação dos assinalamentos - KCW140	61
Tabela 3 - Correlações $^1J_{CH}$, $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ no HMQC e HMBC – KCW158 – (fr: fraco)	69
Tabela 4 - Confirmação dos assinalamentos - KCW158	73
Tabela 5- uAG na partição em acetato de etila	75
Tabela 6 - uAG na partição em butanol	75
Tabela 7 - AA(%) da partição em acetato de etila	76
Tabela 8 - AA(%) da partição em butanol	77

LISTA DE ESPECTROS

	Pag
Espectro 1 - RMN 1H de KCW140 - O solvente utilizado foi DMSO- d_6	48
Espectro 2 - Expansão da região entre 6.0 e 7.8 ppm do RMN 1H da KCW140 – Sinais dos Hidrogênios Aromáticos	49
Espectro 3 - Expansão da região entre 4.2 e 5.8 ppm do RMN 1H da KCW140 - Sinal do Hidrogênio Anomérico	50
Espectro 4 - Expansão da região entre 2.8 e 4.5 ppm do RMN 1H da KCW140 - Sinal dos Hidrogênios da Metoxila e do Açúcar	51
Espectro 5 - HMQC da KCW140	52
Espectro 6 - Expansão entre 5.8 e 7.8 ppm - Correlações $^1J_{CH}$ dos hidrogênios aromáticos – HMQC KCW140	52
Espectro 7 - Expansão entre 2.9 e 4.3 ppm - Correlações $^1J_{CH}$ dos hidrogênios do O-CH ₃ (assinalados) e dos hidrogênios do açúcar (não assinalados) –	53

HMQC KCW140

Espectro 8 - Expansão entre 4.5 e 5.45 ppm - Correlação $^1J_{CH}$ do hidrogênio anomérico – HMQC KCW140	53
Espectro 9 - HMBC KCW140	54
Espectro 10 – Expansão entre 5.5 e 8.1 ppm – Correlações $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ dos hidrogênios aromáticos – HMBC KCW140	54
Espectro 11- Expansão entre 6.48 e 6.94 ppm – Correlações $^2J_{CH}$ do hidrogênio em 6.78 ppm – HMBC KCW140	55
Espectro 12 - Expansão entre 3.64 e 3.94 ppm – Correlação $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ dos hidrogênios do O-CH ₃ – HMBC KCW140	55
Espectro 13 - Expansão entre 6.0 e 4.5 ppm – Correlação $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ do hidrogênio anomérico – HMBC KCW140	56
Espectro 14 - RMN 1H de KCW158 - O solvente utilizado foi DMSO- d_6	62
Espectro 15 - Expansão da região entre 6.3 e 8.0 ppm do RMN 1H da KCW158 – Sinais dos Hidrogênios Aromáticos	63
Espectro 16 - Expansão da região entre 4.15 e 4.75 ppm do RMN 1H da KCW158 - Sinal do Hidrogênio Anomérico	64
Espectro 17 - COSY KCW158	65
Espectro 18 - Expansão entre 6.0 e 9.4 ppm – Acoplamento entre hidrogênios aromáticos - COSY KCW158	65
Espectro 19 - HSQC KCW158	66
Espectro 20 - Expansão entre 5.0 e 9.2 ppm - Correlações $^1J_{CH}$ dos hidrogênios aromáticos - HSQC KCW158	66
Espectro 21 - Expansão entre 2.2 e 5.1 ppm - Correlações $^1J_{CH}$ do hidrogênio anomérico e dos demais hidrogênios do açúcar (não assinalados) - HSQC KCW158	67
Espectro 22 - HMBC KCW158	67
Espectro 23 - Expansão entre 12.2 e 14.3 ppm – Correlações $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ da hidroxila em C-5 – HMBC KCW158	68
Espectro 24 - Expansão entre 6.0 e 8.4 ppm – Correlações $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ dos hidrogênios aromáticos – HMBC KCW158	68

Espectro 25 - Expansão entre 3.8 e 5.5 ppm – Correlações $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ do hidrogênio anomérico – HMBC KCW158	69
Espectro 26 - RMN 1H da KCW001	73
Espectro 27 - Expansão na região entre 6.8 e 7.75 ppm - RMN 1H KCW001	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 2-D – bidimensional
- 4CL – enzima 4-coumarato-CoA ligase
- AA – atividade antioxidante
- ADP – Adenosina difosfato
- ANR – antocianidina redutase
- ANS – enzima antocianidina sintase
- ATP – Adenosina trifosfato
- BuOH – Butanol
- C4H – enzima cinamato-4-hidroxilase
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CH₂Cl₂ – Diclorometano
- CHCl₃ – Clorofórmio
- CHI – enzima chalcona isomerase
- CHI – enzimas chalcona isomerase
- CHS – enzima chalcona sintase
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CO₂ – Dióxido de carbono
- CoA – Coenzima A
- COSY – Correlated Spectroscopy
- COX – enzima ciclo-oxigenase
- CYP450 – Citocromo P450
- d – duplete
- D.A.D. – Detector de feixe de diodos
- DAHP – 3-deoxi-D-arabino-heptuloseonato
- dd – duplete de duplete
- DFR – enzima diidroflavonol redutase
- DMSO-d₆ – Dimetil-sulfóxido hexadeuterado
- DPPH – difenil-1-picrilidrazila
- EC₅₀ – concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH*
- EM – Espectrômetro de Massas

EPSP – 3-enol-piruvil-chiquimico-3-fosfato
EtOH – Etanol
F3H – enzima flavanona 3-hidroxilase
FLS – enzima flavonol sintase
FNSI e FNSII – enzimas flavona sintase
fr – fraco
H₂O – Água
H₂SO_{4(aq)} – Ácido Sulfúrico Aquoso
H₃PO₄ – Ácido Fosfórico
HAc – Ácido acético
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSV – Herpes simplex vírus
Hz – Hertz
IFS – enzima isoflavona sintase
J – constante de acoplamento
LAR – enzima leucoantocianidina redutase
LDL – lipoproteínas de baixa densidade
LOX – enzima 5-lipoxigenase
m – múltiplo
MeOH – Metanol
MHz – MegaHertz
MIC – concentração mínima para inibir o crescimento
Na₂CO₃ – Carbonato de Sódio
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
nm – Nanômetro
NOESY – Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NP – Natural Product (Reagente)
p.a. – para análise
PAL – enzima fenilalanina amônia liase

PEG – Polietilenoglicol

PEP – Fosfo-enol-piruvato

ppm – partes por milhão (expressão)

Radiação UV-B – Radiação Ultravioleta B

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rpm – rotações por minuto

s – simpleto

Σ Abs – Média das absorbâncias

t – tripleto

TFA – Ácido trifluoroacético

Tr – tempo de retenção na coluna

uAG – unidades de ácido gálico equivalentes

uAG/mg – unidades de ácido gálico equivalentes por miligrama de amostra

UFGT – enzima UDP-glicose-flavonoide 3-O-glicosiltransferase

UV – Ultra-Violeta

δ – deslocamento químico

RESUMO

WALDHELM, Kássia Cristina Vieira Waldhelm. FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Cassia australis* (Fabaceae, Leguminosae). Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Cassia australis é um arbusto de pequeno a médio porte que pode atingir até 2 metros de altura e 2,5 metros de diâmetro. Ocorre em restingas do litoral brasileiro, principalmente nos estados Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco. Ainda não há na literatura dados acerca da fitoquímica da espécie. Neste trabalho deseja-se estudar a composição flavonoídica da espécie, determinar o teor de fenóis totais e avaliar a atividade antioxidante.

As partições em acetato de etila e butanol, obtidas a partir do extrato hidrometanólico, revelaram pela análise por CLAE/UV a presença de flavonóides do tipo flavona e flavonol glicosilados, respectivamente.

Foram isoladas e identificadas duas flavonas, descritas pela primeira vez no gênero, a partir da partição em acetato de etila: Tricetina-4'-metoxi-3'- β -D-glucosídeo e Isoscutelareina-6-C- β -glucosídeo. As flavonas tiveram suas estruturas propostas por métodos espectroscópicos, tais como RMN- ^1H , COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMQC e HMBC.

A avaliação da atividade antioxidante foi feita pelo método do DPPH e a determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu. Foi observado que, mesmo com a presença de glicosídeos, tanto a partição em acetato de etila, quanto a partição em butanol possuem uma atividade antioxidante destacável (EC_{50} = 5,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 16,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) e uma composição fenólica alta (620 uAG/mg e 332 uAG/mg, respectivamente).

ABSTRACT

WALDHELM, Kássia Cristina Vieira Waldhelm. FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Cassia australis* (Fabaceae, Leguminosae). Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Cassia australis is a small-medium bush and may reach up to 2 meters and e 2,5 meters of diameter. Occurs at sandbank of the Brazilian coast, mainly in Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Sergipe, Alagoas and Pernambuco states. So far there is no information published concerning the phytochemistry of the species. This work purpose to study the composition and content of flavonoids and evaluate the antioxidant activity.

The more polar partitions (ethyl acetate and *n*-butanol), obtained from hydro-methanolic extract, shown by HPLC/UV analysis the presence of flavonoids like flavones and flavonol glycosylated, respectively.

Two flavones were isolated and identified, described for the first time in the genus, from the ethyl acetate partition: tricetin-4'-methoxy-3'- β -D-glucosyde and isoscutellarein-6-C- β -glucosyde. The flavones were identified by spectroscopic methods such as ^1H RMN, ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMQC and HMBC.

Total phenolic contents were determined by the Folin–Ciocalteu method and the antioxidant activity was evaluated by DPPH. The results showed an excellent activity, even with the glycosydes, for the ethyl acetate and *n*-butanol partition (EC_{50} = 5,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 16,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) and a high phenolic content (620 $\mu\text{AG}/\text{mg}$ and 332 $\mu\text{AG}/\text{mg}$, respectively).

I - Introdução

1 – O Gênero *Cassia*

O gênero *Cassia* (Fabaceae, Leguminosae) é constituído por mais de 600 espécies incluindo arbustos, árvores e ervas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Viegas Junior *et al.* 2006).

Por conta de revisões na classificação botânica dos gêneros *Cassia* e *Senna*, houve a transposição taxonômica de espécies do gênero *Cassia* para o táxon *Senna*. Com a separação das leguminosas em três grupos distintos (Subfamílias Caesalpinioideae, Mimosaceae e Papilionaceae), o gênero *Cassia*, agora incluído em Fabaceae (Leguminosae) pertence à subfamília Caesalpinioideae. Espécies de *Cassia*, juntamente com aquelas com sinonímia *Senna* ou com algumas que mudaram para o grupo *Senna* após o novo sistema de classificação taxonômica adotado, constituem um dos maiores gêneros da família Fabaceae (Viegas Junior *et al.* 2006).

Nos ecossistemas brasileiros, particularmente na Mata Atlântica, o gênero *Cassia* é muito frequente, sendo que na região sudeste algumas espécies são bastante apreciadas devido à beleza de suas flores e, por consequência, muito utilizadas como plantas ornamentais (Viegas Junior *et al.* 2006).

O gênero apresenta diversas espécies com potencial medicinal, muitas já descritas pela literatura. Uma das espécies mais representativas do potencial medicinal deste gênero é *C. fistula*, intensamente cultivada na Índia, Ceilão, China e Egito, onde tem várias indicações na medicina tradicional. Suas folhas apresentam atividade purgativa e laxativa, enquanto seus frutos são utilizados devido à atividade anti-reumática e anti-inflamatória. (Viegas Junior *et al.* 2006)

A *C. siamea* Lam., uma espécie muito utilizada para fins alimentares e medicinais na África e na Ásia, possui já descritas atividades antipirética, laxante, anti-hipertensiva, antiviral, antioxidante e sedativa. Estudos recentes demonstraram atividade analgésica e anti-inflamatória. (Nsonde Ntandou *et al.* 2010)

Outra espécie, *S. villosa*, é utilizada na medicina mexicana para tratar diversas doenças, entre elas infecções cutâneas, dismenorrea e alguns tipos de inflamações. Seu extrato clorofórmico apresenta significativa atividade contra as formas

epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma*, o que sugere seu uso contra Doença de Chagas (Guzman *et al.* 2008).

Na medicina popular, tribos americanas, africanas e indianas usam preparações da *S. occidentalis* como tônico, estomáquico, febrífugo, laxante e antimicrobiano. Diversas propriedades biológicas da espécie já foram comprovadas, tais como antibacteriana, antifúngica, antimalárica, antitumoral e hepatoprotetora, além de apresentar atividade contra o vírus da hepatite B (Lombardo *et al.* 2009).

Na medicina popular brasileira, folhas e sementes de *S. occidentalis* também são empregadas como antifúngico tópico, especialmente no tratamento de feridas e micoses como “impingem” (tínea do corpo) e “pano branco” (ptíriase versicolor). Oficialmente, a primeira edição da Farmacopeia Brasileira preconiza o emprego do extrato fluido da raiz de *S. occidentalis*, como tônico e depurativo (Farmacopéia Brasileira, 1ª Ed). A propriedade inseticida também foi atribuída à *S. occidentalis*. Estudos mostram que a espécie pôde inibir o desenvolvimento de triatomíneos, insetos vetores da doença de Chagas (Lombardo *et al.* 2009).

Por sua indicação em alguns países africanos como antimalárico, na forma de extrato das folhas, *S. occidentalis* consta de uma lista de plantas selecionadas para controle de doenças tropicais. Estudos de inibição do crescimento de *Plasmodium falciparum* revelaram a atividade inibitória do extrato em concentrações de 6-600 µg/mL, quando comparado ao cloridrato de quinina (Tiwari, 1985 apud Viegas Junior *et al.* 2006). Outros estudos farmacológicos confirmaram que o extrato diclorometânico das folhas de *S. occidentalis* possui atividade antimalárica *in vitro*, sendo capaz de inibir até 81% do desenvolvimento do parasita (Tona *et al.* 1999). Os efeitos da intoxicação com a *S. occidentalis* já foram observados em diversas espécies de animais, como bovinos, caprinos, ovinos, suínos, entre outros, inseridos em protocolos experimentais. Os principais efeitos incluem lesões hepáticas, alterações histopatológicas nos rins, degenerações nas musculaturas esquelética e cardíaca, perda de peso e morte. As informações sobre a toxicidade da para humanos são escassas (Lombardo *et al.* 2009).

Outra espécie do gênero muito estudada é *S. alata*. De acordo com um estudo etnofarmacológico feito nas Antilhas Francesas, a espécie é uma das quatro mais citadas, com indicações principais para constipação e erupções cutâneas (Longuefosse *et al.* 1996). Também foram descritos usos devido à atividade anti-infecciosa para

Malária, Herpes Zoster e algumas micoses. Na comunidade quilombola brasileira “Quilombola de Olho D'água dos Pires”, os pesquisadores constataram o uso das flores da espécie contra gripe (Franco *et al.* 2006). Estudos também demonstraram que o extrato aquoso da espécie apresentou notável interação com o CYP450 e com Glutathione-S-Transferase, indicando que seu uso pode interferir no metabolismo de outras substâncias (Hennebelle *et al.* 2009).

C. laevigata é uma espécie nativa do Norte ao Sul da América, amplamente naturalizada difundida entre os trópicos. Utilizada na medicina popular para o tratamento da dor de ouvido, da alopecia, de doenças biliares, da cólera e também como um expectorante, laxante e vermífugo (Jones *et al.* 2000).

S. reticulata Willd. é utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento de obstruções do fígado e no combate ao reumatismo. Estudos apontam suas atividades antiviral, antibacteriana e antifúngica também (dos Santos *et al.* 2008).

O uso de folhas e raízes de *C. nigricans* é muito comum na medicina tradicional nigeriana e indicado para tratamento de úlceras gástricas, disfunções gastrointestinais, dor reumatoide e como contraceptivo; no Senegal e na Guiné Francesa esta planta é utilizada como vermífugo (Akah *et al.* 1998; Nwafor *et al.* 2001).

No Japão, muitos trabalhos foram realizados com várias espécies nativas e exóticas de *Cassia*, com objetivo de validar suas propriedades medicamentosas e isolar os metabólitos ativos. Na medicina popular japonesa, as folhas frescas de *C. torosa* são utilizadas no tratamento de picadas de insetos, como digestivo e tônico. (Viegas Junior *et al.* 2006).

Os extratos metanólicos de *C. angustifolia* e *C. alata*, ricos em terpenos e quinonas, respectivamente, demonstraram 100% de inibição no crescimento de *Staphylococcus pyogenes* e *Corynebacterium diphtheriae* e o de *C. fistula* inibiu em 100% a cultura de *Candida albicans* (Viegas Junior *et al.* 2006).

1.1 - Características Químicas e Farmacológicas do Gênero

O gênero *Cassia* se destaca pelo grande conteúdo de antraquinonas em sua composição. Porém, já foram descritos diversos tipos de flavonoides (Dehmlow *et al.* 1998; Hatano *et al.* 1997 e 1999; Coetzee *et al.* 1999), alcaloides piperidínicos (Viegas

Junior *et al.* 2004), estilbenoides (Baba *et al.* 1994 apud Viegas Junior *et al.* 2004) e estéres alifáticos (Guzman *et al.* 2008).

Dentre os derivados antracênicos com atividade farmacológica podemos destacar os obtidos da espécie *S. occidentalis*. A 1,8-diidroxi-antraquinona (Figura 1) foi considerada um dos constituintes ativos por apresentar atividade antimalárica *in vitro*. Análises das diversas partes da planta demonstraram que também podem conter substâncias pertencentes à classe dos flavonoides, das xantonas e dos esteróis (Lombardo *et al.* 2009; Yadav *et al.* 2009; Viegas Junior *et al.* 2006).

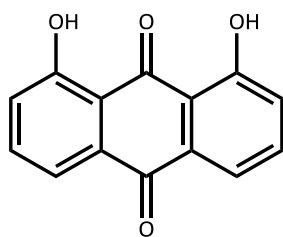


Figura 1 - 1,8-diidroxi-antraquinona isolada de *S. occidentalis*

Outras antraquinonas foram isoladas de *S. villosa* e de *S. alata* (Figura 2a e 2b), assim como quinonas, esteróis e flavonoides. O ácido graxo acetato de 8-hidroximetilidenotrieicosanila (Figura 2c), isolado do extrato clorofórmico das folhas de *S. villosa*, apresentou atividade contra o *Trypanossoma cruzi* (Guzman *et al.* 2008; Hennebelle *et al.* 2009).

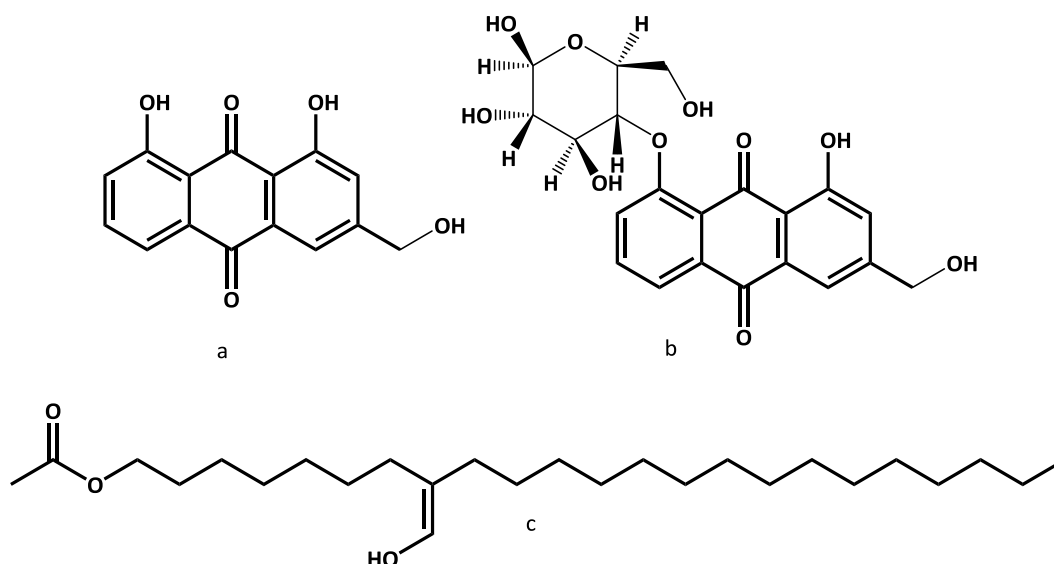


Figura 2 - a e b: Antraquinonas isoladas de *S. alata*; c: Acetato de 8-hidroximetilidenotrieicosanila isolado de *S. villosa*

Da espécie *S. reticulata* foram isolados pela primeira vez duas antraquinonas — 1,3,8-triidroxiantraquinona (Figura 3a) e 1,6,8-triidroxi-3-metoxiantraquinona (Figura 3b) — antes apenas descritas em microorganismos (dos Santos *et al.* 2008).

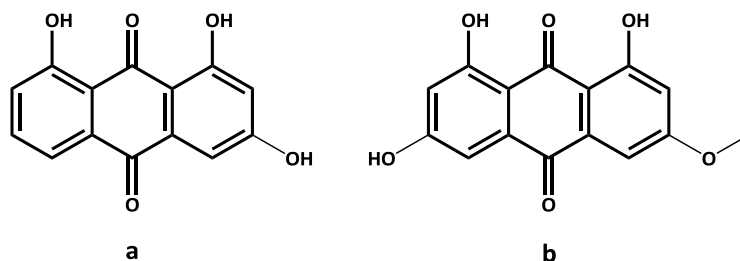


Figura 3 - Antraquinonas isoladas de *S. reticulata*

O estudo fitoquímico das sementes, raízes e folhas de *C. torosa* levou ao isolamento de diversos flavonoides, hidroantracenos, lactonas naftalênicas e antraquinonas. Destes constituintes, algumas antraquinonas, bisantraquinonas glicosiladas e flavonas foram os constituintes responsáveis pelo uso no tratamento de picadas de insetos, como digestivo e tônico.(Figura 4). Estudos sobre a atividade anti-alérgica do torosásideo A (a), torosídeo B (b), torosacrisona-8-O-6''-malonil- β -gentiobiosídeo (c) e torosacrisona 8-O-gentiobiosídeo (d) (Figura 5) confirmaram a forte atividade inibitória de *b* (a uma concentração de 10^{-4} M) e moderada de *c* e *d* (a uma concentração de 10^{-5} M) sobre leucotrienos B₄, C₄, D₄ e E₄ liberados em peritônio de ratos (Kanno *et al.* 1999).

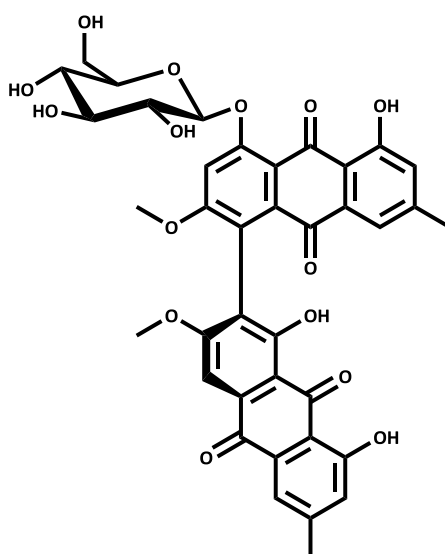


Figura 4 - Bisantraquinona glicosilada de *C. Torosa*

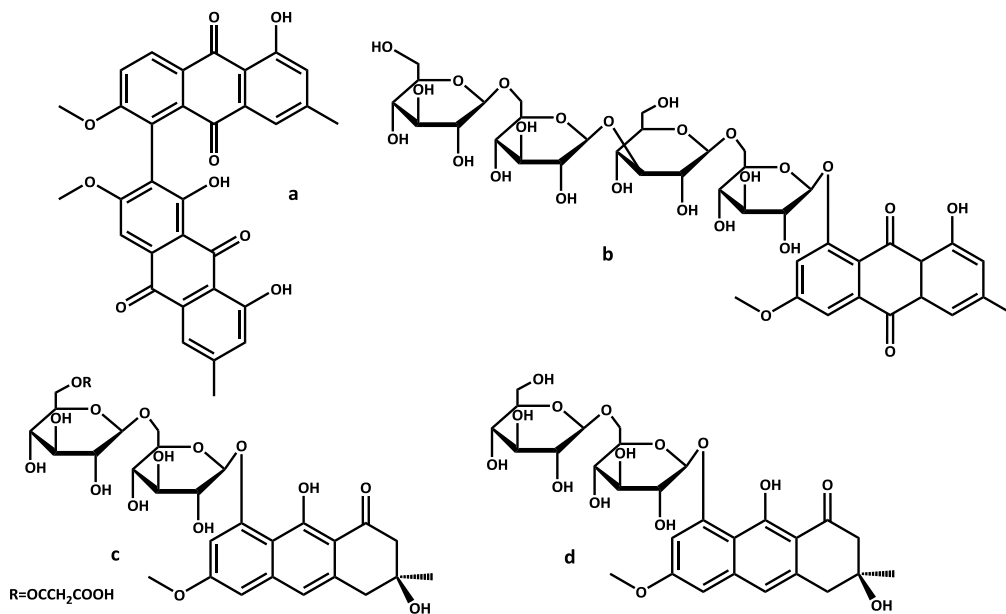


Figura 5 - Antraquinonas isoladas de *C. torosa* com atividade anti-alérgica

A maioria das espécies de *Cassia* e de *Senna* que ocorre no Brasil revelou a presença de alcaloides piperidínicos como principais representantes desta classe. Estas substâncias são particularmente interessantes em virtude das propriedades tóxicas e farmacológicas (analgésica, anti-inflamatória e anestésica) já demonstradas em diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados com extratos e substâncias puras isoladas de *C. excelsa* e *C. spectabilis*, dentre outras. Alguns poucos exemplos de outras classes químicas isoladas destas espécies são as flavonas glicosiladas (a e b), os ésteres alifáticos de cadeia longa (c e d), a cromona glicosilada (e) (Figura 6) e polissacarídeos obtidos das sementes de *C. spectabilis* (Viegas Junior *et al.* 2006).

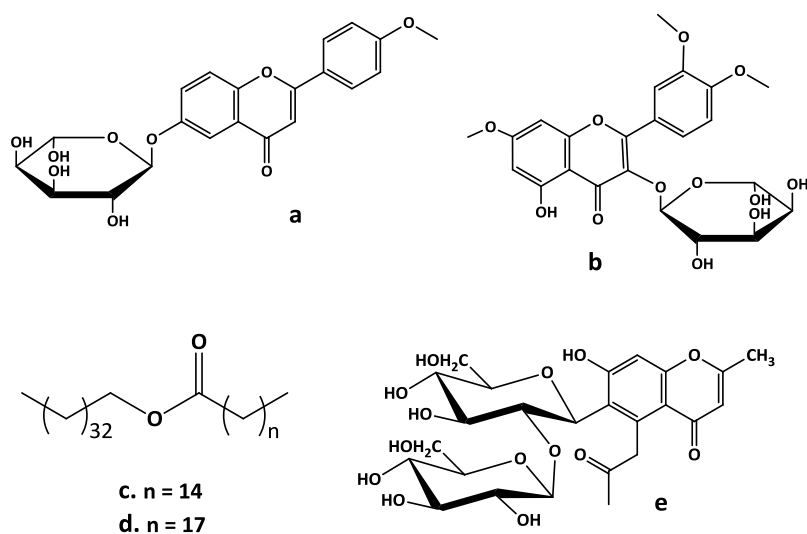


Figura 6 - Flavonas, ésteres e cromona isolados de *C. spectabilis*

C. spectabilis é a espécie de *Cassia* nativa do Brasil que tem apresentado a maior diversidade de alcaloides piperidínicos e vários efeitos farmacológicos dessas substâncias vêm sendo confirmados. Dentre vários alcaloides já descritos, podemos citar (-)-espectralina (a), leptofilina-A (b) e 3-acetil-leptofilina-A (c) (Figura 7), que inibiram seletivamente o desenvolvimento das linhagens mutantes de *S. cerevisiae*, demonstrando citotoxicidade seletiva (Bolzano *et al.* 1995; Viegas Junior *et al.* 2006).

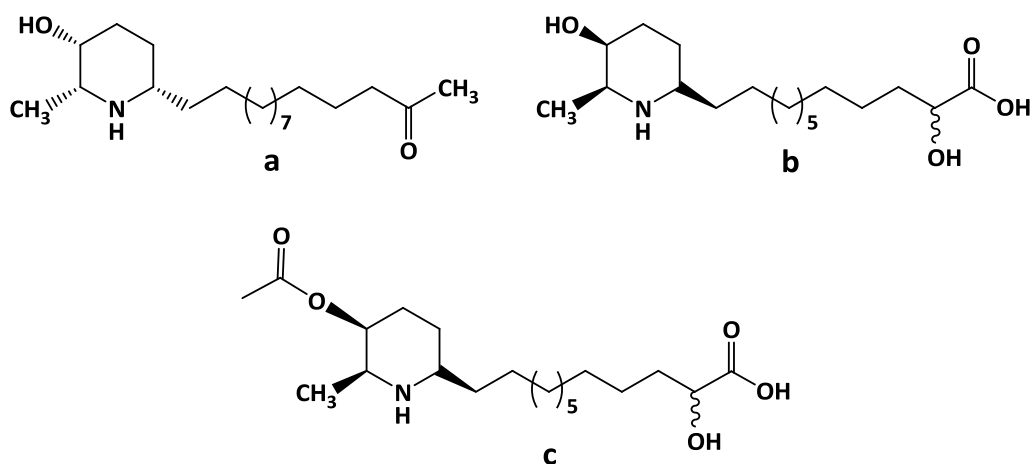


Figura 7 - Alcaloides piperidínicos isolados de *C. spectabilis*

Dentre os compostos fenólicos isolados, podemos destacar também os C-glicosídeos isolados de *S. occidentalis* (Figura 8) (Hatano *et al.* 1999) e os taninos condensados (ou dímeros de flavanas) isolados de *C. noname* e de *C. petersiana* (Figura 9) (Coetzee *et al.* 1999; Hatano *et al.* 1997).

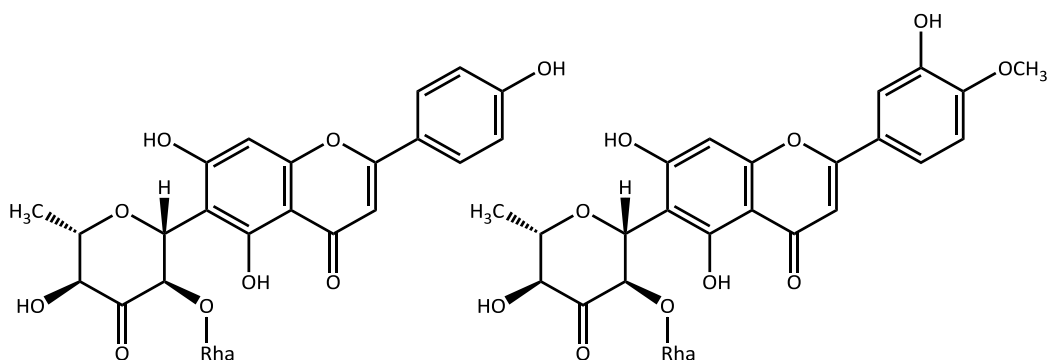


Figura 8 - C-glicosídeos de *S. Occidentalis*

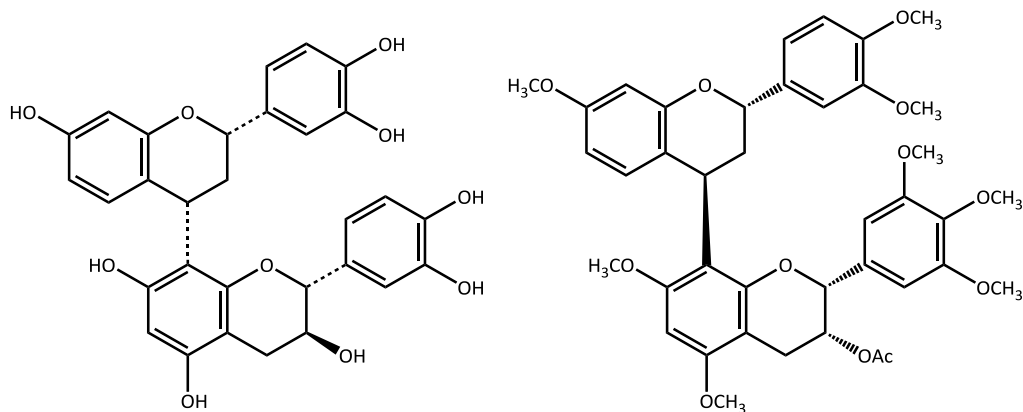


Figura 9 - Taninos condensados de *C. noname* e *C. petersiana*

A contínua identificação de novos metabólitos de *Cassia*, aliada aos novos métodos de avaliação farmacológica e biológica em projetos de bioprospecção de fármacos está sendo determinante na reavaliação de vários extratos vegetais, objetivando a busca por novas classes químicas, a identificação de metabólitos ativos e, preferencialmente, seletivos a determinados alvos biológicos (Viegas Junior *et al.* 2006).

1.2 - A espécie *Cassia australis* Vellozo

1.2.1 - Botânica e Sistemática

a) Sinonímia

- Sinonímias científicas

Senna appendiculata (Vogel) Wiersema; *Cassia appendiculata* Vogel; *Senna australis* Vellozo (Vell.) Irwin & Barneby.

- Sinonímias populares no Brasil

“Fedegoso-rasteiro”; “acácia-da-restinga”.

b) Descrição

Cassia australis é um arbusto de pequeno a médio porte que pode atingir até 2 metros de altura e 2,5 metros de diâmetro (Figura 10).



Figura 10 - *Cassia australis* (arquivo pessoal)

É uma espécie de clima tropical e tropical úmido, cresce em local com bastante incidência de luz e cujo solo pode ser pobre ou mesmo arenoso.

A espécie apresenta flores grandes e vistosas, de cor amarela intensa e com 65 mm de diâmetro em média, as quais exalam um odor suave e cítrico (Figura 11) que atraem diversos insetos polinizadores.



Figura 11 - Flores de *Cassia australis* (retirado de <http://farm1.static.flickr.com/184> em 18/08/10)

As inflorescências de *Cassia australis* destacam-se da ramagem verde, ficando as flores bem evidentes e atrativas à longa distância. Elas são distribuídas uniformemente por toda a planta e “funcionam”, assim, como uma grande unidade de atração para seus polinizadores.

A floração é anual, entre os meses de dezembro e maio, com pico em janeiro e fevereiro. A liberação das sementes inicia-se em fevereiro e estende-se até meados de junho (Silva *et al.* 2002).

c) Distribuição

Ocorre em restingas do litoral brasileiro, principalmente nos estados Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco.

d) Estudos químicos da espécie *Cassia australis*

Ainda não há na literatura dados relativos ao estudo fitoquímico da espécie.

2 - Flavonoides

2.1 - Classificação e Variedade Estrutural

O termo flavonoide corresponde a um grupo grande de substâncias polifenólicas caracterizadas por uma estrutura benzo- γ -pirano. Geralmente possuem um esqueleto comum C₆-C₃-C₆ em que os dois anéis aromáticos são unidos por três carbonos e um oxigênio (Figura 12) (Andersen, 2006; Dewick, 2002).

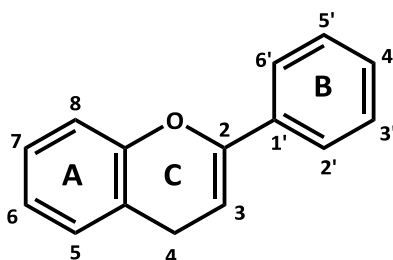


Figura 12 - Esqueleto fundamental de um flavonoide

De acordo com o grau de insaturação e oxidação do anel C, os flavonoides são divididos em várias subclasses: chalcona, flavona, flavonol, flavanona, flavanonol,

flavan-3,4-diol, isoflavona, catequina e antocianidina. (Figura 13) (Andersen, 2006; Dewick, 2002).

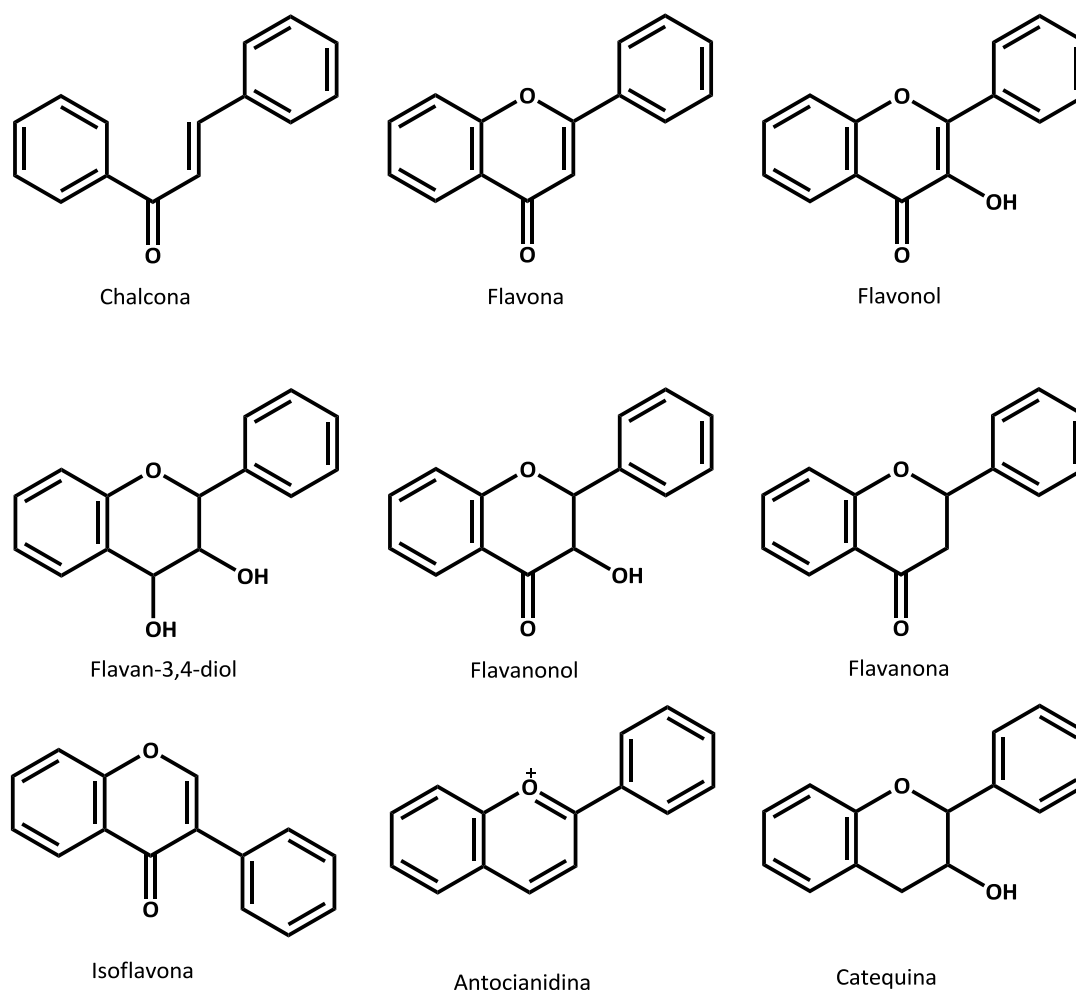


Figura 13 - Classes dos flavonoides

Os flavonoides são normalmente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5' e frequentemente um ou mais grupos hidroxilas podem estar metilados, acetilados, prenilados, glicosilados ou sulfatados. Quando não possuem açúcares ligados, os flavonoides são chamados de agliconas e quando possuem são chamados de glicosídeos (Andersen, 2006; Dewick, 2002).

Os glicosídeos podem estar na forma O- ou C-glicosídeos, porém ligações O-glicosídicas são mais comuns do que ligações C-glicosídicas. Os O-glicosídeos possuem a porção açúcar ligada a um dos grupos hidroxilas da aglicona (mais comumente nas posições 3 e 7), ao passo que os C-glicosídeos possuem a ligação glicosídica através de um carbono (geralmente na posição C-6 ou C-8) (Figura 14). Os açúcares mais frequentemente encontrados são ramnose, glicose, galactose e arabinose (Figura 15) e

podem variar em número e tipo em um mesmo flavonoide. Podem existir ainda resíduos acila como malonato, acetato e cinamato, entre outros, ligados aos açúcares (Andersen, 2006; Dewick, 2002).

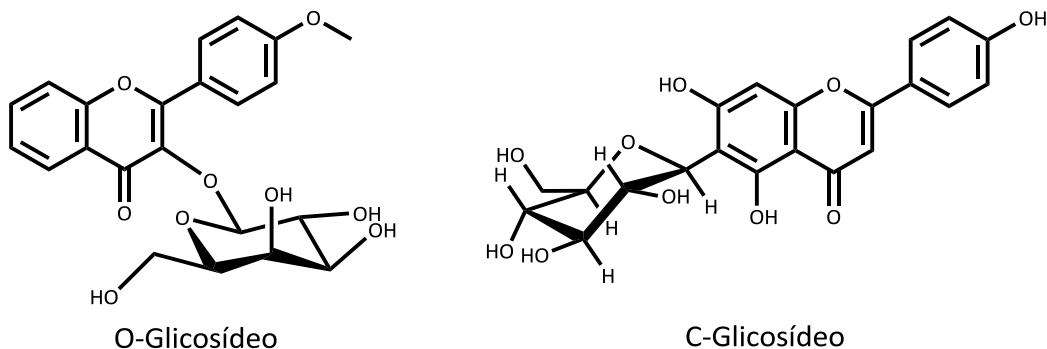


Figura 14 - Exemplo de O-glicosídeo e C-glicosídeo

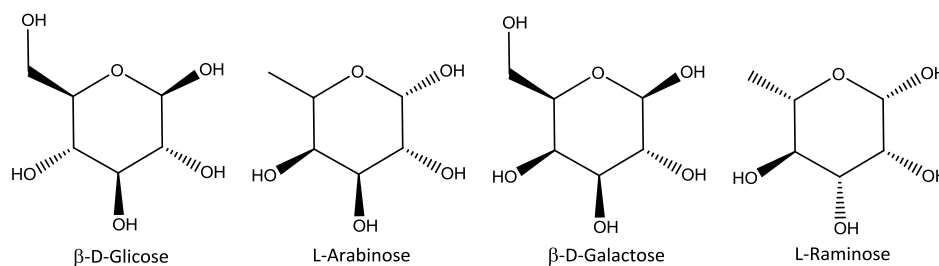


Figura 15 - Estrutura dos açúcares mais comuns em flavonoides

2.2 - Ocorrência, Distribuição e Papel no Metabolismo Vegetal

Os flavonoides estão presentes em seres fotossintéticos e por isso encontrados em quase todas as algas e plantas. A maioria das plantas vasculares contém flavonoides e já existem descritos na literatura isolamento em briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas. Podem ser encontrados tanto em frutas, folhas, sementes, troncos, flores assim como em produtos obtidos a partir de plantas como chás, vinhos, mel e propólis (Aoki, T. *et al.* 2000).

O relato mais antigo sobre determinação de flavonoides em algas e plantas foi para a alga verde *Nitella hookeri* (Characeae) constituída de C-glucosil-flavonas. Desde então flavonoides têm sido relatados a partir de briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas. Algumas famílias possuem preferência na biossíntese de um ou outro

tipo de flavonoide e por esta razão muitas vezes eles são utilizados como quimio-marcadores das espécies (Iwashina, 2000).

Dentre os tipos de flavonoides, as flavonas representam um dos maiores subgrupos e este ainda pode ser dividido devido às possibilidades de hidroxilações, O-metilações, C-metilações, isoprenilações e diversas outras além das possíveis glicosilações, uma vez que a presença de O- e C-glicosídeos é muito frequente. O mais comum é a ocorrência de 7-O-glicosídeos, porém a substituição pode ocorrer em outras posições também. Por conta das várias substituições possíveis no esqueleto principal o número de flavonas já descritas é muito grande – até 1999 cerca de 350 flavonas e 500 flavonas-glicosídicas já haviam sido descritas. São encontradas em mais de 70 famílias do reino Plantae e está presente em todas as partes da planta e em vários órgãos: caule, folhas, brotos, casca, espinhos, raízes, rizomas, flores, frutas e sementes (Martens, 2005).

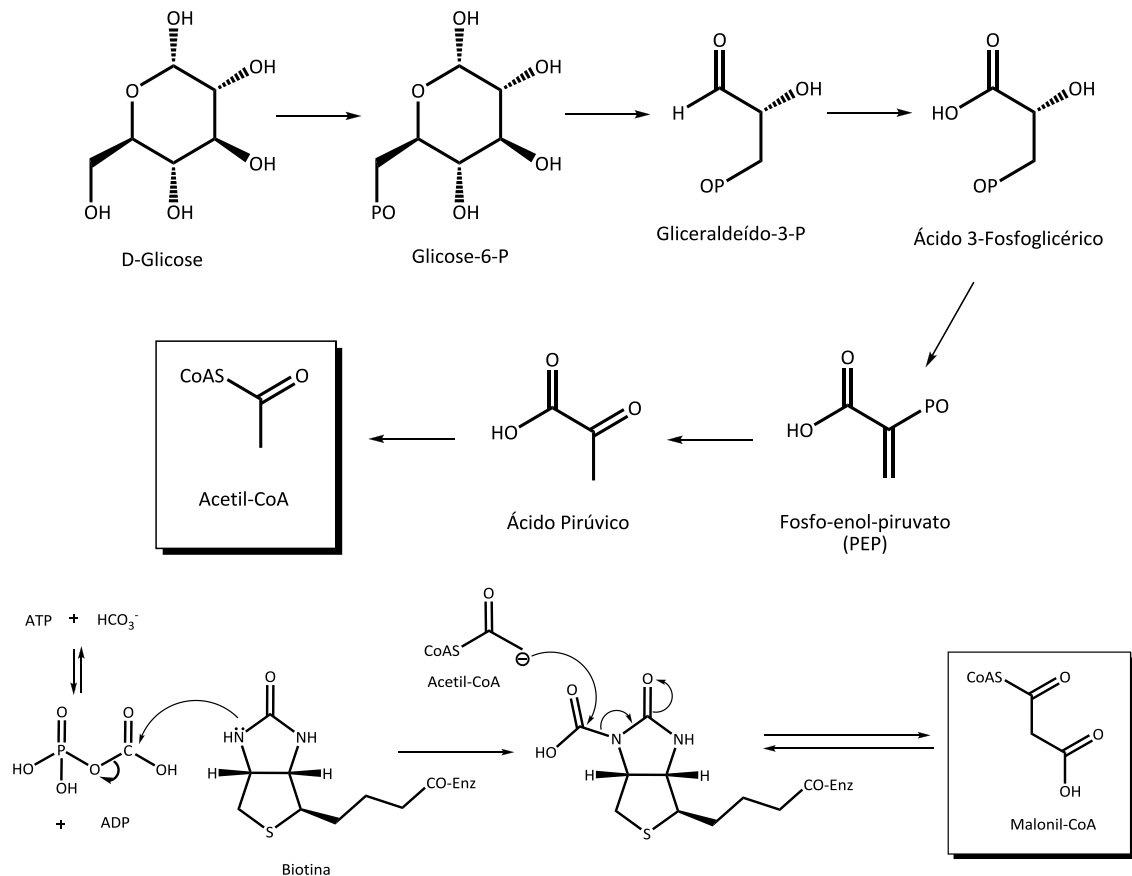
De um modo geral, os flavonoides são necessários para o desenvolvimento pleno das plantas. Encontram-se nos cloroplastos e estão envolvidos com a expressão de diversas enzimas. Eles são um grupo de substâncias coloridas, podendo gerar cores desde as mais claras como branco e marfim até as mais vibrantes como vermelhos e laranjas. E por conta disso, um de seus papéis nas flores é promover uma coloração e um odor atrativos aos polinizadores, favorecendo a dispersão das espécies de plantas. Também estão correlacionados com o papel de defesa, sinalização química e regulação de enzimas. Seu papel de defesa consiste na proteção frente tanto a microorganismos patógenos, como fungos e bactérias, aos insetos e outros animais herbívoros, quanto à radiação UV-B ou ao efeito de outras plantas (atividade alelopática). Como sinalizadores químicos, atuam como uma resposta às condições de estresse biótico e abiótico (Cushnie, 2005; Cartaya, 2001).

2.3 - Biossíntese

O anel B e os três carbonos que compõem o anel C originam-se do ácido aminado fenilalanina, que é produzido pela via do chiquimato. Os seis carbonos do

anel A são originados a partir de unidades de malonil-CoA, produzidas pela via do acetato (Dewick, 2002).

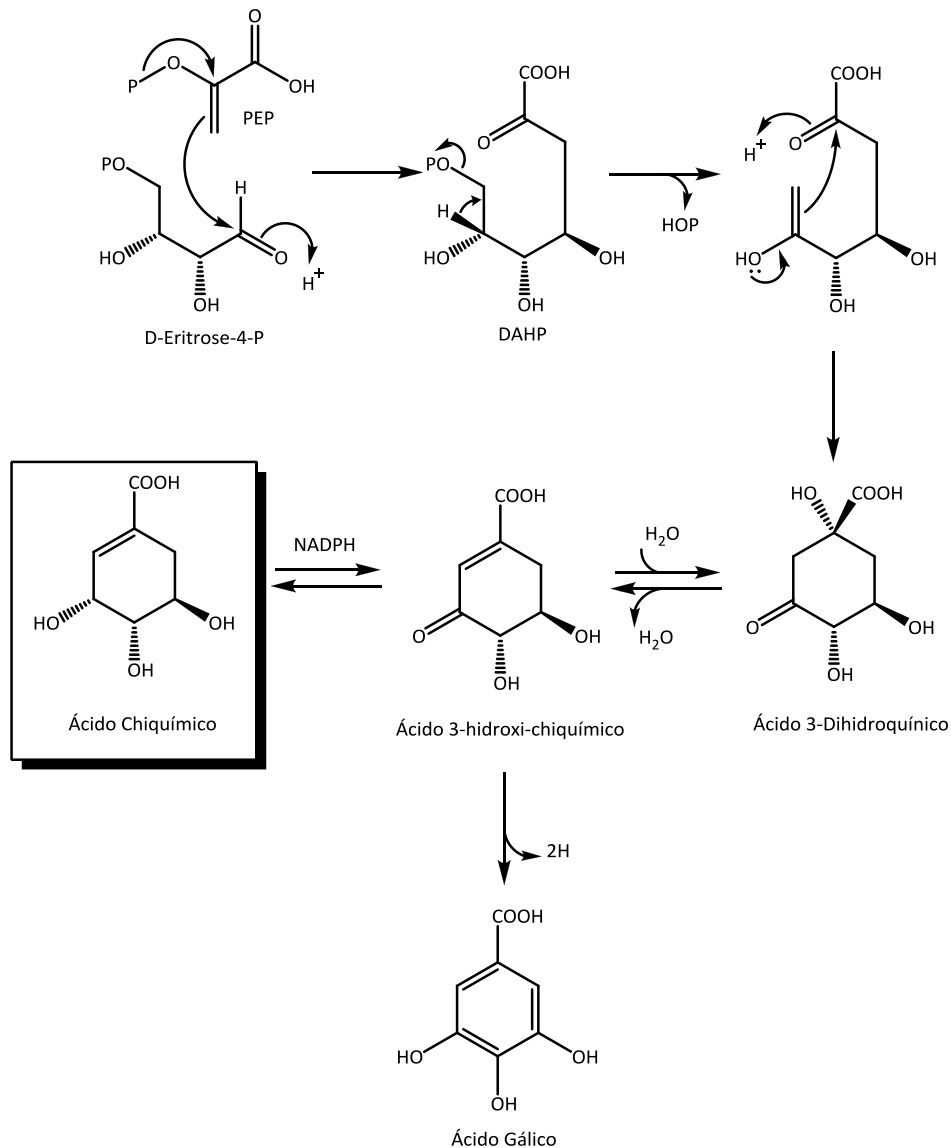
O acetil-CoA é formado através da descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico, oriundo da via da glicólise. O malonil-CoA é gerado através de uma reação de carboxilação do acetil-CoA através do CO₂, utilizando-se a coenzima biotina e ATP (Esquema 1) (Dewick, 2002).



Esquema 1 - Biossíntese do Acetil-CoA e do Malonil-CoA

A formação da fenilalanina começa com a ligação do fosfo-enol-piruvato (PEP) com a D-eritrose-4-fosfato gerando um esqueleto de sete carbonos chamado 3-deoxi-D-arabino-heptulose (DAHP). Com a saída do ácido fosfórico do DAHP e posteriormente uma reação aldol intramolecular, o 3-deidro-quinato é formado. Este após sofrer uma desidratação forma o 3-hidroxi-chiquimato e este ao sofrer uma redução pelo NADPH forma então o ácido chiquímico. O 3-hidroxi-chiquimato pode gerar também dois outros produtos: o ácido gálico – após sofrer oxidação e enolização

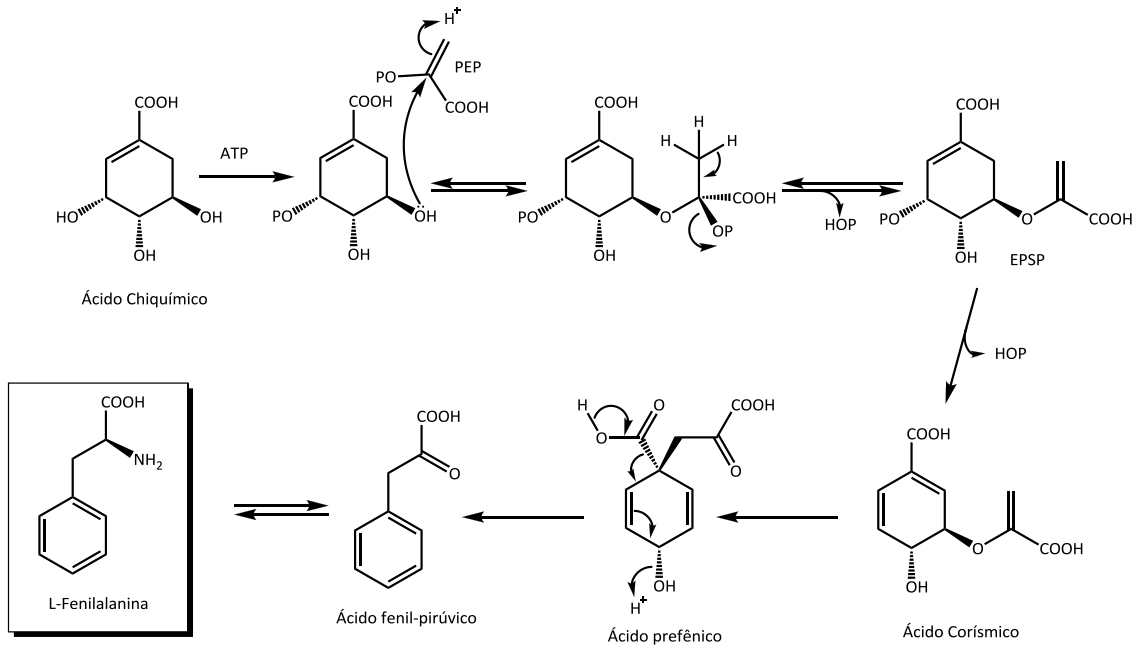
– e o ácido protocatecuico – após sofrer desidratação e enolização (Esquema 2) (Dewick, 2002).



Esquema 2 - Biossíntese do Ácido Chiquímico

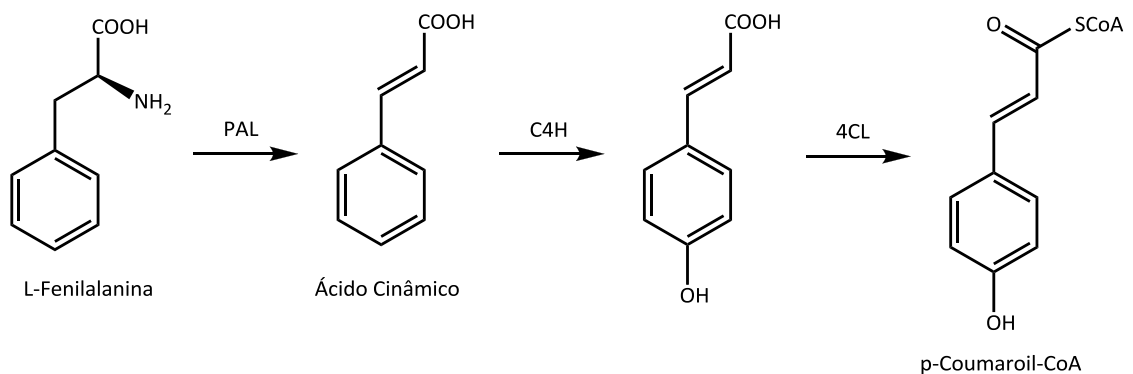
O ácido chiquímico, após uma fosforilação na posição 3, reage com o PEP através de uma reação de adição seguida de eliminação formando o 3-enol-piruvil-chiquimico-3-fosfato (EPSP). Com a eliminação do ácido fosfórico do EPSP, é formado, portanto, o ácido corísmico. O ácido corísmico sofre um rearranjo formando o ácido prefênico. A biossíntese da fenilalanina através do ácido prefênico varia de organismo para organismo, pois depende das enzimas envolvidas. De um modo geral, duas reações estão envolvidas: uma aromatização através de descarboxilação – formando o

ácido fenil-pirúvico – e uma transaminação que converte o grupamento cetona em um grupamento amina (Esquema 3) (Dewick, 2002).



Esquema 3 - Biossíntese da L-Fenilalanina

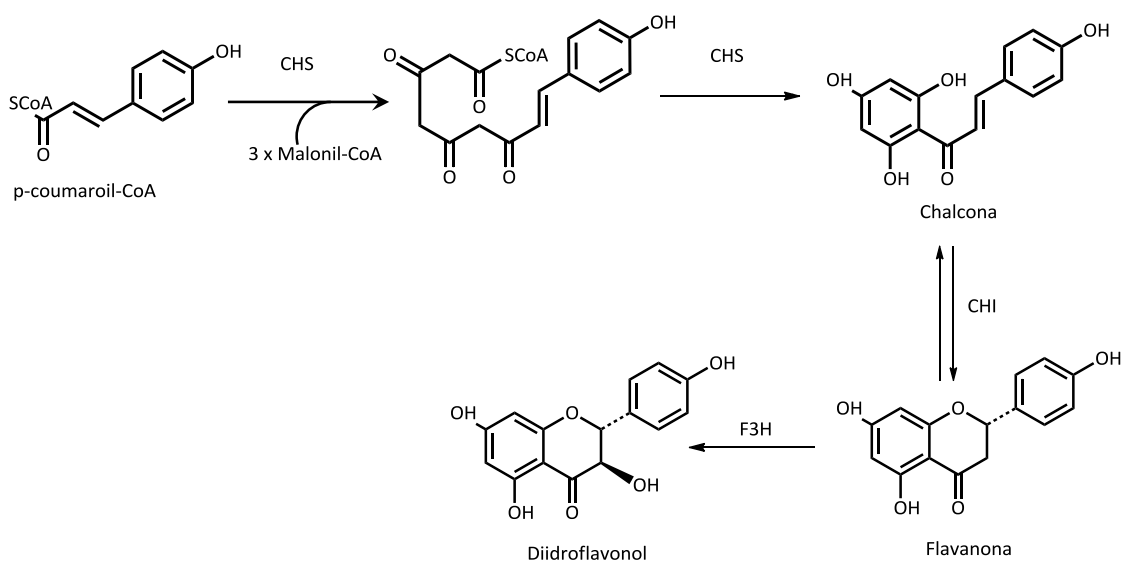
A fenilalanina elimina amônia através da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) gerando o ácido *trans*-cinâmico. Este forma através da enzima cinamato-4-hidroxilase (C4H) o ácido *p*-coumárico. Finalmente, a formação do éster *p*-coumaroil-CoA se dá através da ação da enzima 4-coumarato-CoA ligase (4CL) (Esquema 4). (Dewick, 2002).



Esquema 4 - Biossíntese do p-Coumaroil-CoA

A biossíntese dos flavonoides começa, de fato, com a condensação de uma unidade do *p*-coumaroil-CoA com três unidades do malonil-CoA através de

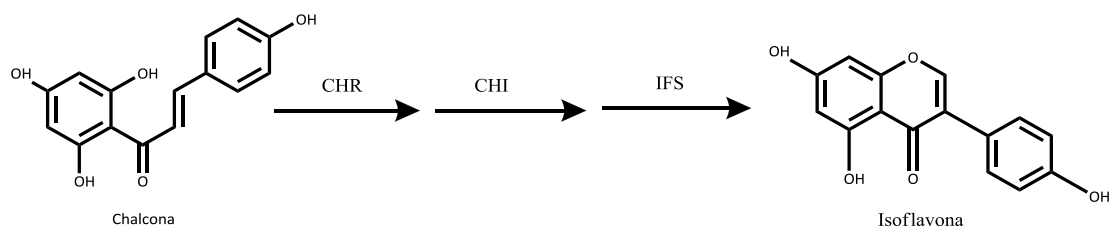
descarboxilações sequenciais feitas pela enzima chalcona sintase (CHS), formando uma chalcona. As hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel A, muito comuns nos flavonoides, é gerada através dessa enzima nesse estágio. O próximo passo é a formação de uma flavanona pela ação da enzima chalcona isomerase (CHI), que converte a chalcona em uma (2S)-flavanona ao fechar o anel C por uma isomerização estereoespecífica. Em seguida a enzima flavanona 3-hidroxilase (F3H) faz uma 3-hidroxilação estereoespecífica gerando o diidroflavonol (Esquema 5). Tanto a chalcona, quanto a flavanona e o diidroflavonol servirão de intermediários para a biossíntese das outras classes de flavonoides de acordo com o metabolismo de cada espécie, porém quando a enzima F3H não é expressa ou então é inativa, as flavanonas serão predominantes e as demais classes de flavonoides não serão encontradas (Dewick, 2002).



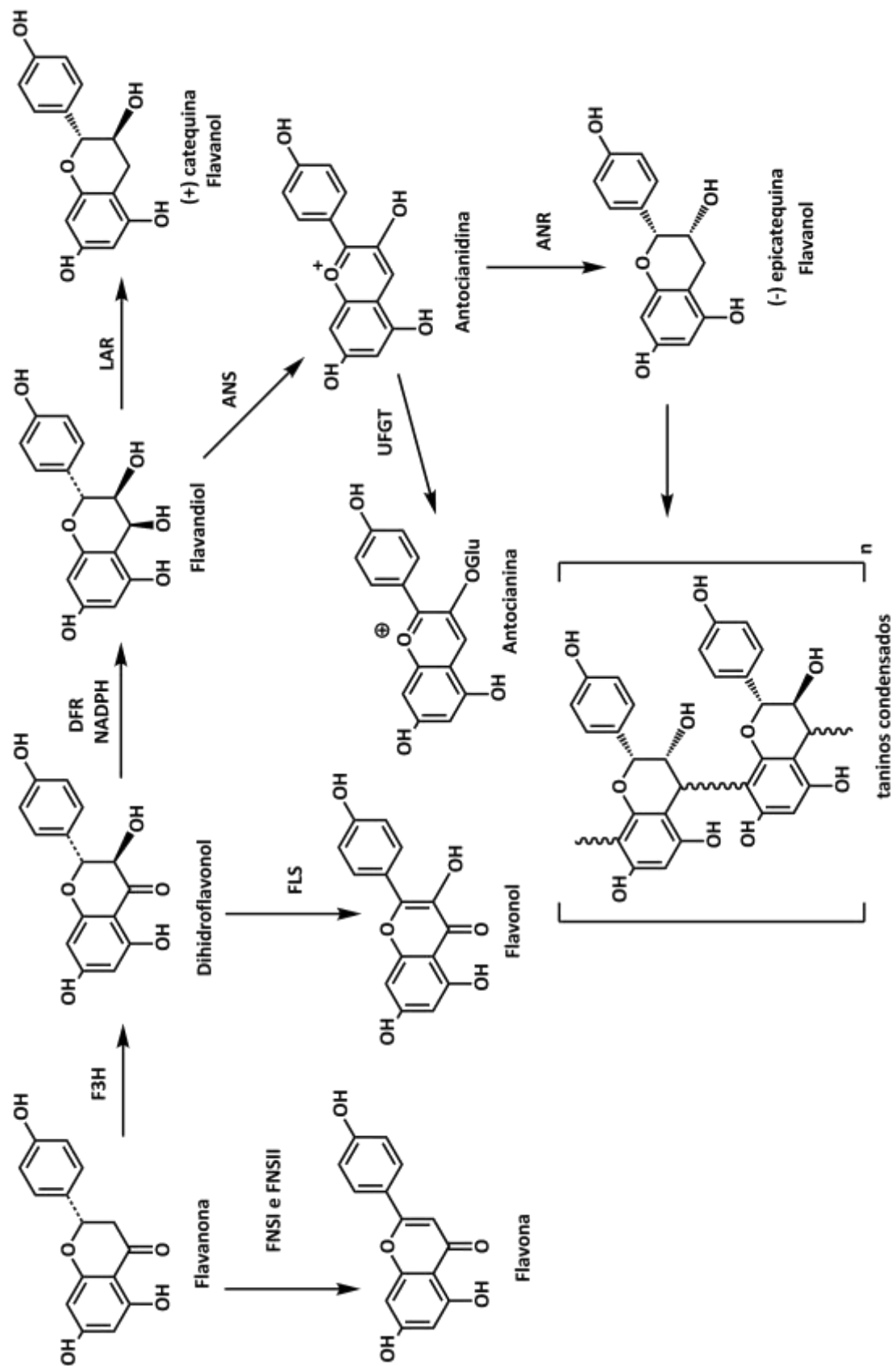
Esquema 5 - Biossíntese da Flavanona e do diidroflavonol

As flavonas são derivadas das flavanonas por uma redução no anel C, catalisada por duas enzimas flavona sintase (FNSI e FNSII), enquanto que os flavonóis são sintetizados a partir dos diidroflavonóis pela ação da enzima flavonol sintase (FLS). Os Flavandióis não são tão facilmente encontrados no reino Plantae, uma vez que atuam como precursores de outras classes de flavonoides. Eles são formados a partir dos diidroflavonóis através da enzima diidroflavonol redutase (DFR) em uma

reação NADPH-dependente. As antocianidinas são sintetizadas a partir do flavandióis pela ação da enzima antocianidina sintase (ANS) e através da enzima UDP-glicose-flavonoide 3-O-glicosiltransferase (UGFT) formam as antocianinas. Os flavanóis são formados por duas vias biossintéticas: uma a partir do flavandióis, que pela ação da enzima leucoantocianidina redutase (LAR) dão origem às (+)-catequinas; e a outra a partir das antocianidinas, que pela ação da antocianidina redutase (ANR) dão origem às (-)-epicatequinas. Os flavanóis, quando polimerizados, formam os taninos condensados (Esquema 7). As isoflavonas são sintetizadas a partir das chalconas, primeiramente através da ação da enzima chalcona redutase, formando uma deoxichalcona. Este intermediário sofre então ação das enzimas chalcona isomerase (CHI) e isoflavona sintase (IFS), formando então a isoflavona (Esquema 6) (Dewick, 2002).



Esquema 6- Biossíntese da Isoflavona



Esquema 7 - Biosíntese dos derivados flavonoídicos

O motivo pelo qual existe uma grande variabilidade de estruturas de flavonoides se deve:

- às diferenças entre as estruturas fundamentais das agliconas e seu grau de oxidação/redução;
- às diferenças quanto ao número e às posições das hidroxilações nas agliconas;
- às diferenças entre as derivatizações dos grupos hidroxilas – como, por exemplo, metilações, prenilações, glicosilações, etc.

2.4 - Isolamento e identificação estrutural

O essencial para o estudo dos flavonoides é saber quais são os meios possíveis para a sua separação (analítica ou preparativa) e seu isolamento.

Até a década de 1970, a cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Poliamida, Eletroforese por Papel e Cromatografia em Gel de Silica eram as técnicas de separação mais utilizadas para substâncias fenólicas (Horowitz, 1960; Williams, 1952; Hrazdina, 1970). De todos esses métodos, CCD continua sendo atualmente uma das principais técnicas para análise qualitativa de flavonoides, uma vez que é um método rápido, versátil e simples.

No início dos anos 1980, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) começou a ser muito utilizada (Bankova, 1983; Oleszek *et al.* 1988). Atualmente esta técnica é utilizada tanto em análises qualitativas como quantitativas e é possível identificar, separar e quantificar flavonoides ao acoplar o CLAE a detectores de Ultra-Violeta (UV), do Espectrômetro de Massas (EM) ou da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Ossipov *et al.* 1995; Zeraik, 2010; Ye *et al.* 2002; Waridela, 2004; Tatsisa *et al.* 2007).

Um grande número de técnicas também pode ser utilizado para separações preparativas: CLAE, cromatografia em colunas com fases estacionárias tipo Diaion, XAD-2 e XAD-7, cromatografia em coluna por exclusão em gel com Sephadex LH-20, entre outras (Einbonda *et al.* 2004; Modnicki *et al.* 2007; Tomás-Barberán, 2002; Krenna *et al.* 2003). A escolha do melhor método depende do extrato obtido e o tipo de flavonoide estudado.

Para a extração de flavonoides a escolha do solvente muitas vezes depende do tipo de flavonoide presente e por conta disso a polaridade do solvente é muito importante. Clorofórmio e acetato de etila são capazes de extrair os flavonoides menos polares, como isoflavonas, flavanonas, flavonas metiladas e flavonóis. Já flavonoides mais polares, como glicosídeos e algumas agliconas, podem ser extraídos com alcoóis ou misturas de álcool e água. Pode-se também utilizar a extração por solventes sequenciais, através do aumento do gradiente da polaridade. O primeiro passo consiste na utilização de diclorometano ou acetato de etila, por exemplo, para a extração dos flavonoides menos polares. No segundo passo, utiliza-se butanol para a extração dos flavonoides mais polares (Rijke *et al.*, 2006; Naczki, 2004; Andersen, 2006).

Com os avanços da técnica de RMN já é possível assinalar quase que todos os sinais do espectro de hidrogênio e carbono de um flavonoide isolado, principalmente quando se tem os espectros dos experimentos de RMN em 2D como HSQC e HMBC. Nestes experimentos, os núcleos ^1H são magnetizados e diretamente detectados, enquanto que os núcleos ^{13}C são indiretamente detectados. No HSQC, correlaciona-se um núcleo ^{13}C com um núcleo ^1H em apenas em uma ligação e por isso os sinais observados no espectro são de correlação direta ($^1J_{\text{CH}}$). No HMBC, as correlações são através de mais de uma ligação e por isso observam-se correlações a longa distância ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$). Também é possível se obter informações através do NOESY – um experimento de RMN em 2D que correlaciona as interações espaciais dos núcleos. Espera-se em um espectro de ^1H de um flavonoide a ocorrência de sinais na região entre 6 e 8 ppm para os hidrogênios dos anéis A e B e sinais entre 3,5 e 5,5 ppm para os hidrogênios do açúcar. Um sinal simples para H-3, no anel C, entre 6,3 e 6,8 ppm, é um bom indicativo da presença de flavonas. (Andersen, 2006).

2.5 - Atividade Biológica

Já existem diversos estudos sobre as atividades biológicas dos flavonoides, entre eles atividade antimicrobiana (Cushnie, 2005), antiparasitária (da Silva *et al.*, 2008), cardioprotetora (Geleijnse, 2008; Tijburg, 1997), hipoglicemiante (Cazarolli,

2008), entre outras. Abaixo estão descritos alguns exemplos das atividades biológicas dos flavonoides.

a) Atividade anti-inflamatória

Flavonoides podem diminuir o número de leucócitos imobilizados durante um processo inflamatório assim como podem inibir a degranulação de neutrófilos e mastócitos. Também foi observado que podem inibir as vias de produção da ciclo-oxigenase (COX) e da 5-lipoxigenase (LOX) pelo metabolismo do ácido aracdônico, porém o mecanismo exato pelo qual os flavonoides inibem estas enzimas não está claro. Outras formas de atividade anti-inflamatória está relacionada a inibição da biossíntese das prostaglandinas e com a inibição de enzimas tirosina cinase. Estas enzimas estão envolvidas com uma variedade de funções, como catalisadores, transporte de membrana, receptores hormonais e de fatores de crescimento e transferência de energia na síntese de ATP. Ao inibi-las, o flavonoide inibe o crescimento e a proliferação celular descontrolados gerados no processo inflamatório (Nijveldt *et al.* 2001).

b) Atividade antiviral

Os flavonoides possuem atividade frente a inúmeros vírus. Quercetina, morina, rutina, diidroquercetina, leucocianidina, catequina e outros apresentaram atividade contra diversos vírus, entre eles o vírus causador da herpes (Herpes simplex virus - HSV), Influenza e Adeno vírus. O mecanismo de ação proposto envolve inibição da polimerase viral ao se ligar ao ácido nucleico viral. Também foi demonstrado, que o flavonoide afeta os estágios de replicação viral e que a aglicona é mais efetiva em sua forma livre do que ligada a um açúcar (Cushnie, 2005).

A presença de sinergismo também foi observada quando combinados algumas flavonas e flavonóis. Por exemplo, kaempferol e luteolina mostraram-se mais efetivos juntos no combate ao HSV, o que pode explicar porque própolis é mais ativo do que o flavonoide isolado. O sinergismo também foi observado entre flavonoides e outros agentes anti-virais: quercetina e apigenina potencializaram o efeito do aciclovir frente ao HSV (Cushnie, 2005).

Por conta do aumento do número de pessoas contaminadas pelo vírus HIV desde os anos 1980, as investigações pela atividade anti-viral das substâncias têm se voltado para essa área, porém ainda não foram descritas contribuições significativas da atividade dos flavonoides frente ao HIV (Nijveldt *et al.* 2001).

c) Atividade antibacteriana

Existem diversos dados na literatura sobre a atividade antimicrobiana de flavonoides, porém muitos ainda não possuem seus mecanismos de ação completamente elucidados (Cushnie, 2005). Dentre as estruturas, podemos destacar a retrochalcona licochalcona C isolada de *Glycyrrhiza inflata* cuja concentração mínima para inibir o crescimento (MIC) de *Staphylococcus aureus* foi de 6,25 mg/mL (Haraguch, 1998). Flavonas isoladas de *Sophora exigua* apresentaram MIC entre 3,13 e 6,25 mg/mL para uma linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, o que pode ser uma alternativa ao tratamento de infecções hospitalares por bactérias multiresistentes (Tsuchiya *et al.* 1996).

Os flavonoides possuem a capacidade de quelar íons metálicos como Fe^{+2} , Zn^{+2} e Cu^{+2} e, por isso, ao retirarem esses metais do meio biológico, podem inibir o crescimento de diversos microorganismos, uma vez que estes muitas vezes possuem fatores de crescimento dependentes destes metais (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

d) Atividade cardioprotetora

Uma explicação para os efeitos protetores dos flavonoides sobre as doenças coronarianas se deve à habilidade de prevenir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), responsáveis pela produção de placas de ateroma, ao diminuir a quantidade de radicais livres circulantes na corrente sanguínea. Outra habilidade é a anti-agregação plaquetária devido à capacidade de inibir a cascata de ativação da COX e da LOX, o que diminui a o processo inflamatório do vaso e a agregação plaquetária (Yao *et al.* 2004).

e) Atividade antitumoral

Os flavonoides interferem em um grande número de vias celulares regulatórias, como crescimento, apoptose, divisão celular, transcrição, transmissão

neuronal, resposta ao estresse, processos inflamatórios, etc. Eles podem agir como sequestrante de radicais livres, inibidores enzimáticos, entre outros e seus efeitos podem ser divididos em dois grupos: efeitos eletrônicos e feitos estéricos. A capacidade de mobilizar os elétrons do anel aromático, responsável pela a atividade antioxidante, quanto à semelhança estrutural com diversas substâncias presentes no meio biológico, pode explicar a capacidade de inibir enzimas, hormônios, etc. A alta afinidade por íons metálicos também complementa a atividade, uma vez que muitas enzimas são dependentes de metais como ferro, cobre e zinco (Havsteen, 2002). Um exemplo de atividade antitumoral foi relatado por Hsu e colaboradores (2009) que demonstraram que a flavona tricetina foi capaz de inibir o ciclo celular da célula de uma linhagem de câncer de mama, além de induzir a morte destas mesmas células por apoptose, o que sugere que, no futuro, este flavonoide poderá ser um potente agente antitumoral.

3 - Atividade Antioxidante

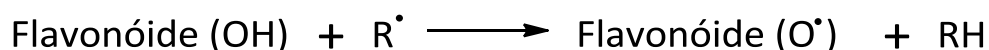
3.1 - Flavonoides e atividade antioxidante

Uma das propriedades mais relevantes da maioria dos flavonoides é sua capacidade de agir como antioxidante. As flavonas e as flavan-3-óis são, dentre os tipos de flavonoides, os que apresentam maior atividade antioxidante frente às espécies de radicais livres. As células do corpo humano estão constantemente interagindo com radicais livres e espécies de oxigênio reativas devido ao metabolismo normal ou por alguma influência externa. Não se sabe exatamente todos os mecanismos envolvidos da interação entre os radicais livres e as nossas células, porém um dos fenômenos conhecidos até o momento é a peroxidação lipídica, que resulta em um dano às membranas celulares. Tais danos podem alterar a pressão osmótica da célula, devido às alterações na estrutura da membrana, o que leva a morte celular. Radicais livres são capazes de atrair diversos mediadores de inflamação, o que contribui para o estado inflamatório do organismo responsável por diversos danos celulares também (Martínez-Flórez *et al.* 2002; González-Torres *et al.* 2000; Heim *et al.* 2002; Cartaya, 2001; Harborne, 2000).

Ao longo do processo evolutivo, o organismo vivo desenvolveu diversas maneiras de combater as espécies de radicais reativas através de enzimas como, por exemplo, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e também através de processos não enzimáticos utilizando substâncias com atividade antioxidante como, por exemplo, glutathione e ácido ascórbico. Quando há um desequilíbrio na produção de espécies radicalares no organismo, o resultado final é um aumento no consumo e por consequência a diminuição das substâncias antioxidantes endógenas (Martínez-Flórez *et al.* 2002; González-Torres *et al.* 2000; Heim *et al.* 2002; Cartaya, 2001; Harborne, 2000).

Os flavonoides, quando ingeridos, podem reverter esse quadro, uma vez que eles interagem com as espécies radicalares por diversos mecanismos, o que faz com que desempenhem um papel de quimioproteção ao organismo (Martínez-Flórez *et al.* 2002; González-Torres *et al.* 2000; Heim *et al.* 2002; Cartaya, 2001; Harborne, 2000).

O principal mecanismo antioxidante é por sequestro direto de radicais livres. Os flavonoides são oxidados pelos radicais, gerando uma espécie radicalar mais estável e menos reativa, de acordo com o esquema abaixo (Esquema 8) (Martínez-Flórez *et al.* 2002; González-Torres *et al.* 2000; Heim *et al.* 2002; Cartaya, 2001; Harborne, 2000):



Esquema 8 - Oxidação de um flavonoide (Onde R• é um radical livre e O• é o oxigênio radical do flavonoide)

3.2 – Estrutura x atividade antioxidante

Os requisitos químicos necessários para se estabelecer a capacidade antioxidante em um flavonoide são:

- A presença de duas hidroxilas no anel B confere ao flavonoide uma maior estabilidade na forma radicalar, por conta da possibilidade de deslocalização dos elétrons. Quando as hidroxilas estão em *orto* (formando o grupo catecol) o flavonoide possui uma atividade maior quando comparada às hidroxilas na posição *meta*.

- Ligação dupla entre as posições C-2 e C-3 do anel C, em conjugação com a carbonila, é capaz de deslocalizar os elétrons devido a uma conjugação com o anel B.
- A substituição do hidrogênio de grupamento hidroxila em C-3, por açúcar ou grupo alquila aumenta a tensão entre as ligações do anel e diminui a atividade antioxidante. A substituição da hidroxila por um hidrogênio desestabiliza a deslocalização dos elétrons e também diminui a atividade antioxidante.
- Grupos hidroxilas nas posições 7 e 5 no anel A em conjugação com a carbonila em C-4 no anel C são necessários para uma atividade antioxidante máxima.

Certas substituições diminuem a atividade antioxidante. Por exemplo, a presença de grupamentos açúcares, faz com que glicosídeos possuam atividade antioxidante menor do que das suas respectivas agliconas. A presença de substituições dos grupos hidroxilas do anel B por grupos metoxilas também faz com que a atividade diminua (Martínez-Flórez *et al.* 2002; González-Torres *et al.* 2000; Heim *et al.* 2002; Cartaya, 2001; Harborne, 2000; Rice-Evans, 1996; Balasundram, 2006).

II – Objetivo

O presente trabalho tem por objetivo o isolamento de flavonoides e a avaliação da atividade antioxidante da espécie *Cassia australis*.

Objetivos específicos:

- Isolar flavonoides utilizando técnicas de cromatografia em coluna;
- Identificar os flavonoides por técnicas de uni- e bidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C ;
- Determinar o teor de compostos fenólicos das partições em acetato de etila e butanol pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar a atividade antioxidante das partições em acetato de etila e butanol através do método de sequestro do radical DPPH $^\bullet$.

III – Material e Métodos

1 – Material

1.1 – Material vegetal

O material vegetal foi coletado na Reserva de Grumari (Rio de Janeiro) em dezembro de 2008 e depositado pela professora Alice Sato sob o número 652HUNI no Herbário da Universidade do Rio de Janeiro (UNIRIO).

1.2 – Fases Estacionárias utilizadas para Cromatografia

- Sephadex LH-20 (PHARMACIA®)
- XAD-2 (Sigma-Aldrich®)
- Gel de Silica (400 – 200 Mesh) (Ultra Chem®)

1.3 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

- Placa (de alumínio) de gel de sílica AL 60 F254 20 x 20 cm MERCK®.

1.4 – Solventes

- Para cromatografia:
 - ▶ Solventes em grau para análise (p.a.) nas cromatografias em camada delgada e coluna e em grau espectroscópico para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As misturas de solventes foram feitas sempre volume a volume (v/v).
- Para RMN
 - ▶ Solvente deuterado (DMSO- d_6).

1.5 – Reagentes

- Para preparação dos meios reacionais foram utilizados reagentes em grau para análise e para meio aquoso empregou-se água desmineralizada.
- Para a análise das CCD foram utilizados os seguintes reagentes cromogênicos:

- ▶ NP (“Natural Products”): Solução de 2-aminoetildifenilborato em EtOH a 1 mg/ml SPECTRUM®
- ▶ PEG: Solução de Polietilenoglicol 4000 a 5% em EtOH (PEG) FLUKA®
- ▶ Orcinol: Solução de Orcinol MERCK® 2% em EtOH.
- ▶ $H_2SO_{4(aq)}$: Solução de H_2SO_4 (p.a.) a 10% em H_2O destilada.
- Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizada solução 0,3 mM de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) SIGMA® em MeOH.
- Para determinação do teor de fenóis totais foram utilizados soluções de Folin–Ciocalteu SPECTRUM® (10% em H_2O destilada) e Carbonato de Sódio (7,5% de Na_2CO_3 anidro em H_2O destilada) VETEC®.
- Para a hidrólise das partições foi utilizada solução de Ácido Trifluoroacético (TFA) (Merck®) 2N em MeOH.
- Para a hidrólise das CCD foi utilizada Ácido Clorídrico P.A (Vetec®).

1.6 – Equipamentos

- A análise em CLAE acoplada ao detector de feixe de fotodiodos foi realizada em aparelho SHIMADZU® CBM-10 A, equipado com bomba LC-10AD e detector ultravioleta de feixe de fotodiodos SPD-M10A. A coluna utilizada foi a Lichrosorb-RP-18 de 25 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro.
- Para medidas no ultravioleta (UV) foi utilizado um espectrofotômetro SHIMADZU® modelo U.V-1601 com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm QS HELIMA®.
- Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN¹H e RMN¹³C) foram registrados em espectrômetros Jeol Eclipse+ spectrometer (400 MHz), Varian (400 e 500 MHz) e Bruker DRX (400 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e a multiplicidade destes descrita como: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), multiplete (m) e duplete duplo (dd). Os experimentos HSQC, HMBC e COSY foram realizados usando-se o *software* de aquisição pertencente aos sistemas utilizados. A calibração dos espectros foi feita com o sinal do TMS

(preferencialmente) ou com o sinal do solvente utilizado. Os processamentos dos espectros foram realizados utilizando-se os software MestReNova 6.0.2.

- Para evaporação dos extratos e frações foi utilizado um evaporador rotatório PEMEM® juntamente com bomba de vácuo COLE PARMER INSTRUMENT COMPANY modelo 7049-50 e um banho FISATOM® modelo 550 (1200 W 230 V).
- A liofilização foi realizada em liofilizador LABCONCO®.
- Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica modelo AB204 METTLER TOLEDO MICRONAL S/A.

2 – Análise fitoquímica

2.1 – Preparação do Extrato Hidrometanólico

Foram separados folhas, galhos e flores. As folhas foram secadas em estufa a 50°C. O material seco foi moído em moinho de facas e no final obteve-se 850g de folhas. O material triturado foi extraído por maceração durante sete dias utilizando-se um total de 5L da mistura de solventes MeOH:H₂O (8:2).

2.2 – Análise do perfil cromatográfico por CLAE

Em busca do perfil cromatográfico das partições e das frações mais purificadas realizou-se análise através do CLAE/UV com os seguintes parâmetros:

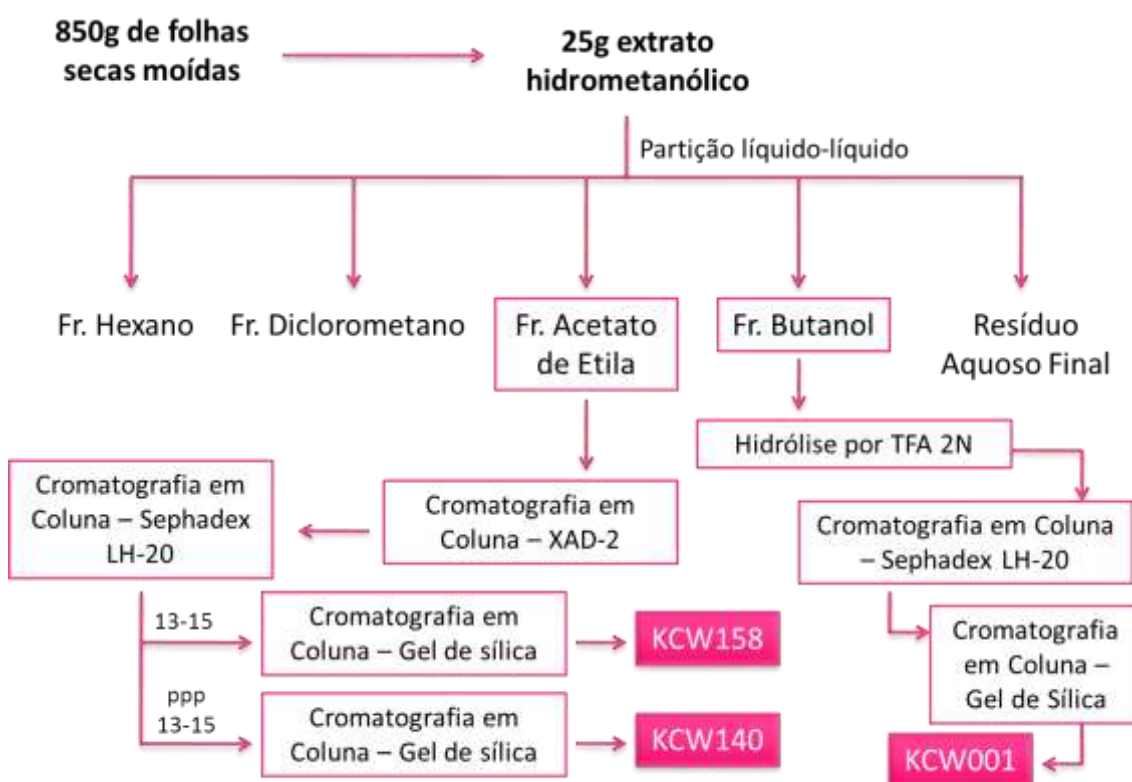
- Coluna RP 18
- Eluição por gradiente (5% de B até 70% de B em A por 55 min), onde:
 - ▶ solução A = H₂O: H₃PO₄ 1%
 - ▶ solução B = MeOH:H₃PO₄ 1%.

2.3 – Isolamento e caracterização de substâncias

O extrato hidrometanólico obtido foi concentrado em evaporador rotativo fornecendo 25g de material bruto. Este foi ressuspenso em MeOH:H₂O (9:1) e submetido a sucessivas partições líquido-líquido com hexano. Separada a fração hexânica, a fração metanol:água foi evaporada para retirada do metanol e, sobre o

resíduo aquoso procederam-se as sucessivas partições com diclorometano, acetato de etila e butanol (Esquema 9).

A partição hexânica foi descartada. A diclorometânica foi guardada para posterior análise. As demais foram investigadas utilizando-se CCD. As cromatoplasas foram eluídas na fase orgânica da solução de BuOH:H₂O:HAc (4:5:1) e em CHCl₃:MeOH (9:1), reveladas com NP/PEG e observadas em lâmpada ultravioleta na busca por flavonoides. As partições em acetato de etila e butanol apresentaram o perfil desejado e ambas foram concentradas em evaporador rotativo e posteriormente trabalhadas.



Esquema 9 - Esquema resumido da análise fitoquímica do extrato hidrometanólico de *Cassia australis*

2.3.1 – Partição em Acetato de Etila

Foram obtidos 8,1g de material concentrado e devido ao perfil flavonoídico variado apresentado na CCD (Figura 16) optou-se por fazer mais de um tipo de fracionamento por cromatografia em coluna (Esquema 10).

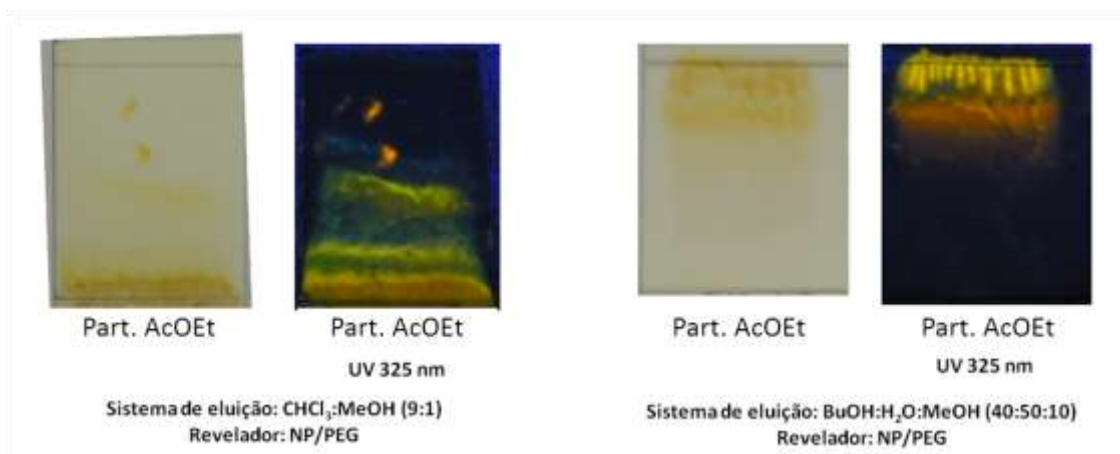


Figura 16 - CCD Partição em Acetato de Etila



Esquema 10 - Fracionamento da partição em Acetato de etila

2.3.1.1 – Cromatografia Líquida Utilizando XAD-2

Para o fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia líquida em coluna aberta, utilizando XAD-2 como fase estacionária, foram utilizados 2,0g da amostra e gradiente de MeOH:H₂O como fase móvel, começando com 100% de H₂O e seguindo até 100% de MeOH, numa concentração crescente de metanol, de 10 em 10%, sobre água. Utilizou-se 150mL de cada mistura proporcional e foram recolhidos 150mL de cada eluato. As frações obtidas foram aplicadas em CCD e as cromatoplasas foram eluídas na fase orgânica da solução de BuOH:H₂O:HAc (4:5:1) e reveladas com NP/PEG. As frações que apresentaram semelhança no perfil cromatográfico foram agrupadas (Figura 17).

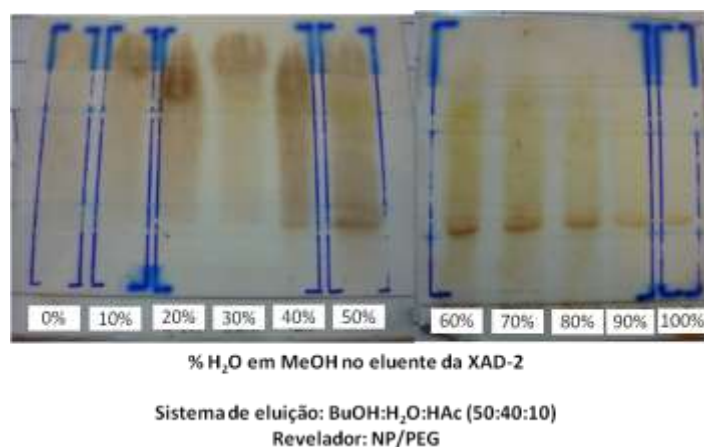


Figura 17 - CCD das frações da partição em acetato de etila em XAD-2

As frações [0% - 22,2 mg], [10% - 99,8 mg], [50% - 121,2 mg] e [60-90% - 275,9 mg], por conterem substâncias reveláveis pelo reagente NP/PEG, foram separadas para serem purificadas.

A fração obtida em 0% de H₂O e 100% MeOH foi submetida a duas colunas de Sephadex LH-20, utilizando MeOH 90% em H₂O como fase móvel, porém, ao final, o material purificado apresentou rendimento muito baixo ($m < 1,0$ mg), o que impossibilitou a realização dos espectros de RMN.

A fração eluída em 10% de H₂O e 90% de MeOH foi refractionada por Sephadex LH-20, iniciando em MeOH:H₂O (7:3) e indo até MeOH 100%, de 100 em 100 ml, e as frações obtidas foram agrupadas por semelhança e repurificadas (Figura 18). As frações E, F e H foram repurificadas por Sephadex LH-20 novamente, porém os rendimentos finais também foram insuficientes para possibilitar a obtenção de espectros.



Figura 18 - CCD do fracionamento da fração [10% H₂O - Partição Acetato de Etila]

A fração obtida em 50% de MeOH e 50% de H₂O também foi refracionada por Sephadex LH-20, iniciando em MeOH:H₂O (3:7) e indo até MeOH 100%, de 100 em 100 ml. Foram obtidas diversas frações (Figura 19) e as frações 8-10 e 11-13 foram refracionadas para purificação.

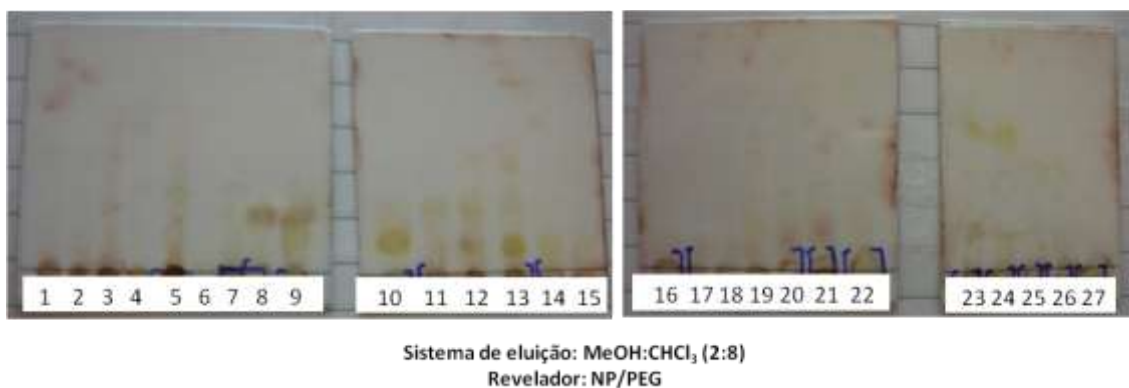


Figura 19 - CCD do fracionamento da fração [50% H₂O - Part. Acetato de Etila]

As frações 8-10 foram submetidas a uma nova purificação, desta vez em coluna de gel de sílica começando com 90% de CH₂Cl₂ e 10% de MeOH e indo até 100% de MeOH, de 5% em 5% e recolhendo 5 em 5 mL. Ao final, as subfrações foram agrupadas conforme a semelhança cromatográfica (Figura 20) e guardadas para posterior purificação, uma vez que seus rendimentos eram muito baixos.

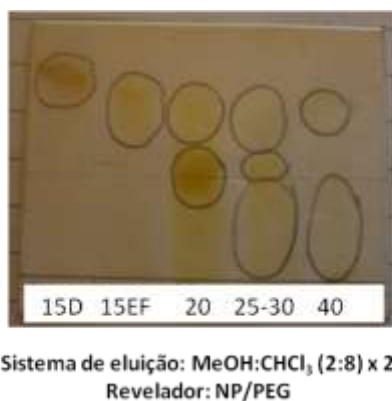


Figura 20 - CCD do refracionamento da fração 8-10 vinda da [50% H₂O - Partição Acetato de Etila]

As frações 11-13 também foram submetidas a uma nova purificação em coluna cromatográfica de gel de sílica começando com 100% de CH₂Cl₂ e indo até 100% de MeOH, de 10% em 10% e recolhendo 20 em 20 mL. Ao final, as frações foram

agrupadas conforme a semelhança cromatográfica (Figura 21) e a subfração 70-1 foi separada para análise por RMN, porém não foi possível identificá-la devido ao baixo rendimento obtido.

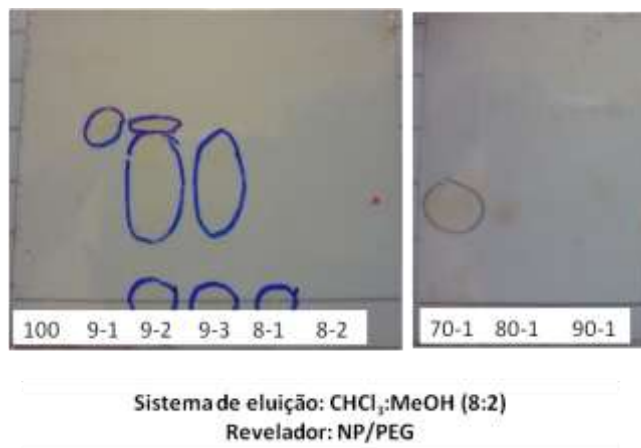


Figura 21 – CCD do refractionamento da fração 11-13 vinda da [50% H₂O - Part. Acetato de Etila]

A fração obtida em 60-90% de HO em MeOH foi refractionada por cromatografia em coluna Sephadex LH-20, iniciando em MeOH:H₂O (1:1) e indo até MeOH 100%, de 100 em 100 ml. Ao final foram obtidas 21 subfrações (Figura 22).

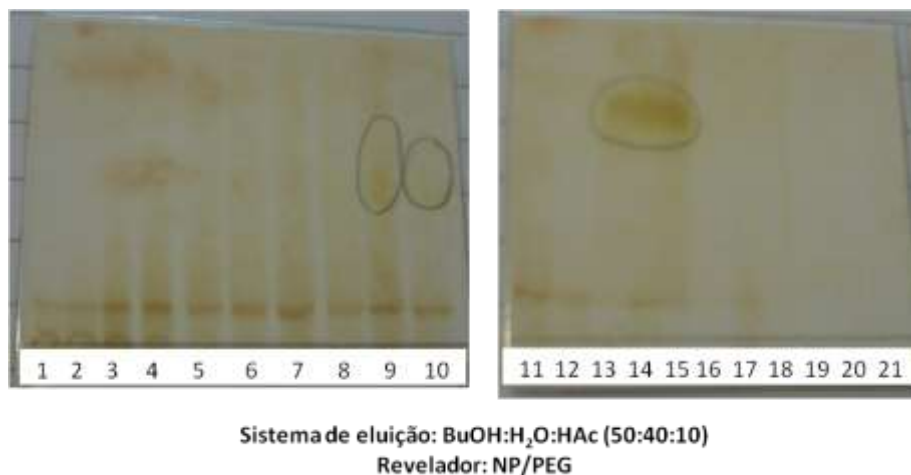


Figura 22 - CCD do fracionamento da [60-90% H₂O - Partição Acetato de Etila]

As subfrações 13-15 foram agrupadas e foi observada uma mistura de 2 substâncias cuja solubilidade era diferente em uma solução de MeOH e H₂O. Tentou-se, dessa maneira, separar as substâncias através da diferença de solubilidade; após solubilizar completamente a amostra em MeOH, foi adicionado gotas de H₂O destilada lentamente até que uma das substâncias começou a precipitar. A amostra foi deixada

em repouso por 10 minutos para que a substância precipitasse completamente e, após isso, a amostra com o precipitado foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. Após a separação do sobrenadante houve nova adição de água seguida de outra centrifugação. Ao final foram separadas duas subfrações: uma solúvel em H₂O e uma insolúvel em H₂O.

Através de comparação em CCD foi observado que a subfração insolúvel em H₂O destilada possuía a substância majoritária em comum com a amostra 15EF, vinda do refractionamento de uma amostra que saiu em 50% de MeOH e H₂O na cromatografia em coluna de XAD-2 (Figura 23). Com isso as amostras foram agrupadas, obtendo-se com isso 30 mg de material. Este foi submetido a uma purificação por Sephadex LH-20, utilizando-se MeOH como solvente e a amostra purificada obtida (KCW140) foi enviada para análise por RMN.

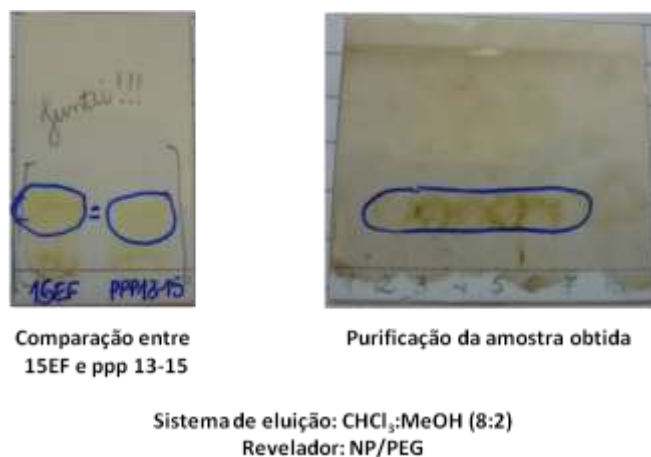


Figura 23 – CCD da purificação da amostra ppp 13-15 + 15EF

A subfração solúvel em H₂O foi purificada em cromatografia em coluna Sephadex LH-20, utilizando-se H₂O destilada como eluente e foram obtidos dois grupos de amostras: um com uma substância aparentemente pura e outro com uma mistura dessa substância pura e mais outra (Figura 24). A amostra com uma substância foi então enviada para análises de RMN (KCW158).

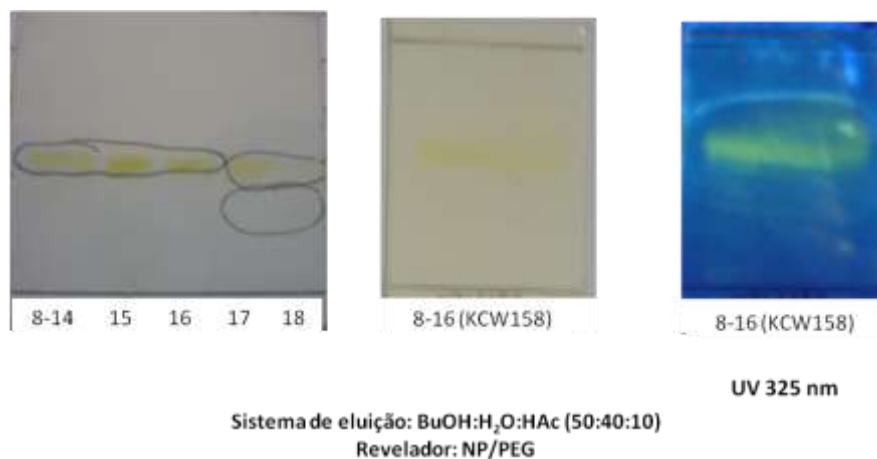


Figura 24 – CCD da purificação da amostra 13-15

2.3.1.2 – Filtração a Vácuo Utilizando Gel de Sílica

Para o fracionamento por filtração a vácuo foi utilizado 200g de gel de sílica como fase estacionária e 2,0g da amostra. Utilizou-se, como fase móvel, gradiente de concentração de CH₂Cl₂ em MeOH, começando com 100% de CH₂Cl₂ indo até 50% de MeOH. As frações foram recolhidas de acordo com o gradiente de concentração e agrupadas por semelhança, conforme o perfil cromatográfico em CCD (Figura 25).

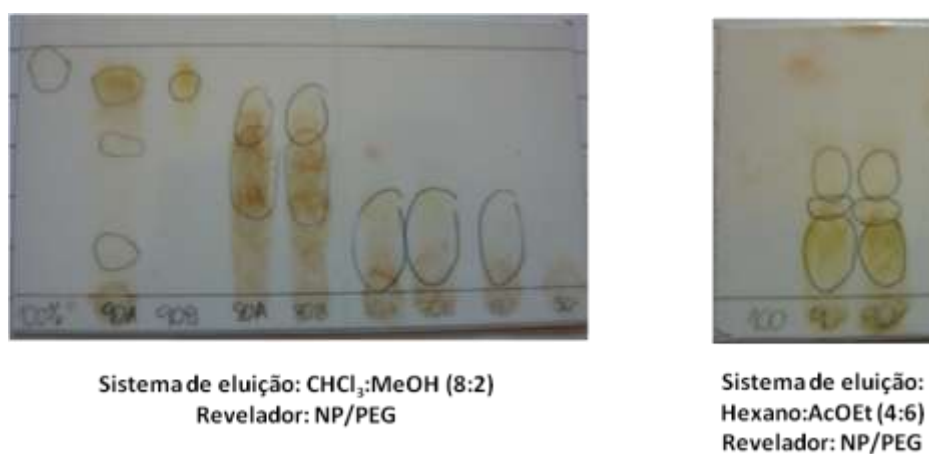


Figura 25 - CCD da Filtração à vácuo da partição em acetato de etila

As frações 90-A e 90-B foram agrupadas e submetidas a um novo fracionamento em coluna de gel de sílica, com gradiente de concentração dos solventes hexano:acetato de etila (1:1) até acetato de etila 100%, para sua purificação, porém, ao final, não obteve-se rendimento suficiente para realizar as análises por RMN.

As frações 80-A e 80-B também foram agrupadas e refracionadas utilizando o mesmo sistema acima, porém, ao final, o rendimento das amostras obtidas não foi suficiente para realizar as análises por RMN.

2.3.1.3 – Hidrólise

Foi realizada hidrólise ácida com 500mg da partição acetato de etila em uma solução metanólica com água residual a 2N de ácido trifluoroacético (TFA), em tubo de hidrólise, sob refluxo, por 2 horas. Em seguida, o material foi evaporado, ressuspenso em água destilada e submetido à partição com acetato de etila a fim de se separar as agliconas dos açúcares. O material em acetato de etila foi evaporado e aplicado em CCD para confirmação da hidrólise (Figura 26).

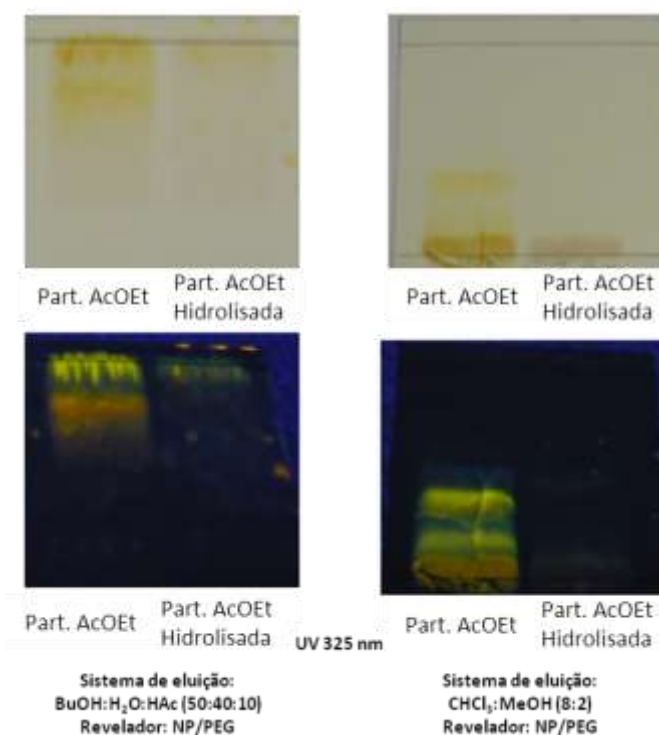


Figura 26 - CCD da hidrólise da partição em acetato de etila

2.3.2 – Partição Butanólica

Foram obtidos 7,3g de material concentrado e devido ao perfil bastante polar observado na CCD (Figura 27) optou-se por trabalhar utilizando-se cromatografia em colunas XAD-2 e Sephadex LH-20 (Esquema 11).

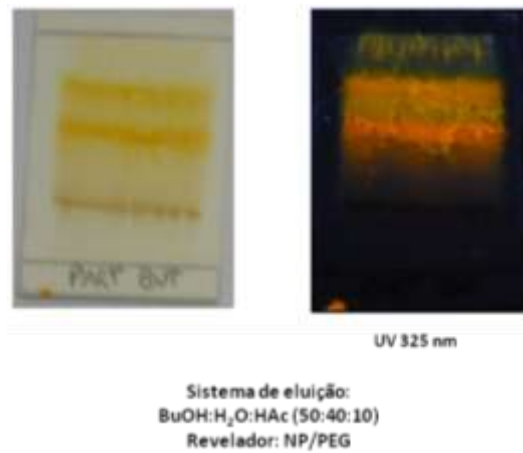
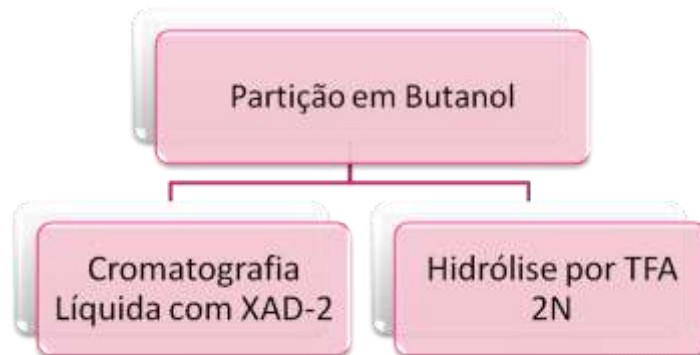


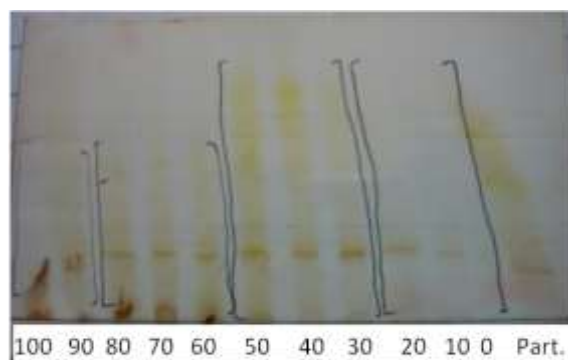
Figura 27 - CCD da partição butanólica



Esquema 11- Fracionamento da partição em Butanol

2.3.2.1 - Cromatografia Líquida Utilizando XAD-2

Para o fracionamento por cromatografia líquida utilizando XAD-2 como fase estacionária foram utilizados 2,0g da amostra e gradiente de concentração dos solventes MeOH:H₂O como eluente, começando com 100% de H₂O e indo até 100% de Metanol, de 10 em 10% . Utilizou-se 250mL de cada gradiente e foram recolhidas frações de 250mL de acordo com o gradiente assinalado. As frações obtidas foram aplicadas em CCD e agrupadas por semelhança conforme o perfil cromatográfico (Figura 28).



% H₂O em MeOH no eluente da XAD-2

Sistema de eluição: BuOH:H₂O:HAc (50:40:10)

Revelador: NP/PEG

Figura 28 - CCD da XAD-2 da Partição em Butanol

A fração [50-30% H₂O] foi então purificada por cromatografia em coluna Sephadex LH-20 em gradiente de concentração de MeOH:H₂O, começando com 90% de H₂O e indo até 100% de MeOH, de 50 em 50 mL e 10 e 10%. Desta coluna foram obtidas 13 grupos de frações com o mesmo perfil no UV e a subfração 12 foi selecionada para um fracionamento em Sephadex LH-20 novamente, utilizando-se MeOH 100% como fase móvel. Deste novo fracionamento foi obtida uma fração mais purificada que foi novamente purificada em mais uma coluna de Sephadex LH-20 e, no final, foram obtidas duas frações mais semipurificadas que foram guardadas para uma análise posterior.

2.3.2.2 – Hidrólise

Foi realizada hidrólise ácida com 500mg da partição em uma solução metanólica contendo água residual a 2 N de ácido trifluoroacético (TFA) em tubo de hidrólise, sob refluxo, por 2 horas. Em seguida, o material foi evaporado, ressuspenso em água destilada e submetido à partição com acetato de etila a fim de se separar as agliconas dos açúcares. O material em acetato de etila foi evaporado e aplicado em CCD para confirmação da hidrólise (Figura 29).

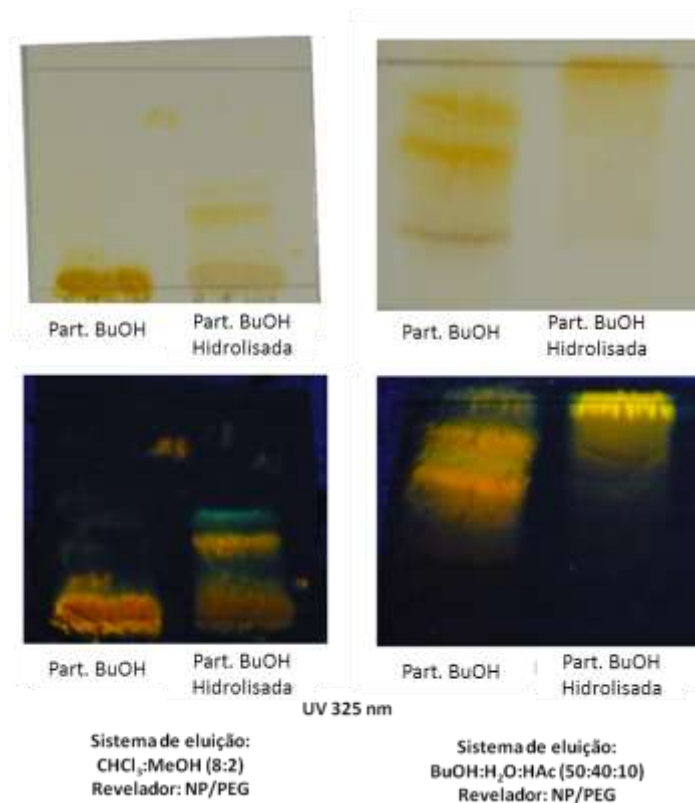


Figura 29 - CCD da hidrólise da partição em butanol

Em busca das principais agliconas presente nos glicosídeos desta partição fez-se então um fracionamento com Sephadex LH-20, utilizando-se 200 mg de amostra e gradiente de concentração MeOH e H₂O, começando na proporção de 1:1 e indo até MeOH 100%. Duas frações semipuras, eluídas com MeOH 100%, foram purificadas novamente, porém em coluna de gel de Silica, utilizando-se CHCl₃ em MeOH (9:1). As agliconas obtidas foram denominadas KCW001 e KCW002 e foram submetidas às análises por RMN.

3 – Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais das partições em acetato de etila e butanol foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e colaboradores (1999) utilizando ácido gálico como padrão.

a) Preparo das amostras

Foram feitas soluções de 50 µg/mL das partições em acetato de etila e butanol e retiradas alíquotas de 3mL para realizar o ensaio.

A cada alíquota adicionou-se 5mL da solução de Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos adicionou-se 4mL da solução de Carbonato de Sódio e homogeneizou-se a solução resultante. Após 2 horas determinaram-se as absorvâncias a 740nm. O teor de fenóis totais foi expresso em unidades de ácido gálico equivalentes (uAG) a partir da curva de calibração.

b) Preparo do padrão

Foram feitas soluções de ácido gálico a 125, 50, 25 e 10µg/mL em água destilada. A cada alíquota de 3mL das soluções de ácido gálico adicionou-se 5mL da solução de Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos adicionou-se 4mL da solução de Carbonato de Sódio e homogeneizou-se a solução resultante. Após 2 horas determinaram-se as absorvâncias a 740nm e foi construída uma curva de calibração (Gráfico 1).

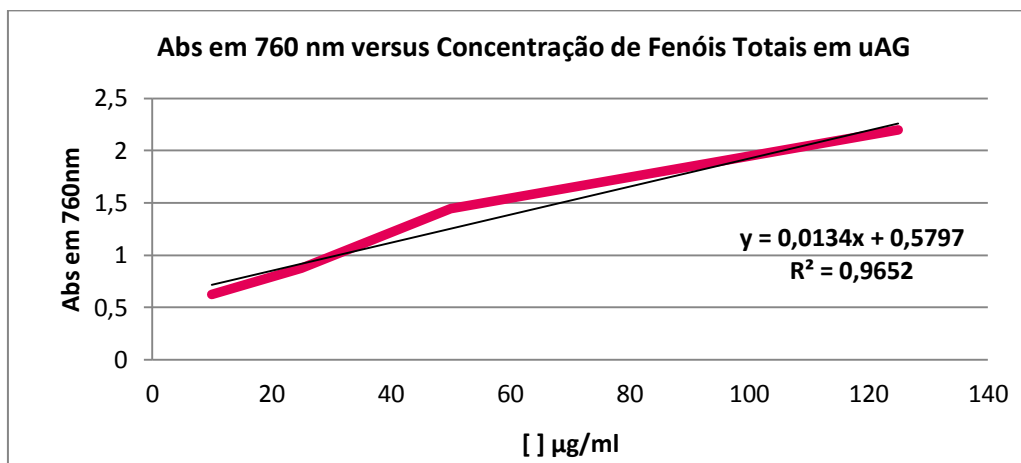


Gráfico 1 - Curva de calibração do Ácido Gálico

4 – Avaliação da atividade antioxidante

O DPPH é um radical estável de cor violeta (Figura 30) que ao aceitar um elétron ou um radical hidrogênio, a partir de uma substância antioxidante, torna-se uma molécula estável de coloração amarelada.

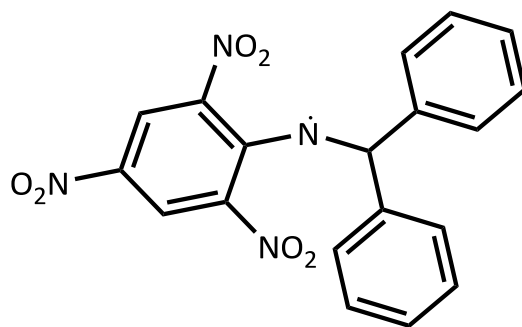


Figura 30 - Radical DPPH

A diferença na absorvância do padrão negativo (apenas a solução do DPPH com água destilada) em relação às amostras mostra o poder antioxidante destas frente ao DPPH.

a) Preparo das amostras

Foi preparada uma solução mãe (SM) em água destilada com concentração igual a 1mg/ml das partições em acetato de etila e butanol. A partir da SM foram preparadas soluções de 250, 125, 50, 25, 10 e 2,5µg/ml e separadas três alíquotas de 2,5mL de cada solução. Nestas adicionou-se 1,0ml da solução de DPPH 0,3 mM.

b) Preparo da solução em branco

Para cada concentração, 1,0ml de etanol e 2,5ml da solução diluída foram utilizados como branco.

c) Preparo da solução de controle negativo

A solução de DPPH (1,0ml; 0,3mM) adicionada a 2,5ml de água destilada foi utilizada como controle.

d) Preparo da solução de controle positivo

O extrato padronizado de Ginkgo biloba EGb 761® e o Ácido Gálico foram utilizados como padrões positivos para a atividade antioxidante por esse método.

e) Leitura das amostras

As reações transcorreram à temperatura ambiente durante 30 minutos e em seguida, foram feitas leituras de absorvância a 518nm.

f) Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) foi definida de acordo com a equação abaixo (Equação 1):

$$AA(\%) = 100 - \left\{ \frac{[(Aa - Ab) \times 100]}{Ac} \right\}$$

Equação 1 - Determinação da Atividade Antioxidante

Onde:

Aa = Absorvância da amostra

Ab = Absorvância do branco

Ac = Absorvância do controle negativo

Uma maneira de se expressar a atividade antioxidante é por meio do EC50, ou seja, concentração mínima necessária para o antioxidante (amostra) reduzir em 50% o radical DPPH inicial da reação. Os valores do EC₅₀ das partições foram calculados através da linha de tendência logarítmica das curvas obtidas nos gráficos em que o eixo x representou a concentração dos extratos e o eixo y a atividade antioxidante calculada segundo a equação 1.

IV – Resultados e discussão

1 - Análise Fitoquímica por CLAE/UV

Com base no perfil cromatográfico e nas bandas de absorção apresentados no UV, foi possível constatar que a maioria dos flavonoides presentes nas partições acetato de etila e butanol era das classes flavona e flavonol (Figuras 31, 32, 33, 34, 35 e 36). Flavonoides possuem espectros de ultravioleta característicos com 2 bandas: banda I e banda II. A banda II, com absorbância máxima entre 240 e 285nm, é atribuída ao anel A. Já a banda I, com absorbância máxima entre 300 e 550nm é atribuída ao anel B. O espectro de UV de flavonas e flavonóis apresenta absorbância máxima para a banda II em torno de 240 e 280nm e para a banda I em torno de 300 a 380nm (Merken, 2000).

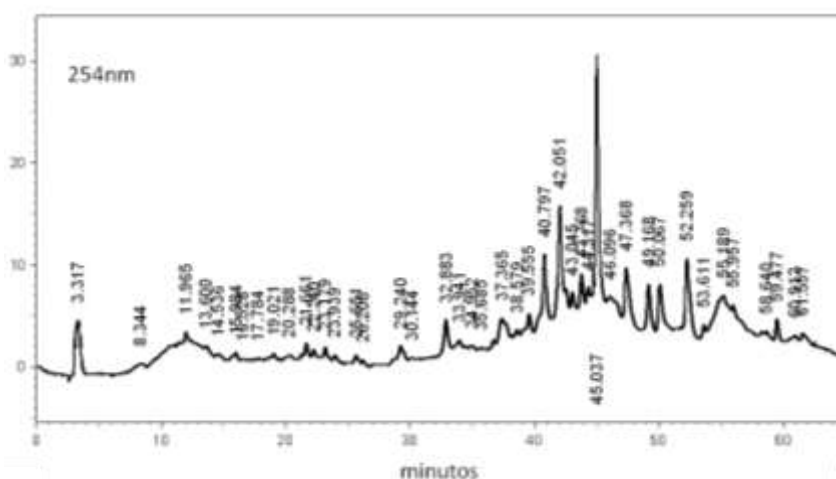


Figura 31 - Cromatograma da partição em acetato de etila em 254nm

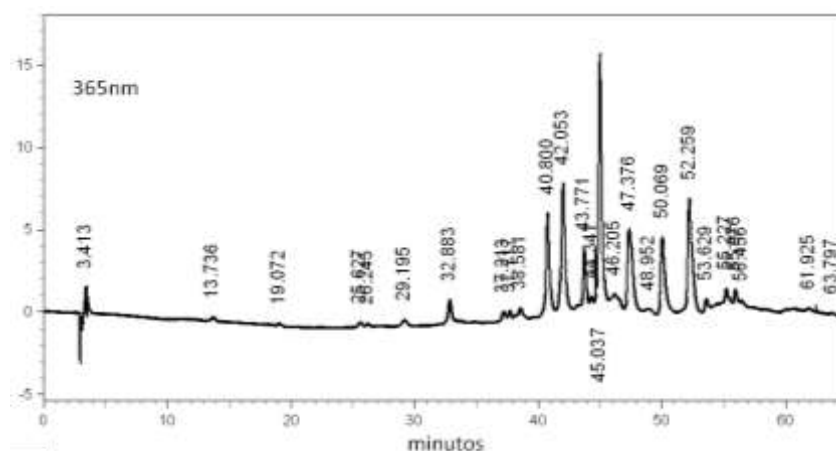


Figura 32 - Cromatograma da partição em acetato de etila em 365nm

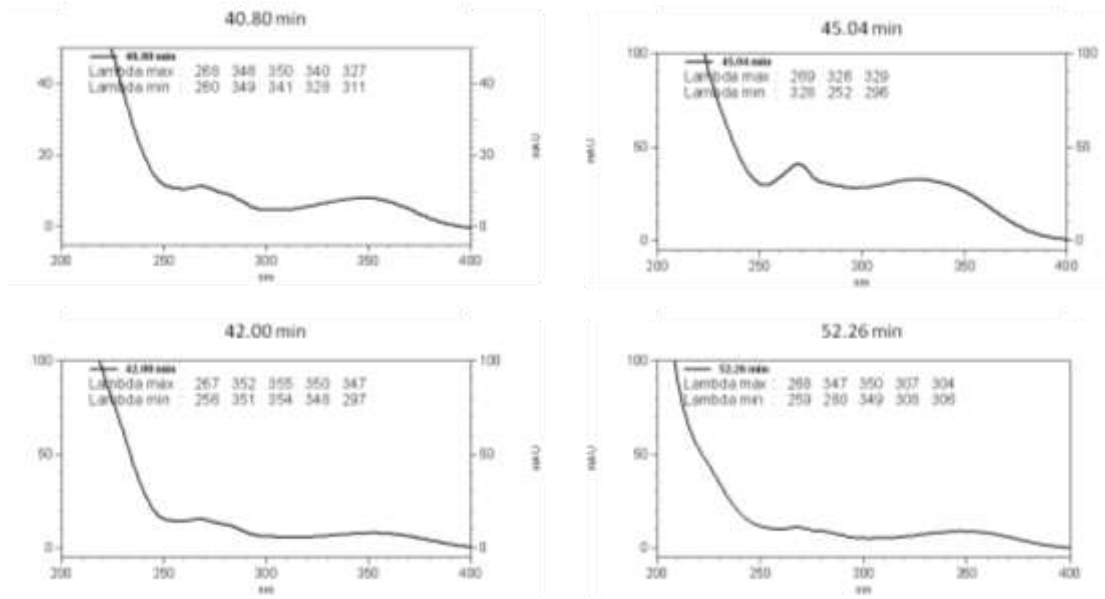


Figura 33 - UV dos principais sinais do cromatograma da partição em acetato de etila

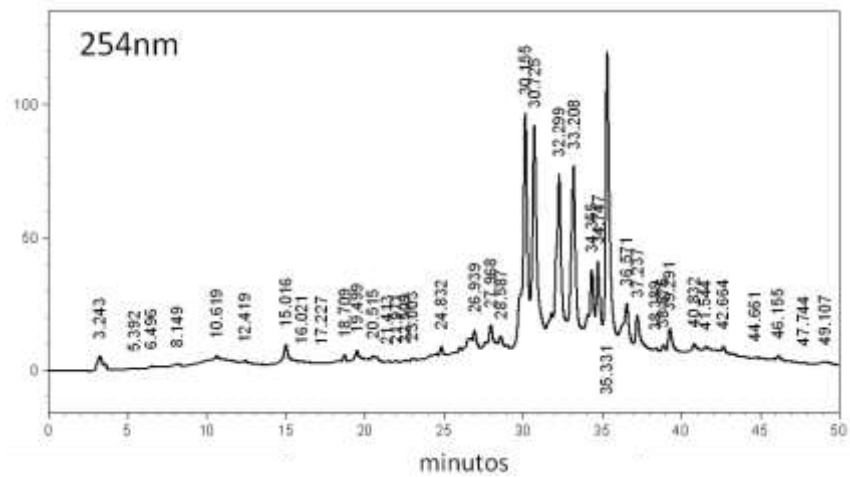


Figura 34 - Cromatograma da partição em butanol em 254nm

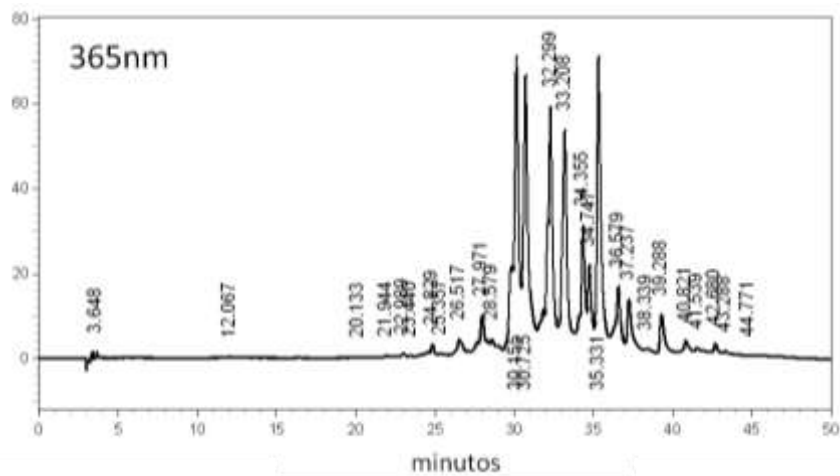


Figura 35 - Cromatograma da partição em butanol em 365nm

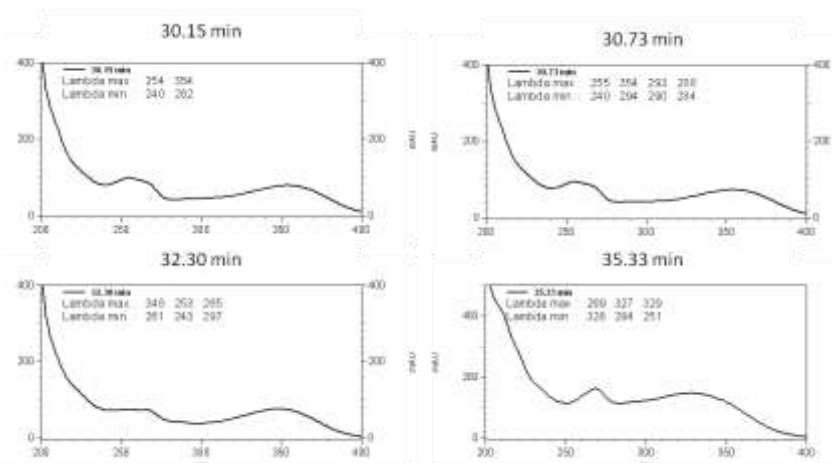


Figura 36 - UV dos principais sinais do cromatograma da part. BuOH

Desta maneira, pode-se verificar a partir da análise dos cromatogramas, que na fração acetato de etila há uma predominância de flavonas ($\lambda_{max} < 350$ nm, para a banda I) de menor polaridade (Tr > 40 min.) e, na partição butanólica, uma predominância de flavonóis ($\lambda_{max} > 350$ nm, para a banda I), de maior polaridade (30 min. < TR < 40 min.).

2 – Elucidação estrutural da substância KCW140

Foi realizada uma análise por CLAE através de co-injeção da amostra KCW140 com a partição em Acetato de Etila e com base nos dados obtido no cromatograma foi possível confirmar que se tratava de uma flavona, uma vez que o λ_{max} para a Banda I foi de 345 nm, cujo tempo de retenção era de 52,591 min (Figura 37).

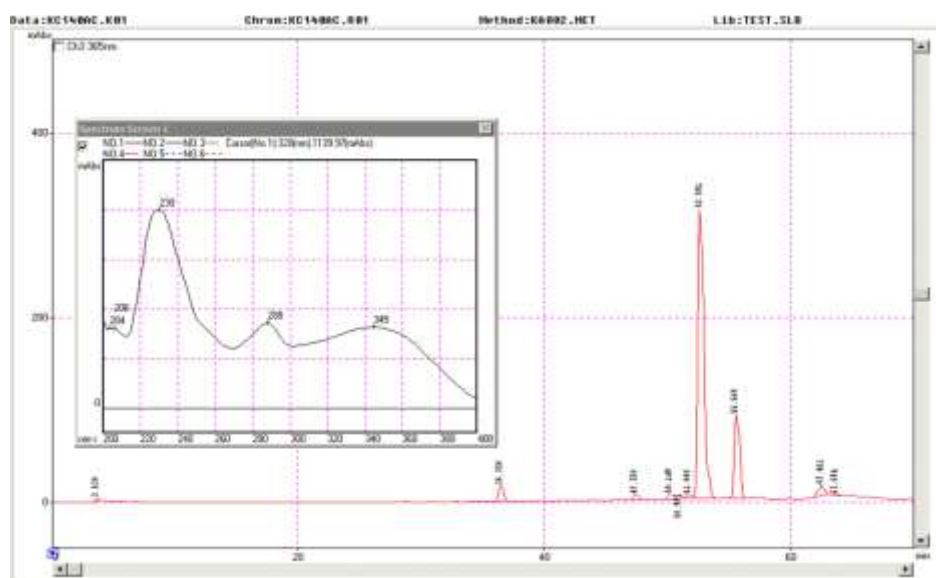
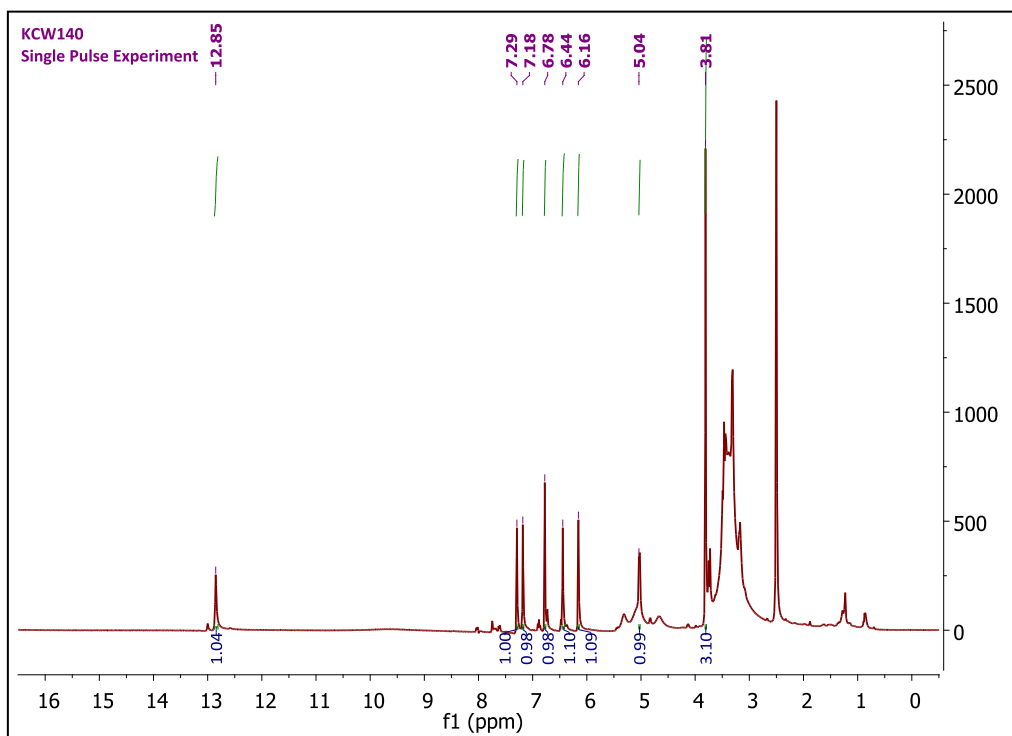


Figura 37 - Cromatograma da co-injeção da amostra KCW140 com a partição em Acetato de Etila em 365nm

Abaixo, o espectro de RMN¹H (Espectro 1).



Espectro 1 - RMN ¹H de KCW140 - O solvente utilizado foi DMSO-d₆

Como é possível observar, aparece um sinal simpleto com integração para 1 hidrogênio em 12.85 característico da presença de uma hidroxila na posição C-5, comumente chamada de hidroxila quelatogênica devido à ligação de hidrogênio que faz com a carbonila em C-4 (Figura 38).

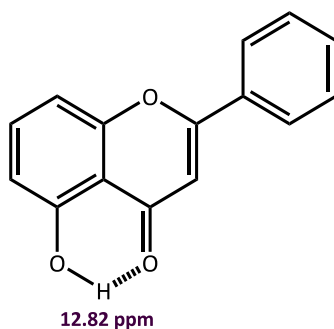
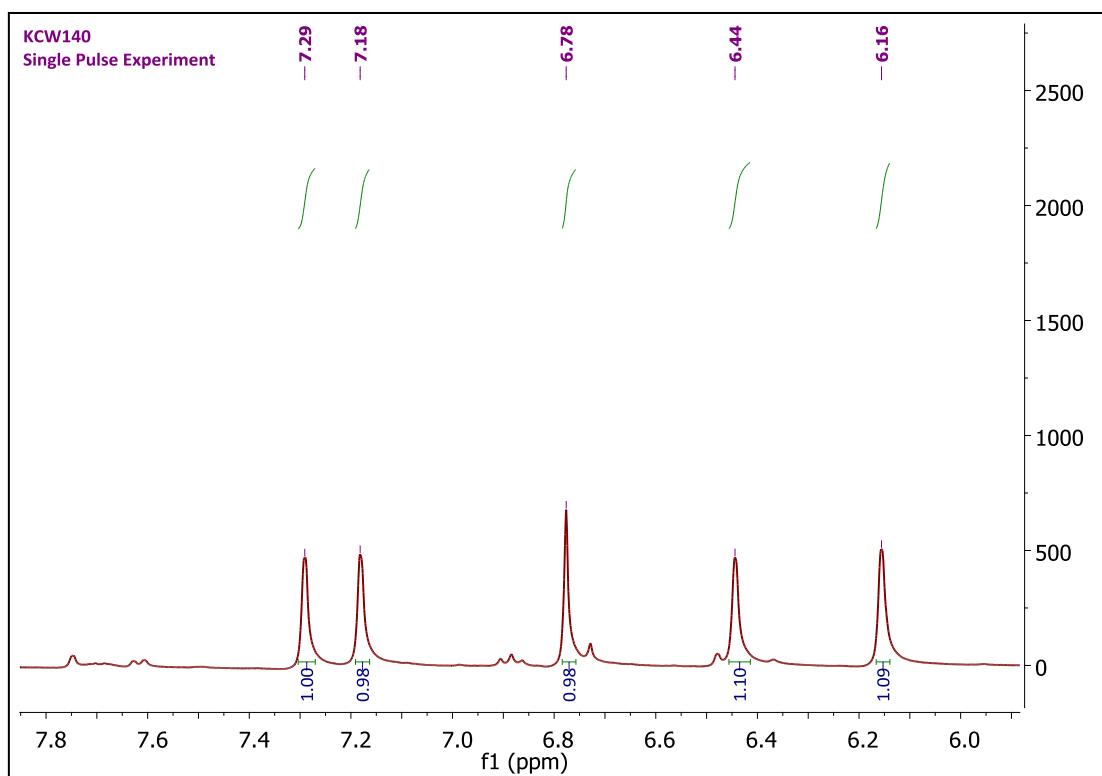


Figura 38 - Representação da hidroxila quelatogênica (12.82 ppm)

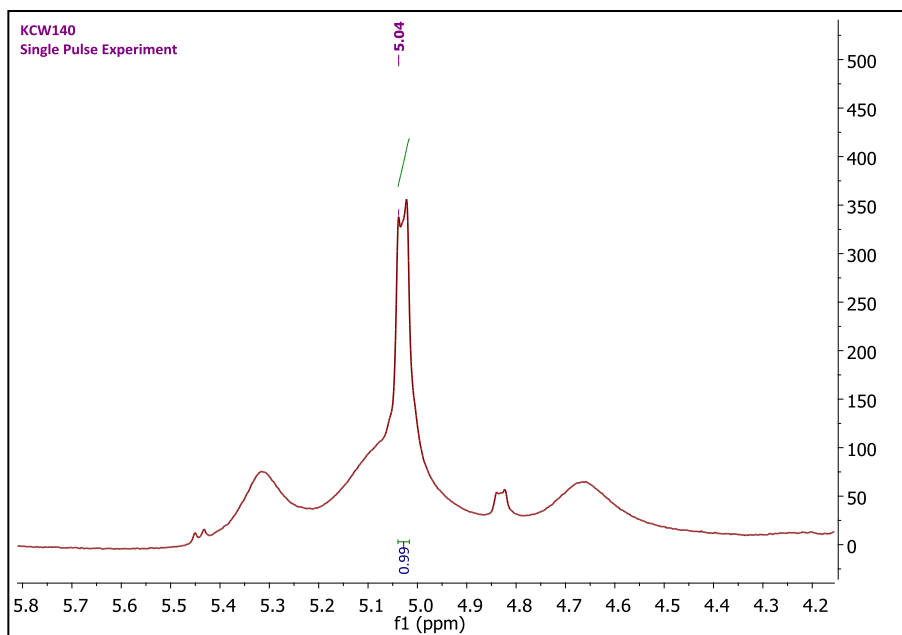
Na região dos hidrogênios aromáticos – 6.0 e 8.0 ppm (Espectro 2) – é possível observar 5 sinais simpletos, com integração para 1 hidrogênio cada.



Espectro 2 - Expansão da região entre 6.0 e 7.8 ppm do RMN ^1H da KCW140 – Sinais dos Hidrogênios Aromáticos

Os sinais em 7.18 e 7.29 ppm, dois simpletos largos, são sinais característicos de hidrogênios do anel B, pois por serem mais desblindados que os outros hidrogênios aromáticos do anel A apresentam deslocamento químico mais alto.

O sinal em 6.78 ppm indica fortemente a presença de uma flavona, uma vez que ele é um sinal característico de hidrogênio na posição C-3. Os sinais em 6.16 e 6.44 ppm são sinais de dois hidrogênios do anel A, uma vez que estes deslocamentos químicos são característicos para hidrogênios H-6 e H-8 deste anel, mais blindados quando comparados aos H do anel B, devido a presença de oxigênio *ortho*, nas posições 5, 7 e 9.



Espectro 3 - Expansão da região entre 4.2 e 5.8 ppm do RMN ¹H da KCW140 - Sinal do Hidrogênio Anomérico

O sinal em 5.04 ppm, com integração para 1 hidrogênio (Espectro 3), indica a presença de um açúcar ligado à aglicona, uma vez que este deslocamento químico é característico para hidrogênios anoméricos, ou seja, para o hidrogênio ligado ao carbono cujo o oxigênio está ligado à aglicona (Figura 39). A presença de um açúcar do tipo glicose foi confirmada por CCD (Figura 40).

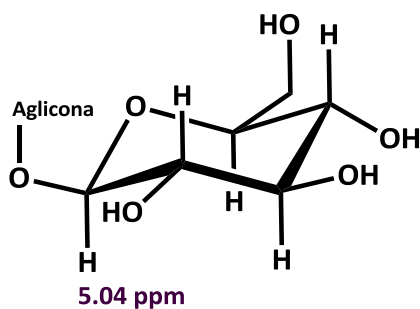
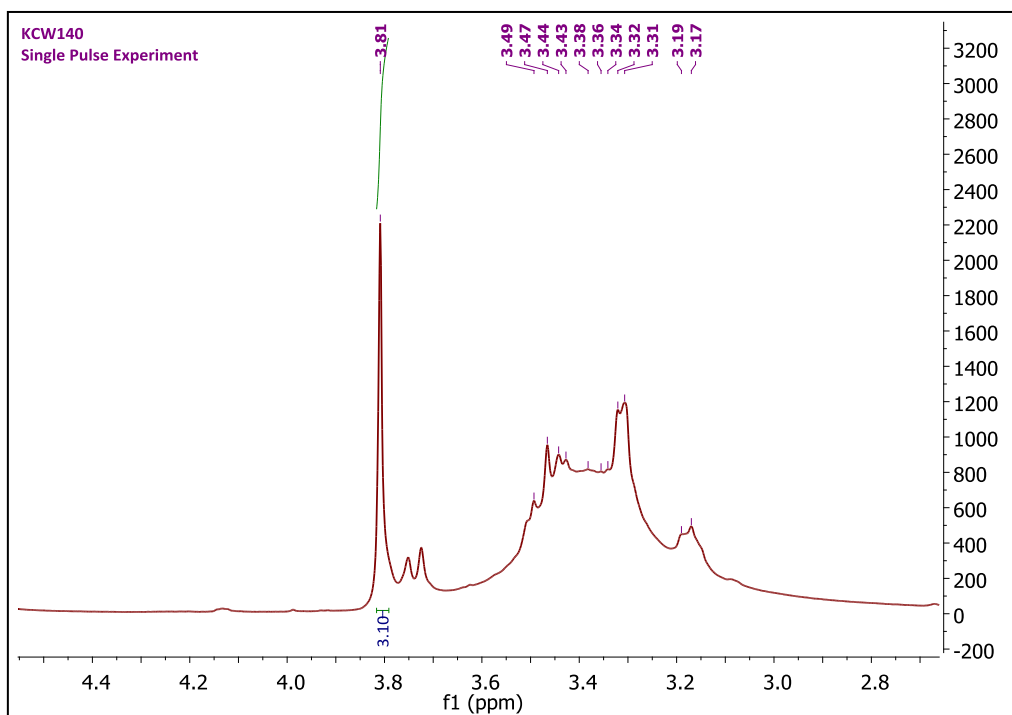


Figura 39 - Representação do hidrogênio anomérico



Figura 40 - Confirmação da presença de Glicose - KCW140

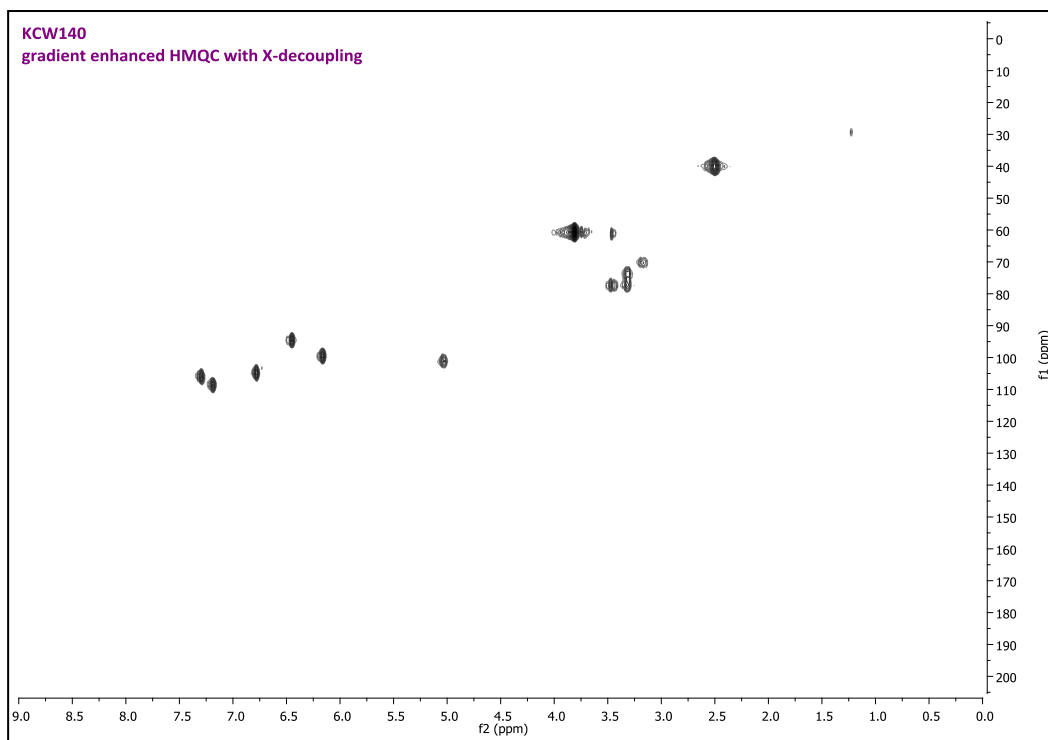


Espectro 4 - Expansão da região entre 2.8 e 4.5 ppm do RMN ^1H da KCW140 - Sinal dos Hidrogênios da Metoxila e do Açúcar

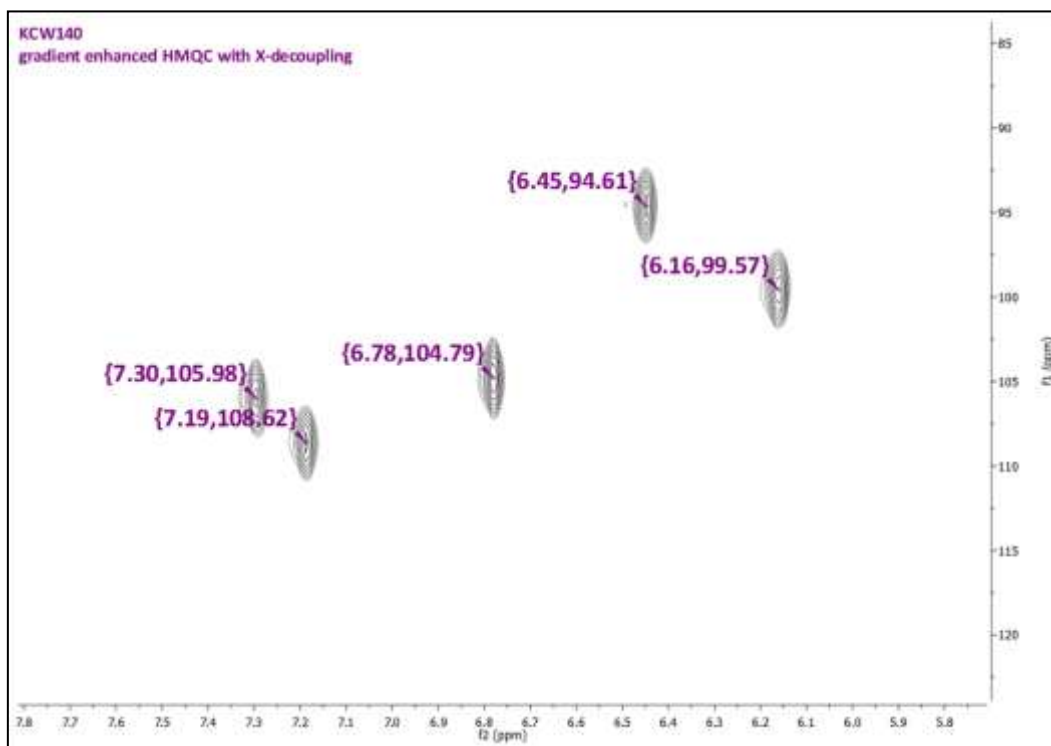
O sinal com integração para 3 hidrogênios em 3.81 ppm (Espectro 4) é um sinal característico de hidrogênios de uma metila ligada a um oxigênio – metoxila, o que indica que uma das hidroxilas do esqueleto flavonoídico tem seu hidrogênio substituído por uma metila.

Os sinais entre 3.1 e 3.5 ppm podem ser atribuídos aos sinais dos hidrogênios do açúcar, mas devido às multiplicidades e ao fato dos sinais localizarem-se todos numa mesma região do espectro (envelopados) não foi possível atribuir os deslocamentos químicos aos seus respectivos hidrogênios.

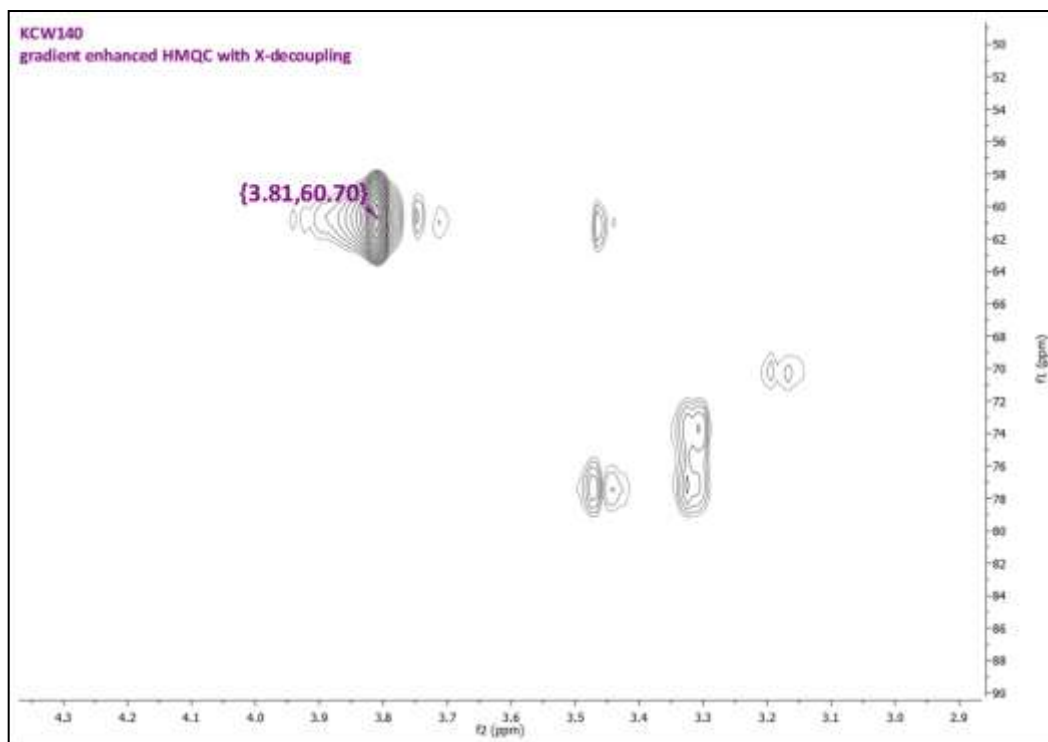
O espectro bidimensional HMQC mostra as correlações entre hidrogênios e carbonos em ^1J , ou seja, correlaciona os hidrogênios com os seus respectivos carbonos (Espectros 5 e expansões nos espectros 6, 7 e 8).



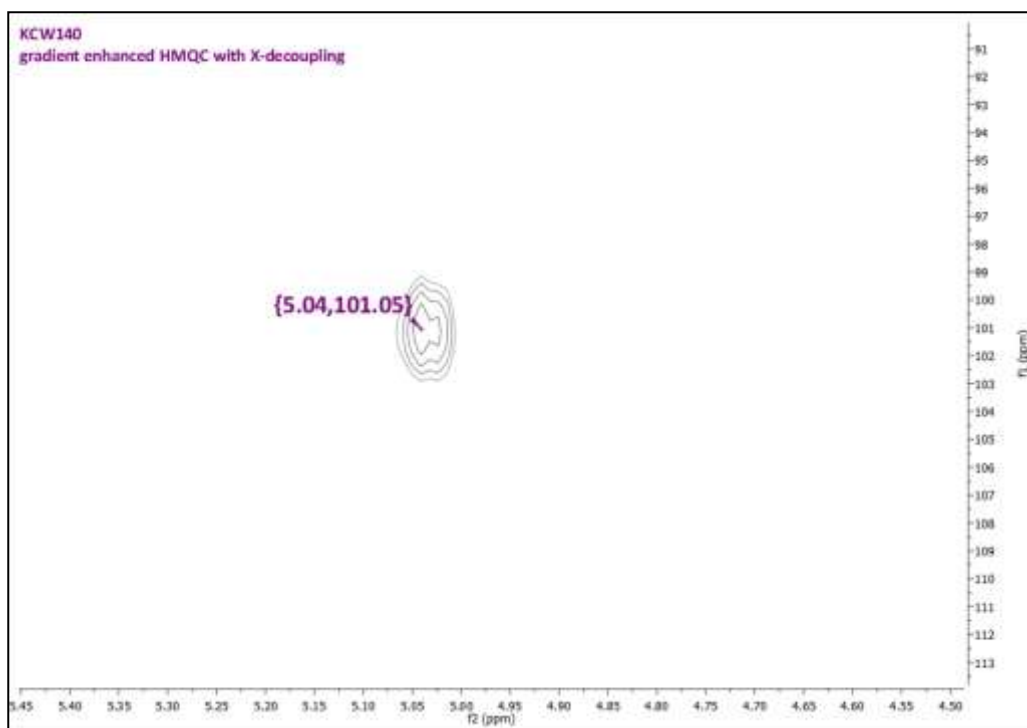
Espectro 5 - HMQC da KCW140



Espectro 6 - Expansão entre 5.8 e 7.8 ppm - Correlações $^1J_{CH}$ dos hidrogênios aromáticos – HMQC KCW140



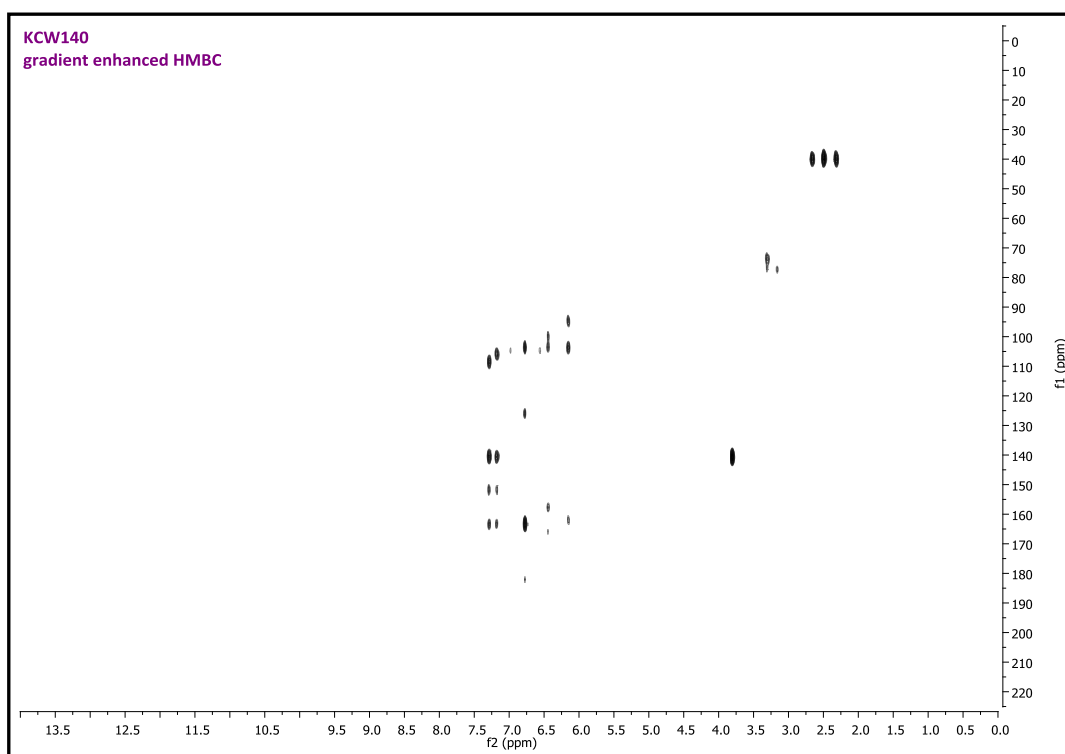
Espectro 7 - Expansão entre 2.9 e 4.3 ppm - Correlações $^1J_{CH}$ dos hidrogênios do O-CH₃ (assinalados) e dos hidrogênios do açúcar (não assinalados) – HMQC KCW140



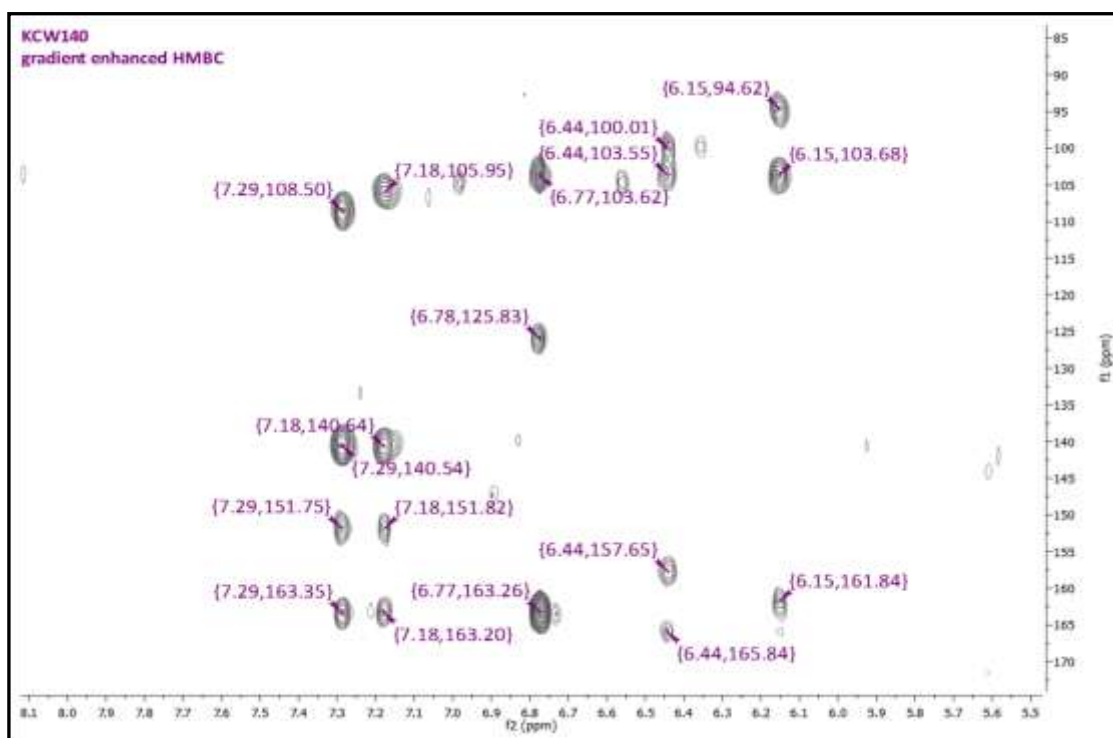
Espectro 8 - Expansão entre 4.5 e 5.45 ppm - Correlação $^1J_{CH}$ do hidrogênio anomérico – HMQC KCW140

No espectro bidimensional HMBC foi possível observar as correlações entre hidrogênios e carbonos à longa distância – $^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ e, mais raramente, $^4J_{CH}$ (Espectro 9 e expansões nos espectros 10, 11, 12 e 13). É importante lembrar que algumas vezes

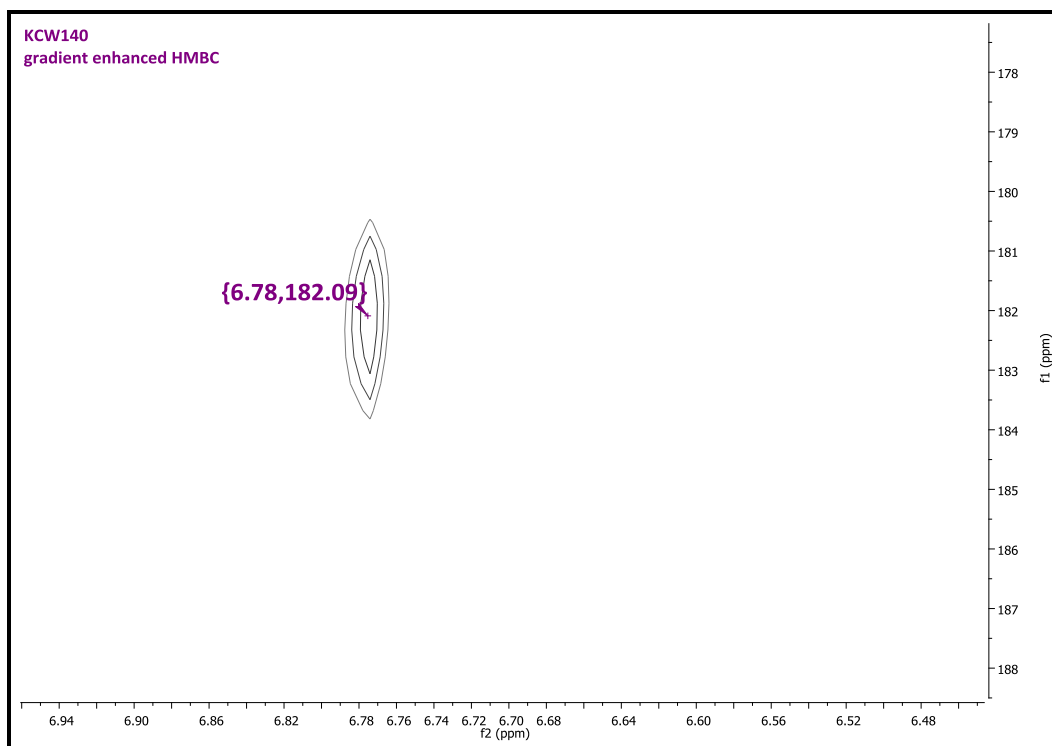
os sinais $^3J_{CH}$ apresentam sinais mais fortes que os sinais de $^2J_{CH}$ ou $^4J_{CH}$ devido aos valores de ajuste do espectrômetro para a técnica serem escolhidos na faixa de $^3J_{CH}$.



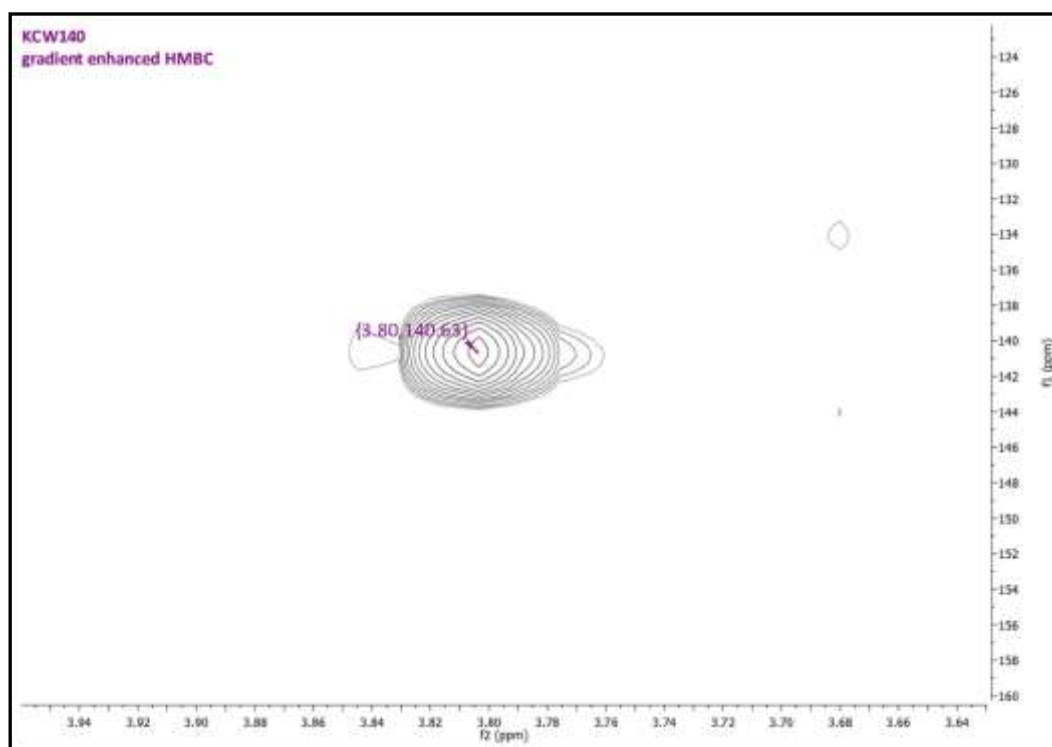
Espectro 9 - HMBC KCW140



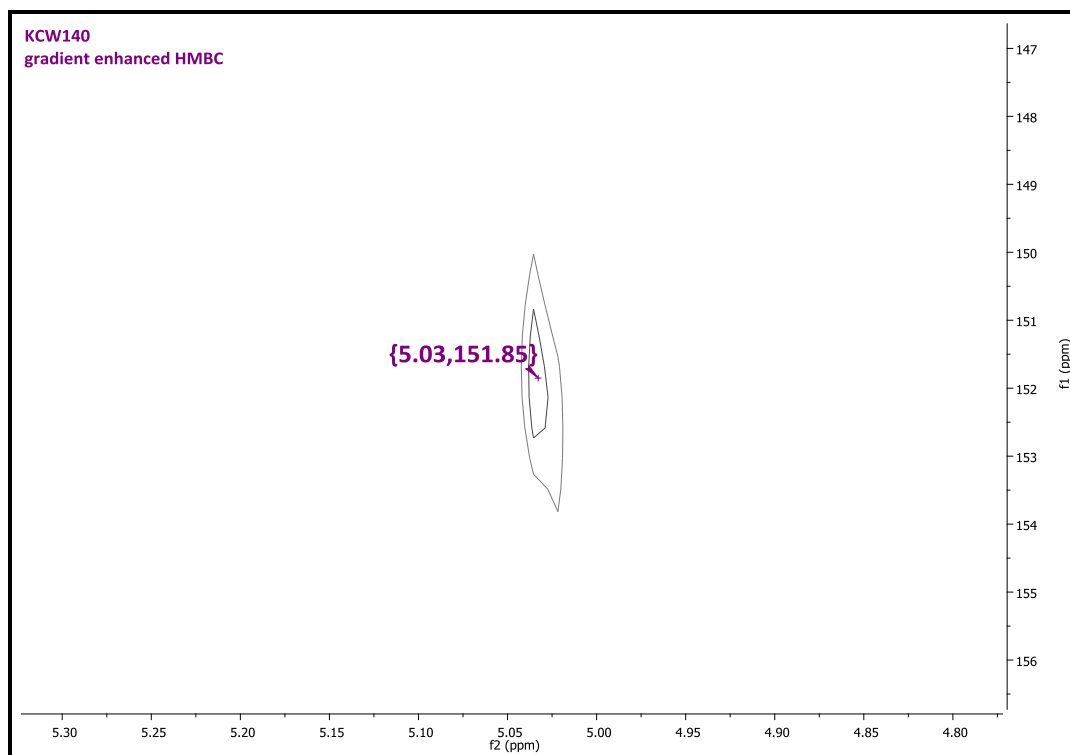
Espectro 10 – Expansão entre 5.5 e 8.1 ppm – Correlações $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ dos hidrogênios aromáticos – HMBC KCW140



Espectro 11- Expansão entre 6.48 e 6.94 ppm – Correlações $^2J_{CH}$ do hidrogênio em 6.78 ppm – HMBC KCW140



Espectro 12 - Expansão entre 3.64 e 3.94 ppm – Correlação $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ dos hidrogênios do O-CH₃ – HMBC KCW140



Espectro 13 - Expansão entre 6.0 e 4.5 ppm – Correlação $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ do hidrogênio anomérico – HMBC KCW140

Com base nas correlações obtidas nos espectros HMQC e HMBC foi possível montar uma tabela (Tabela 1) e discutir os assinalamentos da estrutura:

1H	Correlações $^1J_{CH}$ no HMQC	Correlações $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ no HMBC
	^{13}C	^{13}C
7.30 (s, 1H)	105.98	108.50, 140.54, 151.75, 163.35
7.19 (s, 1H)	108.62	105.95, 140.64, 151.82, 163.20
6.78 (s, 1H)	104.79	103.62, 125.83, 163.26, 182.09
6.45 (s, 1H)	94.61	99.57, 103.55, 157.65, 165.84
6.16 (s, 1H)	99.57	94.62, 103.68, 161.84
5.04 (d, 1H)	101.05	151.85
3.81 (s, 3H)	60.70	140.63

Tabela 1 - Correlações $^1J_{CH}$, $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ no HMQC e HMBC – KCW140

- O sinal simples em 12.82 ppm é relativo a hidroxila em C-5.
- O sinal em 182.09 ppm pode ser atribuído ao carbono da carbonila (C-4) devido ao seu alto deslocamento químico.

- O hidrogênio em 6.78 ppm, ligado ao carbono 104.79 ppm, apresentou no HMBC quatro correlações: uma com o carbono da carbonila, o que confirma a hipótese dele estar na posição C-3; uma com o carbono em 163.26, o que sugere que este seja o carbono da posição 2, pois por estar ligado diretamente a um oxigênio seu deslocamento químico é mais alto; uma outra correlação com o carbono em 103.62 ppm, que pode ser atribuído ao carbono na posição 10 devido ao seu deslocamento químico (carbono quaternário aromático); e ao carbono em 125.83 ppm, que pode ser atribuído ao carbono na posição 1' do anel B (Figura 41).

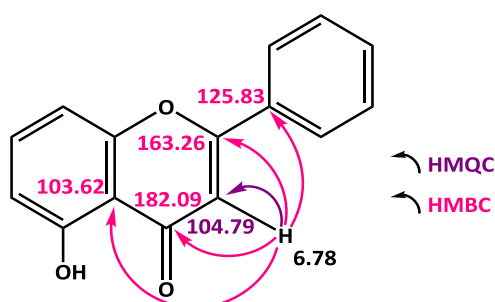


Figura 41 – Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140

- O sinal em 3.81 ppm (RMN¹H) é característico de hidrogênio de O-CH₃ e com auxílio da técnica HSQC podemos atribuir ao carbono metílico o deslocamento químico 60.70 ppm. Através do HMBC foi possível observar a correlação com o carbono em 140.63 ppm, o que indica fortemente que seja neste carbono que a metoxila esteja ligada (Figura 42).

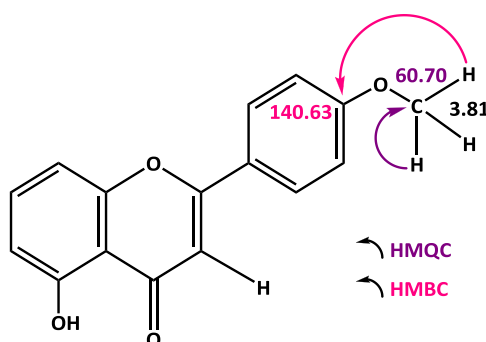


Figura 42 – Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140

- Os sinais entre 140 e 170 ppm podem ser atribuídos a carbonos aromáticos ligados a espécies eletronegativas, como oxigênio por exemplo.

- Os sinais em 7.30 e 7.19 ppm são sinais dos hidrogênios do anel B, ligados, respectivamente, aos carbonos 105.98 e 108.62 ppm. Como no HMBC aparecem correlações entre os dois, podemos dizer que devido ao formato do sinal (simpleto largo) o acoplamento existente entre eles é muito baixo (*meta*). Ambos os hidrogênios se correlacionam com os carbonos 140.63, 151.7 e 163.2 ppm, sendo que o sinal da correlação com o carbono em 140.63 ppm aparece mais intenso do que o com os outros dois, o que sugere que este carbono esteja $^3J_{CH}$ dos dois hidrogênios (H-2' e H-6') (figura 43).

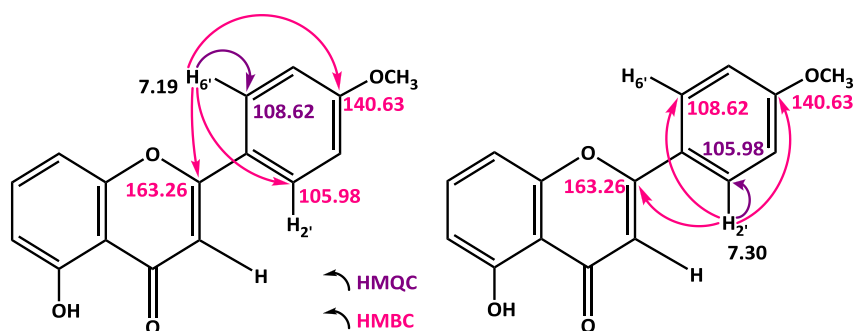


Figura 43 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140

- O sinal em 5.04 ppm, correspondente ao hidrogênio anomérico do açúcar, está ligado ao carbono anomérico em 101.05 ppm, no açúcar, e se correlaciona, no HMBC, com o carbono em 151.85 ppm; e, como tanto o hidrogênio na posição 2' quanto o da posição 6' se correlacionam com ele (C-3'), podemos dizer então que o açúcar está ligado em C-3'. Os dois hidrogênios também se correlacionam com o carbono em 163.2 ppm, e por isso podemos dizer a mesma coisa para a hidroxila. Devido ao seu deslocamento químico ser maior, foi atribuído então que o carbono da posição 6' em 108.62 ppm era o carbono vizinho à hidroxila e o carbono na posição 2', em 105.98 ppm, era o carbono vizinho à ligação glicosídica (Figura 44).

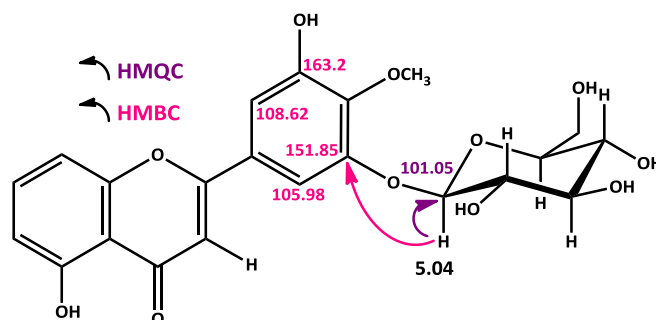


Figura 44 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140

- Os sinais em 6.45 e 6.16 ppm são de 2 hidrogênios do anel A. Estes hidrogênios possuem seus sinais como simpletos largos, o que sugere um acoplamento *meta* entre eles. Como sabemos que existe uma hidroxila em C-5, a outra estará em C-7, visto que na biossíntese de flavonoides, as posições de hidroxilações no anel A são preferencialmente em C-5 e C-7, pelo fato desta região originar-se da via acetato/malonato. Soma-se a isso o fato segundo o qual, se os hidrogênios estivessem em posição *orto* um em relação ao outro, existiria um acoplamento característico de 8 Hz (em média). Portanto, as posições que ambos os hidrogênios ocupam serão um em C-6 e outro em C-8. O hidrogênio em 6.45 ppm, ligado ao carbono em 94.61 ppm, se correlaciona, no espectro HMBC, com o carbono em 157.65 ppm. Este deslocamento químico é típico do carbono em C-9, uma vez que este carbono está diretamente ligado a oxigênio. Com base no deslocamento químico e com a correlação com o carbono C-9, podemos dizer então que este hidrogênio está na posição C-7. Este hidrogênio também se correlaciona com os carbonos em 99.57, 103.55 e 165.84 ppm: o carbono em 103.55 ppm é o C-10, como já foi observado; o carbono em 99.57 ppm pode ser atribuído ao carbono C-6, cujo hidrogênio em 6.16 ppm está ligado; o carbono em 165.84 ppm pode ser atribuído ao carbono em C-7, e seu deslocamento químico mais elevado é resultado da presença de um grupo hidroxila nesta posição. O hidrogênio em 6.16 ppm, na posição C-6, se correlaciona com os carbonos em 94.62 ppm (C-8), 103.68 (C-10) e 161.84 ppm. Este último deslocamento químico pode ser atribuído ao carbono com a hidroxila em C-5 (Figura 45).

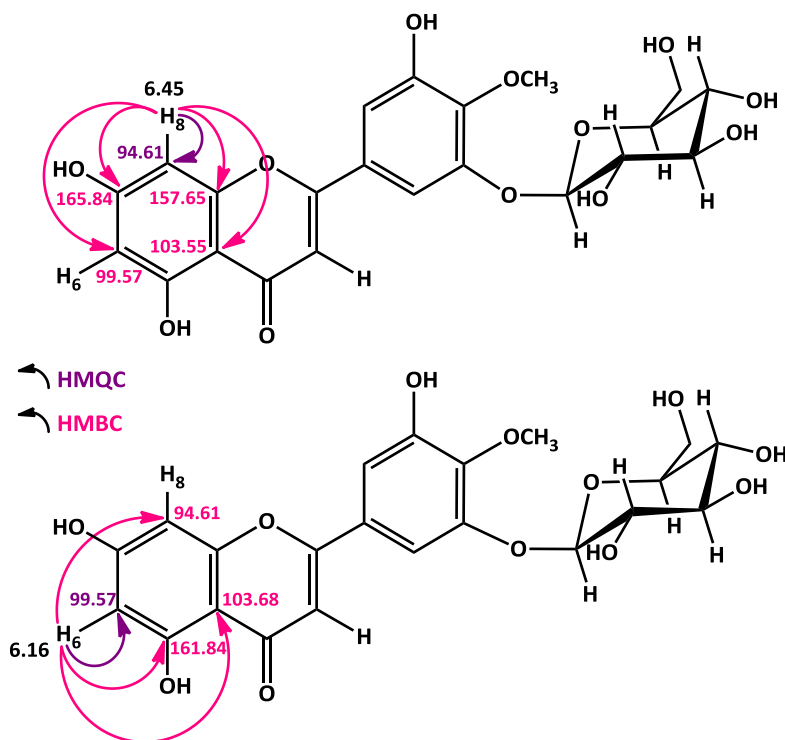


Figura 45 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW140

A estrutura proposta foi, portanto (Figura 46):

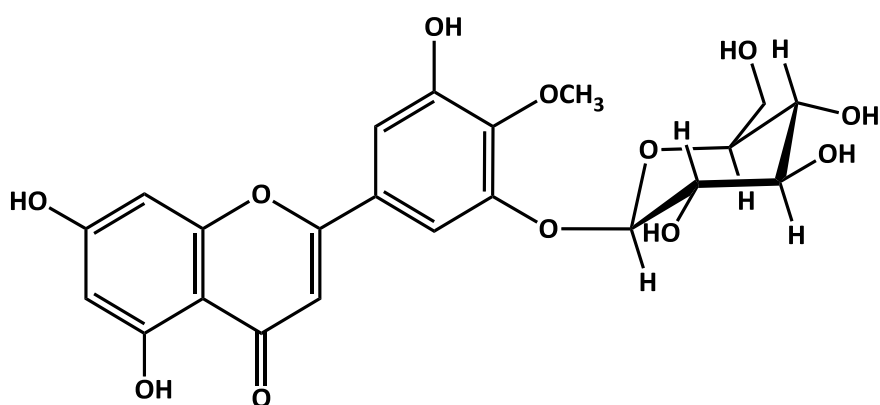


Figura 46 - Estrutura proposta para KCW140 – Tricetin-4'-metoxi-3'- β -D-glucosídeo

A confirmação dos assinalamentos foi feita por comparação com os dados da literatura (Tabela 2):

Posição	δ RMN ^1H e ^{13}C KCW140	δ RMN ^1H e ^{13}C Yuping et al., 2000
	(400 MHz, DMSO- d_6)	(350 MHz, DMSO- d_6)
HO-5	12.82 (1H, s)	12.88 (1H, s)
HO-7	--	10.85 (1H, s)
HO-5'	--	9.61 (1H, s)
H-2'	7.30 (1H, s)	7.31 (1H, d, J=1.3 Hz)
H-6'	7.19 (1H, s)	7.19 (1H, dd, J=1.3 Hz)
H-3	6.78 (1H, s)	6.81 (1H, s)
H-8	6.45 (1H, s)	6.50 (1H, d, J=1.1 Hz)
H-6	6.16 (1H, s)	6.21 (1H, d, J=1.1 Hz)
H-1''	5.04 (1H, d)	5.04 (1H, d, J=5.2 Hz)
OCH ₃ -4'	3.81 (3H, s); 60.70	3.82 (3H, s); 60.4
C-4	182.09	181.4
C-7	165.84	164.3
C-2	163.26	163.1
C-5	161.84	161.4
C-9	157.65	157.3
C-3'	151.85	151.4
C-5'	163.2	151.0
C-4'	140.63	140.3
C-1'	125.83	125.6
C-3	104.79	108.2
C-6'	108.62	105.7
C-2'	105.98	104.6
C-10	103.68	103.8
C-1''	101.05	100.7
C-6	99.57	98.9
C-8	95.61	94.0

Tabela 2 - Confirmação dos assinalamentos - KCW140

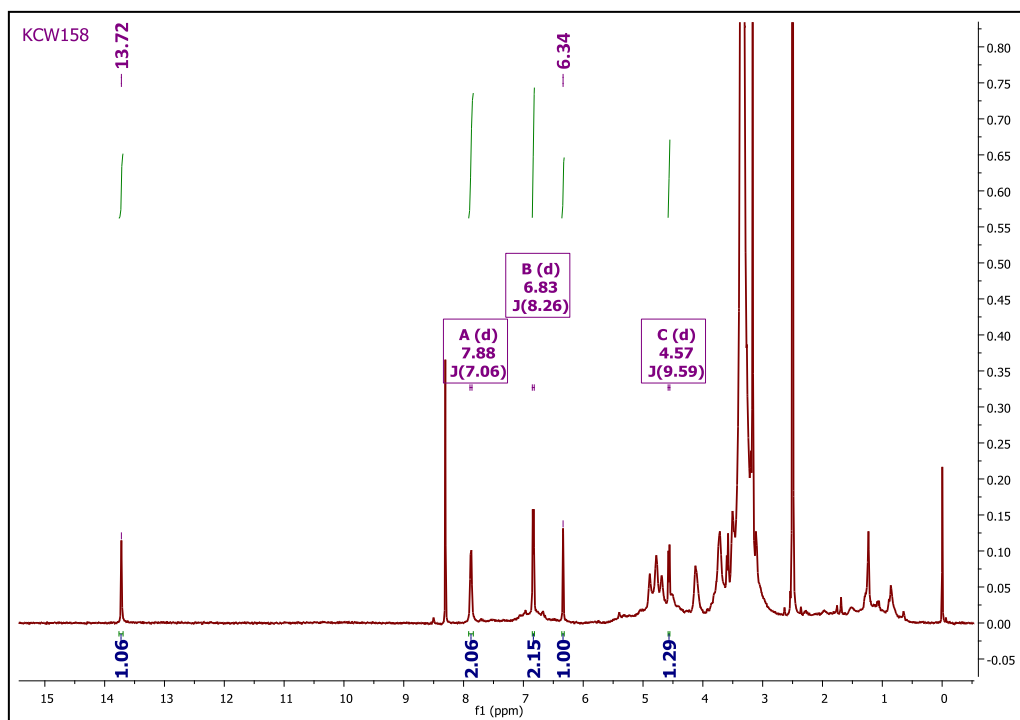
3 – Elucidação estrutural da substância KCW158

Foi realizada uma análise por CLAE através de co-injeção da amostra KCW158 com a partição em Acetato de Etila e com base nos dados obtido no cromatograma foi possível confirmar que se tratava de uma flavona, uma vez que o λ_{\max} para a Banda I foi de 350 nm, cujo tempo de retenção era de 36.313 min (Figura 47).



Figura 47 - Cromatograma da co-injeção da amostra KCW158 com a partição em Acetato de Etila - 365 nm

Abaixo está o espectro de RMN ^1H (Espectro 14).

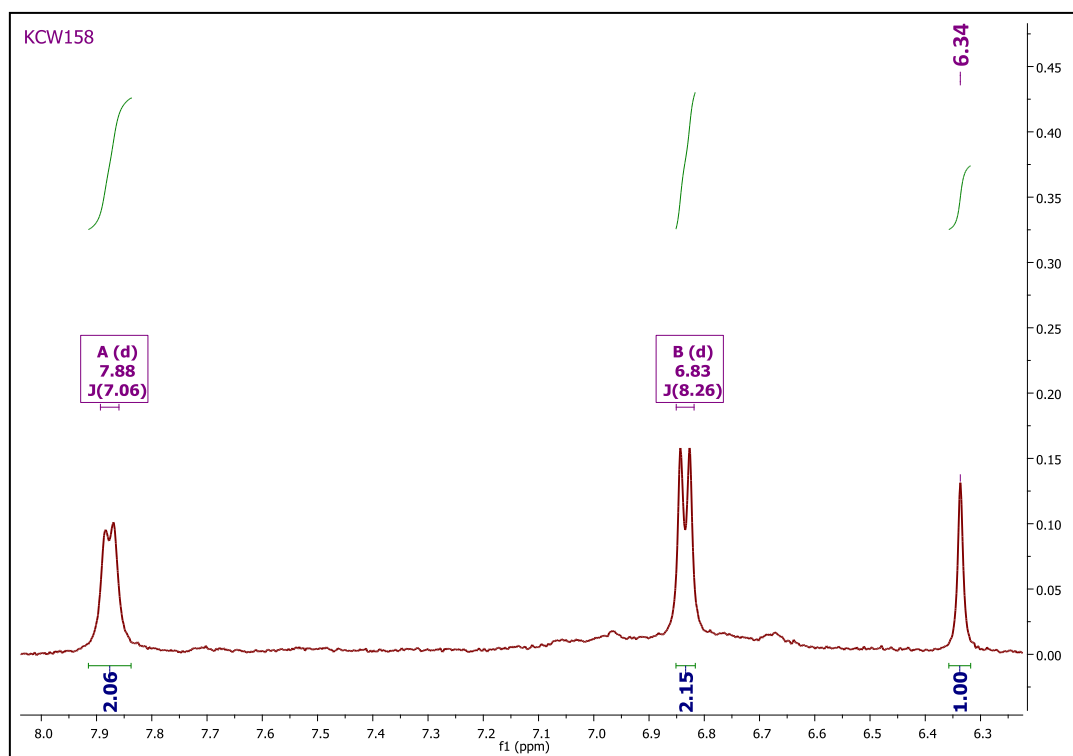


Espectro 14 - RMN ^1H de KCW158 - O solvente utilizado foi DMSO-d6

Como podemos observar esta substância possui um sinal em 13.72 ppm, o que indica a presença de uma hidroxila na posição C-5.

Podem ser vistos também três sinais na região dos hidrogênios aromáticos: 7.88 ppm (duplete, 2H, J 7.04= Hz), 6.83 ppm (duplete, 2H, J= 8.26 Hz) e 6.34 ppm (simpleto, 1H) (Espectro 15).

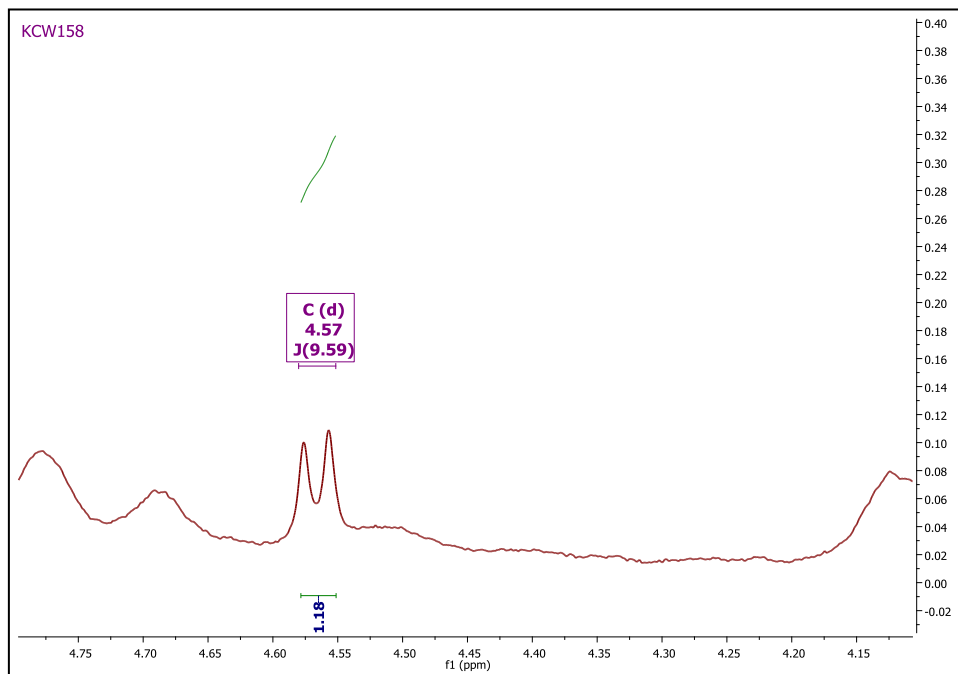
Os sinais entre 2.9 e 4.5 ppm podem ser atribuídos aos sinais dos hidrogênios do açúcar, mas devido às multiplicidades e ao fato dos sinais caírem todos na mesma região do espectro não foi possível atribuir os deslocamentos químicos aos seus respectivos hidrogênios.



Espectro 15 - Expansão da região entre 6.3 e 8.0 ppm do RMN ¹H da KCW158 – Sinais dos Hidrogênios Aromáticos

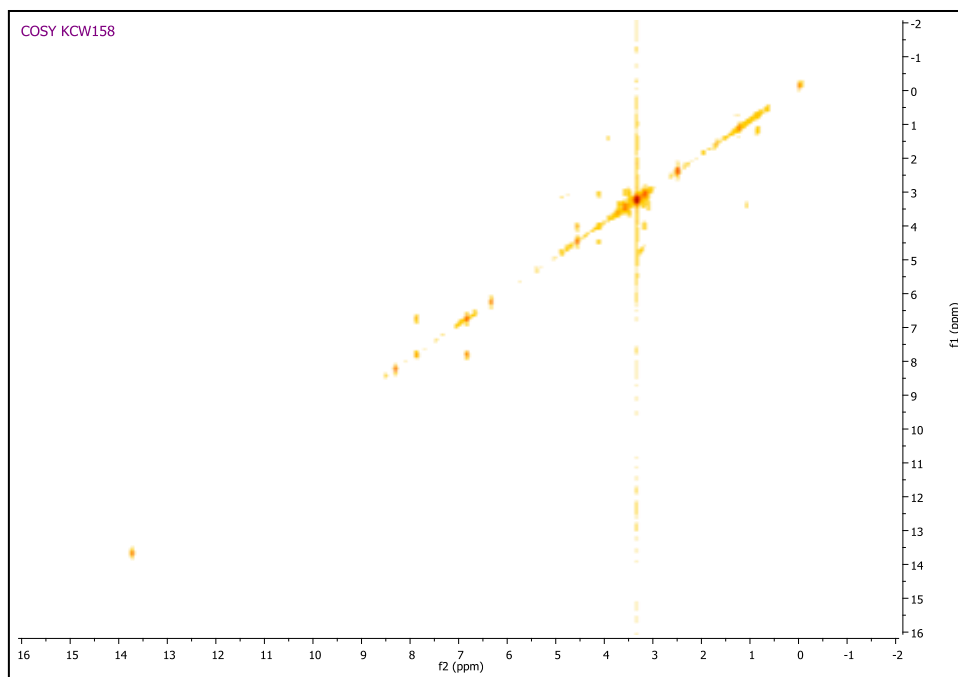
Os sinais duplos em 7.88 e 6.83 ppm, com integração para 2 hidrogênios cada, indicam fortemente a presença de uma substituição *para* no anel B. O sinal simpleto com integração para 1 hidrogênio em 6.34 ppm é característico de hidrogênio na posição C-3, o que sugere que a substância KCW158 seja uma flavona.

O sinal duplo em 4.57 ppm, com integração para 1 hidrogênio e $J = 9.59$ Hz, indica fortemente a presença de um grupamento açúcar na estrutura (Espectro 16), uma vez que este deslocamento é característico de hidrogênios anoméricos.

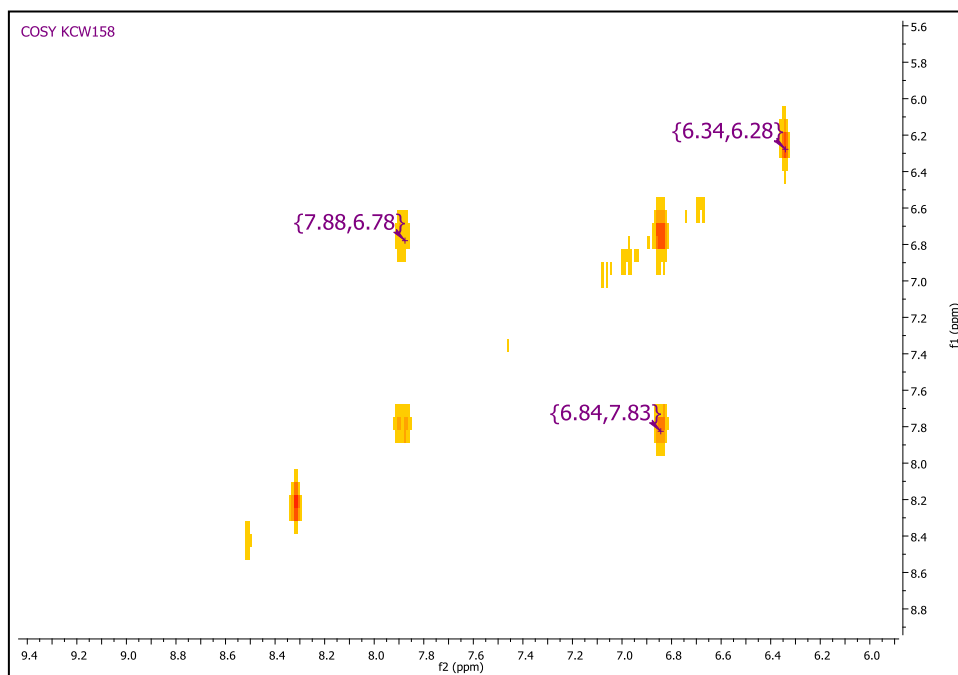


Espectro 16 - Expansão da região entre 4.15 e 4.75 ppm do RMN ^1H da KCW158 - Sinal do Hidrogênio Anomérico

O espectro bidimensional COSY mostra os acoplamentos entre hidrogênios e, através dele, é possível confirmar o acoplamento entre os hidrogênios aromáticos: os dois dupletos em 7.88 e 6.83 ppm acoplam entre si e o simpleto em 6.34 ppm não apresenta correlação. (Espectro 17 e expansão no espectro 18 e 19).

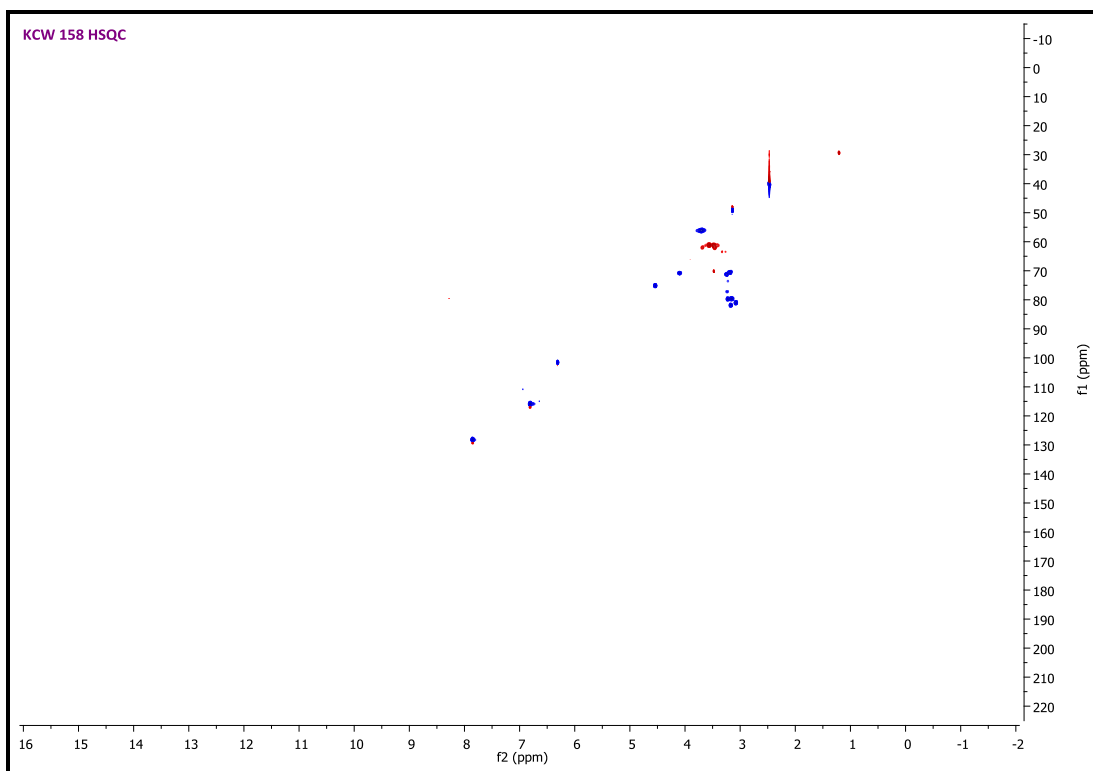


Espectro 17 - COSY KCW158

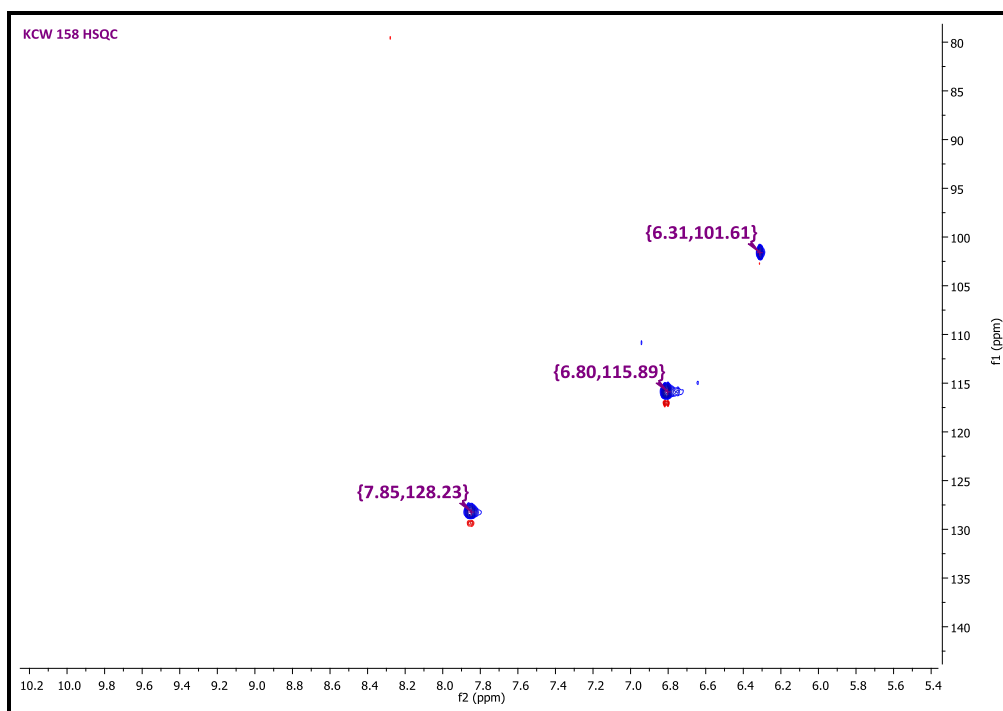


Espectro 18 - Expansão entre 6.0 e 9.4 ppm – Acoplamento entre hidrogênios aromáticos - COSY KCW158

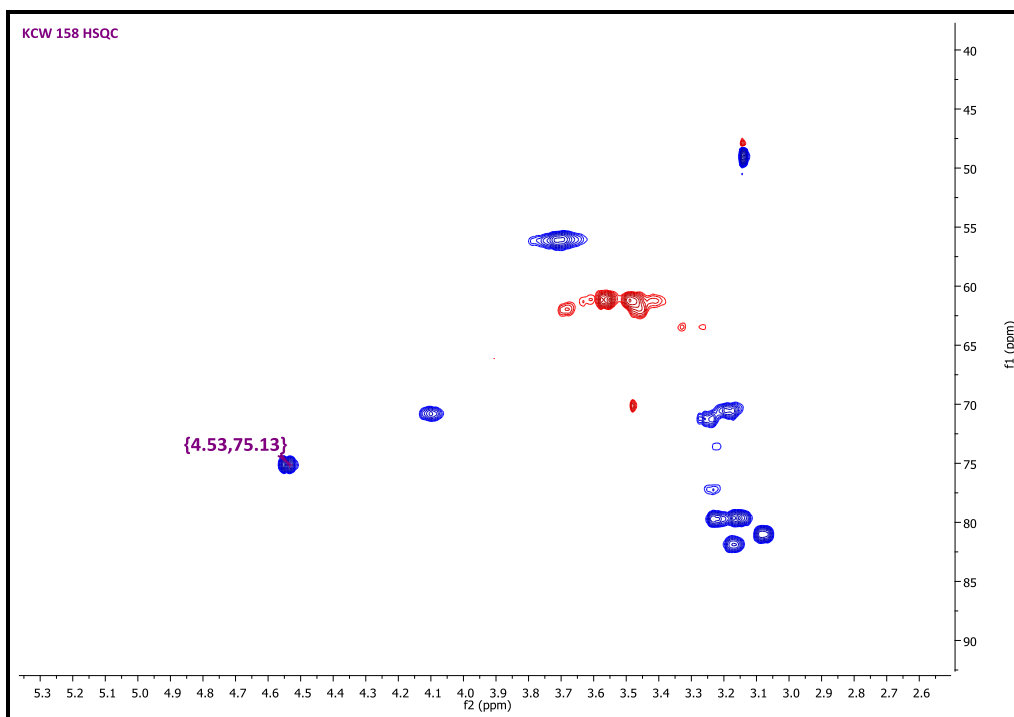
O espectro bidimensional HSQC mostra as correlações entre hidrogênios e carbonos em 1J e com isso permite que correlacionemos os hidrogênios com os seus respectivos carbonos (Espectros 19 e expansões nos espectros 20 e 21).



Espectro 19 - HSQC KCW158

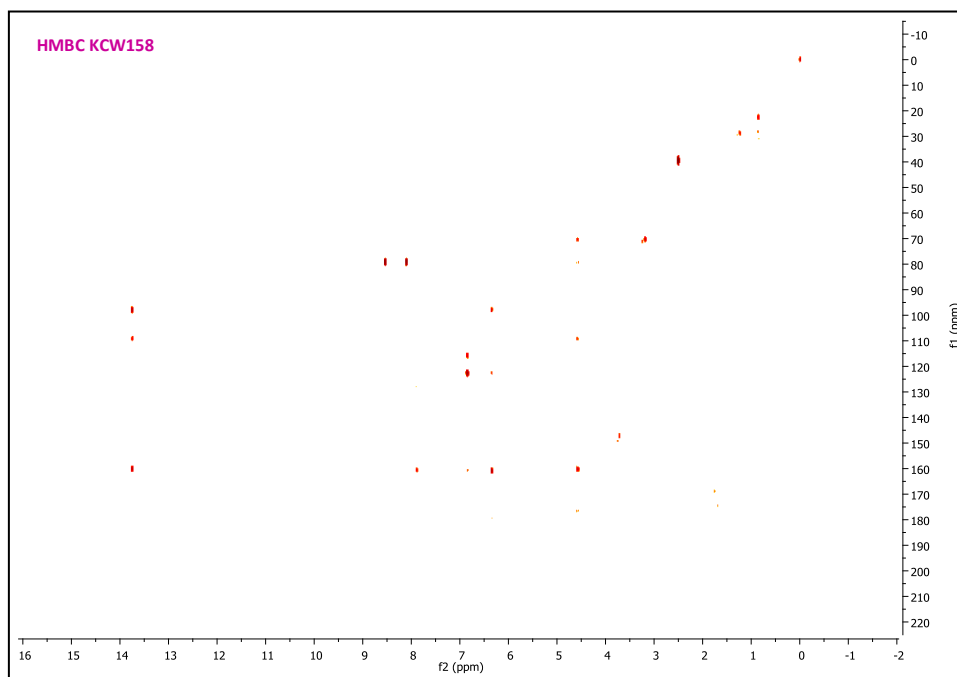


Espectro 20 - Expansão entre 5.4 e 10.2 ppm - Correlações $^1J_{CH}$ dos hidrogênios aromáticos - HSQC KCW158

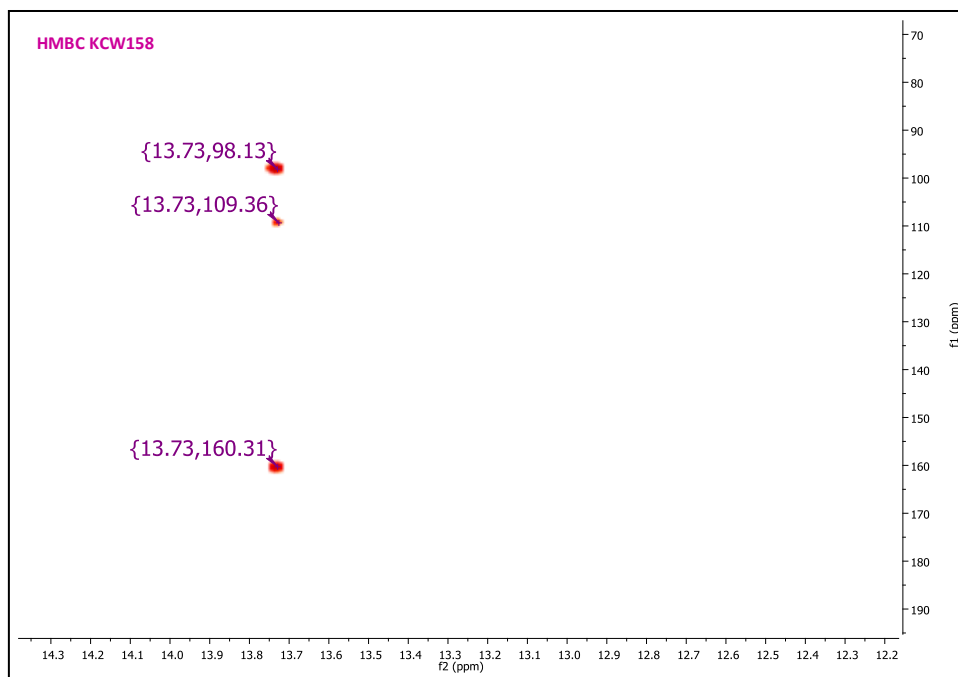


Espectro 21 - Expansão entre 2.2 e 5.1 ppm - Correlações $^1J_{CH}$ do hidrogênio anomérico e dos demais hidrogênios do açúcar (não assinalados) - HSQC KCW158

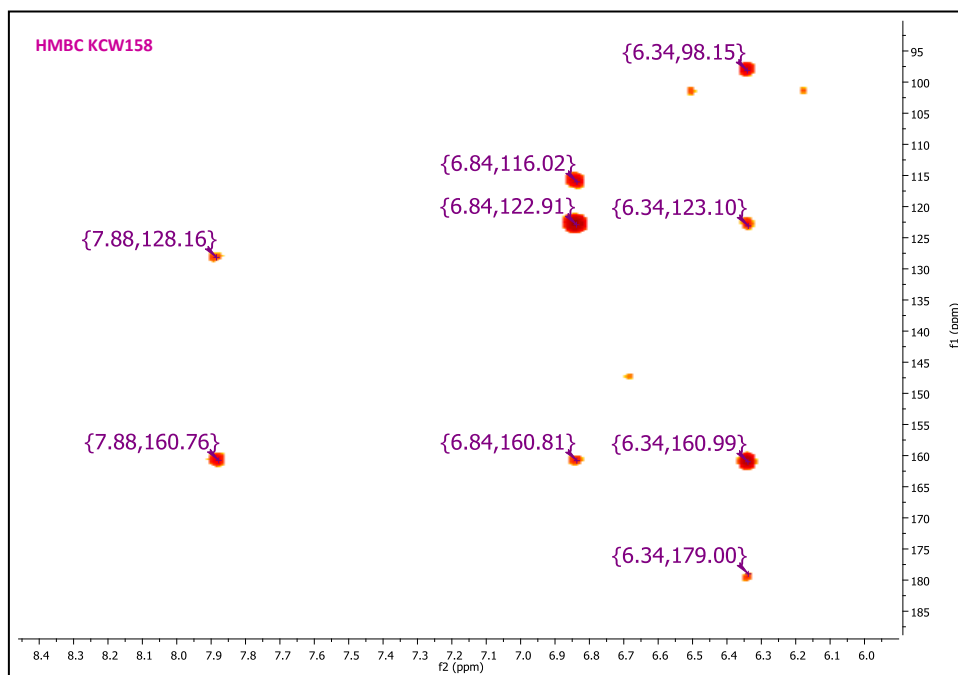
O espectro bidimensional HMBC mostra as correlações entre hidrogênio e carbono a longa distância – $^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ e às vezes $^4J_{CH}$ (Espectro 22 e expansões nos espectros 23, 24 e 25).



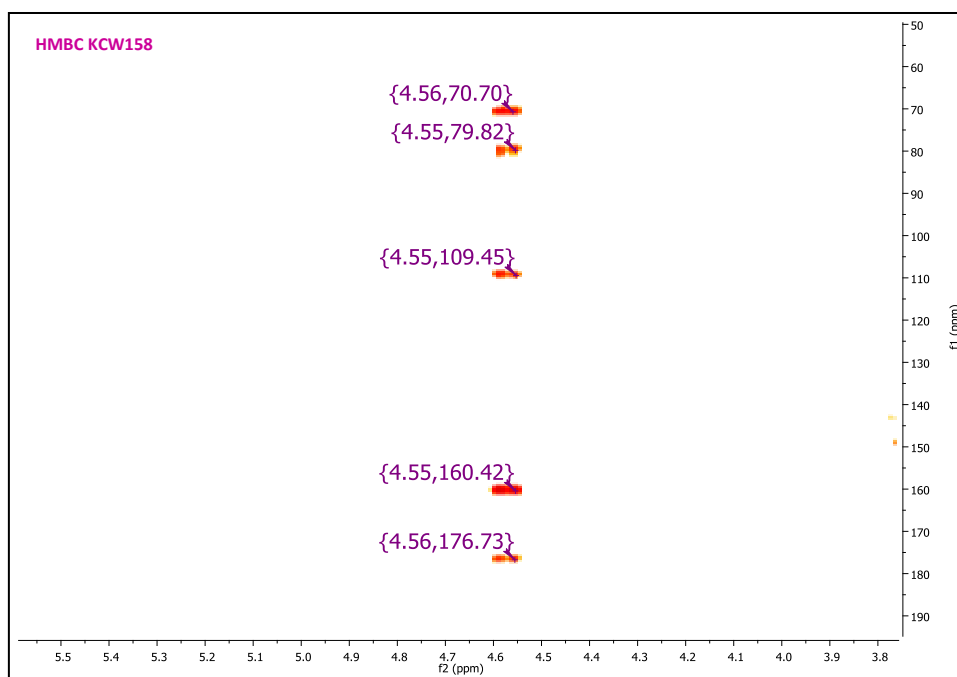
Espectro 22 - HMBC KCW158



Espectro 23 - Expansão entre 12.2 e 14.3 ppm – Correlações $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ da hidroxila em C-5 – HMBC KCW158



Espectro 24 - Expansão entre 6.0 e 8.4 ppm – Correlações $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ dos hidrogênios aromáticos – HMBC KCW158



Espectro 25 - Expansão entre 3.8 e 5.5 ppm – Correlações $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$ do hidrogênio anomérico – HMBC KCW158

Com base nas correlações obtidas nos espectros de COSY, HMQC e HMBC foi possível montar uma tabela (Tabela 3) e discutir os assinalamentos da estrutura:

1H	Correlações $^1J_{CH}$ no HMQC ^{13}C	Correlações $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ no HMBC ^{13}C
13.72 (s, 1H)	--	160.31, 109.36, 98.13
7.88 (d, 2H, J 7.06 Hz)	128.36	160.76, 128.16 (fr)
6.83 (d, 2H, J 8.26 Hz)	116.00	160.81 (fr), 122.91, 116.02
6.34 (s, 1H)	101.67	179.00 (fr), 160.99, 123.10 (fr), 98.15
4.57 (d, 1H, J 9.59 Hz)	75.18	176.73, 160.42, 109.45, 79.82, 70.70

Tabela 3 - Correlações $^1J_{CH}$, $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ no HMQC e HMBC – KCW158 – (fr: fraco)

- O simpleto em 13.72 ppm, relativo à hidroxila em C-5, se correlaciona com os carbonos em 160.31, 109.36 e 98.13 ppm. Analisando os três deslocamentos químicos podemos atribuir o de 160.31 ppm ao carbono no qual a hidroxila está ligada, uma vez que este valor é compatível para carbonos aromáticos ligados a oxigênios; o de 98.13 ppm ao carbono da posição 10, uma vez que este valor é

compatível para carbonos nesta posição; e o de valor 109.36 ppm ao carbono na posição 6, uma vez que este é o carbono mais próximo capaz de fazer correlações com a hidroxila. Não é muito comum hidroxilas fenólicas apresentarem correlações no HMBC, porém uma vez que realizam fortemente ligações de hidrogênio com a carbonila, o hidrogênio da hidroxila se mantém fixo e por isso se torna capaz de detectar as correlações a longa distância (Figura 48).

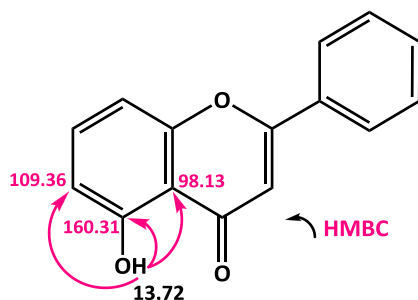


Figura 48 – Assinalamentos parciais para elucidação da KCW158

- Os dois dupletos em 7.88 e 6.83 ppm, com integração para 2 hidrogênios cada e acoplamentos entre 7-8 Hz, sugerem a presença de um anel B para-substituído, visto que seus altos valores de deslocamento químico são compatíveis pois os hidrogênios do anel B são mais desblindados que os demais hidrogênios da estrutura. Os dois hidrogênios apresentam correlação com um carbono em 160.8, o que sugere que a substituição na posição C-4' seja por uma hidroxila. Sabe-se que correlações $^3J_{CH}$ se apresentam mais intensamente no espectro de HMBC e com base nisso foi possível assinalar as posições para os dois deslocamentos químicos (Figura 49).

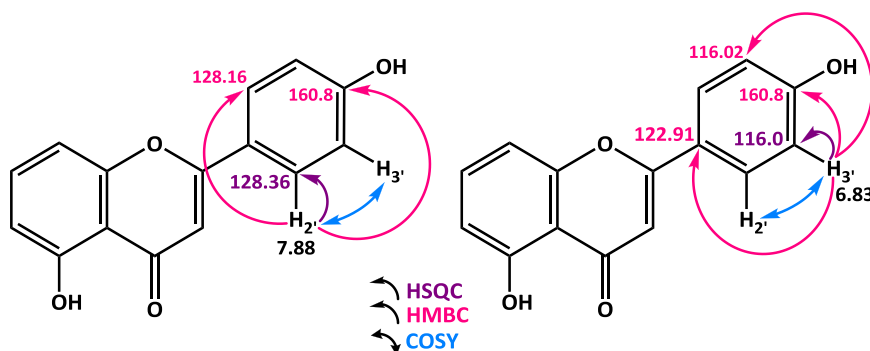


Figura 49 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW158

- O simpleto em 6.34 ppm, ligado ao carbono em 101.67 ppm, indica a presença de um hidrogênio na posição C-3. Analisando suas correlações a longa distância pode-se concluir que o carbono em 179.00 ppm pode ser atribuído ao carbono da carbonila devido ao seu alto deslocamento químico; o carbono em 98.15 ppm já foi

assinalado como o carbono da posição em C-10; o carbono em 160.99 ppm pode ser atribuído ao carbono da posição C-2, uma vez que este deslocamento químico é compatível com carbonos sp² ligados à átomos de oxigênio; e por fim, o carbono em 123.10 ppm pode ser atribuído ao carbono na posição 1', uma vez que este deslocamento é característico de carbonos nesta posição (Figura 50).

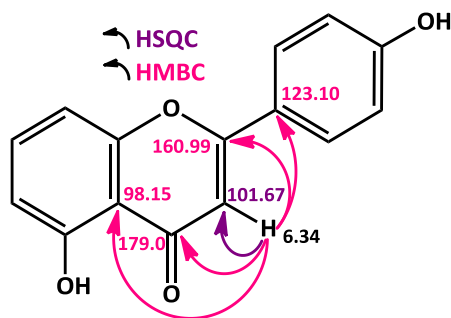


Figura 50 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW158

- O duplete em 4.57 ppm, característico de hidrogênio anomérico, está ligado diretamente a um carbono com deslocamento químico de 75.18 ppm. Este deslocamento é típico carbono de ligação C-glicosídica, o que sugere que esta flavona seja um C-glicosídeo.
- Observando os deslocamentos químicos das correlações apresentadas no HMBC pelo hidrogênio anomérico, pode-se separar em 2 grupos de carbonos: carbonos aromáticos, cujos deslocamentos são 109.45, 160.42 e 176.73 ppm; e carbonos do açúcar, cujos deslocamentos químicos são 70.70 e 79.82 ppm. O carbono em 160.42 ppm é o carbono da posição 5, ligado à hidroxila quelatogênica. O carbono em 109.45 ppm é o carbono da posição C-6, e tudo indica que seja este o carbono ligado ao açúcar, uma vez que seu deslocamento químico é característico. O carbono cujo deslocamento químico é 176.73 ppm pode ser atribuído a posição C-7 e devido ao seu deslocamento sugere a presença de uma hidroxila nesta posição. Em relação aos deslocamentos químicos do açúcar, podemos atribuir o de 70.70 ppm ao C-2'' e de 79.82 ppm ao C-3'' do açúcar. A configuração axial-axial dos hidrogênios 1'' e 2'' do açúcar foi atribuída devido ao alto valor de J (9.59 Hz) do hidrogênio 1''. (Figura 51).

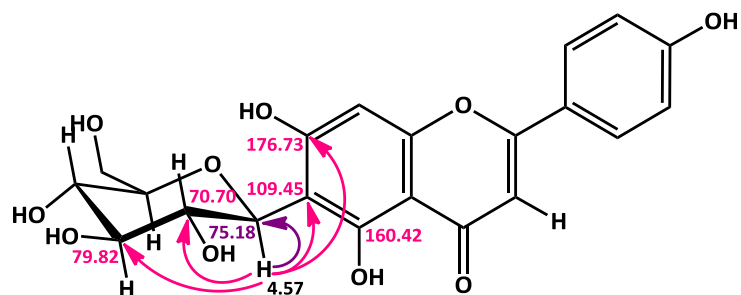


Figura 51 - Assinalamentos parciais para elucidação da KCW158

- A ausência de outros sinais relativos a hidrogênios aromáticos sugere que o anel A esteja completamente substituído, por isso foi atribuída então uma hidroxila na posição C-8.

A estrutura proposta foi, portanto (Figura 52):

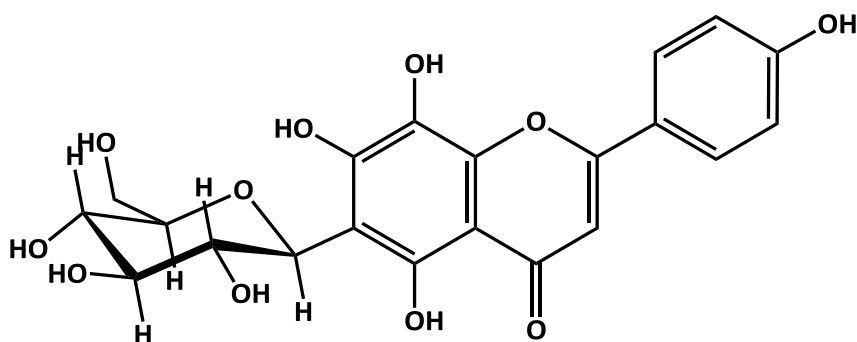


Figura 52 – Estrutura proposta para KCW158 – Isoscutelareina-6-C-β-glucosídeo

A confirmação dos assinalamentos foi feita por comparação com os dados da literatura (Tabela 4):

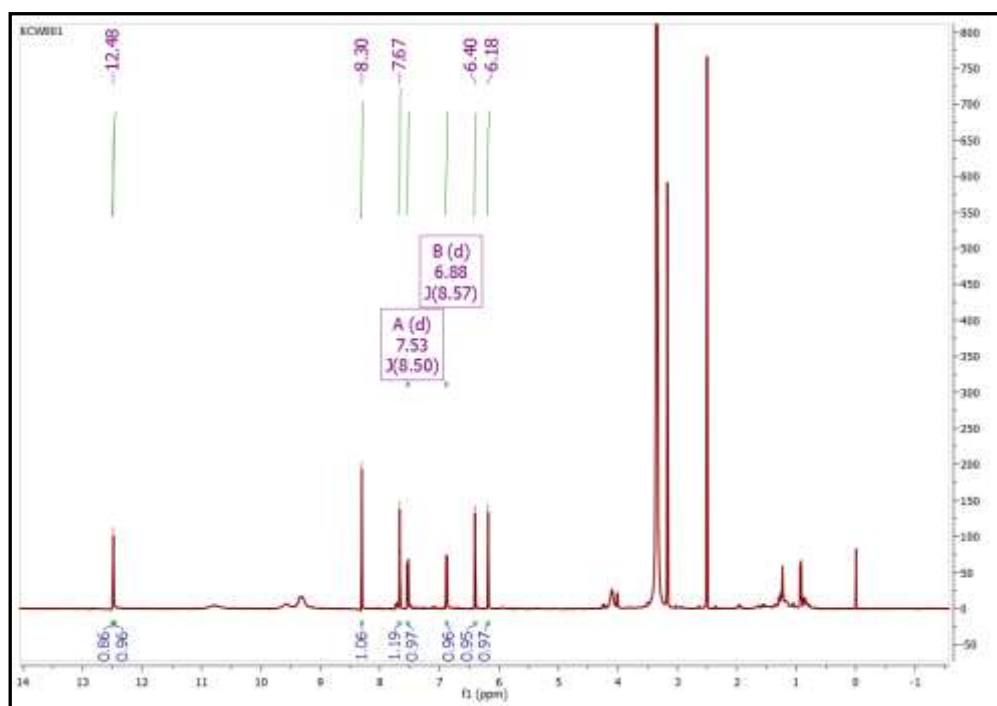
Posição	δ RMN ^1H e ^{13}C KCW140	δ RMN ^1H e ^{13}C Rigano et al., 2007
HO-5	13.72 (1H, s)	--
H-2' e H-6'	7.88 (d, 2H, J= 7.06 Hz)	7.51 (2H, d, J=8.6 Hz)
H-3' e H-5'	6.83 (d, 2H, J= 8.26 Hz)	6.83 (2H, d, J=8.6 Hz)
H-3	6.34 (1H, s)	6.48 (1H, s)
H-1''	4.57 (d, 1H, J= 9.59 Hz)	4.95 (1H, d, J=7.5 Hz)
C-4	179.0	181.9
C-7	176.73	153.1

C-2	160.99	163.4
C-5	160.42	147.5
C-9	--	145.6
C-3'	116.0	115.3
C-5'	116.02	115.3
C-4'	160.8	158.7
C-1'	123.10	121.2
C-3	101.67	103.0
C-6'	128.16	132.3
C-2'	128.36	132.3
C-10	98.15	103.0
C-1''	75.18	75.3
C-6	109.45	107.8
C-8	95.61	122.8

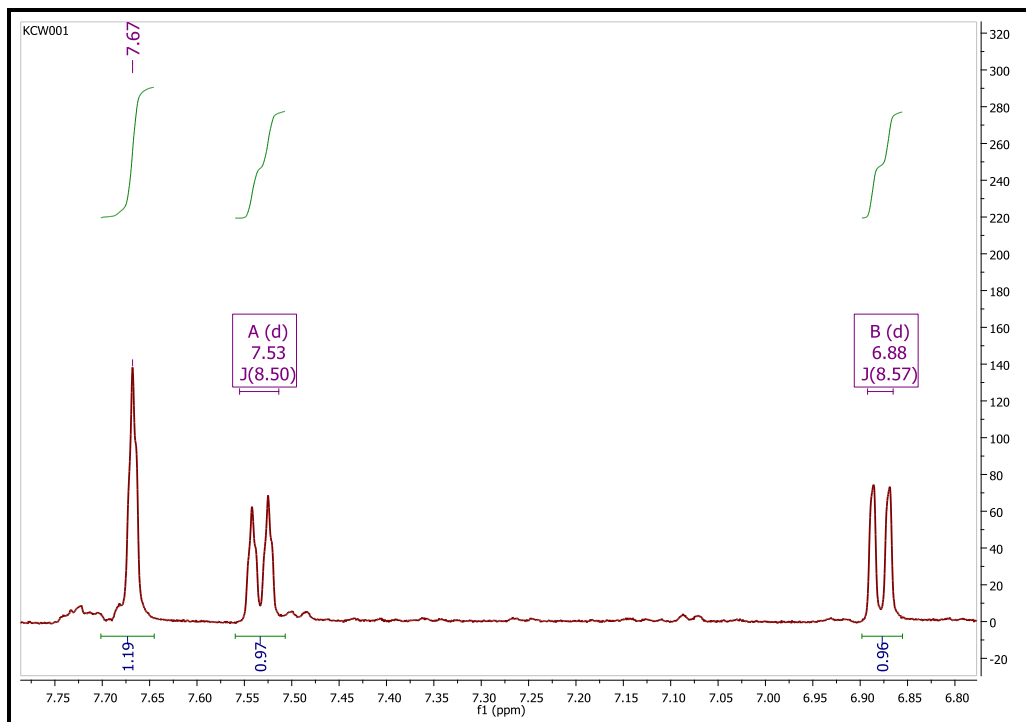
Tabela 4- Confirmação dos assinalamentos - KCW158

4 – Elucidação estrutural da aglicona KCW001

Abaixo está o espectro de RMN ^1H (Espectros 26 e 27).



Espectro 26 - RMN ^1H da KCW001



Espectro 27 - Expansão na região entre 6.8 e 7.75 ppm - RMN ^1H KCW001

- Como pode ser observado, na região dos hidrogênio aromáticos existem 6 hidrogênios, sendo que 2 acoplam entre si em *orto* (7.53 e 6.88 ppm), porém deve ser notado que o simpleto em 7.67 ppm é um simpleto largo e o dubleto em 7.53 também. Isto sugere a existência de um acoplamento muito baixo entre eles, possivelmente em *meta*. Com isso intui-se então que exista o padrão de substituição 1, 3 e 4 – provavelmente no anel B.
- O sinal simples em 12.48 é característico de hidroxila na posição C-5.
- O sinal em 8.30 foi atribuído a presença de impurezas na amostra.
- Suspeitou-se tratar então da estrutura da Quercetina. Foi realizada, então, uma CCD para comparação da aglicona KCW001 com padrão autêntico de quercetina e com isso obteve-se a confirmação da estrutura (Figura 53).



Figura 53 - Comparação da KCW001 e Padrão autêntico de Quercetina

5 – Determinação do teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi expresso em unidades de ácido gálico equivalentes (uAG) a partir da curva de calibração obtida (Tabelas 5 e 6).

Partição em Acetato de Etila

[] µg/ml	Σ Abs	uAG/mg
50	0,995	620

Tabela 5- uAG na partição em acetato de etila

Partição Butanólica

[] µg/ml	Σ Abs	uAG/mg
50	0,7815	332

Tabela 6 - uAG na partição em butanol

6 – Determinação da atividade antioxidante

Mediu-se a atividade antioxidante das partições e com base nos resultados obtidos foi possível montar uma curva de atividade e o EC₅₀ para cada uma das partições. O desempenho da partição em acetato de etila encontra-se abaixo (Tabela 7 e Gráfico 2):

[] µg/ml	Σ AA(%)
2,5	25,38
10	61,83
25	87,52
50	89,18
125	89,21
250	89,85

Tabela 7 - AA(%) da partição em acetato de etila

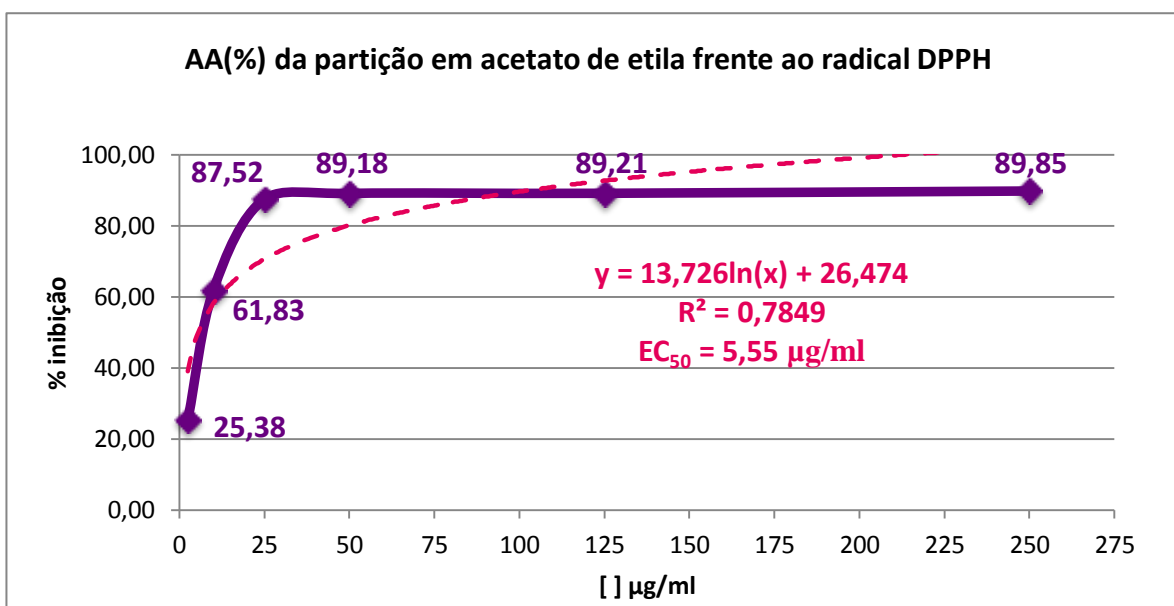


Gráfico 2 - Atividade antioxidante frente ao radical DPPH da partição em acetato de etila

Como pode ser observado na partição em acetato de etila, a partir da concentração de 25 µg/ml não houve um aumento significativo da atividade e na concentração de 5,5 µg/ml a atividade é de 50%.

A partição butanólica apresentou valores para a atividade antioxidante um pouco acima dos valores obtidos pela partição em acetato (Tabela 8 e Gráfico 3).

[] µg/ml	Σ AA(%)
10	23,66
25	61,73
50	88,35
125	88,84

250	91,35
500	93,17

Tabela 8 - AA(%) da partição em butanol

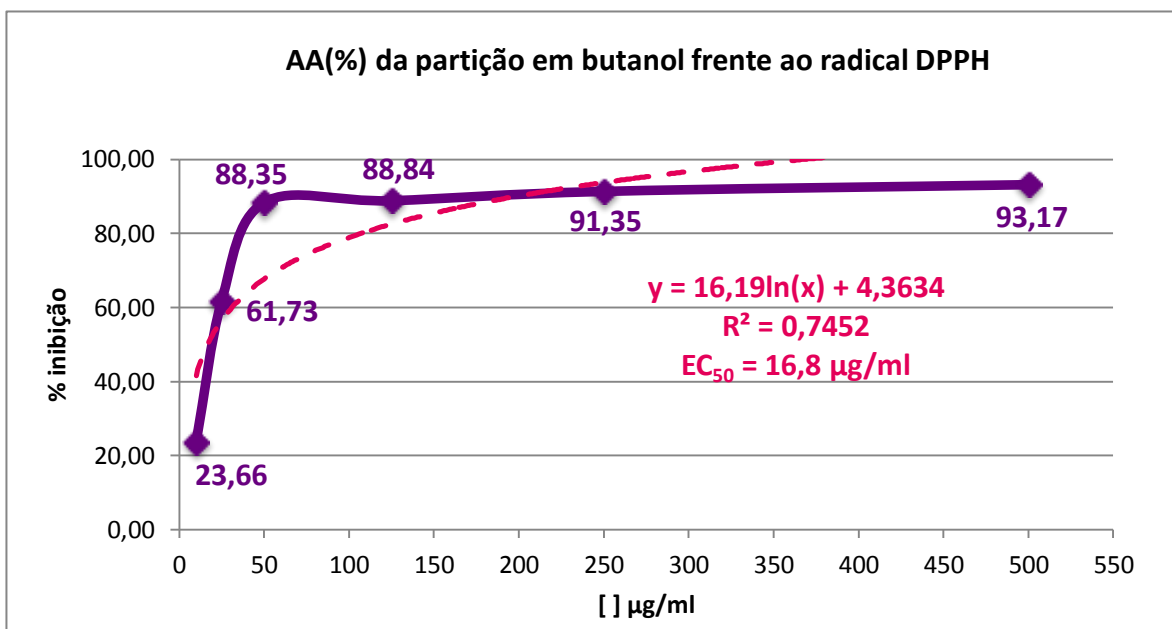


Gráfico 3 - Atividade antioxidante frente ao radical DPPH da partição em butanol

Tais resultados para a atividade antioxidante podem ser atribuídos a presença de compostos fenólicos nas partições, principalmente flavonas e flavonóis.

Anteriormente já havia sido descrito neste gênero o isolamento de algumas flavonas e flavonóis e seus glicosídeos. Dentre as flavonas podemos citar:

- 4'-hidroxi-3',7-dimetoxiflavona-5-O-glucosídeo, isolada das sementes de *Cassia spectabilis* (Sinha, 1985);
- 5,3',4'-tri-hidroxi-6-metoxi-7-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-galactopiranosídeo, isolada das sementes de *C. fistula* (Yadava, 2003);
- 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxi-flavona-5-O- α -L-rhamnopiranosil-7-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-xilopiranosídeo, isolado de *C. sophera* (Yadava, 2006);
- 2',3',6-Trihidroxi-4'-metoxi-7-O-neohesperidosídeo, isolado das folhas de *C. siamea* (Shafiuliah, 1996), entre outros.

Dentre os flavonóis temos como exemplo:

- kaempferol-3-O- β -D-glucosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucosídeo, isolado das folhas de *C. alata* (Palanichamy, 1990);
- kaempferol-3-rhamnosídeo e a quercetina-3-arabinosídeo, isolados de *C. nodosa* (Kumar, 2006);
- kaempferol-3-O-[(6''-O-trans-sinapoil)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucosídeo, isolado de *C. augustifolia* (Wu, 2009);
- kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo e rutina, isolados das flores de *C. hirsuta* (Rao, 1999); entre outros.

Não há na literatura trabalhos da ocorrência das flavonas tricetina e isoscutelareina ou de seus derivados nesta espécie e neste gênero, sendo este, portanto, um recorte inédito.

Tais flavonas não são muito comuns, tendo sua ocorrência inferior às de outras flavonas. Em uma busca na base de dados SCOPUS, em 7 de setembro de 2010, o termo “Chrysin” (Crisina) retornou 1029 ocorrências; “Apigenin” (Apigenina), 3912; e “Luteolin” (Luteolina) 3674. Enquanto que “Tricetin” (Tricetina) retornou 64 ocorrências e “Isoscutellarein” (Isoscutelareina) 80.

Alguns dos trabalhos envolvendo isoscutelareina e seus derivados são relativos à família Asteraceae (Ozipek, 2002; Stevens, 1999; Wollenweber, 1997), mas também há trabalhos nas famílias Lamiaceae (Plioukas, 2010; Luan, 2008; Janeska, 2007), Iridaceae (Rigano, 2007) e Rutacea (Andersen, 2006).

A ocorrência de tricetina foi descrita em algumas espécies, e dentre elas podemos destacar a ocorrência no gênero *Biebersteinia*, o único gênero da família Biebersteiniaceae (Greenham, 2001). Também há trabalhos em plantas das famílias Fabaceae (Stochmal, 2001; Pistelli, 2009), Ericaceae (Nazemiyeh, 2008), Berberidaceae (Wang, 2007), Lamiaceae (Marin, 2004), em algumas espécies de musgo (Basile, 1999), no *Ginkgo biloba* (Yuping et al., 2000) e em pólen e mel das flores da família Myrtaceae (Medeiros, 2008; Pyrzyńska, 2009; Campos, 2002). Há trabalhos também da sua presença em alguns cereais, como arroz, e outros alimentos, como cana-de-açúcar (Zhou, 2009).

Por conta da sua presença em diversos alimentos, sendo a flavona majoritária em alguns casos, esta tem sido considerada um nutracêutico, devido às suas atividades quimioprotetoras frente a algumas doenças, incluindo certos tipos de tumores (Zhou, 2009). Dentre os trabalhos que mais destacam essa atividade, está o realizado por Hsu e colaboradores, em 2009. Neste trabalho eles investigaram o efeito da tricetina frente a uma linhagem de adenocarcinoma de mama e constataram que o flavonoide bloqueava o ciclo celular na fase G2/M, ou seja antes de ocorrer a divisão celular. Foi observado também que o flavonoide era capaz de induzir apoptose das células tumorais e por isso consideraram que a tricetina poderá ser em breve um potente agente antitumoral.

Uma justificativa para esta atividade pode ser o potencial antioxidante da aglicona desta flavona, uma vez que esta possui em sua estrutura 5 grupos hidroxilas, estando 3 ligadas em carbonos vizinhos, formando o grupo pirogalol (Figura 52).

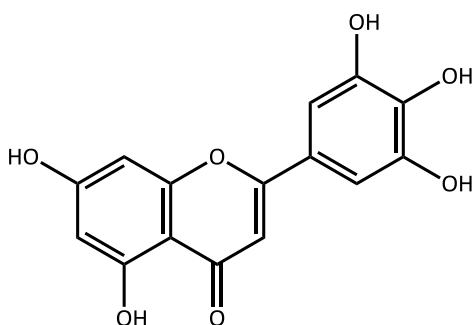


Figura 54 - Estrutura da tricetina

Nesta dissertação, a tricetina isolada (Figura 53) encontra-se di-substituída no anel B, o que, de acordo com a literatura (Rice-Evans, 1996; Balasundram, 2006), desfavorece a atividade antioxidante. Entretanto, Van Acker e colaboradores (1996) apontam em seu trabalho acerca da relação estrutura x atividade antioxidante que a presença de uma substituição do hidrogênio da posição C-4' por um grupo $-OCH_3$ ou $-OCH_2CH_3$ parece ativar a hidroxila na posição C-3', favorecendo a atividade antioxidante. Somando-se a isto, a Tricetin-4'-metoxi-3'- β -D-glucosídeo aqui isolada, possui ainda as hidroxilas em C-5 e C-7 não substituídas, as quais em conjugação com a carbonila em C-4 no anel C, permitem uma atividade antioxidante máxima. Espera-se então, apesar do grupo pirogalol não mais encontrar-se livre, que a atividade

antioxidante deste glicosídeo ainda se faça presente devido ao tipo de substituição no hidrogênio da hidroxila em C-4' e à manutenção das demais hidroxilas da estrutura.

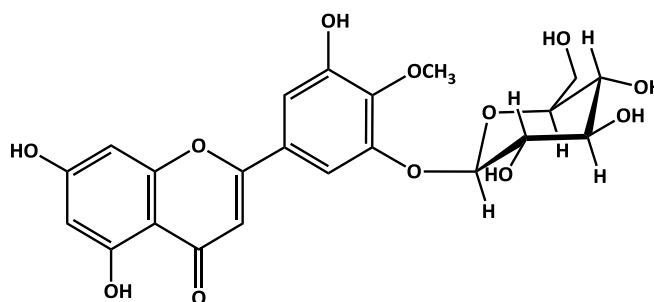


Figura 55 – Tricetin-4'-metoxi-3'-β-D-glucosídeo – Tricetina di-substituída

A outra flavona isolada e identificada (Figura 54) também possui substituição, entretanto por ser um C-glicosídeo a substituição não envolve nenhuma das hidroxilas, o que faz com que existam quatro hidroxilas livres. Destas três estão no anel A, formando formando o grupo catecol (C-7 e C-8) e permitindo a conjugação com a carbonila (C-5 e C-7). Tal arranjo estrutural favorece a deslocalização eficiente do radical, possibilitando que este glicosídeo possua uma razoável atividade antioxidante.

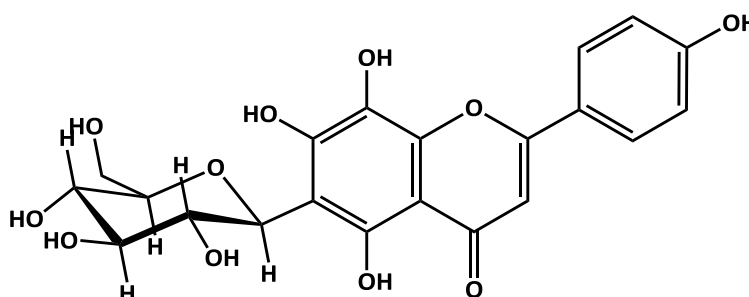


Figura 56 - Isoscutelareina-6-C-β-glucosídeo

Foi observado que, mesmo com a presença de glicosídeos, tanto a partição em acetato de etila, quanto a partição em butanol possuem uma atividade antioxidante destacável ($EC_{50} = 5,55 \mu\text{g/mL}$ e $16,8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) e uma composição fenólica alta (620 uAG/mg e 332 uAG/mg , respectivamente).

Como pode ser observado, o EC_{50} da partição em butanol é aproximadamente 3 vezes maior quando comparado ao da partição em acetato de etila, o que pode

indicar a presença de flavonoides mais substituídos na partição butanólica, comparada aos da partição em acetato de etila.

Considerando o fato de que foram isolados dois flavonoides glicosilados (um O- e um C-glicosídeo) na partição em acetato de etila, espera-se então, que na partição butanólica existam flavonoides com mais de um açúcar. Como foi possível identificar após a hidrólise a presença de flavonóis – quercetina e kampferol – nesta partição, acredita-se também que na partição em acetato de etila as flavonas glicosiladas ocorram preferencialmente enquanto que na partição butanólica são os flavonóis glicosilados os preferidos.

Em um primeiro momento, a ampla presença de glicosídeos flavonoídicos poderia indicar uma atividade antioxidante baixa, porém após a determinação da composição fenólica e da elucidação estrutural das duas flavonas isoladas da partição em acetato de etila, tal atividade antioxidante é justificada. Apesar da presença dos glicosídeos, ambas as estruturas atendem a vários critérios necessários para uma atividade antioxidante máxima. A alta composição fenólica das partições também pode ser responsável pelas atividades.

Sabe-se que muitos dos efeitos positivos dos flavonoides sobre as doenças são atribuídos à sua atividade antioxidante. Uma vez que esta espécie é amplamente difundida no litoral brasileiro, com muitas flores, o que atrai insetos, incluindo abelhas, poderia ser útil para a produção de um mel cuja composição fenólica e a atividade antioxidante fosse alta, capaz de atuar como um quimiopreventor.

Devido ao grande potencial desta espécie, acredita-se também que desdobramentos deste trabalho possam originar outras contribuições e enriquecer a literatura com dados acerca de utilizações no campo medicinal.

V – Conclusão

- ▶ O predomínio dos flavonoides do tipo flavona glicosilada foi observado na composição da partição em acetato de etila enquanto que do tipo flavonol glicosilado na composição da partição em butanol.
- ▶ Foram isoladas e identificadas 2 flavonas descritas pela primeira vez no gênero *Cassia*:
 - Tricetin-4'-metoxi-3'-β-D-glucosídeo
 - Isoscutelareina-6-C-β-glucosídeo
- ▶ A atividade antioxidante da partição em acetato de etila apresentou um $EC_{50} = 5,55 \mu\text{g/mL}$ e a determinação de fenóis totais apontou a concentração de 620 uAG/mg.
- ▶ A atividade antioxidante da partição em butanol apresentou um $EC_{50} = 16,8 \mu\text{g/mL}$ e a determinação de fenóis totais apontou a concentração de 332 uAG/mg.

VI – Referências Bibliográficas

Akah, P. A.; Orisakwe, O. E.; Gamaniel, K. S.; & Shittu, A. **Evaluation of nigerian traditional medicines: II. Effects of some nigerian folk remedies on peptic ulcer.** Journal of Ethnopharmacology, 62(2): 123-127, 1998.

Andersen, O. M.; Markham, K. R. **Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications**; CRC Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

Aoki, T.; Akashi, T.; Ayabe, S. **Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity, and Biosynthesis.** Journal of Plant Resesarch 113: 475-488, 2000.

Baez, D. A.; Vallejo, L. G. Z.; Jimenez-Estrada, M. **Phytochemical studies on *Senna skinneri* and *Senna wislizeni*.** Natural Product Letters, 13(3): 223-228, 1999.

Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** Food Chemistry 99: 191–203, 2006.

Bankova, V. S.; Popov, S. S.; Marekov, N.L. **A Study on Flavonoids of Propolis.** Journal of Natural Products 46 (4): 471-474, 1983.

Basile, A.; Giordano, S.; López-Sáez, J. A.; & Cobianchi, R. C. **Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses.** Phytochemistry, 52(8): 1479-1482, 1999.

Benalla, W.; Bellahcen, S.; Bnouham, M. **Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors.** Current Diabetes Reviews 6(4): 247-254, 2010.

Bolzani, V. S.; Gunatilaka, A. A. L.; Kingston, D. G. I. **Bioactive and Other Piperidine Alkaloids from *Cassia leptophylla*.** Tetrahedron 51(21): 5929-5934, 1995.

Botta B.; Delle Monache, G.; De Rosa M. C.; Scurria R.; Vitali A.; Vinciguerra V.; Menendez P.; Misiti D. **Studies in cell suspension cultures of *Cassia didymobotrya*. part III. The biotransformation of chalcones to flavones and biflavanones.** Heterocycles 29(11): 2175-2183, 1989.

Braz Filho, R.; dos Santos, R. N.; Silva, M. G. de V. **Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminoseae).** Quimica Nova 31(8): 1979-1981, 2008

Campos, M. G.; Webby, R. F.; & Markham, K. R. **The unique occurrence of the flavone aglycone tricetin in Myrtaceae pollen.** Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 57(9-10): 944-946, 2002.

Cartaya, O.; Reynaldo, I. **Flavonoides: características químicas y aplicaciones.** Cultivos Tropicales 22 (2): 5-14, 2001.

Cazarolli, L. H.; Zanatta, L.; Alberton, E. H.; Figueiredo, M. S. R. B.; Folador, P.; Damazio, R. G.; **Flavonoids: Cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis.** Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 8(10): 1032-1038, 2008.

- Chauhan, D.; Rai, R.; Chauhan, J. S. **Two flavonoid triglycosides from *Cassia marginata***. Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry 41(2): 446-448, 2002.
- Coetzee, J.; Mcitekaka, L.; Malana, E.; Ferreira, D. **Structure and synthesis of butiniflavan-epicatechin and epigallocatechin probutinidins**. Phytochemistry 52: 737-743, 1999.
- Coetzee, J.; Mcitekaka, L.; Malana, E.; Ferreira, D. **Structure and synthesis of the first procassinidin dimers based on epicatechin, and gallo- and epigallo-catechin**. Phytochemistry 53: 795-804, 2000.
- Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. **Antimicrobial activity of flavonoids**. International Journal of Antimicrobial Agents 26: 343–356, 2005.
- da Silva, V. C.; De Carvalho, M. G.; Borba, H. R.; & Silva, S. L. C. **Anthelmintic activity of flavonoids isolated from roots of *Andira anthelmia* (leguminosae)**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18(4), 573-576, 2008.
- de la Rosa, L. A.; Alvarez-Parrilla, E, Gonzalez-Aguilar, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals : chemistry, nutritional value and stability**. 1. ed. 2010.
- de Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T. **Analytical separation and detection methods for flavonoids**. Journal of Chromatography A, 1112(1-2): 31-63, 2006.
- de Witte, P. **Metabolism and Pharmacokinetics of Anthranoids**. Pharmacology 47 (1):86-97, 1993.
- Dehmlow, E. V.; Van Ree, T.; Guntenhöner, M. **2, 4- trans-, 7' 4'- dihydroxy- 4-methoxyflavan from *Cassia abbreviata***. Phytochemistry 49 (6): 1805-1806, 1998.
- Delle Monache, G.; De Rosa, M. C.; Scurria, R.; Monacelli, B.; Pasqua, G.; Giuseppe Dall'Olio, G.; Botta, B. **Metabolites from in vitro cultures of *Cassia didymobotrya***. Phytochemistry 30(6): 1849-1854, 1991.
- Dewick, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. London: John Wiley & Sons. 2002.
- dos Santos et al. **Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae)**. Quim. Nova, Vol. 31, No. 8, 1979-1981, 2008.
- Dubey, P.; Gupta, P. C. **A new flavonol glycoside from seeds of *Cassia multijug***. Planta Medica 38(2): 165-168, 1980.
- Duquénois, P.; Anton, R. **Contribution to the chemical study of the leaves of *Cassia sieberiana* D.C.** Planta Medica 16(2): 184-190, 1968.
- Einbonda, L. S.; Reynertsona, K. A.; Luo, X-D.; Basileb, M. J.; Kennellya, E. J. **Anthocyanin antioxidants from edible fruits**. Food Chemistry 84: 23–28, 2004.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 1 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929.

Franco, E. A. P.; Barros, R. F. M. **Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí.** Revista Brasileiras de Plantas Mediciniais Botucatu 8:78, 2006.

Franz, G. **The Senna drug and its chemistry.** Pharmacology 47 (1): 2-6, 1993

Geleijnse, J. M.; Hollman, P. C. H. **Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms?** American Journal Clinical Nutrition 88:12–3, 2008.

González-Torres, M. C.; Betancourt-Rule, M.; Ortiz-Muñiz, R. **Daño Oxidativo y Antioxidantes.** Bioquímica, 25 (1): 3-9, 2000.

Goppel, M.; Franz, G. **Stability control of Senna leaves and Senna extracts.** Planta Medica 70(5): 432-436, 2004.

Greenham, J.; Vassiliades, D. D.; Harborne, J. B.; Williams, C. A.; Eagles, J.; Grayer, R. J.; et al. **A distinctive flavonoid chemistry for the anomalous genus *Biebersteinia*.** Phytochemistry, 56(1): 87-91, 2001.

Gupta, A.; Singh, J.; Sharma, J. P. **Anthraquinone and dihydroflavonol from *Cassia angustifolia*.** Journal of the Indian Chemical Society 79(3): 289-290, 2002.

Guzmán, E.; Pérez, C.; Zavala, M.A.; Acosta-Viana, K.Y.; Pérez S. **Antiprotozoal activity of (8-hydroxymethylen)-trיעicosanyl acetate isolated from *Senna villosa*.** Phytomedicine 15: 892–895, 2008.

Haraguchi, H.; Tanimoto, K.; Tamura, Y.; Mizutani, K.; & Kinoshita, T. **Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*.** Phytochemistry, 48(1): 125-129, 1998.

Harborne, J.B.; Williams, C.A. **Advances in flavonoid research since 1992.** Phytochemistry 55: 481-504, 2000.

Hatano, T.; Mizuta, S.; Ito, H.; Yoshida, T. **C-Glycosidic flavonoids from *Cassia occidentalis*.** Phytochemistry 52: 1379-1383, 1999.

Hatano, T.; Yamashita, A.; Hashimoto, T.; Ito, H.; Kubo, N.; Yoshiyama, M.; Shimura, S.; Itoh, Y.; Okuda, T.; Yoshida, T. **Flavan dimers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*.** Phytochemistry 46 (5): 893-900, 1997.

Havsteen, B. H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** Pharmacology & Therapeutics 96: 67–202, 2002.

Hazni, H.; Ahmad, N.; Hitotsuyanagi, Y.; Takeya, K.; Choo, C. **Phytochemical constituents from *Cassia alata* with inhibition against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** Planta Medica 74(15): 1802-1805, 2008.

- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. **Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships.** Journal of Nutritional Biochemistry, 13(10): 572-584, 2002.
- Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Joseph, H.; Bailleul, F. **Ethnopharmacology of *Lippia alba*.** Journal of Ethnopharmacology 116(2): 211-222, 2008.
- Hennebelle, T.; Weniger, B.; Joseph, H.; Sahpaz, S.; Bailleul, F. ***Senna alata*.** Fitoterapia 80: 385–393, 2009.
- Hernández, I.; Leonor Alegre, L.; van Breusegem, F.; Sergi Munné-Bosch, S. **How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?** Trends in Plant Science 14 (3), 2009.
- Horowitz, R.M.; Gentili, B. Flavonoids of Citrus. IV. **Isolation of Some Aglycones from the Lemon (*Citrus limon*).** The Journal of Organic Chemistry 25 (12):2183-2187, 1960.
- Hrazdina, G. Column Chromatographic **Isolation of the Anthocyanidin-3,5-Diglucosides from Grapes.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 18 (2), 1970.
- Hsu, Y. A.; Uen, Y. ; Chen, Y.; Liang, H.; & Kuo, P. O. **Tricetin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(18): 8688-8695, 2009.
- Iwashina, T. **The structure and distribution of the flavonoids in plants.** Journal of Plant Research, 113(1111): 287-299, 2000.
- Janeska, B.; Stefova, M.; & Alipieva, K. **Assay of flavonoid aglycones from the species of genus *Sideritis* (lamiaceae) from macedonia with HPLC-UV DAD.** Acta Pharmaceutica, 57(3), 371-377, 2007.
- Jones, L.; Bartholomew, B.; Latif, Z.; Sarker, S. D.; Nash, R. J. **Constituents of *Cassia laevigata*.** Fitoterapia 71: 580-583, 2000.
- Kanno, M.; Shibano, T.; Takido, M.; & Kitanaka, S. **Antiallergic agent from natural sources. 2. structures and leukotriene release-inhibitory effect of toroside B and torosachryson 8-O-6''-malonyl β -gentiobioside from *Cassia torosa* CAV.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 47(7): 915-918, 1999.
- Kestell, P.; Zhao, L.; Jameson, M. B.; Stratford, M. R. L.; Folkes, L. K.; Baguley, B. C. **Measurement of plasma 5-hydroxyindoleacetic acid as a possible clinical surrogate marker for the action of antivasular agents.** Clinica Chimica Acta 314(1-2): 159-166, 2001.
- Krenna, L.; Mironb, A.; Pempa, E.; Petra, U.; Kopp, B. **Flavonoids from *Achillea nobilis*** L. Zeitung Naturforsch 58c: 11-16, 2003.
- Kumar, R.; Ilyas, M.; Parveen, M.; Shafiullah. **A new chromone from *Cassia nodosa*.** Journal of Asian Natural Products Research 8(7): 595-598, 2006.

- Liu, A.; Xu, L.; Zou, Z.; Yang, S. **Studies on chemical constituents from leaves of *Cassia alata***. China Journal of Chinese Materia medica 34(7): 861-863, 2009.
- Lombardo, M.; Kiyota, S.; Kaneko, T.M. **Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae)**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada 30(1): 1 – 9, 2009.
- Longuefosse, J.L.; Nossin, E.J. **Medical ethnobotany survey in Martinique**. Journal of Ethnopharmacology 53: 117-142, 1996.
- Luan, L.; Gan, F.; Wu, Y. **Simultaneous determination of three flavonoids in rat plasma by RP-LC after oral administration of the total flavonoids of *Scutellaria barbata***. Chromatographia 68(9-10): 823-828, 2008.
- Malterud, K.E.; Farbrot, T.L.; Huse, A.E.; Sund, R.B. **Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Anthraquinones and Anthrones**. Pharmacology (1):77-85, 1993.
- Marin, P.D.; Grayer, R.J.; Grujic-Jovanovic, S.; Kite, G.C.; Veitch, N.C. **Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica***. Phytochemistry 65: 1247–1253, 2004.
- Martens, S.; Mithöfer, A. **Flavones and flavone synthases**. Phytochemistry 66: 2399–2407, 2005.
- Martin, T. S.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K. **Phenolic compounds from leaves of *Cassia alata***. Natural Medicines 52(4): 373, 1998.
- Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; & Tuñón, M. J. **Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes**. Nutricion Hospitalaria, 17(6): 271-278, 2002.
- Matsuura, S.; Yoshioka, S.; & Iinuma, M. (1978). **Studies on the constituents of the useful plants. VII. the constituents of the leaves of *Cassia obtusifolia* L.** Yakugaku Zasshi, 98(9), 1288-1291.
- Medeiros, K. C. P.; Figueiredo, C. A. V.; Figueredo, T. B.; Freire, K. R. L.; Santos, F. A. R.; Alcantara-Neves, N. M.. **Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice**. Journal of Ethnopharmacology, 119(1): 41-46, 2008.
- Merken, H. M.; Beecher, G. R. **Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (3), 2000.
- Modnicki, D.; Tokar, M.; Klimek, B. **Flavonoids And Phenolic Acids Of *Nepeta cataria* L. Var. *Citriodora* (Becker) Balb. (Lamiaceae)**. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research 64 (3): 247-252, 2007
- Morimoto, S.; Nonaka, G.; Nishioka, I. **Tannins and related compounds. Procyanidin C-glucosides and an acylated flavan-3-ol glucoside from the barks of *Cinnamomum***

cassia blume and *C. obtusifolium* nees. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 34(2), 643-649, 1986.

Murti, P. B. R.; shadri, T. R. **Chemical composition of indian *Senna leaves (Cassia angustifolia)*.** Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A, 10(2): 96-103, 1939.

Naczka, M.; Shahidi, F. **Extraction and analysis of phenolics in food.** Journal of Chromatography A 1054: 95–111, 2004.

Nazemiyeh, H.; Bahadori, F.; Delazar, A.; Ay, M.; Topcu, G.; Kolak, U.; et al. **Tricetin 4'-O- α -L-rhamnopyranoside: A new flavonoid from the aerial parts of *Erica arborea*.** Chemistry of Natural Compounds, 44(2): 174-177, 2008.

Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A. M. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.** American Journal of clinical Nutrition 74:418–25, 2001.

Nsonde Ntandou, G. F.; Banzouzi, J. T.; Mbatchi, B.; Elion- Itou, R.D.G.; Etou-Ossib, A. W.; Ramos, S.; Benoit- Vical, F. Abena, A. A.; Ouamba, J. M. **Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. Stem bark extracts.** Journal of Ethnopharmacology 127:108–111, 2010.

Nwafor, P. A.; & Okwuasaba, F. K. **Effect of methanolic extract of *Cassia nigricans* leaves on rat gastrointestinal tract.** Fitoterapia, 72(3): 206-214, 2001.

Oleszek, W.; Lee, C. Y.; Jaworski, A. W.; Price, K. R. **Identification of some phenolic compounds in apples.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 36 (3): 430-432, 1998.

Ossipov, V.; Nurmi, K.; Loponen, J.; Prokopiev, N.; Haukioja, E; Pihlaja, K. **HPLC isolation and identification of flavonoids from white birch *Betula pubescens* leaves.** Biochemical Systematics and Ecology 23: 213-222, 1995.

Ozipek, M.; Saracoglu, I.; Ogihara, Y.; Caliş, I. **Nuatigenin-type steroidal saponins from *Veronica fuchsii* and *V. multifida*.** Zeitschrift Fur Naturforschung 57(7-8): 603-608, 2002.

Palanichamy, S.; & Nagarajan, S. **Analgesic activity of *Cassia alata* leaf extract and kaempferol 3-O-sophoroside.** Journal of Ethnopharmacology 29(1): 73-78, 1990.

Perumal Samy, R.; Gopalakrishnakone, P. **Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 7(3): 283-294, 2010.

Pistelli, L.; Bertoli, A.; Noccioli, C.; Mendez, J.; Musmanno, R. A.; Di Maggio, T.; **Antimicrobial activity of *Inga fendleriana* extracts and isolated flavonoids.** Natural Product Communications, 4(12): 1679-1683, 2009.

- Plioukas, M.; Termentzi, A.; Gabrieli, C.; Zervou, M.; Kefalas, P.; Kokkalou, E. **Novel acylflavones from *Sideritis syriaca* ssp. *syriaca***. Food Chemistry 123(4): 1136-1141, 2010.
- Pyrzynska, K.; & Biesaga, M. **Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey**. Trends in Analytical Chemistry, 28(7): 893-902, 2009.
- Rai, K. N.; & Kumari, S. **Isolation of polyphenolic constituents from pods of *Cassia marginata* roxb. hort and their biological activity**. Asian Journal of Chemistry 18(1): 289-294, 2006.
- Rao, K. V.; Damu, A. G.; Jayaprakasam, B.; & Gunasekar, D. Flavonol glycosides from *Cassia hirsuta*. Journal of Natural Products 62(2): 305-306, 1999.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; George Paganga, G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids**. Free Radical Biology & Medicine, 20(7): 933-956, 1996.
- Rigano, D.; Formisano, C.; Grassia, A.; Grassia, G.; Perrone, A.; Piacente, S.; Vuotto, M. L.; Senatore, F. **Antioxidant flavonoids and isoflavonoids from rhizomes of *Iris pseudopumila***. Planta Medica, 73(1), 93-96, 2007.
- Sandnes, D.; Johansen, T.; Teien, G.; & Ulsaker, G. **Mutagenicity of crude Senna and Senna glycosides in *Salmonella typhimurium***. Pharmacology and Toxicology 71(3 l):165-172, 1992.
- Saracino, M. R.; Lampe, J. W. **Phytochemical regulation of UDP-glucuronosyltransferases: Implications for cancer prevention**. Nutrition and Cancer 59(2): 121-141, 2007.
- Shafiuliah, Khan, M. S.; Parveen, M.; Kamil, M.; Ilyas, M. **Isolation of 2',3',6-trihydroxy-4'-methoxy-7-O-neohesperidoside, a novel flavone glycoside from *Cassia siamea***. Journal of Chemical Research - Part S, (1), 2-3, 1996.
- Sibanda, T.; Okoh, A. I. **The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents**. African Journal of Biotechnology 6(25): 2886-2896, 2007.
- Silva, A.L.G.; W.T. Ormond; M.C.B. Pinheiro. **Biologia floral e reprodutiva de *Cassia australis* (Vell.) Irwin & Barneby (Fabaceae, Caesalpinioideae)**. Boletim Museu Nacional de Botânica 121: 1-11, 2002.
- Sinha, K. S.; Sinha, S. K.; Dwivedi, N. **A flavone glycoside from seeds of *Cassia spectabilis* DC**. Journal of the Indian Chemical Society 62(2): 168-169, 1985.
- Sob, S. V.; Wabo, H. K.; Tchinda, A. T.; Tane, P.; Ngadjui, B. T.; Ye, Y. **Anthraquinones, sterols, triterpenoids and xanthenes from *Cassia obtusifolia***. Biochemical Systematics and Ecology, doi:10.1016, 2010.

- Srivastava, Y. S.; Gupta, P. C. **A new flavonol glycoside from seeds of *Cassia grandis***. *Planta Medica* 41(4): 400-402, 1981.
- Stevens, J. F.; Wollenweber, E.; Ivancic, M.; Hsu, V. L.; Sundberg, S.; Deinzer, M. L. **Leaf surface flavonoids of *Chrysothamnus***. *Phytochemistry* 51(6): 771-780, 1999.
- Stochmal, A.; Simonet, A. M.; Macias, F. A.; & Oleszek, W. **Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5310-5314, 2001.
- Taglioli, V.; Bilia, A. R.; Ghiara, C.; Mazzi, G.; Mercati, V.; Vinciere, F. F. **Evaluation of the dissolution behaviour of some commercial herbal drugs and their preparations**. *Pharmazie*, 56(11): 868-870, 2001.
- Tatsisa, E. C.; Boerenb, S.; Exarchouc, V.; Troganisd, A. N.; Vervoortb, J.; Gerothanassis, I. P. **Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS**. *Phytochemistry* 68: 383-393, 2007.
- Tiwari, R. D.; Sinha, K. S. **Structural studies of a new flavone glycoside from the seeds of *Cassia nodosa***. *Journal of the Indian Chemical Society* 59(4): 526, 1982.
- Tiwari, R. D.; Singh, J. **Phytochemical investigation of *Cassia laevigata* pods. part I. isolation and structural studies of two new flavonol glycosides**. *Planta Medica* 34(3): 319-322, 1978.
- Tomás-Barberán, F. A.; Blázquez, M. A.; Garcia-Viguera, C.; Ferreres, F. and Tomás-Lorente, F. **A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis**. *Phytochemical Analysis* 3: 178–181, 1992.
- Tona, L.; Ngimbi, N.P.; Tsakala, M.; Mesia, K.; Cimanga, K.; Apers, S.; De Bruyne, T.; Pieters, L.; Totté, J.; Vlietinck, A.J. **Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine african medicinal plants used in Kinshasa, Congo**. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1-3): 193-203, 1999.
- Tsimogiannis, D.I.; Oreopoulou, V. **The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members**. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7: 140–146, 2006.
- Tsuchiya, H.; Sato, M.; Miyazaki, T.; Fujiwara, S.; Tanigaki, S.; Ohyama, M. **Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Journal of Ethnopharmacology*, 50(1): 27-34, 1996.
- Van Acker, S. A. B. E.; Van Den Berg, D.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van Der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. **Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids**. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3): 331-342, 1996.
- Van Gorkom, B. A. P. ; De Vries, E. G. E. **Anthranoid Laxatives And Their Potential Carcinogenic Effects**. *Aliment Pharmacology* 13: 443-452, 1999.

- van Os, F. H. L. **Anthraquinone Derivatives in Vegetable Laxatives**. *Pharmacology* 14 (1): 7-17, 1976.
- Viegas Jr.; C.; Bolzani, V. da S.; Furlan, M.; Barreiro, E. J.; Young, M. C. M.; Tomazela, D.; Eberlin, M. N. **Further Bioactive Piperidine Alkaloids from the Flowers and Green Fruits of *Cassia spectabilis***. *Journal of Natural Products* 67 (5), 2004.
- Viegas Jr.; C.; Rezende, A.; Silva, D. H. S.; Castro-Gambôa, I, Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; Miranda, A. L. P.; Moreira, M. S. A.; Young, M. C. M. **Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia***. *Química. Nova* 29 (6), 2006.
- Wang, G.; Tsai, T.; Lin, L. **Prenylflavonol, acylated flavonol glycosides and related compounds from *Epimedium sagittatum***. *Phytochemistry*, 68(19): 2455-2464, 2007.
- Waridel, P.; Wolfender, J.; Lachavanne, J.; Hostettmann, K. **Identification of the polar constituents of potamogeton species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSn and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane diglycoside**. *Phytochemistry*, 65(16): 2401-2410, 2004.
- Wen, D.; Liu, Y.; Li, W.; & Liu, H. **Separation methods for antibacterial and antirheumatism agents in plant medicines**. *Journal of Chromatography B* 812(1-2): 101-117, 2004.
- Williams, B. L.; & Wender, S. H. **The isolation and identification of quercetin and isoquercitrin from grapes (*Vitis vinifera*)**. *Journal of the American Chemical Society*, 74(17): 4372-4373, 1952.
- Wollenweber, E.; Dörr, M.; Beyer, M.; Roitman, J. N.; Puttock, C. F. **Rare flavonoids from *Odixia* and *Ozothamnus spp.* (Asteraceae, Gnaphalieae)**. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C - Journal of Biosciences*, 52(9-10): 571-576, 1997.
- Wu, Q. P.; Wang, Z. J.; Fu, M. H.; Tang, L. Y.; He, Y.; Fang, J.; Gong, Q. F. **Chemical constituents from the leaves of *Cassia angustifolia***. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 30(10): 1250-1252, 2007.
- Wu, Q. P.; Wang, Z. J.; Tang, L. Y.; Fu, M. H.; He, Y. **A new flavonoid glucoside from *Cassia angustifolia***. *Chinese Chemical Letters* 20(3): 320-321, 2009.
- Yadav, J. P.; Arya, V.; Yadav, S.; Panghal, M.; Kumar, S.; Dhankhar, S. ***Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile**. *Fitoterapia*, 81(4): 223-230, 2010.
- Yadava, R. N.; Verma, V. **A new biologically active flavone glycoside from the seeds of *Cassia fistula* (linn.)**. *Journal of Asian Natural Products Research*, 5(1): 57-61, 2003.
- Yadava, R. N.; Jain, P. **A new flavone glycoside from the seeds of *Cassia sophera* linn.** *Journal of the Indian Chemical Society* 83(11): 1175-1178, 2006.
- Yadava, R. N.; Jain, P. **New biologically active flavonol glycoside from *Cassia sophera* linn.** *Journal of the Indian Chemical Society*, 84(7): 683-687, 2007.

Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomás-Barberán, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S.S. **Flavonoids in food and their health benefits**. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3): 113-122, 2004.

Ye, M.; Lib, Y.; Yanc, Y.; Liub, H.; Jic, X. **Determination of flavonoids in Semen Cuscutae by RP-HPLC**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (15): 621-628, 2002.

Yen, G. C.; Duh, P.; Chuang, D. **Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone**. *Food Chemistry* 70: 437-441, 2000.

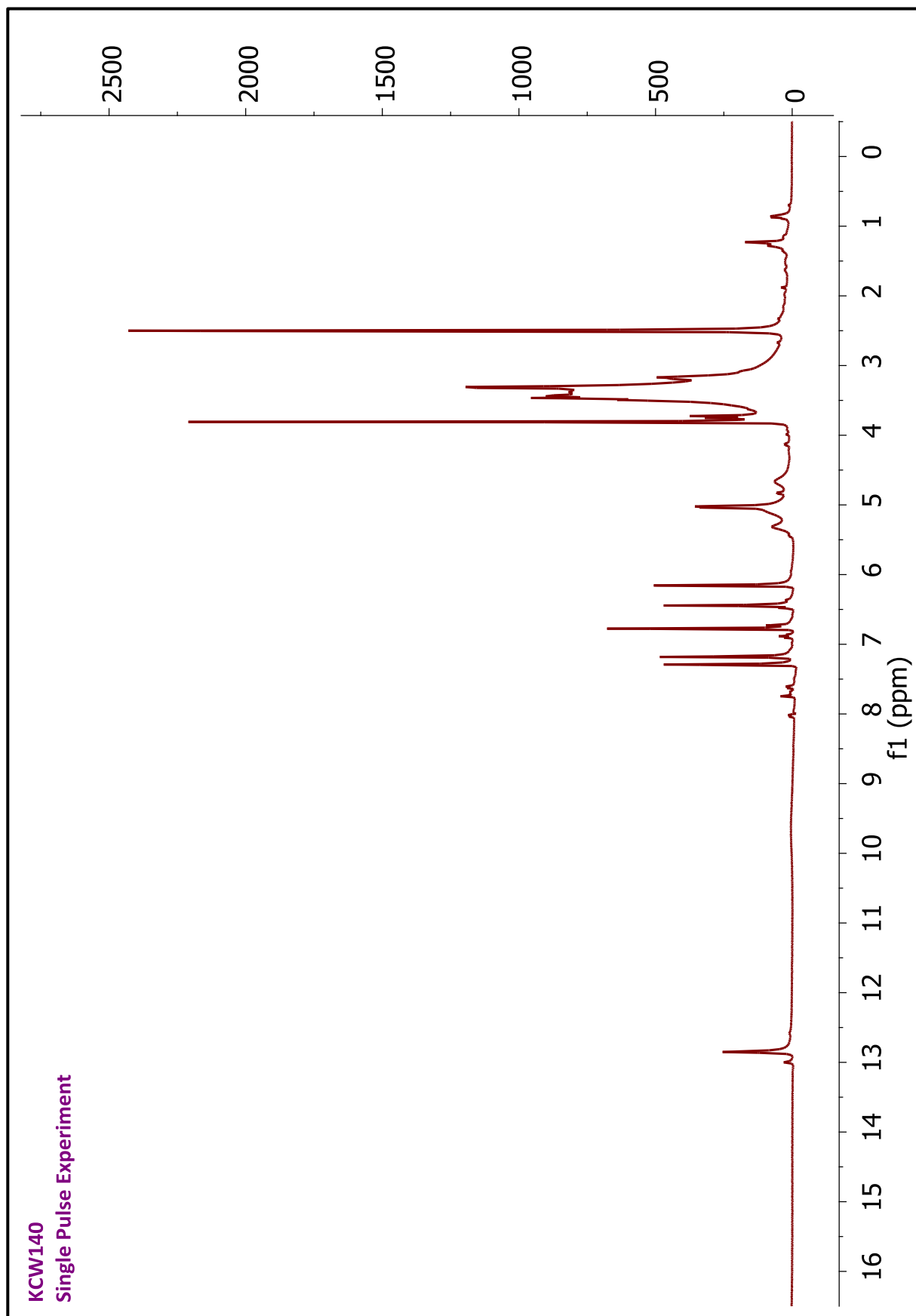
Yuping, T.; Weiping, Z.; Fengchang, L.; Yanfang, L.; Jinghua, W. **Flavone Glycosides from the Leaves of *Ginkgo biloba***. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 9 (3): 119-121, 2009.

Zeraik, M. L.; Yariwake, J. H. **Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD**. *Microchemical Journal* 96: 86-91, 2010

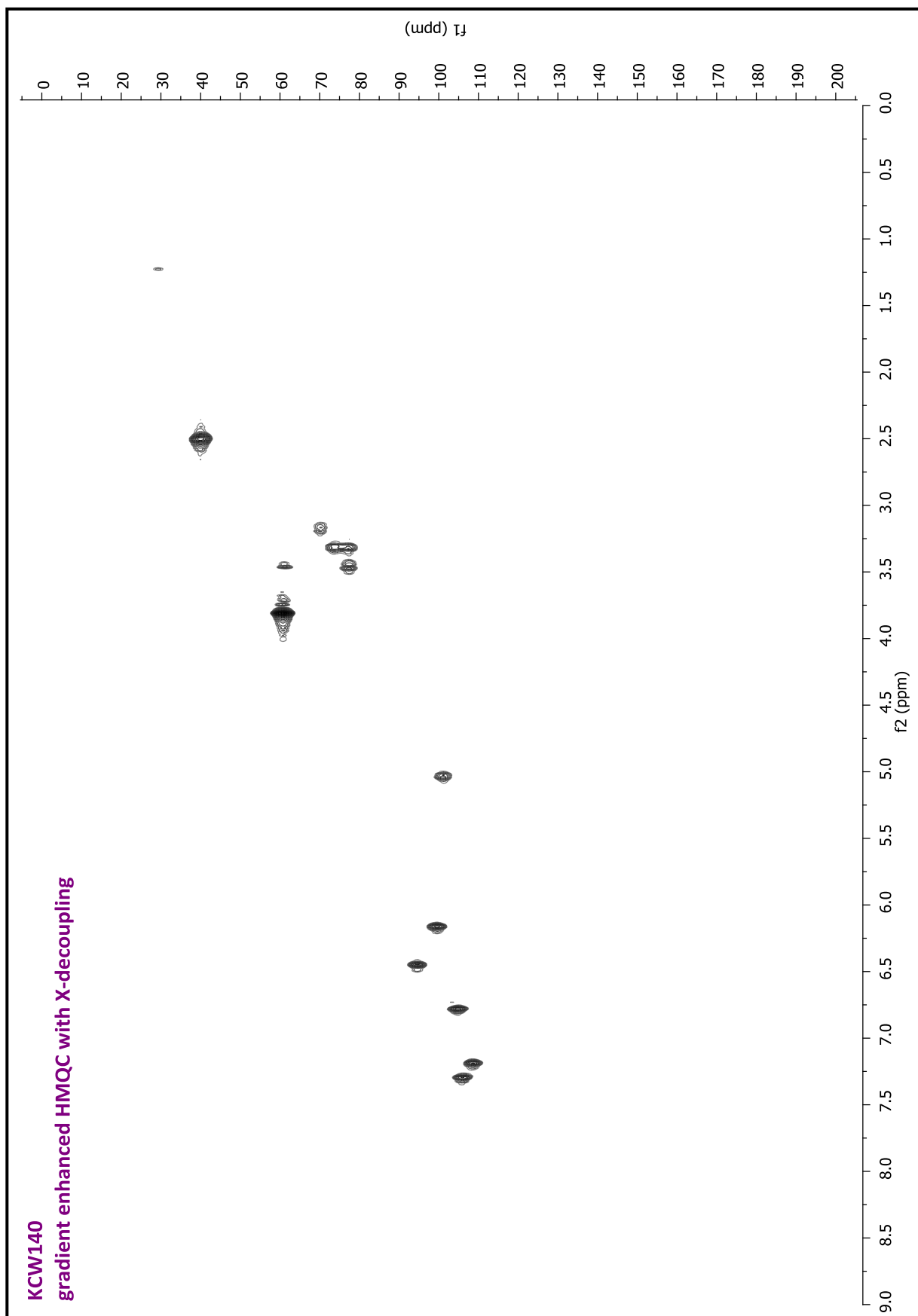
Zhou, J.; Ibrahim, R. K. **Tricin - a potential multifunctional nutraceutical**. *Phytochemistry Reviews*, 1-12, 2009.

VII – Anexos

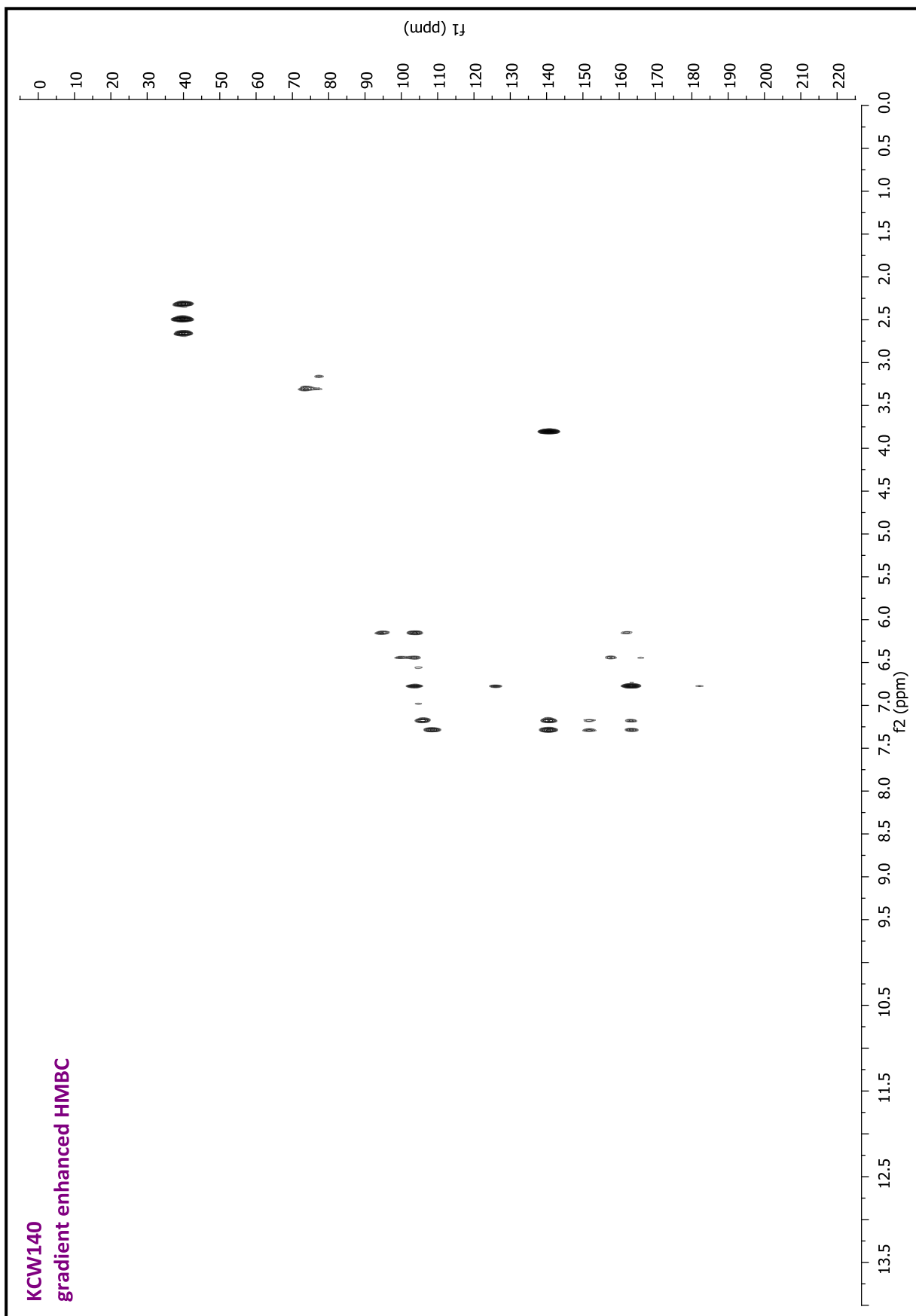
1 – RMN ^1H KCW140



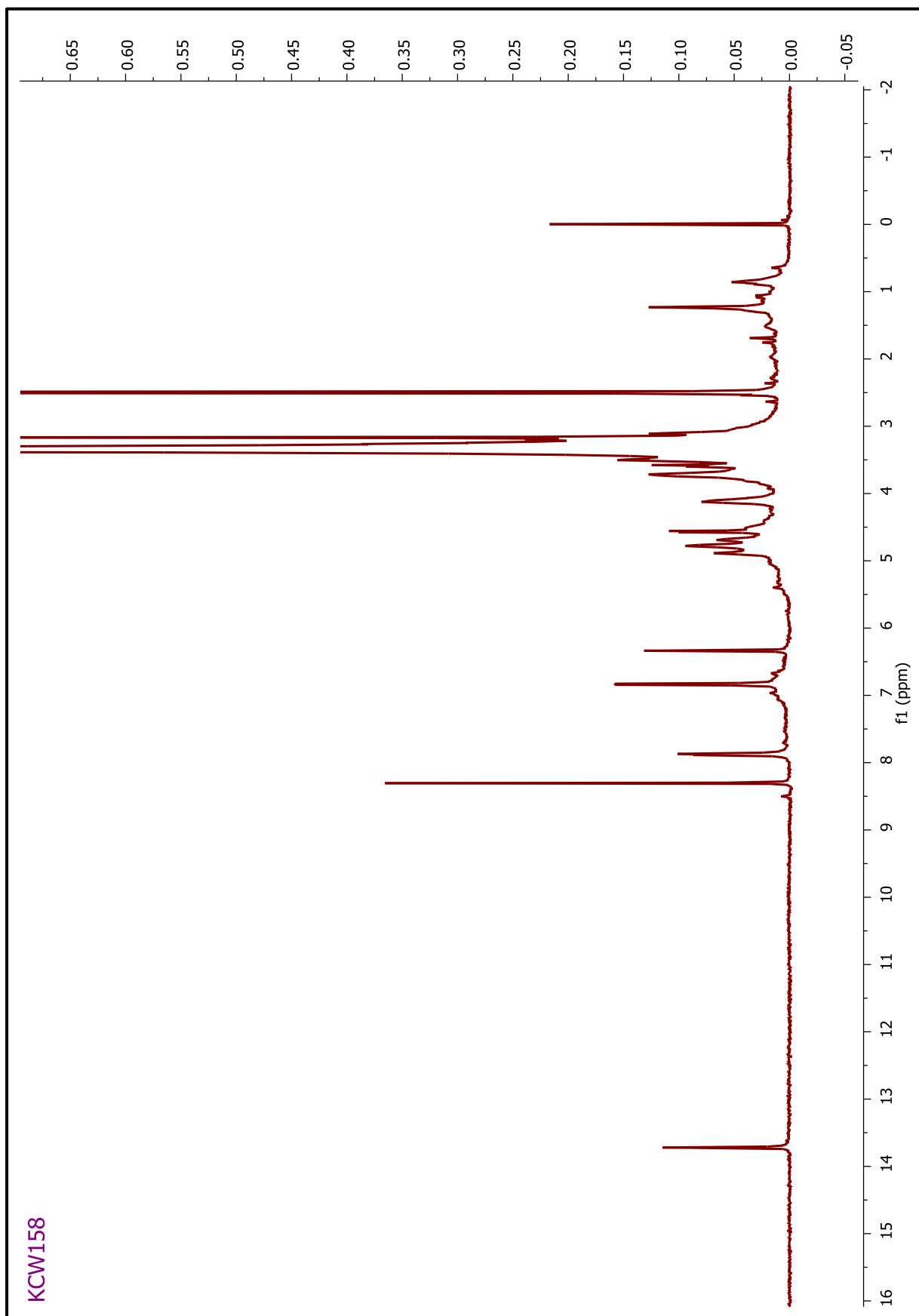
2 – HMQC KCW140



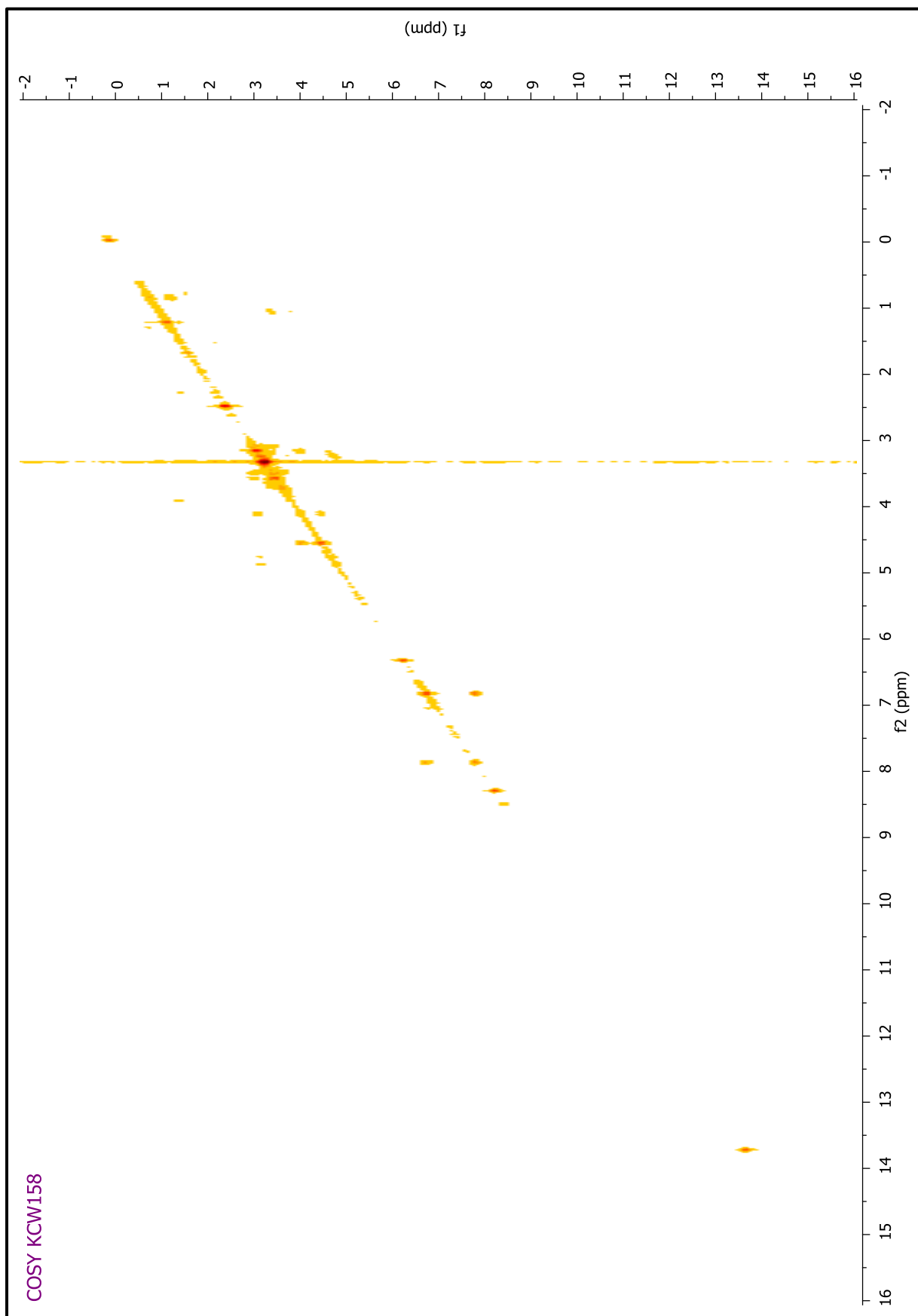
3 – HMBC KCW140



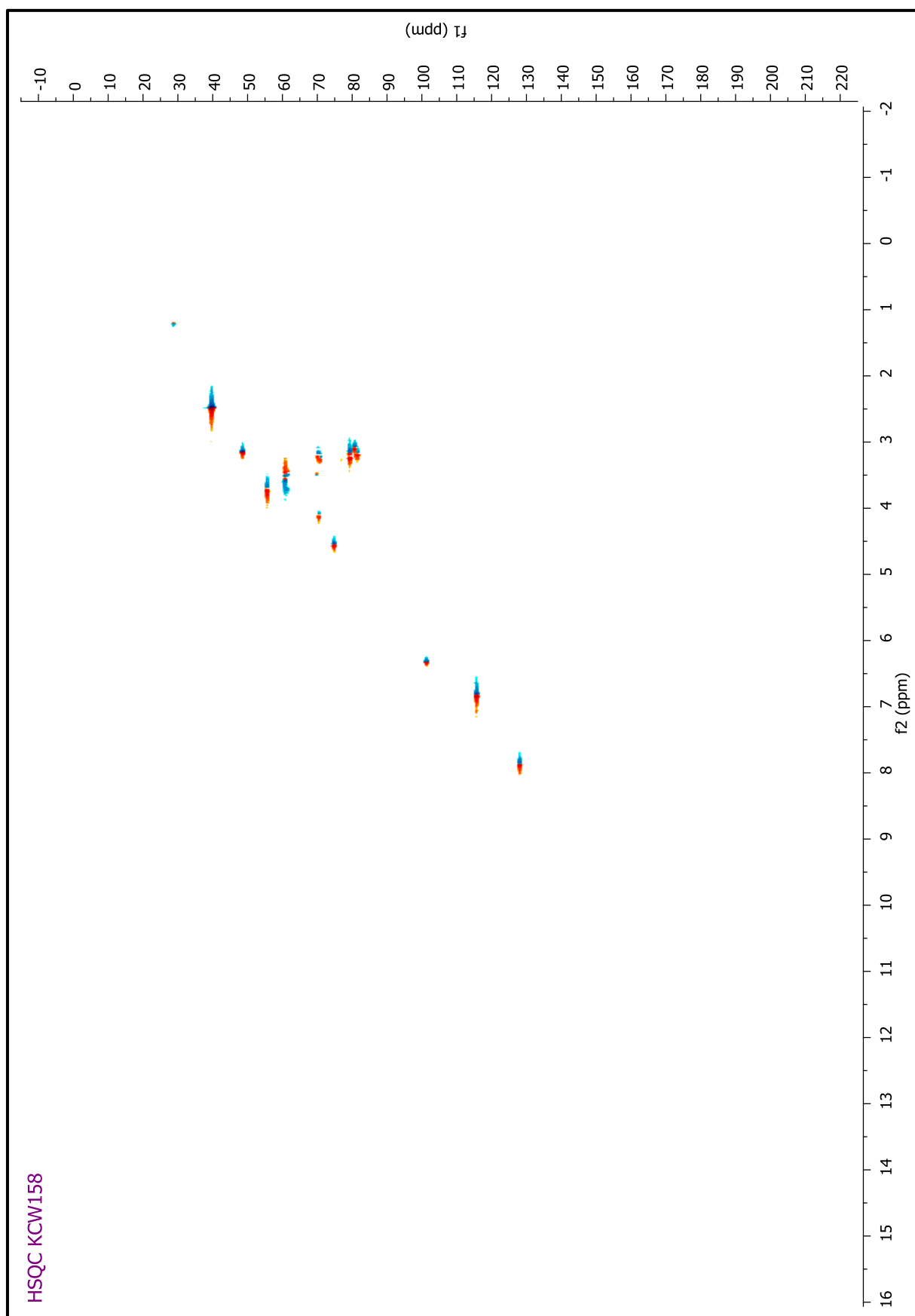
4 - RMN ¹H KCW158



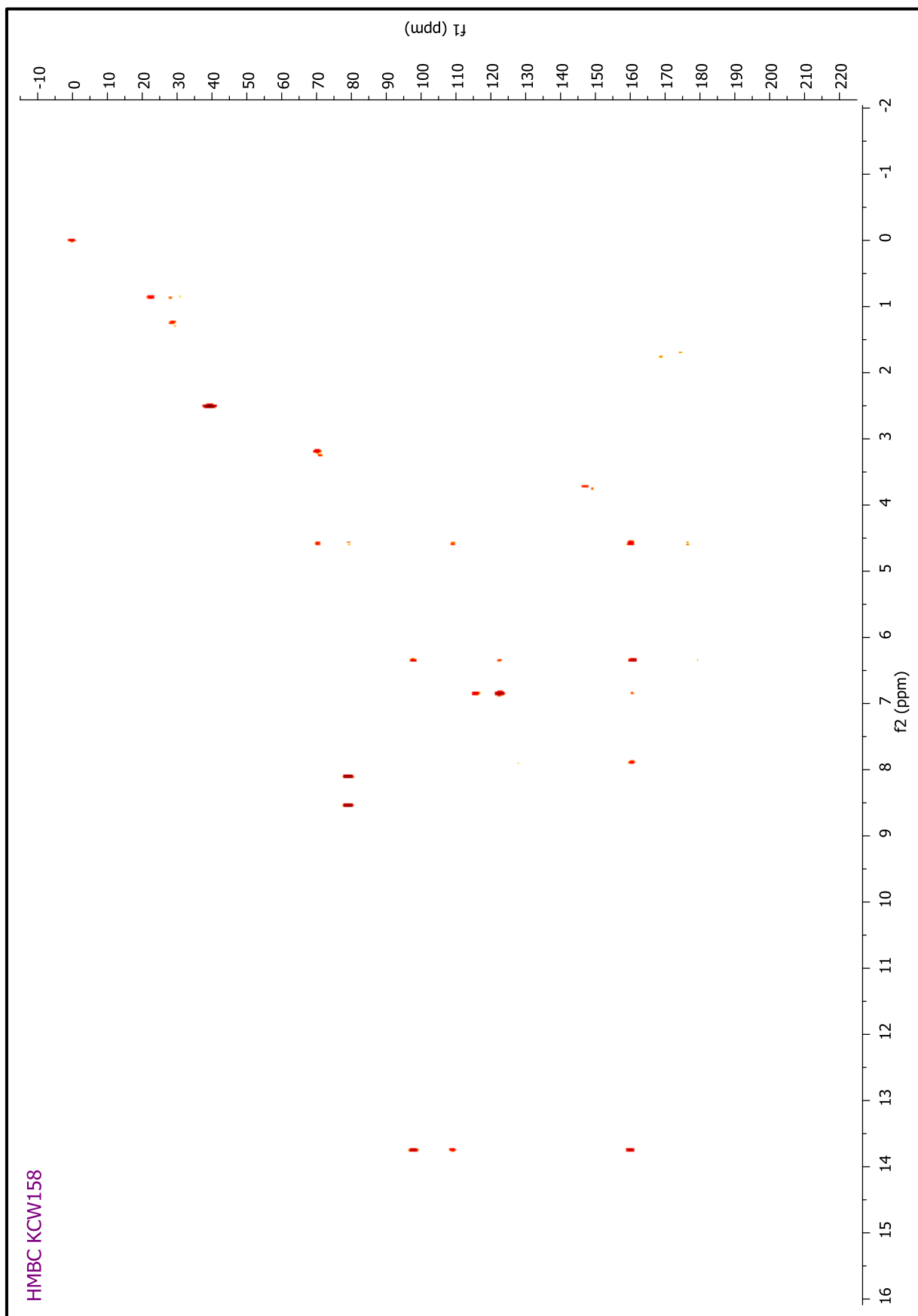
5 - COSY ^1H - ^1H KCW158



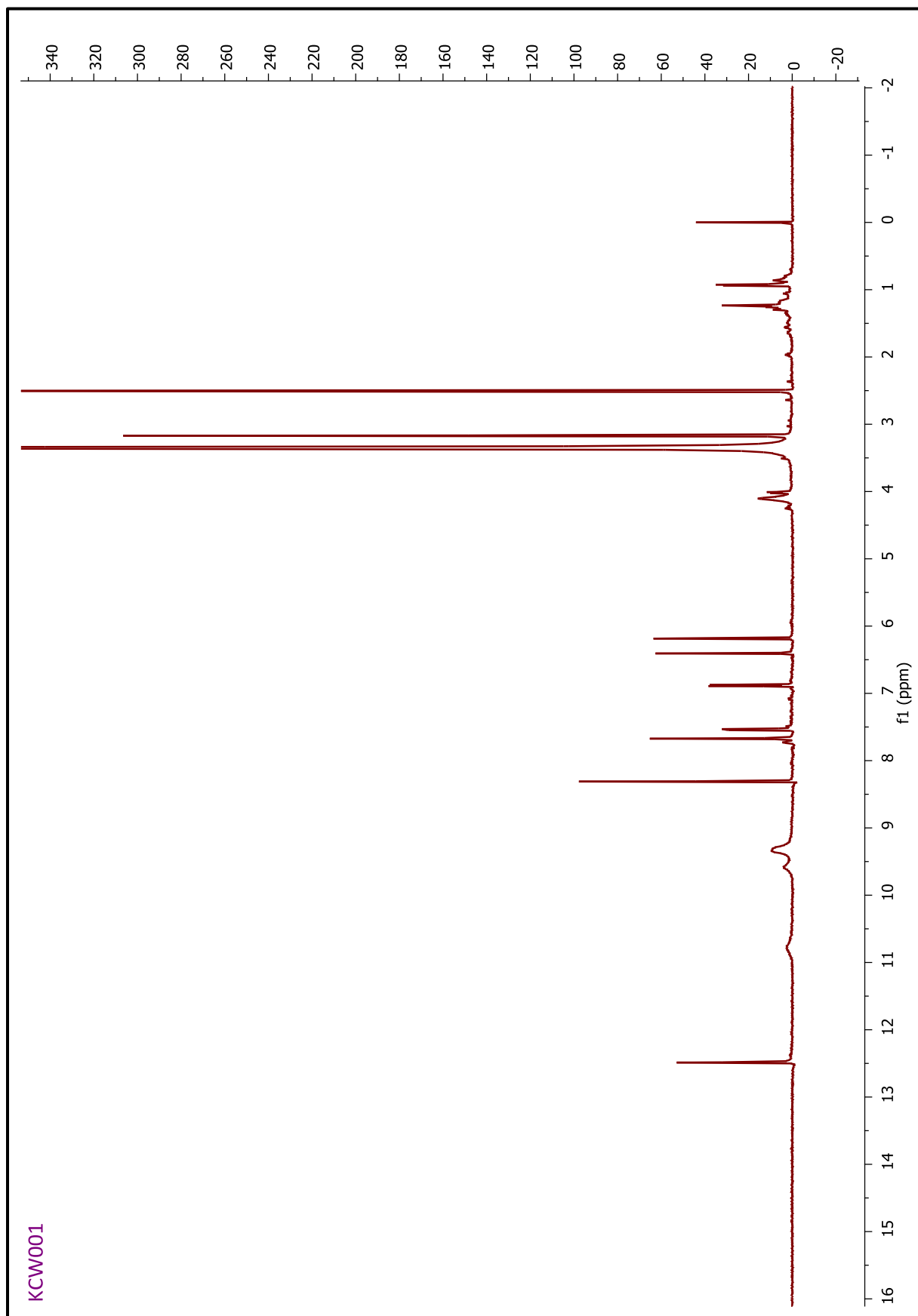
6 – HSQC KCW158



6 – HMBC KCW158



7 - RMN ¹H KCW001



KCW001

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)