



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FLAVONÓIDES ANTIOXIDANTES E DERIVADOS DE
ÁCIDO GÁLICO ISOLADOS DE *Cenostigma gardnerianum*
TUL. (LEGUMINOSAE)

CLAYTON QUEIROZ ALVES

Salvador
2007

CLAYTON QUEIROZ ALVES

**FLAVONÓIDES ANTIOXIDANTES E DERIVADOS DE
ÁCIDO GÁLICO ISOLADOS DE *Cenostigma gardnerianum*
TUL. (LEGUMINOSAE)**

Dissertação submetida ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Química da
UFBA para obtenção do título de Mestre em
Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David

**Salvador
2007**

Dedico este trabalho a minha família,
especialmente aos meus pais, Arlindo
Moura e Maria das Graças Queiroz.

“Os que confiam no Senhor são como os montes de Sião, que não se abalam mas permanecem firmes para sempre”.
(Salmos 25:01)

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho pude contar com a ajuda, atenção e carinho de pessoas que se tornaram fundamentais em minha vida. Meu muito obrigado a:

Deus, pela vida, força e coragem renovada a cada dia.

A minha família, pelo exemplo, incentivo e constante apoio, que foram fundamentais para o meu crescimento.

Aos orientadores, Prof. Dr. Jorge Maurício David e Profa. Dr. Juceni Pereira de Lima David, pela amizade, atenção e por acreditarem em minha capacidade.

Aos meus “companheiros de barco”: Amenson, Iura, João, Leandro, Lorenço, Magnólia, Murilo, e Paulo Daniel, pela amizade e apoio nas horas incertas.

A Jailton e Luis, pelas boas risadas nos finais de semana e pela ajuda nos trabalhos instrumentais.

Aos amigos e colegas de laboratório, Larissa, Lidiane, Luciano, Manuela, Marcus Vinícios, Marcão, Renato e Fábio Dias, pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge López, pela amizade e ajuda na realização dos testes utilizados neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Síntese, especialmente para Lívia, Fabiano e Airam.

Aos colegas do LPPN na Faculdade de Farmácia/UFBA, especialmente a Hugo e Marilena.

Aos meus professores de pós-graduação do IQ/UFBA, pela paciência e atenção na busca pelo conhecimento, especialmente a Silvio Cunha, e aos professores do Departamento de Química e Exatas da UESB, pela amizade e incentivo, especialmente a Luiz Augusto, Regina Yamaki e Vanderlúcia Fonseca.

A Lindomar Portugal e Edevaldo Silva, pela amizade e convivência enriquecedora.

Aos meus amigos e colegas, especialmente a Ana Paula, Aline Lomanto, Adrianinha, Elenir, Jomara, Marcelo, Núbia, Luciano, e Juracir, pelos eternos laços de amizade que nos unem.

Aos pastores Everângila e Manoel Medrado, pelo carinho e constantes orações que me ajudaram a permanecer firme nos meus propósitos.

Aos meus mais recentes e eternos amigos, Ana Souza, Darlene, Etilvânia Manzi, Florisvaldo Abreu, Ione Laís, Jamile Lutiane, Mathias, Patrícia Miranda, Rosa Maria e Teixeira, pela amizade e apoio nas horas mais difíceis, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xii
Lista de Quadros	xiii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. Introdução	1
1.1 Levantamento Botânico: A família Leguminosae	2
1.2 O gênero <i>Cenostigma</i>	3
1.3 Considerações gerais sobre Flavonóides	7
1.4 Potencial Antioxidante dos Flavonóides	9
1.4.1 Os radicais livres	9
1.4.2 Flavonóides como antioxidantes	10
1.4.3 Relação estrutura versus atividade dos flavonóides	12
2. Objetivos	15
2.1 Gerais	15
2.2 Específicos	15
3. Experimental	16
3.1 Coleta e identificação da espécie	16
3.2 Materiais e métodos	16
3.3 Preparo dos extratos	17
3.4 Separação e purificação dos constituintes químicos de <i>C. gardnerianum</i>	19
3.4.1 Fracionamento do extrato AcOEt da folhas	19
3.4.1.1 Purificação da fração AFCG 4	20
3.4.1.2 Purificação da fração AFCG 7	21
3.4.1.1 Purificação da fração AFCG 8	22
3.4.2 Fracionamento do extrato Clorofórmico da folhas	26

3.4.2.1 Purificação da fração MCG 3	26
3.5 Testes de atividade antioxidante.....	28
3.5.1 Inibição da co-oxidação do β -caroteno.....	28
3.5.2 Seqüestro do radical livre DPPH•.....	29
4. Resultados e Discussão.....	30
4.1 Substâncias isoladas dos extratos polares de <i>C. gardnerianum</i>	30
4.2 Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas	32
4.3 Identificação e Determinação estrutural.....	34
4.3.1 Elucidação do ácido gálico e seus derivados.....	34
4.3.2 Identificação de CG 4 e CG 2	34
4.3.3 Determinação estrutural de CG 1	37
4.3.4 Identificação de CG 8	44
4.4 Identificação de flavonóis.....	47
4.4.1 Identificação de CG 3	47
4.4.2 Determinação estrutural de CG 6	50
4.4.3 Identificação de CG 7	56
4.4.4 Identificação de CG 10	61
4.5 Identificação de flavonas	68
4.5.1 Identificação de CG 5	68
4.5.2 Identificação de CG 9	74
4.6 Identificação de cumarinas	80
4.6.1 Identificação da Escoparona (CG 11)	80
4.7 Testes de atividade antioxidante.....	83
4.7.1 Avaliação da atividade antioxidante.....	83
5. Considerações Finais	84
6. Referências	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da espécie <i>Cenostigma gardnerianum</i> Tul.....	4
Figura 2 – Desenho com descrição detalhada das partes de <i>C. gardnerianum</i> Tul.....	5
Figura 3 – Fotos de um espécime de <i>C. gardnerianum</i>	6
Figura 4 – Esqueleto básico de um flavonóide.....	7
Figura 5 – Exemplo da propriedade quelante dos flavonóides.....	13
Figura 6 – Exemplo de deslocalização do elétron desemparelhado na quercetina.....	13
Figura 7 – Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos das folhas de <i>C. gardnerianum</i>	18
Figura 8 – Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos das cascas do caule de <i>C. gardnerianum</i>	18
Figura 9 – Fluxograma do procedimento experimental empregado para a amostra AFCG 7	21
Figura 10 – Estrutura do β -caroteno.....	28
Figura 11 – Estrutura do ácido linoléico	28
Figura 12 – Estrutura do radical livre DPPH•	29
Figura 13 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 4 [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	35
Figura 14 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 4 [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	35
Figura 15 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 2 [CDCl_3 , δ (ppm)]	36
Figura 16 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 2 [CDCl_3 , δ (ppm)]	36
Figura 17 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 1 [DMSO, δ (ppm)]	38
Figura 18 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 1 [DMSO, δ (ppm)]	38
Figura 19 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 1 [DMSO, δ (ppm)]	39
Figura 20 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 1 [CD_3OD , δ (ppm)].....	39
Figura 21 – Espectro RMN DEPT 135° da substância CG 1 [CD_3OD , δ (ppm)].....	40
Figura 22 – Experimento HMQC de CG 1 [CD_3OD , δ (ppm)]	41
Figura 23 – Experimento HMBC de CG 1 [CD_3OD , δ (ppm)]	41
Figura 24 – Experimento HMBC de CG 1 [CD_3OD , δ (ppm)]	41
Figura 25 – Correlações observadas no espectro HMBC de CG 1	42
Figura 26 – Espectro de IV da substância CG 1	42

Figura 27 – Espectro de Massas da substância CG 1 [APCI].....	42
Figura 28 – Formação de CG 1 através da reação de glicosilação	43
Figura 29 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 8 [DMSO, δ (ppm)]	44
Figura 30 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 8 [DMSO, δ (ppm)].....	45
Figura 31 – Espectro de Massas da substância CG 8 [APCI].....	45
Figura 32 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 3 [CD_3OD , δ (ppm)].....	48
Figura 33 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 3 [CD_3OD , δ (ppm)]	48
Figura 34 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 3 [CD_3OD , δ (ppm)].....	49
Figura 35 – Espectro DEPT 135° da substância CG 3 [CD_3OD , δ (ppm)].....	49
Figura 36 – Espectro de Massas da substância CG 3 [APCI].....	49
Figura 37 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)].....	51
Figura 38 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]	51
Figura 39 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]	52
Figura 40 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)].....	52
Figura 41 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]	53
Figura 42 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]	53
Figura 43 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]	54
Figura 44 – Experimento HMQC de CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]	54
Figura 45 – Experimento HMBC de CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]	54
Figura 46 – Correlação observada no espectro HMBC de CG 6	55
Figura 47 – Espectro de Massas da substância CG 6 [APCI].....	55
Figura 48 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	57
Figura 49 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)]	57
Figura 50 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)]	58

Figura 51 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	58
Figura 52 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	59
Figura 53 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	59
Figura 54 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	59
Figura 55 – Espectro DEPT 135° da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	60
Figura 56 – Espectro de Massas da substância CG 7 [APCI].....	60
Figura 57 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	62
Figura 58 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	62
Figura 59 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	63
Figura 60 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	63
Figura 61 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	64
Figura 62 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	64
Figura 63 – Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	64
Figura 64 – Espectro de DEPT da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	65
Figura 65 – Espectro de Massas da substância CG 10 [APCI].....	65
Figura 66 – Espectro RMN de ^1H da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	69
Figura 67 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	69
Figura 68 – Ampliação do espectro RMN ^1H da substância CG 10 [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	70
Figura 69 – Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	70
Figura 70 – Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)].....	71

Figura 71 – Ampliação do espectro RMN ¹³ C da substância CG 10 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	71
Figura 72 – Ampliação do espectro RMN de ¹³ C da substância CG 10 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	72
Figura 73 – Espectro DEPT da substância CG 10 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	72
Figura 74 – Espectro HMQC da substância CG 10 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	72
Figura 75 – Espectro HMBC da substância CG 10 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	73
Figura 76 – Espectro de Massas da substância CG 10 [APCI]	73
Figura 77 – Correlações observadas no espectro HMBC da substância CG 10	73
Figura 78 – Espectro RMN de ¹ H da substância CG 9 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	75
Figura 79 – Espectro RMN de ¹ H da substância CG 9 (Integração) [CD ₃ OD, δ (ppm)]	75
Figura 80 – Ampliação do espectro RMN de ¹ H da substância CG 9 [CD ₃ OD, δ ppm]	76
Figura 81 – Ampliação do espectro RMN de ¹ H da substância CG 9 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	76
Figura 82 – Espectro RMN de ¹³ C da substância CG 9 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	77
Figura 83 – Ampliação do espectro RMN de ¹³ C da substância CG 9 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	77
Figura 84 – Ampliação do espectro RMN de ¹³ C da substância CG 9 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	77
Figura 85 – Espectro DEPT 135° da substância CG 9 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	78
Figura 86 – Espectro de Massas da substância CG 9 [APCI]	78
Figura 87 – Estrutura de ressonância da Escoparona	80
Figura 88 – Espectro RMN de ¹ H da substância CG 11 [CDCl ₃ , δ (ppm)]	81
Figura 89 – Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância CG 11 [CDCl ₃ , δ (ppm)]	81
Figura 90 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da substância CG 11 [CDCl ₃ , δ (ppm)]	82
Figura 91 – Espectro de Massas da substância CG 11 [APCI]	82
Figura 92 – Gráfico do teste da inibição da oxidação do β-caroteno pelas substâncias isoladas de <i>C. gardnerianum</i> .	84

Figura 93 – Gráfico do teste do seqüestro de radicais livres (DPPH•) pelas substâncias isoladas de *C. gardnerianum* 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massas dos extratos orgânicos obtidos de <i>C. gardnerianum</i>	17
Tabela 2 – Frações obtidas da CC principal do extrato acetato de etila das folhas.....	19
Tabela 3 – Frações obtidas da CC de AFCG 4.....	20
Tabela 4 – Frações obtidas da CC de AFCG 4-C.....	20
Tabela 5 – Massa das subfrações obtidas e resultado do teste com FeCl ₃	22
Tabela 6 – Frações obtidas da CC de AFCG 8.....	22
Tabela 7 – Frações obtidas da CC de AFCG 8-C.....	23
Tabela 8 – Frações obtidas da CC de AFCG 8C3	23
Tabela 9 – Frações obtidas da CC de AFCG 8-D.....	24
Tabela 10 – Frações obtidas da CCDP de AFCG 8-D3.....	24
Tabela 11 – Frações obtidas da CC de AFCG 8-E	25
Tabela 12 – Frações obtidas da CC de AFCG 8-E1D	25
Tabela 13 – Frações obtidas da CC de MFCG	26
Tabela 14 – Frações obtidas da CC de MFCG 3	26
Tabela 15 – Frações obtidas da CC de MFCG 3-B2	27
Tabela 16 – Frações obtidas da CC de MFCG 3-B2D	27
Tabela 17 – Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C do Ácido gálico e seus derivados obtidos dos extratos de <i>C. gardnerianum</i> [δ (ppm), J (HZ)]	46
Tabela 18 – Dados de RMN de ¹ H da Quercetina (CG 3) e seus derivados obtidos dos extratos de <i>C. gardnerianum</i> [CD ₃ OD, δ (ppm), J (HZ)].....	66
Tabela 19 – Dados de RMN de ¹³ C da Quercetina (CG 3) e seus derivados obtidos dos extratos de <i>C. gardnerianum</i> [CD ₃ OD, δ (ppm), J (HZ)].....	67
Tabela 20 – Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C das flavonas CG-5 e CG-10 de <i>C. gardnerianum</i> [DMSO*, CD ₃ OD**, δ (ppm), J (HZ)]	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classes de flavonóides e algumas características conhecidas.....	8
Quadro 2 - Flavonóides antioxidantes de ocorrência geral	11
Quadro 3 - Atividade anitoxidante de alguns flavonóides representativos	14
Quadro 4 - Substâncias isoladas dos extratos de <i>Cenostigma gardnerianum</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
AcOEt	Acetato de etila
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
δ	deslocamento químico
DEPT	Distortionless enhancement polarization transference
EM	Espectrometria de massas
Glc	Glicose
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multi bond correlation
J	constante de acoplamento
λ	comprimento de onda
LPPN	Laboratório de pesquisa de produtos naturais
<i>m</i>	múltiplo
MeOH	metanol
MHz	megahertz
<i>m/z</i>	relação massa/carga
Rha	Raminose
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
<i>s</i>	singleto
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UDP-glicose	Uridina difosfato glicose

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico dos extratos polares de *Cenostigma gardnerianum* Tul., além da realização de ensaios de avaliação antioxidante das substâncias isoladas. O gênero *Cenostigma* pertence à família Leguminosae e compreende quatro espécies, sendo três delas endêmicas do Brasil. Das espécies conhecidas, apenas uma apresenta estudo químico preliminar. *C. gardnerianum* é conhecida popularmente como “canela-de-velho” ou “catingueira”, e pode ser encontrada no cerrado e caatinga baianos. Esta espécie é utilizada como forrageira podendo, portanto, ser empregada na alimentação de animais, constituindo assim uma importante fonte de recursos para o homem do sertão, principalmente em época de secas. Utilizando-se métodos cromatográficos usuais (CC, CCDC em sílica, poliamida e permeação em gel de Sephadex), do extrato AcOEt das folhas de *C. gardnerianum* foram isoladas o Ácido gálico, Galato de metila e o Ácido elágico. Foram isolados, ainda deste extrato, os flavonóides: Quercetina; Quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo; Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -D-glicopiranosídeo; Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-*E-p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo; Agathisflavona e Vitexina. Do extrato clorofórmico das folhas foi isolada a Escoparona. Do extrato AcOEt das cascas do caule foi isolado um novo derivado do ácido gálico, caracterizado como Galato de metila-2-*C*- β -D-glicopiranosídeo, uma substância rara nesta classe de compostos. As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas através da análise dos dados obtidos pelos dados de EM, de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT, além de técnicas bidimensionais (HMBC e HMQC). Os testes de atividade antioxidante, *in vitro*, utilizando as metodologias da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e do seqüestro do radical estável DPPH, demonstraram que as substâncias Quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -D-glicopiranosídeo apresentaram excelente atividade, enquanto que a Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-*E-p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo apresentou atividade moderada, e as substâncias Agathisflavona e Galato de metila-2-*C*- β -D-glicopiranosídeo apresentaram baixa ou nenhuma atividade, respectivamente.

Palavras-chave: *Cenostigma gardnerianum*, Leguminosae, derivados do ácido gálico, flavonóides, atividade antioxidante.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical study of the polar extracts of *Cenostigma gardnerianum* Tull. and, the antioxidant activities of the isolates were in the search of new bioactive compounds. The genus *Cenostigma* belongs to Leguminosae family, and it comprises only four species, being three of them endemic of the Brazil. From the known species, only one possessed preliminary chemical study. *C. gardnerianum* is popularly known as "canela-de-velho" or "catingueira", and it can be found in the Bahia's "cerrado" and "caatinga" regions. This species is popularly used as fodder plant so, it could be considered as an important source of resources to Brazilian's semi-arid region. The extracts were purified by common chromatograph techniques (CC, PTLC on silicagel, poliamide and Sephadex) and from of the EtOAc extract of the leaves of *C. gardnerianum* were isolated Gallic acid, Methyl gallate and Ellagic acid. From this extract was also obtained the flavonóides: Quercetin, Quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, Quercetin-3-*O*-(6''-*O*-galloil)- β -D-glucopyranoside, Quercetin-3-*O*-(6''-*E-p*-coumaroil)- β -D-glucopyranoside, Agatisflavone and Vitexin. From the CHCl₃ extract of the leaves was isolated a coumarin known as Scoparin. From the AcOEt extract of barks was isolated a new derivative of the Gallic acid, named as Methyl gallic-2-C- β -D- glucopyranoside, a uncommon compound. All the compounds characterized through data analysis of MS, of ¹H and ¹³C NMR, including DEPT, as well as bidimensional techniques (HMBC and HMQC). The tests of antioxidant activity had demonstrated that the Quercetin-3-*O*-(6''-*O*-galloil)- β -D-glucopyranoside and Quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside presented excellent antioxidant activities, whereas Quercetin-3-*O*-(6''-*O*-galloil)- β -D-glucopyranoside presented moderate activity, and Agatisflavon and Methyl gallic-2-C- β -D- glucopyranoside had presented low or no activity, respectively.

Keywords: *Cenostigma gardnerianum*, Leguminosae, gallic acid derivatives, flavonoids, antioxidant activity.

1.0 Introdução

Desde as mais antigas civilizações o homem tem utilizado plantas para fins medicinais e alimentares. Todos os povos, em todos os continentes utilizam plantas com propriedades terapêuticas. É admirável que este conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios, aprofundando-se e diversificando-se sem nunca, porém, cair totalmente no esquecimento (SILVA & CARVALHO, 2004).

Na maior parte do século passado a síntese era a principal fonte de fármacos industriais, consolidando-se assim o paradigma ocidental da terapêutica: o fármaco é uma molécula pura, geralmente oriunda de síntese, tendo como modelo a aspirina (AAS). Porém, cabe destacar que mesmo a aspirina, bem como vários outros fármacos, foi desenvolvida a partir de um protótipo estrutural obtido de produtos naturais, que no caso foi a salicilina. No entanto, grande parte dos estudos para busca de substâncias bioativas passou a ser realizada ao acaso, procurando-se encontrar substâncias com diferentes atividades através do *screening* maciço.

O processo de descobrimento de fármacos através da síntese orgânica ao acaso mostrou uma série de problemas que deveriam ser solucionados rapidamente. Spinks (1973) indicou que para se obter, por exemplo, um novo anticonvulsivante por esse método, seria necessário testar aproximadamente 400 mil compostos, e para se obter um novo antiviral seria necessário preparar 400 milhões de compostos. Em resposta a estes problemas, surgiram técnicas como a Química Combinatória e Computacional, visando ampliar a fonte de produção de fármacos. Contudo, a química combinatória não conseguiu, até o presente momento, consolidar-se como fonte primária e única de diversidade de estruturas moleculares.

Como diversidade estrutural é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos, os pesquisadores voltaram aos estudos dos produtos naturais, considerando que durante os milhões de anos da evolução a seleção natural realizou um processo de química biológica realmente inigualável. Assim, embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas, e aproximadamente 20 mil compostos obtidos de microrganismos, tenham sido isolados e caracterizados, as fontes de metabólitos secundários são extensas e variadas, o que aumentam as possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância para a química medicinal e para a agricultura (YUNES & FILHO, 2001).

O panorama para a fitoquímica no desenvolvimento de novos fármacos é muito importante para o Brasil ao considerarmos a grande biodiversidade brasileira, pois, apesar do

grande número estimado de espécies vegetais existentes, apenas uma pequena parcela tem sido pesquisada cientificamente quanto ao seu potencial farmacológico.

Torna-se, portanto, necessária a implantação de um programa comprometido, contínuo e eficiente, como o requerido para qualquer conquista de valor na área científico-tecnológica.

1.1 Levantamento Botânico: A família Leguminosae

A família Leguminosae pertence à divisão das Angiospermas, classe Dicotiledônea e da ordem das Rosales. Esta família possui em torno de 670 gêneros e 17500 espécies, espalhadas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (LEWIS, 1987).

Dentre as dicotiledôneas, a família Leguminosae (Fabaceae) é a terceira maior, sendo superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae, e é a maior família dentro da ordem Rosales. São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e também muitas trepadeiras. Desenvolvem-se nos mais variados ambientes, em diferentes latitudes e altitudes.

O fruto é muito variado, em geral legume, seco, deiscente por duas valvas ou do tipo lomento, segmentando-se (*Desmodium*, *Mimosa*) ou seco e indeiscente (*Arachis* e certas espécies de *Cassia*), ou de pericarpo mais ou menos carnoso (*Andira*). Estas plantas vivem simbioticamente com certas bactérias, encontradas nos nódulos das raízes, que são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (*Rhizobium*) (JOLY, 1977).

Há nesta família pelo menos três subfamílias importantes, *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Faboideae* (*Papilionoideae*). A *Mimosoideae* apresenta flores tubulares pequenas e regulares, agrupadas em inflorescências globosas ou em forma de bastão, e os estames são a parte mais atrativa da flor. A *Papilionoideae* tem flores zigomórficas com as do feijão, com pétalas muito atrativas. A *Caesalpinioideae* apresenta as flores mais abertas dentre as Leguminosae, com cinco pétalas.

As leguminosae têm várias vantagens ecológicas que lhes permitem competir com sucesso e colonizar quase todos os ambientes do planeta. Sendo predominantemente uma família de plantas lenhosas, elas parecem conter maiores teores de nitrogênio nas folhas do que a maioria das famílias de plantas lenhosas. Este fato permite realizar taxas maiores de fotossíntese (desde que outros recursos estejam disponíveis) e, conseqüentemente, um maior crescimento, especialmente quando sob intensidades mais elevadas de luz.

As plantas desta família produzem também sementes ricas em nitrogênio, permitindo que as plântulas produzam folhas ricas em nitrogênio nessa fase juvenil e, portanto, cresçam rapidamente. Esses tecidos ricos em nitrogênio são fontes de proteínas para homens e animais. Por isso, em diversas regiões do mundo, várias espécies desta família constituem culturas valiosas para o agronegócio.

Quanto à subfamília Caesalpinioideae, esta compreende cerca de 150 gêneros, estando bem representada no Brasil. *Cássia* é o gênero com maior número de espécies, e é conhecida por suas flores especialmente amarelas. São exemplos deste gênero as espécies conhecidas popularmente como fedegoso, cigarreira, mata-pasto, sene e chuva-de-ouro. Como exemplo de outros gêneros importantes e significativos da subfamília, destacam-se, a *Caesalpinia*, cujo representante mais conhecido é o Pau-Brasil (*C. echinata*), a *Bauhinia*, conhecida como unha-de-vaca (*B. bongardi*), a *Copaífera*, popularmente conhecida como copaíba dos cerrados e matas (*C. duckei* Dwyer), entre outras.

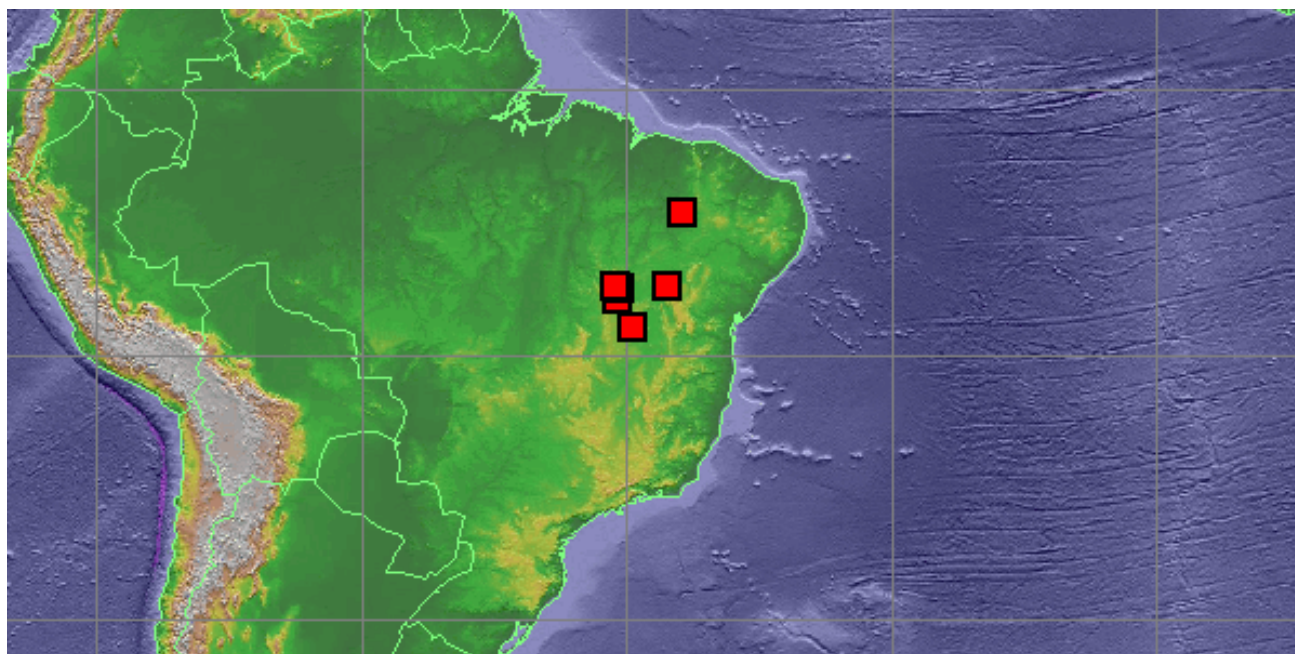
1.2 O gênero *Cenostigma*

O gênero *Cenostigma* é constituído por quatro espécies de hábitos arbóreos e arbustivos, são elas, *C. macrophyllum* Tul., *C. tocantinum* Ducke, *C. gardnerianum* Tul. e *C. sclerophyllum*; sendo que somente *C. sclerophyllum* não é exclusivamente brasileira, ocorrendo concomitantemente no Chaco paraguaio. Das espécies conhecidas, apenas *C. macrophyllum* possui estudo fitoquímico preliminar, onde foram isolados e identificados do extrato etanólico das folhas e da casca do caule triterpenos (ácido 3-4-seco-16- β -hidroxiolean-18-en-3-óico), esteróides livres e glicosilados (sitosterol, estigmasterol, 3 β -O- β -D-glicopiranosil-sitosterol), tocoferóis (α e β -tocoferol) e biflavonas (agathisflavona, amentoflavona e 7-metoxi-amentoflavona), além do ácido elágico livre e esterificado com ácido gálico. As cascas do caule, folhas e flores desta espécie são usadas pela população como espasmolíticas. Estudos farmacológicos com o extrato aquoso das folhas indicaram ação antiulcerogênica, enquanto que o extrato etanólico apresentou atividades antimicrobiana, antiinflamatória e antinoceptiva (SILVA *et al.* 2004; COSTA *et al.* 2002; SANTOS *et al.* 2001).

Cenostigma gardnerianum Tul. é um representante da subfamília Caesalpinioideae, incluída na tribo Sclerolobieae. É uma árvore que pode atingir até 20 m, com a superfície do caule provida de sulcos. Sua floração ocorre de agosto a fevereiro, exibindo flores amarelas e

discretamente perfumadas, reunidas em inflorescências, com uma pétala inferior mediana menor, lembrando uma orquídea. Frutifica de fevereiro a junho, sendo o fruto um legume plano e achatado (Figuras 2 e 3). Devido a estas características, *C. gardnerianum* é extensivamente utilizada como ornamental.

A espécie é amplamente distribuída na caatinga, uma vez que a família constitui a maior diversidade de espécies nesse bioma (QUEIROZ, 1998, 2002). Popularmente conhecida como “canela-de-velho”, “caneleira”, “caneleiro” e “catingueira” (SILVA, 2004), pode ser encontrada na região do cerrado e caatinga baianos (Figura 1). Esta espécie nativa constitui-se em importante fonte de recursos para o homem do sertão, em face de sua disponibilidade em regiões com déficits hídricos frequentes e solos afetados por sais. Assim sendo, *C. gardnerianum* é também utilizada como forrageira ou na alimentação dos animais, e sua madeira tem diversas utilizações. Sua propagação ocorre predominantemente por sementes, requerendo umidade adequada e alguns dias para sua emergência (RIBEIRO & PELACANI, 2006)



Fonte: <http://207.156.243.8/emuwebnybg/objects/common/emuwebmap.php> acessado em 10/09/06

Figura 1: Distribuição da espécie *Cenostigma gardnerianum* Tul.



Fonte: http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=4973 acessado em 21/01/07

Figura 2: Desenho com descrição detalhada das partes de *C. gardnerianum* Tul.



Figura 3: Fotos de um espécime de *C. gardnerianum*, autoria Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiroz

1.3 Considerações gerais sobre Flavonóides

Flavonóides são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e representam uma das maiores classes de substâncias naturais, ocorrendo na forma livre ou como glicosídeos. São substâncias largamente dispersas na natureza, sendo encontradas em diferentes tipos e partes de espécies vegetais, incluindo frutas, folhas, sementes, etc. Podem ser encontrados ainda em temperos, tanto quanto em bebidas, especialmente em vinho tinto, chás e, em menor escala na cerveja (ALCARAZ & CARVALHO, 2004).

O termo flavonóide engloba um grupo de compostos fenólicos complexos com uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (C) com mostrado na Figura 04. São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, constituindo uma importante classe de polifenóis e apresentando relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais.

Esta classe de substâncias é formada por aproximadamente 4.200 compostos fenólicos descritos, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Nesta classe estão inclusos vários subgrupos que apresentam as mais variadas propriedades biológicas. No Quadro 01 estão descritas as principais classes e o resumo de suas propriedades mais importantes.

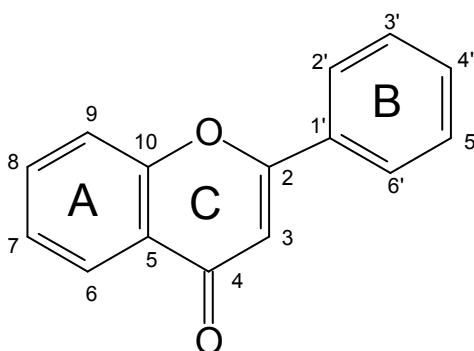


Figura 4: Esqueleto básico de um flavonóide (anéis A, B e C)

Quadro 01: Classes de flavonóides e algumas características conhecidas

Classes	Número aproximado de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	1660	Copigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
Flavonas, flavonóis e seus <i>C</i> -heterosídeos	303	Copigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
Antocianinas	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	110	Estão presentes frequentemente em tecidos de madeiras
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonóides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antigúngica
Neoflavonóides	70	
Biflavonóides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	

As diferenças individuais dentro de cada grupo resultam de variação no número e posição dos grupamentos hidroxilas, de modificações nos núcleos (especialmente a saturação do heterociclo pirônico), e do grau de metilação e glicosilação, as quais afetam várias propriedades dos flavonóides, particularmente a solubilidade.

Dentro das subclasses flavona e flavonol, as substâncias mais comuns são aquelas com hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B e, em menor extensão, aqueles com apenas uma hidroxila na posição 4' (Figura 04).

Os flavonóides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e um grande número ocorre na forma de glicosídeos (também chamados de heterosídeos). O sítio de glicosilação preferido dos flavonóis é a posição 3 e, com menos frequência a posição 7. A glicose é o carboidrato mais usual, porém outras unidades de açúcares podem também ser encontrados, como xilose, galactose e ramnose.

Os flavonóides existem naturalmente numa grande variedade de alimentos de origem vegetal e fazem parte integral da dieta humana. Sua distribuição no reino vegetal é mais acentuada no grupo das Angiospermas, enquanto que é praticamente ausente em algas, e pouco presente em briófitas (FILHO *et al.*, 2001).

A presença de flavonóides em plantas, especialmente nas folhas, pode estar associada à sua capacidade de agir como filtros de UV, protegendo os tecidos responsáveis pela fotossíntese de possíveis danos ao absorver essa radiação, especialmente a banda UV-B (280-315 nm). Além disso, essas substâncias atuam na proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, no controle da ação dos hormônios vegetais, como agentes alelopáticos e na inibição de enzimas (SIMÕES *et al.* 1999)

1.4 Potencial antioxidante dos Flavonóides

1.4.1 Os radicais livres

O conhecimento sobre antioxidantes tem aumentado na atualidade devido, principalmente, aos estudos dos efeitos dos radicais livres sobre os organismos vivos na etiologia de várias doenças. Os radicais livres que agem nos organismos vivos são espécies cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, e são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) (VISIOLI, 2000).

Um radical livre é definido como uma espécie química capaz de ocorrer independente e conter um ou mais elétrons desemparelhados. Os radicais mais importantes presentes nos organismos vivos são os radicais hidroxila (HO^\bullet), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet), e pelas espécies não radicalares, oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (HALLIWELL, 1999).

As ERO são formadas nos organismos aeróbicos como consequência indesejável do acoplamento do processo oxidativo da fosforilação de ADP, com redução de oxigênio molecular através de quatro moléculas de água. Outras fontes de ERO podem incluir as cadeias de transporte de elétrons da fotossíntese e dos microssomas, bem como fagocitose e atividades de enzimas tais como xantina oxidase, triptofano dioxigenase, diamina oxidase, prostaglandina sintase, guaianil ciclase e glicose oxidase. Estas enzimas podem produzir diferentes ERO como intermediários.

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e

síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios, tais como, peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA (SARMA, 1999) e dessa forma encontram-se envolvidas em diversas patologias (*e. g.* artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS), podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWELL, 1992).

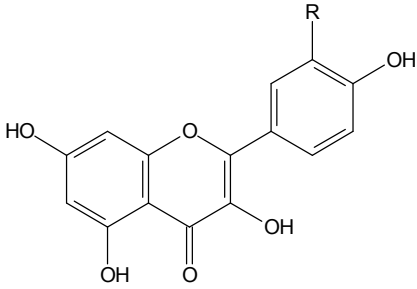
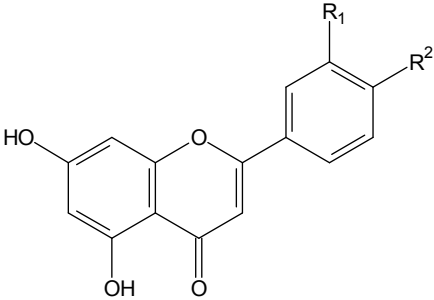
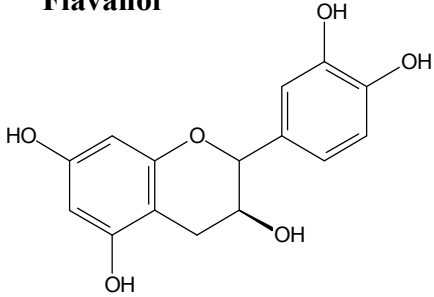
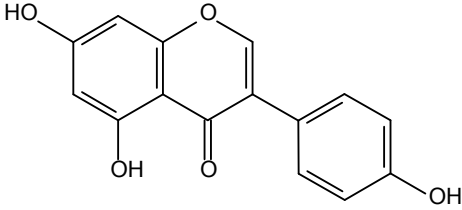
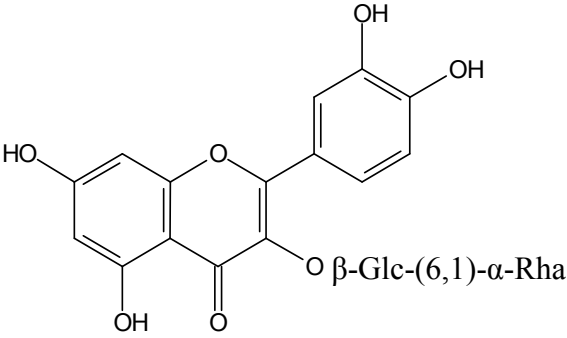
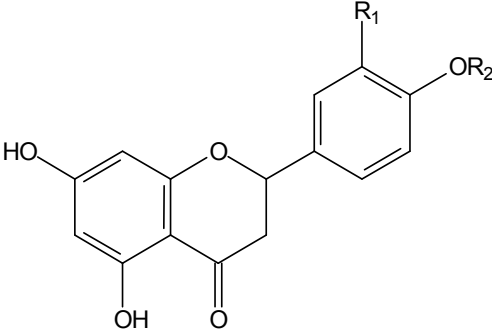
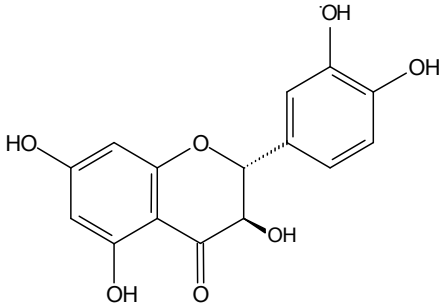
1.4.2 Flavonóides como antioxidantes

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias antioxidantes contra os danos moleculares causados por ERO. Os compostos fenólicos compreendem o principal grupo de substâncias antioxidantes de origem vegetal e, dentre eles, os flavonóides constituem o grupo mais importante. Assim, as propriedades antioxidantes dos flavonóides têm atraído a atenção para a nutrição preventiva, na conservação de alimentos e outras substâncias contra o dano oxidativo, e por contribuírem na prevenção de doenças crônico-degenerativas e outras patologias, como doenças cardiovasculares e cânceres (FILHO *et al.*, 2001).

Em termos ecológicos, os flavonóides desempenham funções associadas à sua habilidade antioxidante, destacando-se como catalisadores na fase clara (luz) da fotossíntese e/ou como reguladores dos canais de ferro envolvidos na fosforilação, assim como protetores de estresses das plantas face à ação seqüestradora de ERO geradas pelo sistema fotossintético de transporte de elétrons. Além disso, apresentam a propriedade de absorver raios UV protegendo as plantas da radiação solar (DAVID *et al.* 2004).

Evidências experimentais têm demonstrado que os flavonóides apresentam atividades biológicas importantes, tais como ação antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica e vasodilatadora (HANASAKI *et al.* 1994). No Quadro 02 são mostrados alguns flavonóides de ocorrência geral que apresentam capacidade antioxidante.

Quadro 02: Flavonóides antioxidantes de ocorrência geral

<p style="text-align: center;">Flavonóis</p>  <p>R=OH (Quercetina) R=H (Kaempferol)</p>	<p style="text-align: center;">Flavonas</p>  <p>R₁=OH; R₂=OH (Luteolina) R₁=H; R₂=OH (Apigenina) R₁=R₂=H (Crisina)</p>
<p style="text-align: center;">Flavanol</p>  <p>Catequina</p>	<p style="text-align: center;">Isoflavona</p>  <p>Genisteína</p>
<p style="text-align: center;">Flavonol glicosilado</p>  <p>Rutina</p>	<p style="text-align: center;">Flavanona</p>  <p>R₁=R₂=OH (Narigenina) R₁=OH; R₂=H (Hesperidina)</p>
<p style="text-align: center;">Diidroflavonol</p>  <p style="text-align: center;">Taxifolina</p>	

1.4.3 Relação estrutura versus atividade dos flavonóides

De modo geral, os flavonóides possuem uma estrutura química ideal para a atividade seqüestradora de radicais livres, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A estrutura é muito importante para a atividade e, quanto maior o número de hidroxilas substituintes no esqueleto básico do flavonóide, maior a atividade antioxidante apresentada (CAO, 1997). Experimentos *in vitro* demonstram que há necessidade da presença de pelo menos dois grupos OH na estrutura, de modo que o flavonóide possa apresentar proteção do lipossomo contra estress oxidativo (BARREIROS *et al.* 2006).

De acordo com alguns autores, os mecanismos de ação antioxidantes podem incluir a supressão da formação das ERO pela inibição das enzimas ou pela quelação de elementos traço envolvidos na produção desses radicais, captura das ERO, controle ou proteção das defesas antioxidantes.

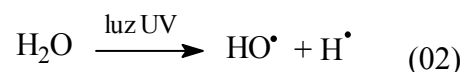
Os flavonóides são reconhecidos devido ao fato de preencherem a maioria dos critérios mencionados, exercendo os efeitos de inibição de enzimas responsáveis pela produção do ânion superóxido e de outras enzimas envolvidas na geração de outras espécies radicalares, quelação de metais traço e redução ou captura de radicais livres (DAVID, *et al.*, 2004)

Ao exibirem propriedades quelantes de metais como o Fe^{2+} e Cu^{2+} os flavonóides atuam prevenindo a formação do radical hidroxila pela reação do metal com o peróxido de hidrogênio, conhecida como reação de Fenton (Equação 01) que é uma importante fonte de ERO.



O radical hidroxila formado no organismo principalmente pela reação de H_2O_2 com metais de transição e pela homólise da água por exposição à radiação ionizante (Equação 02) é o mais deletério ao organismo, pois, devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo* (HALLIWELL, 1992).

Os radicais altamente reativos como HO^\bullet freqüentemente atacam as moléculas através da abstração de hidrogênio e, deste modo, podem causar danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares, do núcleo e mitocondrial.



A glicosilação dos flavonóides reduz a atividade antioxidante, no entanto, aumenta a solubilidade em água, o que permite o seu armazenamento nos vacúolos das células.

Para promover a quelatação de metais (M) são necessários dois grupos OH em relação *orto* nas posições 3' e 4' do anel B, ou uma hidroxila vizinha ao carbono carbonila (C-4) em C-3 ou C-5, conforme mostrado na Figura 05.

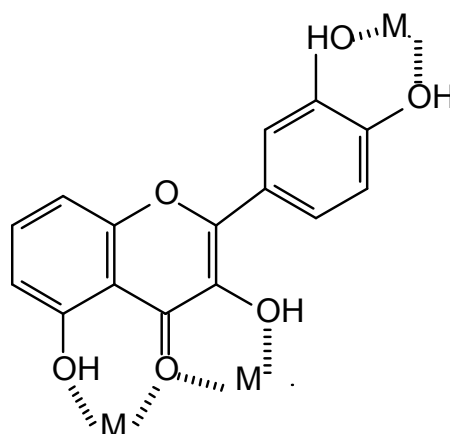


Figura 5: Exemplo da propriedade quelante dos flavonóides

A atividade dos flavonóides como agentes doadores de H^\bullet e elétrons também está relacionada ao número de hidroxilas presentes, sendo que a estabilidade do radical livre flavonoil formado depende da habilidade do flavonóide em deslocalizar o elétron desemparelhado (Figura 06). Em geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior sua atividade. Flavonóides sem nenhuma hidroxila ou que tenham todas as suas hidroxilas substituídas não apresentam atividade antioxidante ou pró-oxidante.

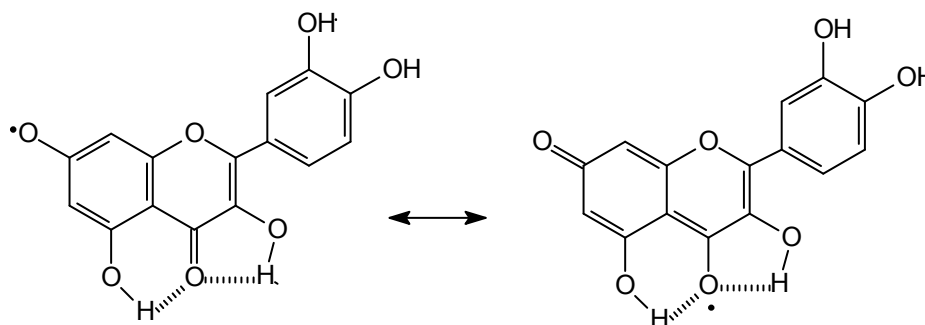


Figura 6: Exemplo de deslocalização do elétron desemparelhado na quercetina

Outro mecanismo que contribui para a atividade antioxidante dos flavonóides é sua habilidade de estabilizar as membranas celulares por meio da diminuição da viscosidade interna, uma vez que sua participação ocorre na porção hidrofóbica da membrana, causando uma diminuição dramática na fluidez dos lipídios (DAVID *et al.*, 2004)

No Quadro 03 são exemplificados alguns flavonóides com comprovada atividade antioxidante. Os valores expressos são referentes à concentração de Trolox para 1 mM do flavonóide.

Quadro 03: Comparação da atividade antioxidante de alguns flavonóides representativos

Flavonóide	Atividade antioxidante (mM de Trolox)
Quercetina	4,7
Rutina	2,4
Catequina	2,4
Luteolina	2,1
Taxifolina	1,9
Apigenina	1,5
Narigenina	1,5
Hesperidina	1,4
Kaempferol	1,3

2.0 Objetivos

2.1 Gerais

- Isolar os constituintes químicos presentes nas folhas e cascas do caule de *C. gardnerianum*;
- Contribuir para o conhecimento químico e taxonômico das espécies da família Leguminosae presentes no estado da Bahia.

2.2 Específicos

- Isolar, através de métodos cromatográficos, os constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário presentes nos extratos das folhas e das cascas do caule de *C. gardnerianum* Tul.;
- Determinar a estrutura das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos como RMN de ^1H , de ^{13}C e outros experimentos (DEPT, NOESY, HMBC, HMQC, COSY, HETCOR), além de EM e comparação com dados da literatura;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das espécies isoladas, pelos métodos de inibição da co-oxidação do β -caroteno, e de sequestro do radical livre estável DPPH.

3.0 Parte Experimental

3.1 Coleta e identificação da espécie

As folhas e caule de um espécime de *Cenostigma gardnerianum* Tul. foram coletadas no município de Casa Nova, Bahia, pelo Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiróz, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Após identificação, uma exsiccata foi depositada no Herbário do Laboratório de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana sob o número HUEFS 78.424.

3.2 Materiais e métodos

A moagem do material vegetal foi realizada utilizando-se moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model 4.

Os solventes empregados no preparo dos extratos, nas eluições das cromatografias em placa e coluna (hexano, metanol, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano) foram de grau analítico da marca Merck. Nas análises por CLAE-EM empregou-se solventes (metanol e acetonitrila) grau HPLC, procedência Tédia Brazil e Baker.

Nos processos de separação por CC os adsorventes utilizados como fase estacionária foram gel de sílica 60 da Merck e Acros, com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm; poliamida 6 da Baker com diâmetro de 50 µm; Sephadex LH-20 da Pharmacia para permeação e sílica Flash com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm da Merck e Acros.

Nas CCDC foram utilizadas placas preparadas com gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ da Merck, que foram ativadas em estufa a 100 °C por 1 h. Também foram utilizadas placas pré-preparadas de gel de sílica 60 F₂₅₄ da Merck.

Nas CCDP foram utilizadas placas de gel de sílica 60 F₂₅₄ de 1 mm de espessura da Merck, e placas cromatográficas de alta resolução de gel de sílica fluorescente a 254 nm de 200 µm de espessura da Whatman.

As placas de CCDP foram reveladas por irradiação com luz UV (254 e 366 nm), enquanto que as placas de CCDC foram reveladas com luz UV (254 e 366 nm), vapores de iodo e outros reveladores químicos.

Os solventes foram evaporados à pressão reduzida utilizando-se evaporadores rotatórios das marcas BUCHI modelo 461, e IKA LABORTECHNIK modelo HB4 basic, com temperatura em geral entre 35 e 50 °C.

Os espectros de massa foram obtidos em detector de massas da Shimadzu modelo LCMS2010 operando no modo APCI.

Os espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT, HMBC e HMQC foram registrados em espectrômetro da Varian, modelo GEMINI 2000 operando a 300 MHz, utilizando-se CDCl_3 , CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, Pyr- d_5 e DMSO- d_6 (procedência Isotech) como solventes e o sinal do hidrogênio ou do ^{13}C dos solventes, como referência interna em relação ao TMS.

3.3 Preparo dos extratos

As folhas (900 g) e cascas do caule (1200 g) foram submetidas à moagem separadamente após secagem em estufa a 40°C com ventilação. O material pulverizado foi então submetido à maceração em MeOH separadamente, por quatro extrações consecutivas, com cerca de 48 h cada, e o filtrado obtido em cada etapa foi reunido e concentrado sob pressão reduzida, originando os extratos metanólicos das folhas e das cascas do caule. Estes por sua vez foram diluídos em MeOH/ H_2O (1/9) e particionados com clorofórmio, dando origem a duas fases, a clorofórmica e a hidrometanólica para cada um dos extratos. A fase clorofórmica, previamente concentrada em rotaevaporador, foi novamente particionada em hexano e metanol, originando as fases hexânica e metanólica (das folhas e das cascas do caule), respectivamente.

A fase hidrometanólica de cada extrato foi concentrada e também particionada com acetato de etila, originando as fases AcOEt e aquosa, que foi descartada conforme esquema proposto nas Figuras 7 e 8. As fases obtidas foram concentradas, pesados e rotulados, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Massas dos extratos orgânicos obtidos de *C. gardnerianum*

Extratos	Massa (g)	
	Folhas	Cascas do caule
Hexânico	13,05	1,75
Acetato de etila	26,07	30,70
Metanólico	14,30	4,13

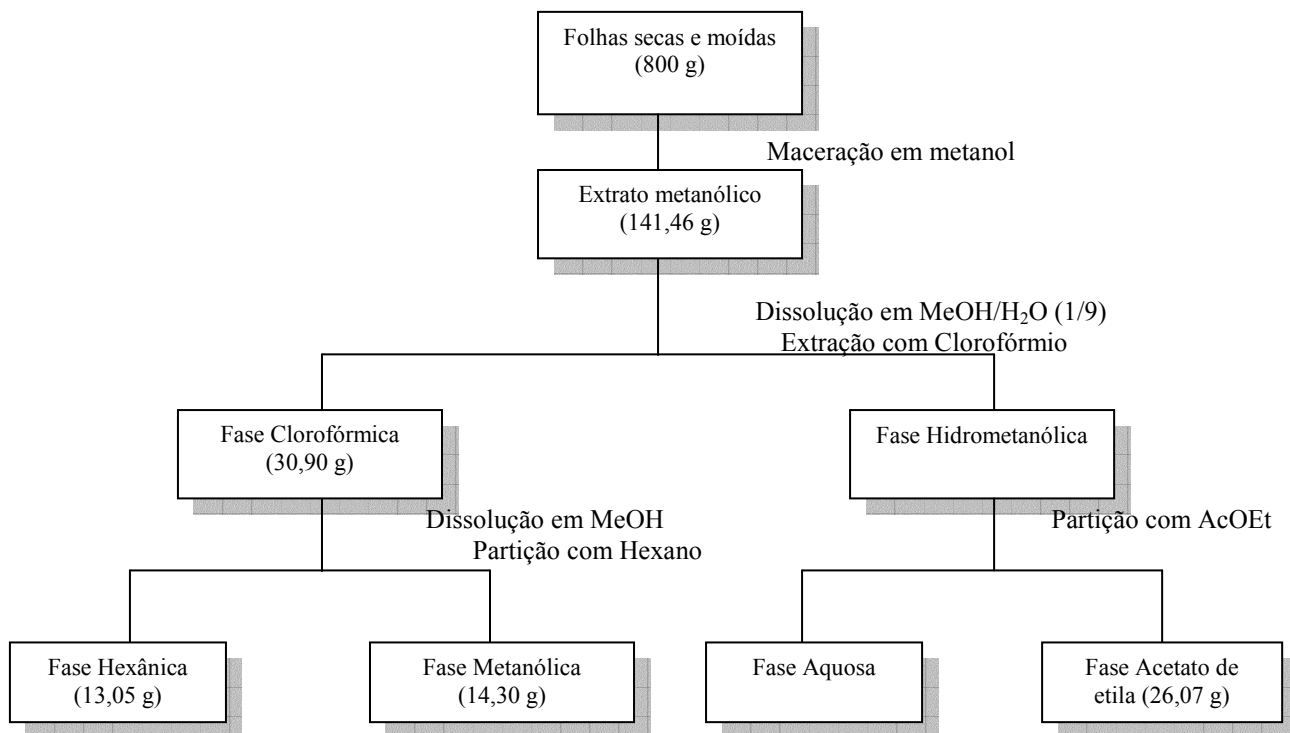


Figura 07: Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos das folhas de *C. gardnerianum*

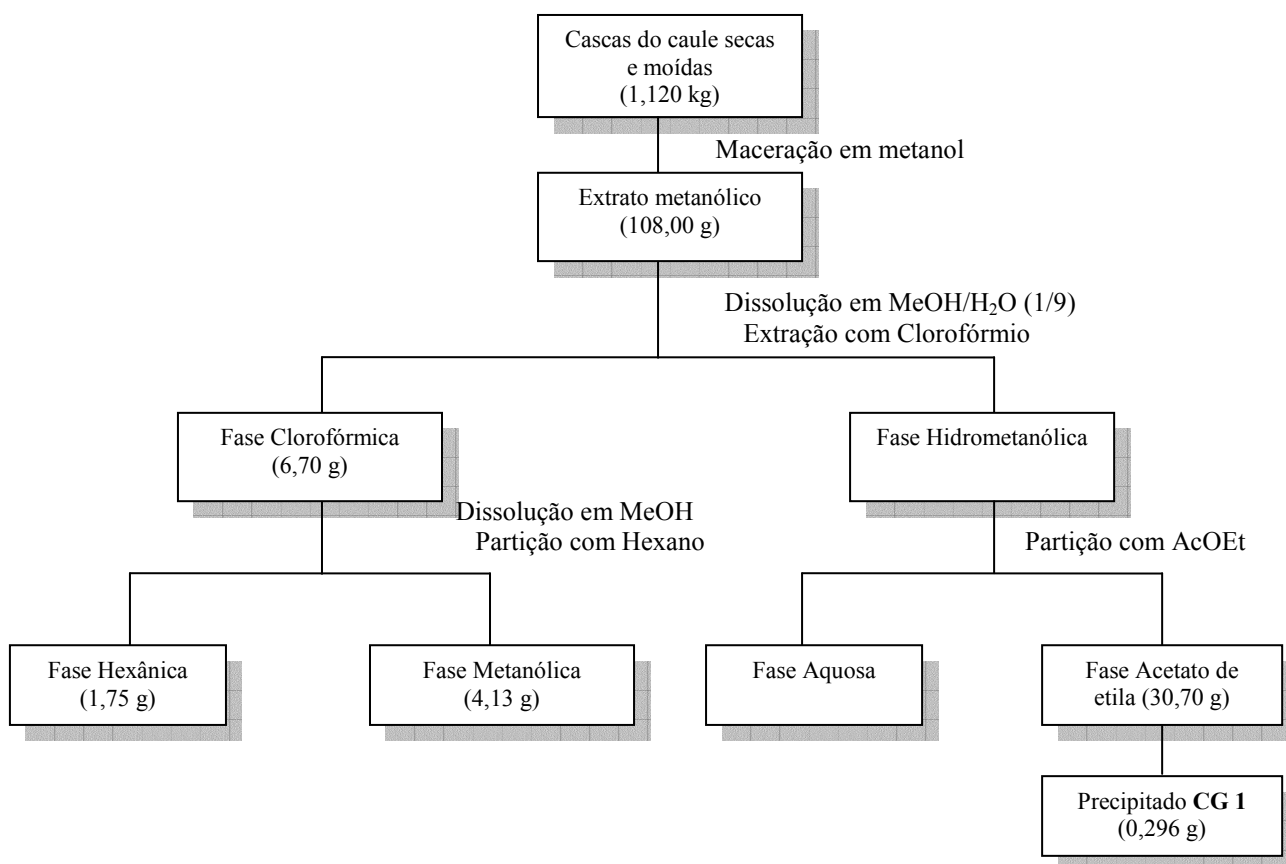


Figura 08: Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos das cascas do caule de *C. gardnerianum*

3.4 Separação e purificação dos constituintes químicos de *C. gardnerianum*

Durante a concentração do extrato AcOEt das cascas do caule, ocorreu precipitação de um sólido cristalino, que foi separado por filtração e purificado através de recristalização com metanol a quente, obtendo-se assim **CG 1** (296 mg).

3.4.1 Fracionamento do Extrato Acetato de Etila das folhas

O concentrado do extrato AcOEt das folhas (26,07 g) foi submetido à CC empregando-se sílica gel 60 como suporte e como fase móvel uma misturas de CHCl₃:MeOH em grau crescente de polaridade. Desta coluna principal foram recolhidas 26 frações de 50 mL, que foram reunidas posteriormente em 11 subfrações (Tabela 02) após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo.

Tabela 02: Frações obtidas da CC principal do extrato acetato de etila das folhas

Código	Frações reunidas	Massa (g)	Substâncias isoladas
AFCG 1	1-2	0,020	Não trabalhada
AFCG 2	3-4	0,218	Não trabalhada
AFCG 3	5	0,136	Não trabalhada
AFCG 4	6-7	0,894	CG 2 e CG 3
AFCG 5	8	0,291	Não trabalhada
AFCG 6	9-12	2,063	Não trabalhada
AFCG 7	13-14	2,035	CG 4
AFCG 8	15-17	4,430	CG 5, CG 6, CG 7, CG 8, CG 9 e CG 10
AFCG 9	18-19	3,853	_____
AFCG 10	20-23	9,205	Não trabalhada
AFCG 11	24-26	Descartada	_____

3.4.1.1 Purificação da fração AFCG 4

A fração AFCG 4 (894,0 mg) foi submetida à CC com sílica Flash, eluída com sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 46 frações de 50 mL cada, que foram reunidas em 5 subfrações após análise em CCDC (Tabela 3).

Tabela 3: Frações obtidas da CC de AFCG 4

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$)
AFCG 4-A	1-12	30,8	98:2
AFCG 4-B	13-17	313,2	9:1
AFCG 4-C	18-40	251,3	4:1 – 1:1
AFCG 4-D	41-46	25,0	MeOH

Análise de RMN de ^1H e de ^{13}C permitiu identificar a subfração AFCG 4-B como sendo o galato de metila (**CG 2**).

A subfração AFCG 4-C foi submetida à purificação em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20, em sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1), onde foram obtidas 22 subfrações de 50 mL que foram agrupadas em 6 subfrações após análise de CCDC (Tabela 04).

Tabela 04: Frações obtidas da CC de AFCG 4-C

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)
AFCG 4-C1	1-6	25,2
AFCG 4-C2	7-11	31,8
AFCG 4-C3	12-13	30,3
AFCG 4-C4	14-16	40,1
AFCG 4-C5	17-18	4,5
AFCG 4-C6	19-22	25,0

A subfração AFCG 4-C6, quando submetida a teste com solução de FeCl_3 , indicou a presença de substâncias fenólicas, e a análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C mostrou que esta substância tratava-se do flavonóide identificado como sendo a quercetina (**CG 3**).

3.4.1.2 Purificação da fração AFCG 7

A fração AFCG 7 (2,035 g) foi submetida à CCDC, comparando-se com ácido gálico comercial. Uma vez que não foi possível comprovar a presença desta substância na fração por CCDC, a mesma foi então dissolvida em acetato de etila, e posteriormente particionada com solução aquosa de bicarbonato, sendo então separado da fase aquosa e concentrado. A fase aquosa foi posteriormente acidificada com HCl, mantendo-se o pH em aproximadamente 6 e 3, e novamente particionada com acetato de etila, conforme o fluxograma proposto na Figura 09.

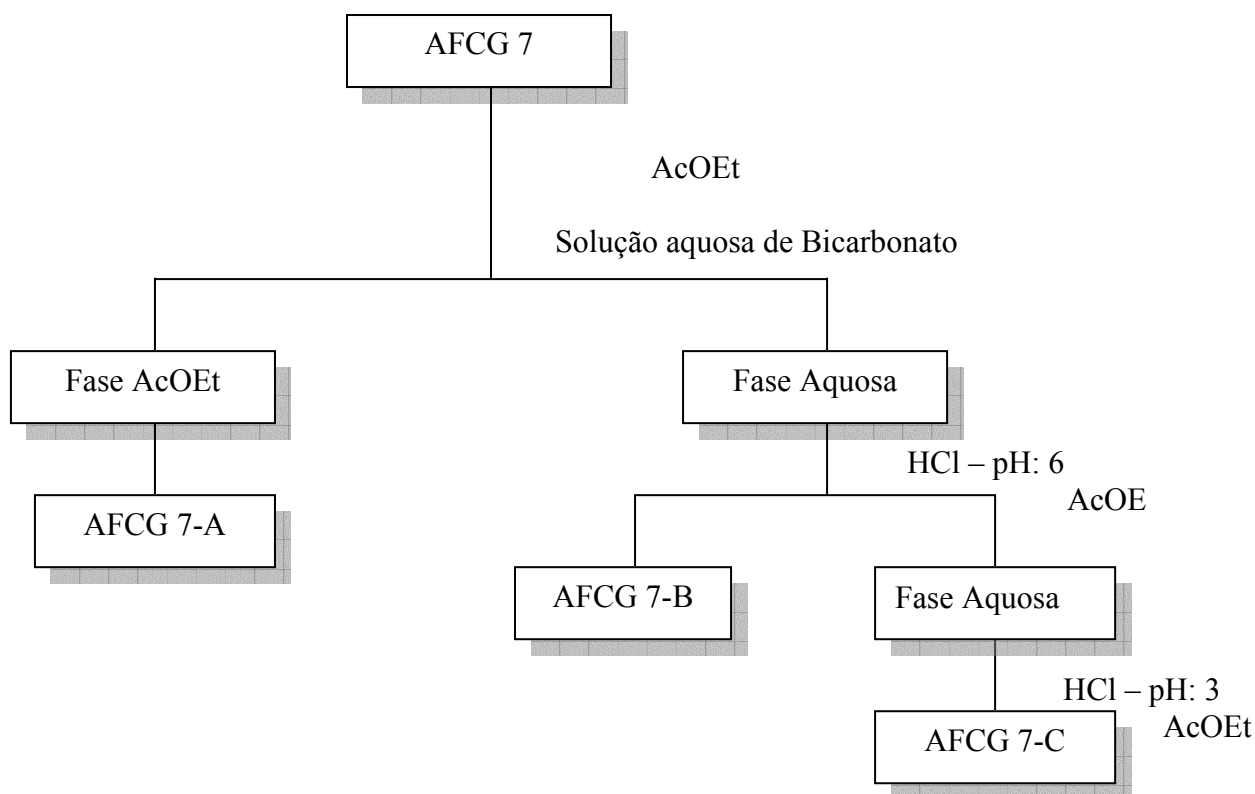


Figura 9: Fluxograma do procedimento experimental empregado para a amostra AFCG 7

Foi realizado teste com cloreto férrico (FeCl_3) com as subfrações obtidas, indicando que apenas a subfração AFCG 7-B apresentava presença de substâncias fenólicas. A Tabela 05 apresenta o resultado do teste e as respectivas massas das subfrações.

Tabela 05: Massa das subfrações obtidas e resultado do teste com FeCl_3

Código	Massa (mg)	FeCl_3
AFCG 7-A	119,3	-
AFCG 7-B	743,7	+
AFCG 7-C	605,7	-

Cerca de 10,0 mg da fração AFCG 7-B foi submetida a um processo de metilação com metanol em meio ácido sob refluxo, com temperatura em torno de 78° C por 12 horas. O produto resultante desta reação foi comparado com galato de metila (**CG2**) através de CCDC, constatando que o derivado preparado era o galato de metila. Deste modo, pôde-se comprovar que esta subfração era o ácido gálico (**CG4**). Posteriormente a subfração **CG 4** foi submetida à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C .

3.4.1.3 Purificação da fração AFCG 8

A fração AFCG 8 (4,430 g) foi submetida à CC empregando-se poliamida 6 como suporte sólido e utilizando como fase móvel o sistema $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$, em grau decrescente de polaridade. Foram coletadas 42 subfrações de 50 mL que foram agrupadas após análise de CCDC (Tabela 06).

Tabela 6: Frações obtidas da CC de AFCG 8

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$)
AFCG 8-A	1-8	370,1	1:4
AFCG 8-B	9-14	600,5	2:3
AFCG 8-C	15-22	490,0	1:1
AFCG 8-D	23-30	747,3	7:3
AFCG 8-E	31-42	615,0	MeOH

As subfrações foram submetidas à CCDC e posteriormente reveladas em UV e iodo, sendo escolhida a subfração AFCG 8-C para purificação em CC, utilizando como fase estacionária gel de Sephadex LH-20, em sistema CH₂Cl₂:MeOH (1:1), onde foram obtidas 21 subfrações de 50 mL que foram agrupadas após análise de CCDC (Tabela 07).

Tabela 7: Frações obtidas da CC de AFCG 8-C

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)
AFCG 8-C1	1-6	31,3
AFCG 8-C2	7-9	49,0
AFCG 8-C3	10-16	295,8
AFCG 8-C4	17-20	36,7
AFCG 8-C5	21	25,0

A subfração AFCG 8-C4 foi identificada como sendo a vitexina (**CG 5**). A subfração AFCG 8-C3 foi submetida a sucessivas permeações em gel de Sephadex LH-20, tendo como eluente uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH (1:1). Foram obtidas 21 subfrações que posteriormente foram agrupadas após análise por CCDC reveladas com luz UV (Tabela 08).

Tabela 8: Frações obtidas da CC de AFCG 8C3

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)
AFCG 8-C3A	1-9	17,9
AFCG 8-C3B	10-16	15,65
AFCG 8-C3C	17-21	152,0

Análise de RMN ¹H e ¹³C mostrou que a subfração AFCG 8-C3C tratava-se de um flavonóide, que foi identificado como quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosídeo (**CG 6**).

A subfração AFCG 8-D (747,3 mg) foi submetida à permeação em gel de Sephadex LH-20, eluída com CH₂Cl₂:MeOH (1:1), onde foram obtidas 27 frações de 100 mL cada, que foram agrupadas em 5 grupos (Tabela 09).

Tabela 09: Frações obtidas da CC de AFCG 8-D

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)
AFCG 8-D1	1-12	219,9
AFCG 8-D2	13-18	183,0
AFCG 8-D3	19-22	73,0
AFCG 8-D4	23-25	140,6
AFCG 8-D5	27	11,7

A subfração AFCG 8-D3 foi submetida a novo fracionamento através de CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo com sistema CHCl₃/MeOH (95:5), sendo recolhidas 4 subfrações após análise em UV(254 e 365 nm) (Tabela 10).

Tabela 10: Frações obtidas da CCDP de AFCG 8-D3

Código	Massa (mg)
AFCG 8-D3A	2,3
AFCG 8-D3B	7,4
AFCG 8-D3C	9,0
AFCG 8-D3D	9,7
AFCG 8-D3E	39,5

A subfração AFCG 8-D3E foi identificada, após análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, com sendo a quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)-β-D-glicopiranosídeo (CG 7).

A subfração AFCG 8-E (615,0 mg) foi dissolvida em acetona, resultando em um precipitado que foi separado por filtração, originando assim 2 subfrações denominadas AFCG 8-E1 a parte solúvel em acetona, e o precipitado (45,0 mg) identificado como sendo o ácido elágico (CG 8). A subfração AFCG 8-E1 foi submetida a novo processo de purificação em CC, tendo Sephadex LH-20 como fase estacionária eluída com CH₂Cl₂:MeOH (1:1), originando 32 subfrações de 50 mL cada, que foram posteriormente agrupadas após análise de CCDC (Tabela 11).

Tabela 11: Frações obtidas da CC de AFCG 8-E

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)
AFCG 8-E1A	1	18,5
AFCG 8-E1B	2	14,3
AFCG 8-E1C	3-4	38,2
AFCG 8-E1D	5	8,2
AFCG 8-E1E	6	75,0
AFCG 8-E1F	7-19	234,0
AFCG 8-E1G	20-32	130,0

Análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C mostrou que a subfração AFCG 8-E1C tratava-se do biflavonóide que foi identificado como sendo a agatisflavona (**CG 9**).

A subfração AFCG 8-E1E foi submetida à permeação em Sephadex LH-20 eluída com mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1), sendo recolhidas 16 subfrações de 50 mL cada, que foram agrupadas após análise de CCDC (Tabela 12).

Tabela 12: Frações obtidas da CC de AFCG 8-E1D

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)
AFCG 8-E1E1	1-2	13,9
AFCG 8-E1E2	3-9	15,7
AFCG 8-E1E3	10-16	35,3

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da subfração AFCG 8-E1E3 mostrou tratar-se do flavonóide identificado como quercetina-3-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo (**CG 10**)

3.4.2 Fracionamento do extrato Clorofórmico das folhas

A fase metanólica do extrato clorofórmico das folhas de *C. gardnerianum* foi submetido a fracionamento por meio de cromatografia em coluna sob gel de sílica 60, utilizando como fase móvel o sistema hexano/AcOEt em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram obtidas 8 subfrações de aproximadamente 150 mL cada, que foram posteriormente agrupadas em cinco subfrações após análise por CCDC (Tabela 13).

Tabela 13: Frações obtidas da CC de MFCG

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MFCG 1	1	1,6	_____
MFCG 2	2	1,3	_____
MFCG 3	3-4	304,8	CG 11
MFCG 4	5	2,8	_____
MFCG 5	6	1,5	_____
MFCG 6	7	4,0	_____
MFCG 7	8	299,2	_____

3.4.2.1 Purificação da fração MCG 3

A subfração MFCG 3 foi submetida à nova purificação através de CC em sílica Flash, eluída com mistura de CH₂Cl₂:MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 20 subfrações de 100 mL cada, que foram posteriormente agrupadas (Tabela 14).

Tabela 14: Frações obtidas da CC de MFCG 3

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)
MFCG 3-A	1-4	55,0
MFCG 3-B	5-17	59,5
MFCG 3-C	18-19	43,6
MFCG 3-D	20	32,7

Após análise por CCDC, a subfração MFCG 3-B foi submetida a novo fracionamento, através de CC em Sephadex LH-20, eluída com mistura de CH₂Cl₂:MeOH (1:1). Foram obtidas 12 subfrações de 50 mL cada que foram agrupadas após análise em CCDC (Tabela 15).

Tabela 15: Frações obtidas da CC de MFCG 3-B

Código	Frações Reunidas	Massa (mg)
MFCG 3-B1	1-2	2,5
MFCG 3-B2	3-7	23,9
MFCG 3-B3	8-10	10,3
MFCG 3-B4	11-12	17,0

A subfração MFCG 3-B2 foi purificada através de CCDP em gel de sílica 60PF, eluindo três vezes consecutivas com sistema CHCl₃/MeOH (95:5), sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 16).

Tabela 16: Frações obtidas da CC de MFCG 3-B2

Código	Massa (mg)
MFCG 3-B2A	3,5
MFCG 3-B2B	5,7
MFCG 3-B2C	5,1
MFCG 3-B2D	2,6

A subfração MFCG 3-B2A foi identificada somente através dos espectros de RMN de ¹H e EM devido a sua pequena massa. A análise revelou tratar-se de uma cumarina, que foi posteriormente identificada como escoparona (**CG 11**).

Fórmula para cálculo de Atividade Antioxidante:

$$AA= 100 [1- (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$$

Onde:

A_0 = Absorbância inicial da amostra

A_t = Absorbância final da amostra

A_0^0 = Absorbância inicial do branco

A_t^0 = Absorbância final do branco

3.5.2 Seqüestro do radical livre DPPH•

O segundo teste desenvolvido avalia a habilidade da substância testada de seqüestrar o radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Figura 12) e está baseado no descoramento de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio [BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995]. Para este procedimento, foi preparada uma solução etanólica de DPPH• (45µg/mL) e soluções com as substâncias testes e padrão em 3 concentrações diferentes (100, 50 e 25 µg/mL) em EtOH. Neste ensaio, utilizou-se quercetina como substância referência, com poder de seqüestrar 100% dos radicais. As determinações foram realizadas no sistema contendo 3,0 mL da solução de DPPH• e 50 µL de etanol para o controle, ou o mesmo volume para as soluções de padrão e amostras. As leituras das absorbâncias em 517 nm foram realizadas imediatamente e após 30 min de incubação da reação à temperatura ambiente, protegida de luz, em espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicatas.

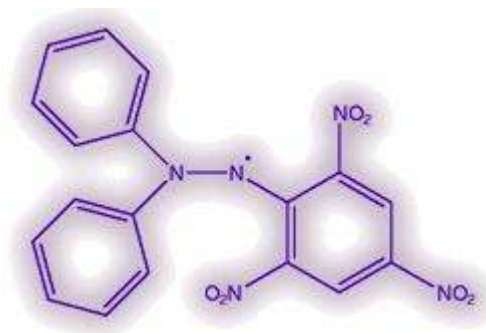
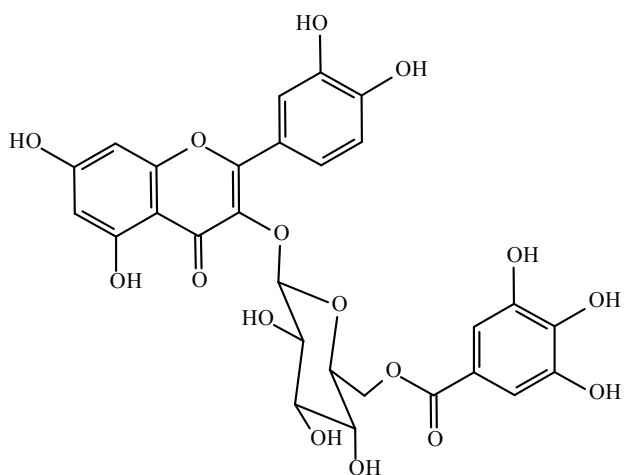
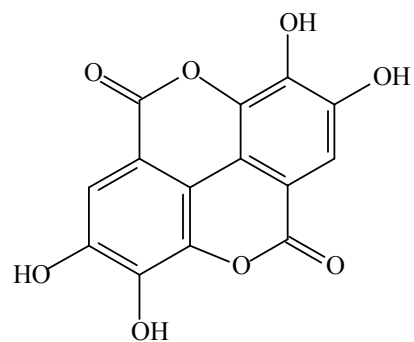


Figura 12: Estrutura do radical livre DPPH

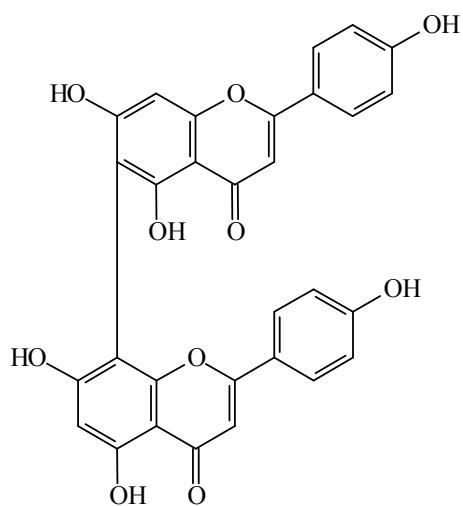
Quadro 04: Continuação



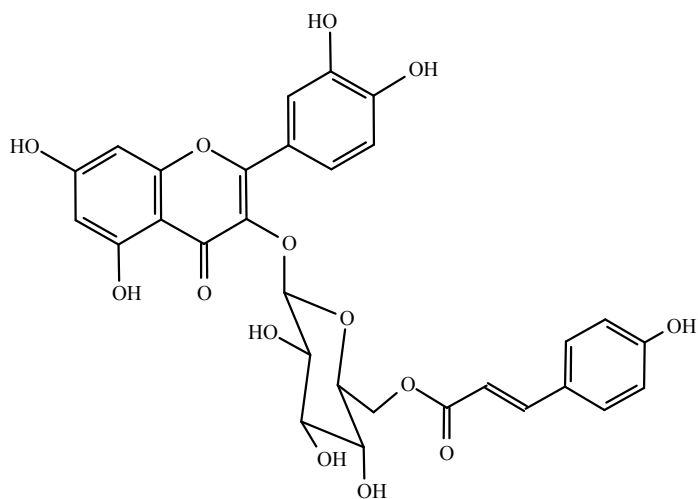
CG 7



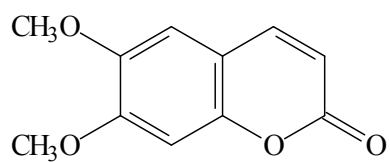
CG 8



CG 9



CG 10



CG 11

4.2 Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas

CG 1 – Ácido 2-C-β-D-glicosil-4-metoxigálico

Sólido cristalino branco; FM= C₁₄H₁₈O₁₀;

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M-H₂O] 327 (100)

RMN ¹H e ¹³C: Tabela 17, p. 45

CG 2 – Galato de Metila

Sólido branco amorfo; FM= C₈H₈O₅

RMN ¹H e ¹³C: Tabela 17, p. 45

CG 3 – Quercetina

Sólido amarelo amorfo; FM= C₁₅H₁₀O₇

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M-1] 301 (100)

RMN ¹H: Tabela 18, p. 65

RMN ¹³C: Tabela 19, p. 66

CG 4 – Ácido Gálico

Sólido branco amorfo; FM= C₇H₆O₅

RMN ¹H e ¹³C: Tabela 17, p. 45

CG 5 – Vitexina

Sólido amarelo amorfo; FM= C₂₁H₂₀O₁₀

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M-1] 431 (100)

RMN ¹H e ¹³C: Tabela 20, p. 78

CG 6 – Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo

Sólido cristalino amarelo; FM= C₂₁H₂₀O₁₂

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M-1] 463 (100)

RMN ¹H: Tabela 18, p. 65

RMN ¹³C: Tabela 19, p. 66

CG 7 – Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -D-glicopiranosídeo

Sólido cristalino amarelo; FM= C₂₈H₂₄O₁₆

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M-1] 615 (100)

RMN ¹H: Tabela 18, p. 65

RMN ¹³C: Tabela 19, p. 66

CG 8 – Ácido Elágico

Sólido branco amorfo; FM= C₂₁H₂₀O₁₂

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M-1] 301 (100)

RMN ¹H e ¹³C: Tabela 17, p. 45

CG 9 – Agatisflavona

Sólido amorfo amarelo; FM= C₃₀H₁₈O₁₀

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M-1] 537 (100)

RMN ¹H e ¹³C: Tabela 20, p. 78

CG 10 – Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-*E-p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo

Sólido amorfo amarelo; FM= C₃₀H₂₆O₁₄

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M-1] 609 (100)

RMN ¹H: Tabela 18, p. 65

RMN ¹³C: Tabela 19, p. 66

CG 11 – Escoparona

Sólido amorfo branco; FM= C₁₁H₁₀O₄

EM modo APCI *m/z* (intensidade relativa): [M+1] 207 (100)

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,88 (d, 1H, J=9,6 Hz, H-4); δ 7,18 (s, 1H, H-8); δ 6,94 (s, 1H, H-5); δ 6,22 (d, 1H, J= 9,6 Hz, H-3); δ 3,85 (s, 3H, O-CH₃); δ 3,93 (s, 3H, O-CH₃).

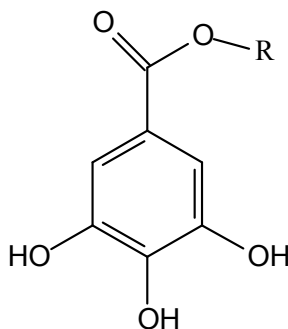
4.3 Identificação e Determinação Estrutural

4.3.1 Elucidação estrutural do Ácido gálico e seus derivados

O ácido gálico e seu dímero derivado, conhecido como ácido elágico, podem existir na forma livre ou ligados como galoil e elagitaninos, respectivamente. São de ocorrência comuns nos chás, vinhos vermelhos, frutas e também tem ocorrência em várias plantas medicinais. O ácido gálico possui comprovada atividade antiinflamatória, além de atividade antimutagênica, anticancerígena e antioxidante. O ácido elágico tem demonstrado atividade antiviral, antitumoral, antimutagênica e antioxidante, sendo utilizado como aditivo seguro de comidas em alguns países, incluindo o Japão (SOONG *et al.*, 2006).

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **CG 1**, **CG 2**, **CG 4** e **CG 8** registraram sinais característicos do ácido gálico e seus derivados. A seguir encontram-se descritos as principais características espectroscópicas que permitiram identificar as substâncias.

4.3.2 Identificação de CG-4 e CG-2



R= H - Ácido gálico (**CG 4**)

R= CH₃ - Galato de metila (**CG 2**)

O espectro de RMN de ^1H (Figura 13, p. 35) de **CG 4** mostrou um único singlete em δ 7,11, valor característico dos dois hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (H-2 e H-6) do ácido gálico. Análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 14, p. 35) indicou a presença de 5 sinais, entre eles, o sinal em δ 169,56, de carbono não hidrogenado, referente à carbonila de

grupo éster ou ácido conjugado. Os dados espectrais, quando também comparados com dados descritos na literatura (SUMG, 1988), permitiram identificar **CG 4** como sendo o ácido gálico.

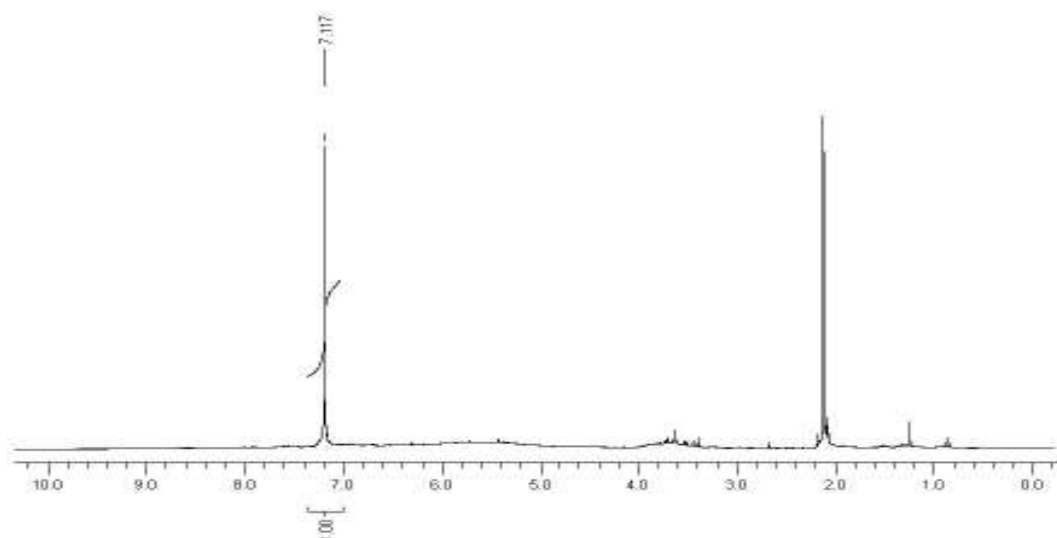


Figura 13. Espectro RMN ^1H da substância **CG 4** [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

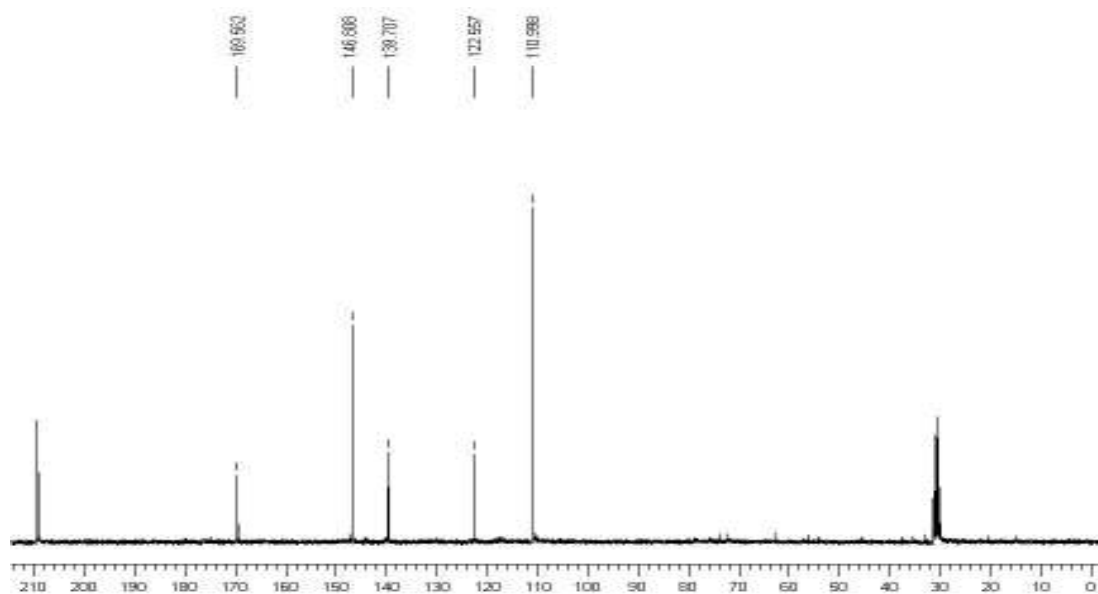


Figura 14. Espectro RMN ^{13}C da substância **CG 4** [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

Os dados de RMN de ^1H (Figura 15) e de ^{13}C (Figura 16) de **CG 2**, indicaram presença dos sinais similares aos do ácido gálico, além de um singlete em δ 3,79, integrando para 3H no espectro de RMN de ^1H , indicativo da presença do grupo metoxila. A presença deste grupo pode ser confirmada pela análise de RMN de ^{13}C , que apresentou, entre outros, um sinal em δ 52,39. Estes dados foram posteriormente comparados com dados da literatura confirmando assim tratar-se do galato de metila (NAWWAR, 1982).

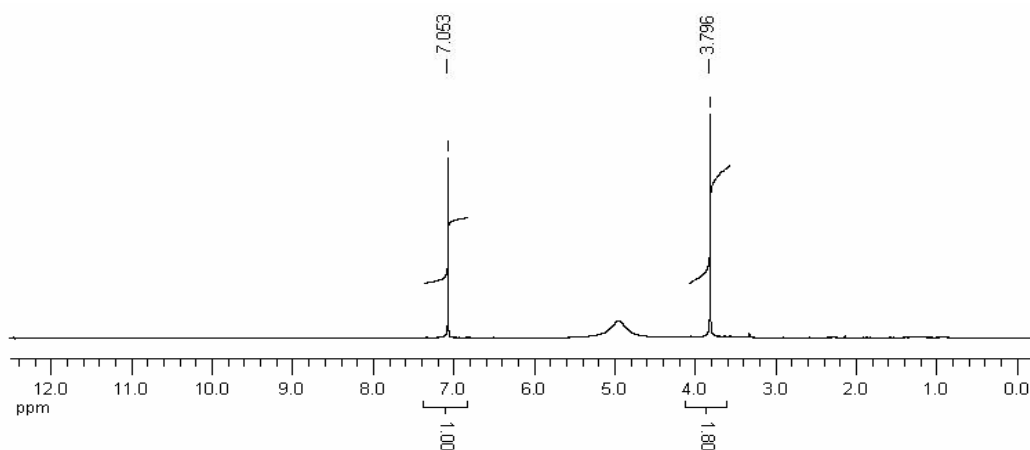


Figura 15. Espectro RMN de ^1H da substância **CG 2** [CD_3OD , δ (ppm)]

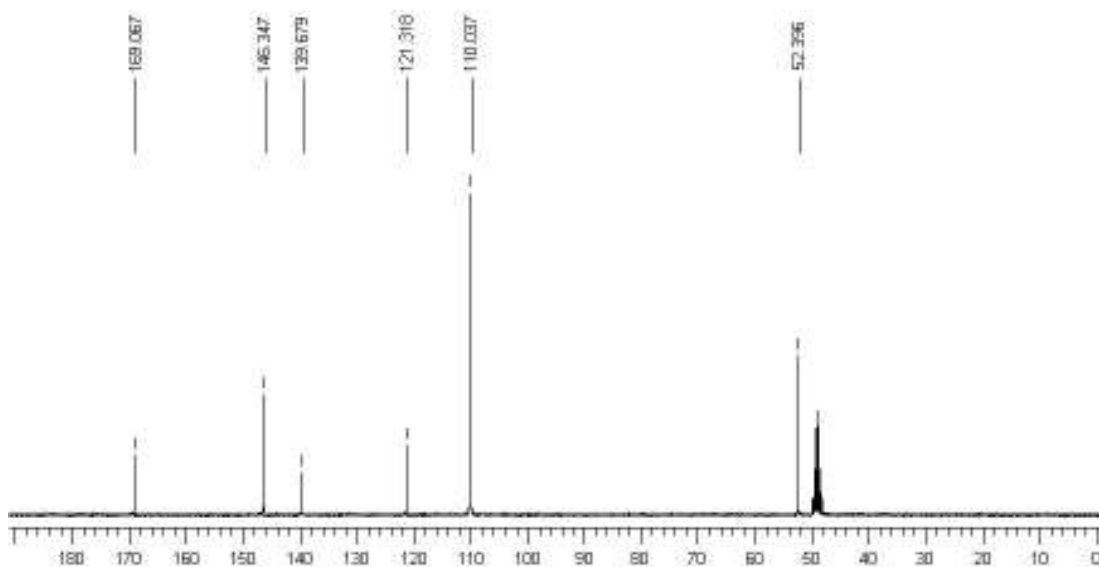
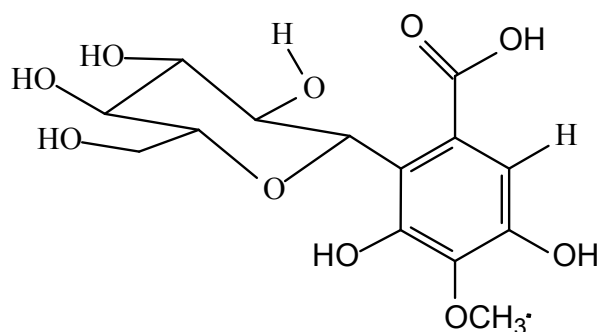


Figura 16. Espectro RMN ^{13}C da substância **CG 2** [CD_3OD , δ (ppm)]

4.3.3 Determinação estrutural de CG1



Ácido 2-C-β-D-glicosil-4-metoxigálico (**CG 1**)

Os espectros de RMN ^1H (Figuras 17 a 19, p 38 e 39) e ^{13}C (Figura 20, p 40), em conjunto com experimentos de DEPT 135° (Figura 21, p 40), de **CG 1** permitiram reconhecer dezoito átomos de hidrogênio e quatorze átomos de carbono. Estes dados, aliados ao íon *quase*-molecular em m/z 327 observado no EM modo APCI (Figura 27, p 42), referente ao íon molecular com perda de uma molécula de água [$\text{M}-\text{H}_2\text{O}$], permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ para esta substância.

A análise do espectro de RMN de ^1H indicou a presença de um singlete em δ 7,07, integrando para 1H, indicativo de hidrogênio ligado a anel aromático. Além disso, pôde-se observar sinais entre δ 3,35-4,09, característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, bem como um dubleto em δ 4,94 ($J= 10,5$ Hz), sugerindo a presença de um açúcar na estrutura deste composto. Pode-se verificar no espectro de RMN ^{13}C a presença de quatorze sinais, sendo que a maioria (picos relativos a carbonos sp^2 e o grupo metoxílico) pôde ser reconhecida como similar ao galato de metila (Tabela 17, p. 46). Neste espectro pôde ser evidenciada a presença de um carbono não hidrogenado em δ 111,0 (C-6). Os sinais de carbonos oxigenados em δ 82,98-62,63 confirmaram a presença de um glicosídeo. O valor do carbono anomérico deste açúcar (δ 74,19) pôde ser identificado através da análise de correlação observada no espectro de HMQC (Figura 22, p 41) e indicou tratar-se de um C-heterosídeo, uma vez que este sinal encontrava-se mais protegido que os sinais observados para os O-Heterosídeos (LEE *et al.*, 2002). Estes dados permitiram propor que **CG 1** tratava-se de um derivado glicosilado do galato de metila.

O espectro de HMBC (Figura 23, p 41) tornou possível a localização deste açúcar na molécula através da correlação do sinal em δ 4,94, referente ao hidrogênio ligado ao carbono

anomérico, com C-2 (δ 117,24). Esta correlação permitiu ainda confirmar a natureza C-heterosídica da substância. O açúcar foi identificado como sendo a β -D-glicose, através de comparação dos dados da parte glicosídica de CG-1 com os descritos na literatura (AGRAWAL, 1989a). Este espectro tornou possível ainda a localização do grupo metoxila, através da correlação do carbono em δ 60,9 com os hidrogênios em δ 3,9 (Fig 24, p. 41). Através do espectro de IV (Fig 26, p. 42) pôde-se confirmar a natureza ácida desta substância, sendo observada a banda em 1709 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O de ácidos carboxílicos (Barbosa, 2007), e a banda referente ao estiramento da ligação O-H entre 3525 e 2650 cm^{-1} . Deste modo, pôde-se concluir que **CG 1** é o ácido 2-C- β -D-glicosil-4-metoxigálico, um novo derivado do ácido gálico. A Figura 25 (p 42) mostra as correlações observadas no espectro HMBC.

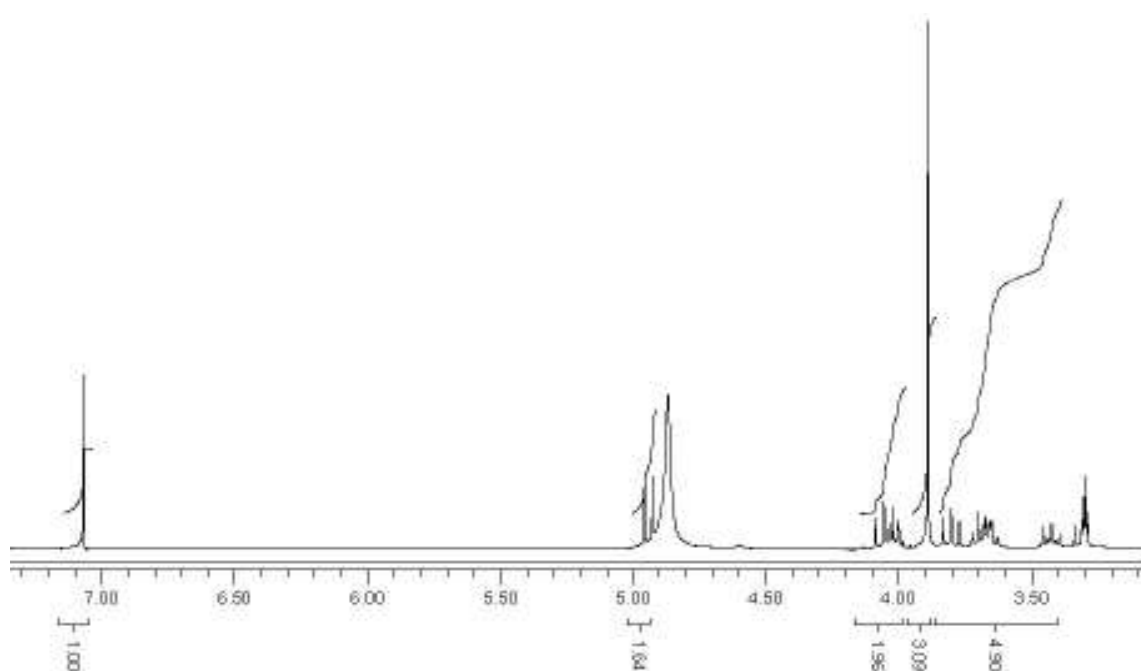


Figura 17. Espectro RMN ^1H da substância **CG 1** [DMSO, δ (ppm)]

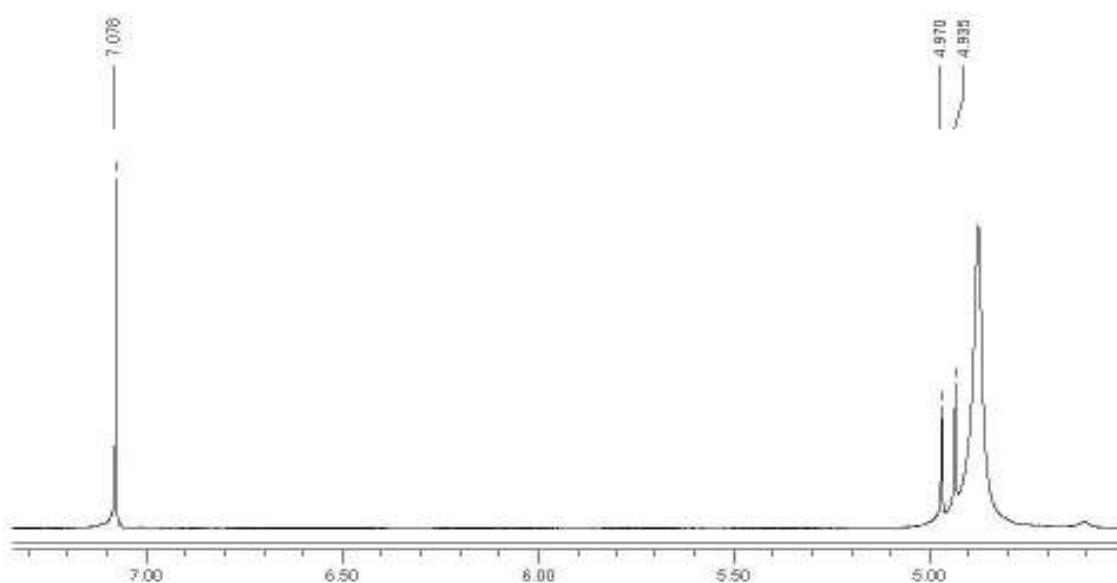


Figura 18. Ampliação do espectro RMN ^1H da substância CG 1 [DMSO, δ (ppm)]

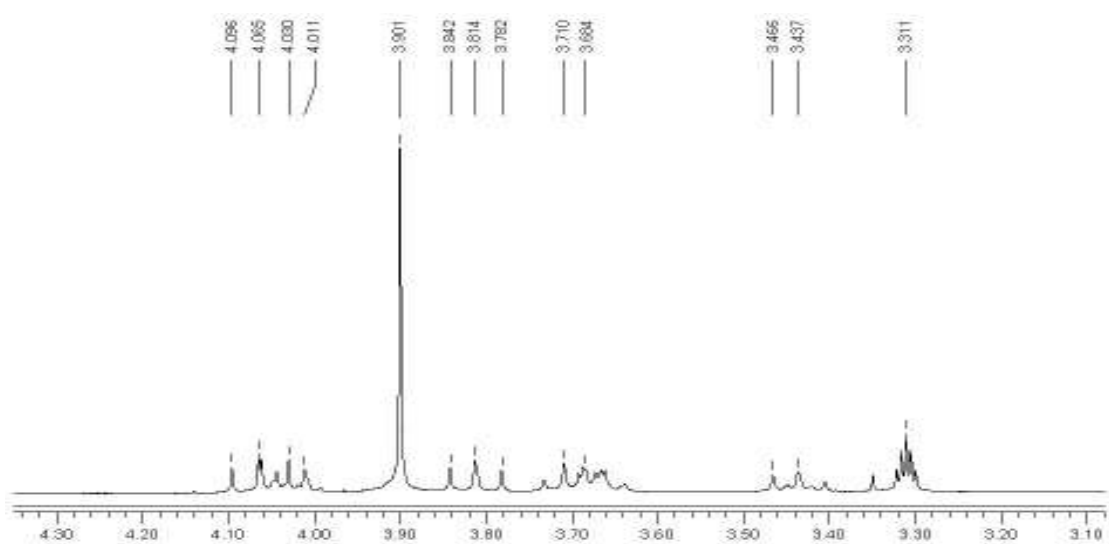


Figura 19. Ampliação do espectro RMN ^1H da substância CG 1 [DMSO, δ (ppm)]

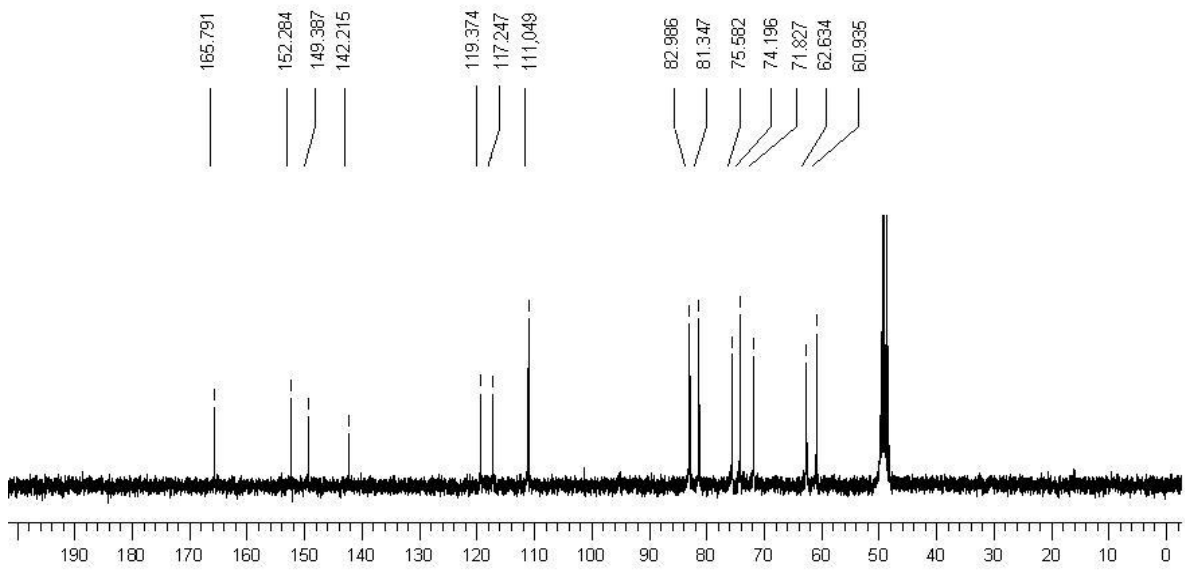


Figura 20. Espectro RMN ^{13}C da substância CG 1 [CD_3OD , δ (ppm)]

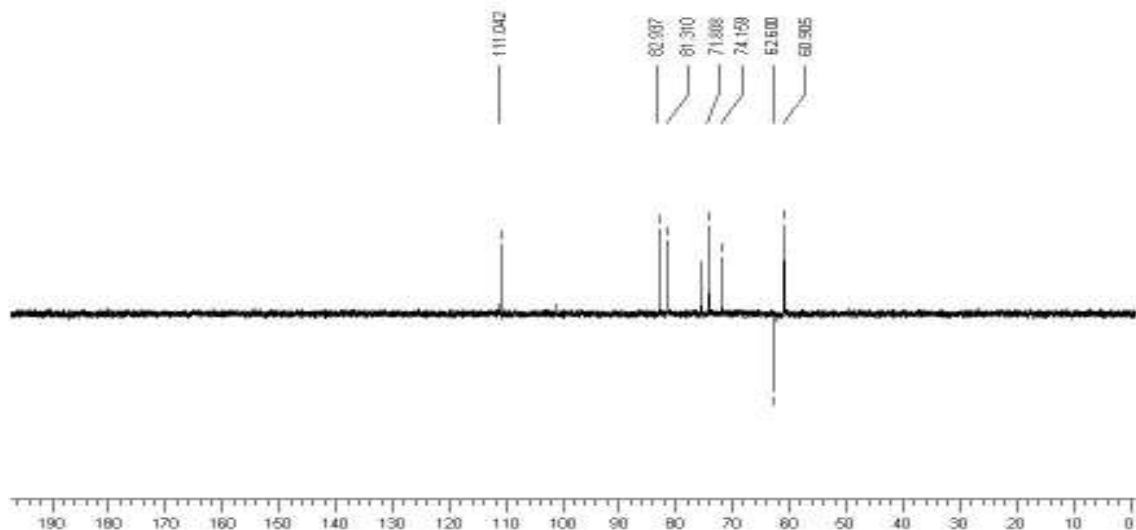


Figura 21. Espectro RMN DEPT 135° da substância CG 1 [CD_3OD , δ (ppm)]

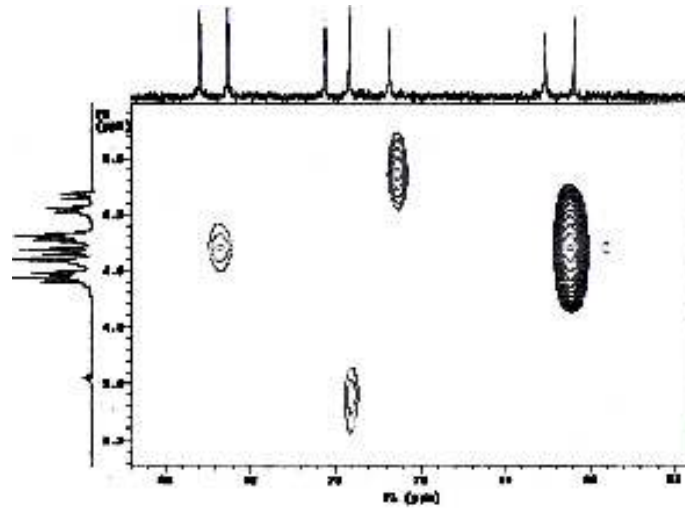


Figura 22. Experimento HMQC de CG 1 [CD₃OD, δ (ppm)]

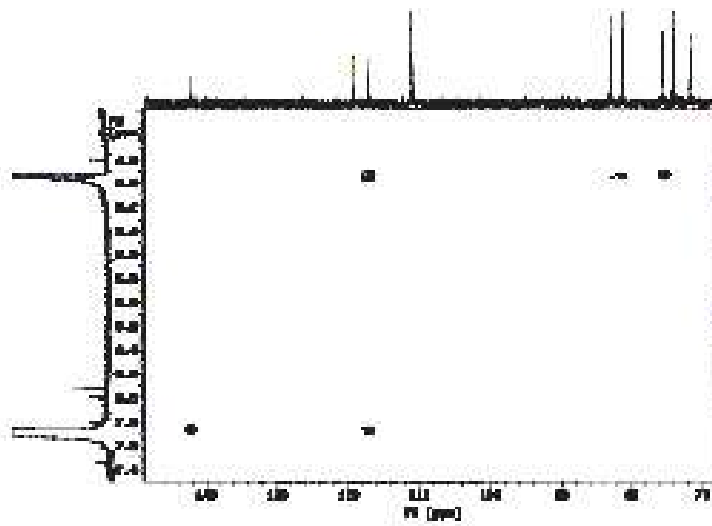


Figura 23. Experimento HMBC de CG 1 [CD₃OD, δ (ppm)]

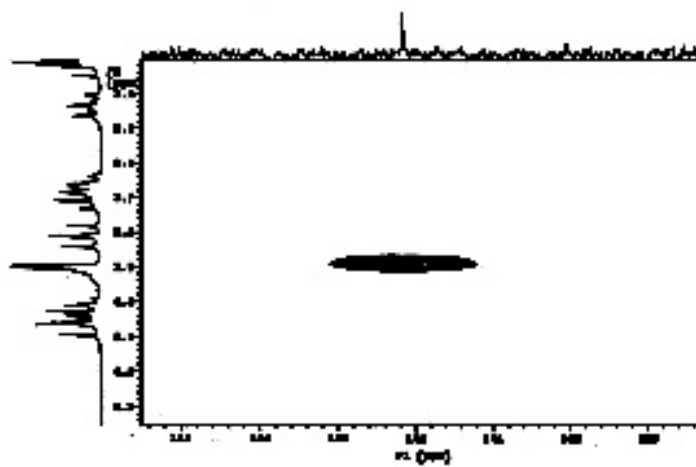


Figura 24. Experimento HMBC de CG 1 [CD₃OD, δ (ppm)]

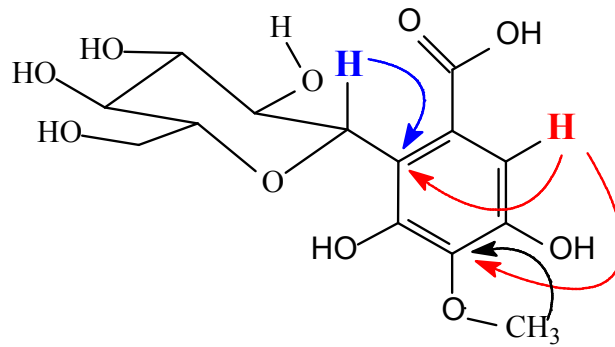


Figura 25: Correlações observadas no espectro HMBC de CG 1

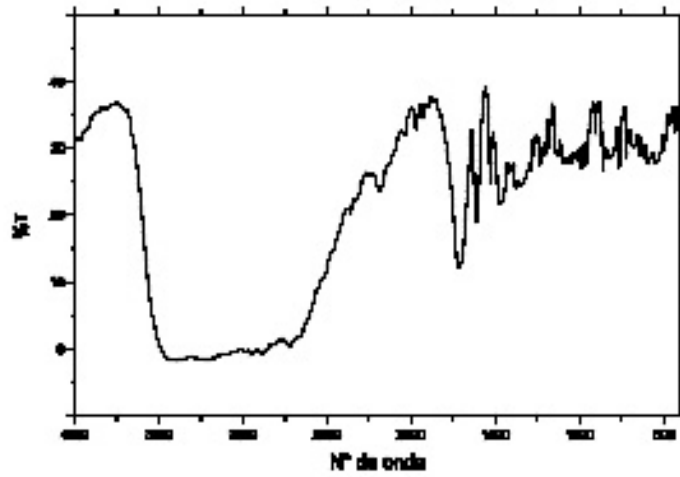


Figura 26. Espectro IV da substância CG 1

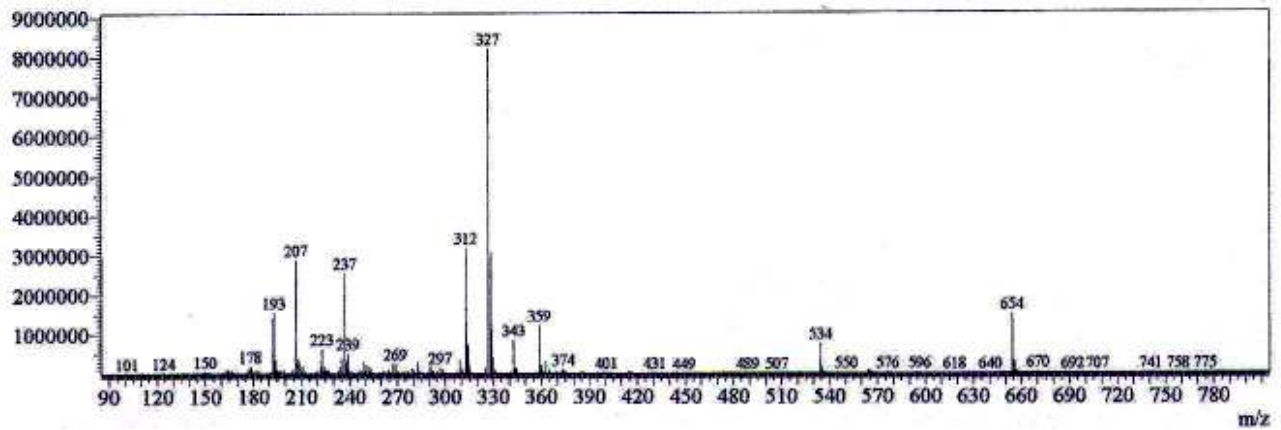


Figura 27. Espectro de Massas da substância CG 1 [APCI]

A ocorrência de metabólitos na forma de glicosídeos requer processos de ataque de unidades de açúcar a um átomo específico da aglicona, para resultar no glicosídeo ou um polissacarídeo. As ligações formadas normalmente tendem a ser através de oxigênio, embora elas não sejam restritas a este átomo, tendo em vista que também são conhecidos *S*-, *N*-, e *C*-glicosídeos.

Considera-se que *C*-glicosídeos são obtidos de maneira similar ao processo envolvido na *C*-alquilação de substâncias naturais, onde um carbono nucleofílico apropriado está disponível, como em sistemas aromáticos ativados por grupos fenólicos nas posições *orto* e *para*. Assim, o *C*-glicosídeo resultante contém a nova ligação carbono-carbono, e para a clivagem desta ligação é necessário processo de oxidação e não redução como ocorre nos *O*-glicosídeos (DEWICK, 2002). A Figura 28 propõe o processo envolvido na formação da substância **CG 1** catalisada enzimaticamente.

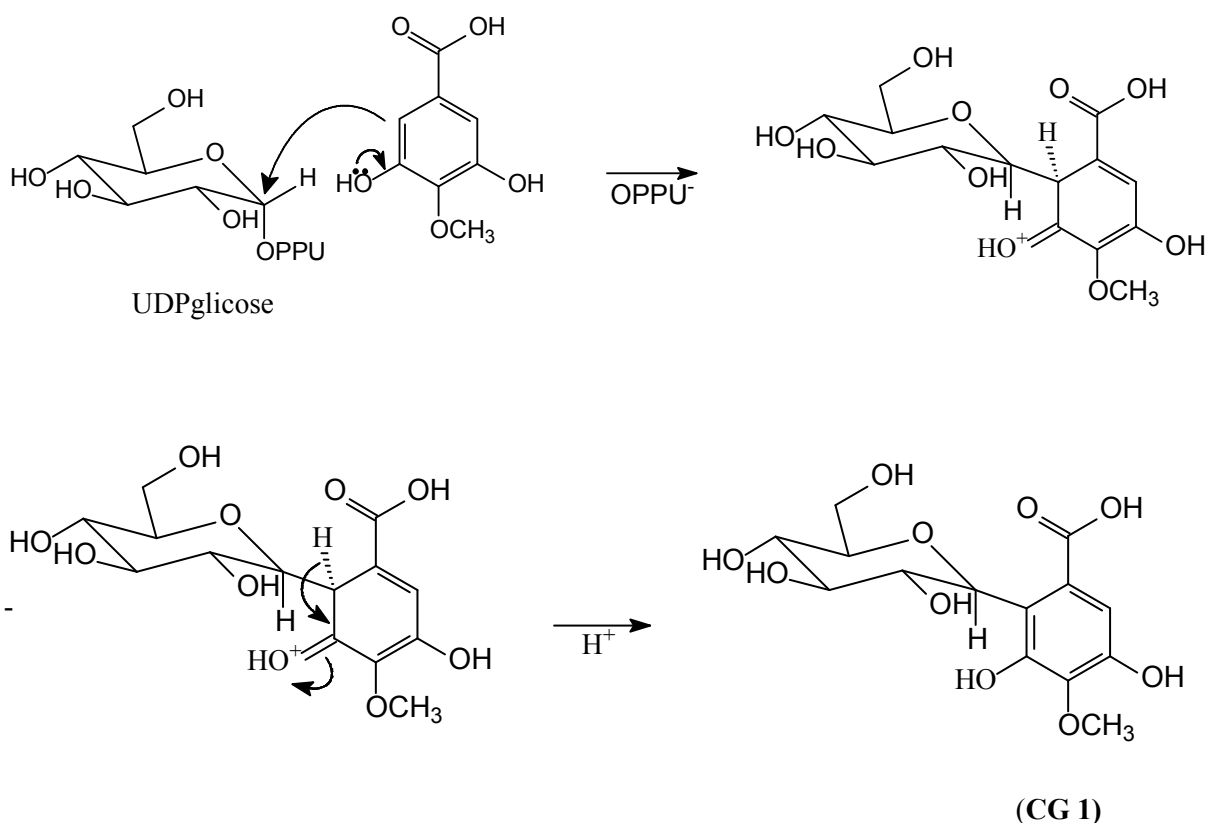
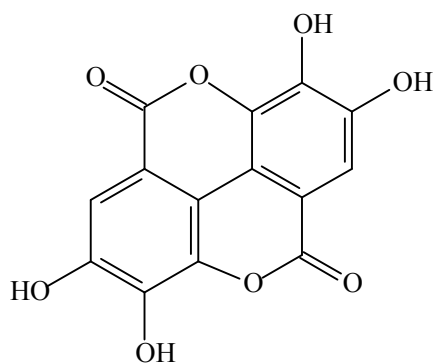


Figura 28: Formação de **CG 1** através da reação de glicosilação.

4.3.4 Identificação de CG-8



Ácido elágico (CG 8)

O ácido elágico (**CG-8**) somente pôde ser identificado pelos dados de RMN de ^{13}C (Figura 30, p 45) e pelo EM (Figura 31, p 45) uma vez que os dados do espectro de RMN ^1H (Figura 29) apresentaram-se similares aos do ácido gálico (Figura 13, p. 35). Assim, pode ser evidenciado no espectro de RMN ^{13}C um sinal em δ 159.10, que é característico de éster cíclico. O EM desta substância mostrou pico de íon *quase*-molecular [M-1] em m/z 301 (pico base), e juntamente com os dados obtidos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C permitiram determinar a fórmula molecular desta substância como sendo $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$. Assim, após comparação direta com os dados descrito na literatura (LI *et al.*, 1999; NAWWAR *et al.*, 1994), pôde-se identificar esta substância como sendo o ácido elágico.

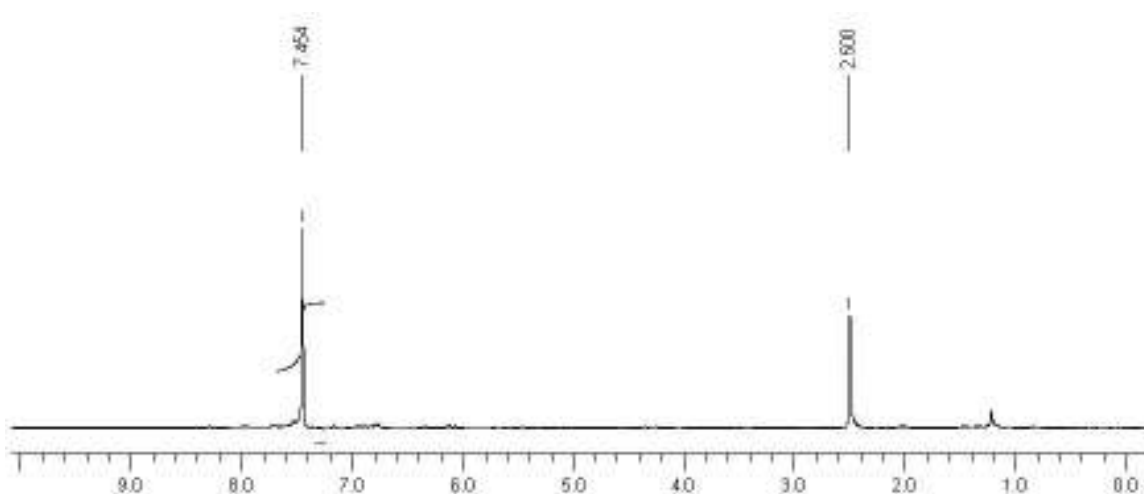


Figura 29. Espectro RMN ^1H da substância CG 8 [DMSO, δ (ppm)]

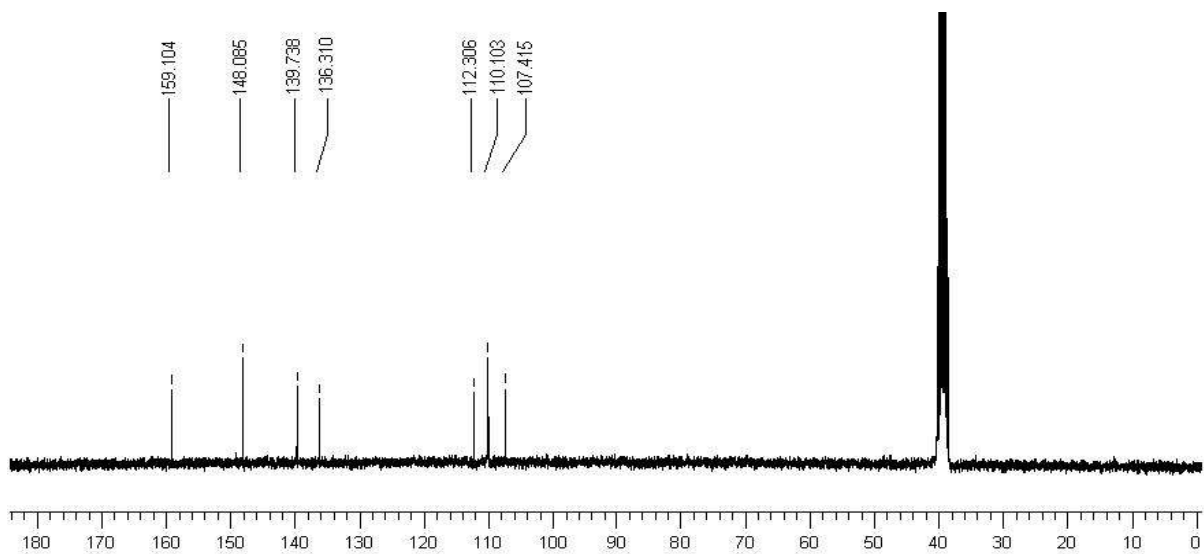


Figura 30. Espectro RMN ^{13}C da substância CG 8 [DMSO, δ (ppm)]

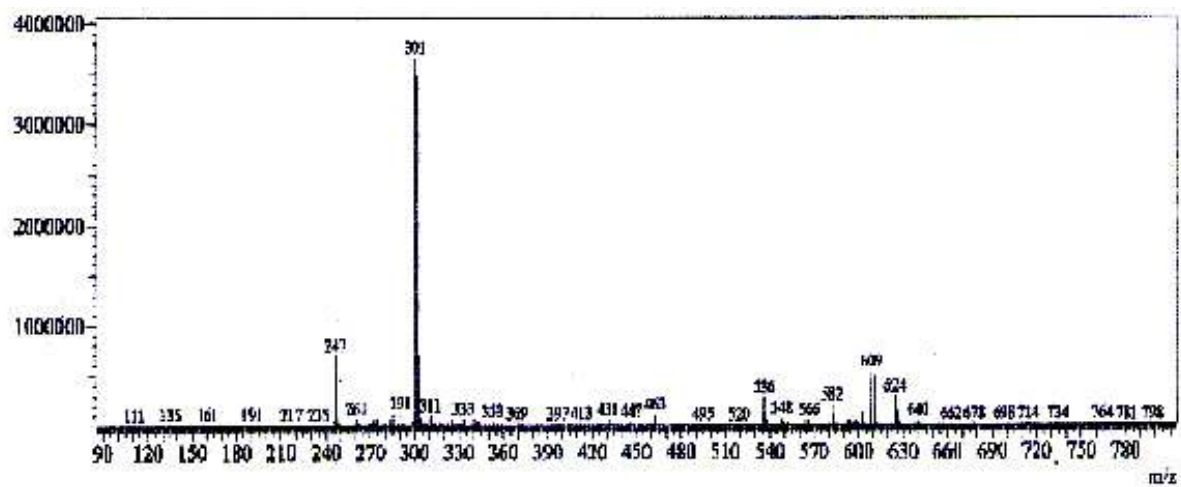


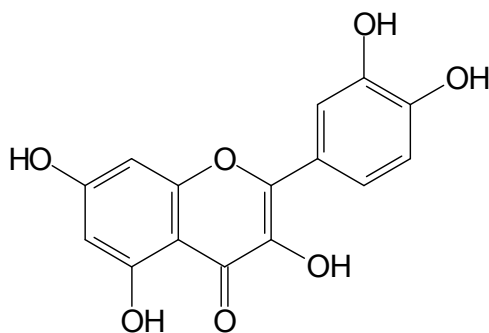
Figura 31. Espectro de Massas da substância CG 8 [APCI]

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) do Ácido gálico e seus derivados obtidos dos extratos de *C. gardnerianum* [(CD_3) $_2\text{CO}$ *, CD_3OD ** , CDCl_3 ***, DMSO ****, δ (ppm), J (HZ)]

Numeração	CG 1**		CG 2***		CG 4*		CG 8****	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	—	119,37	—	121,31	—	122,55	—	112,30
2	—	117,24	7,05 (s)	110,03	7,11 (s)	110,99	—	136,31
3	—	152,28	—	146,34	—	146,80	—	139,73
4	—	142,21	—	139,67	—	139,70	—	148,08
5	—	149,38	—	146,34	—	146,80	7,45 (s)	110,10
6	7,07 (s)	111,04	—	110,03	—	110,99	—	107,41
7	—	165,79	—	169,06	—	169,56	—	159,10
1'	4.95 (d) 10,5	74,19	—	—	—	—	—	112,30
2'	3,35-4,09 (m)	75,58	—	—	—	—	—	136,31
3'	3,35-4,09 (m)	81,34	—	—	—	—	—	139,73
4'	3,35-4,09 (m)	71.82	—	—	—	—	—	148,08
5'	3,35-4,09 (m)	82,98	—	—	—	—	7,45 (s)	110,10
6'	3,35-4,09 (m)	62,63	—	—	—	—	—	107,41
7'	—	—	—	—	—	—	—	159,10
OCH_3	3,91 (s)	60,93	3,79 (s)	52,39	—	—	—	—

4.4 Identificação de flavonóis

4.4.1 Identificação de CG 3



Quercetina (CG 3)

A quercetina (CG 3) foi identificada através dos sinais característicos de flavonol, observados no espectro de RMN de ^1H (Figuras 32 e 33, p 48). Pôde ser evidenciado, neste espectro, um sistema de spins do tipo AMX. Os dois dubletos integrando para 1H cada, além do duplo dubleto observado, são indicativos deste sistema e puderam ser atribuídos aos H-2', H-5' e H-6' do anel B da quercetina, respectivamente. Puderam ser observados ainda, dois dubletos em δ 6,18 e 6,39 com ($J= 1,2$ Hz), integrando para um hidrogênio cada, característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A do flavonol, respectivamente (Tabela 18, p. 66).

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 34, p 49) e DEPT 135° (Figura 35, p 49) pôde-se também verificar a presença de carbonos característicos deste flavonol, como o sinal de carbono carbonílico em δ 177,29 referente ao C-4, e os dois sinais de carbonos não hidrogenados em δ 137,22 e δ 147,96 referentes aos C-3 e C-2, além dos carbonos não hidrogenados em δ 146,19 e 148,74 atribuídos aos C-3' e C-4', respectivamente.

O espectro de massas (Figura 36, p 49) desta substância apresentou íon *quase*-molecular [M-1] em m/z 301 (pico base), e juntamente com os dados descritos na literatura (AGRAWAL, 1989b; HARBONE, 1982), permitiram confirmar a estrutura de CG 3, que foi identificada como sendo a quercetina.

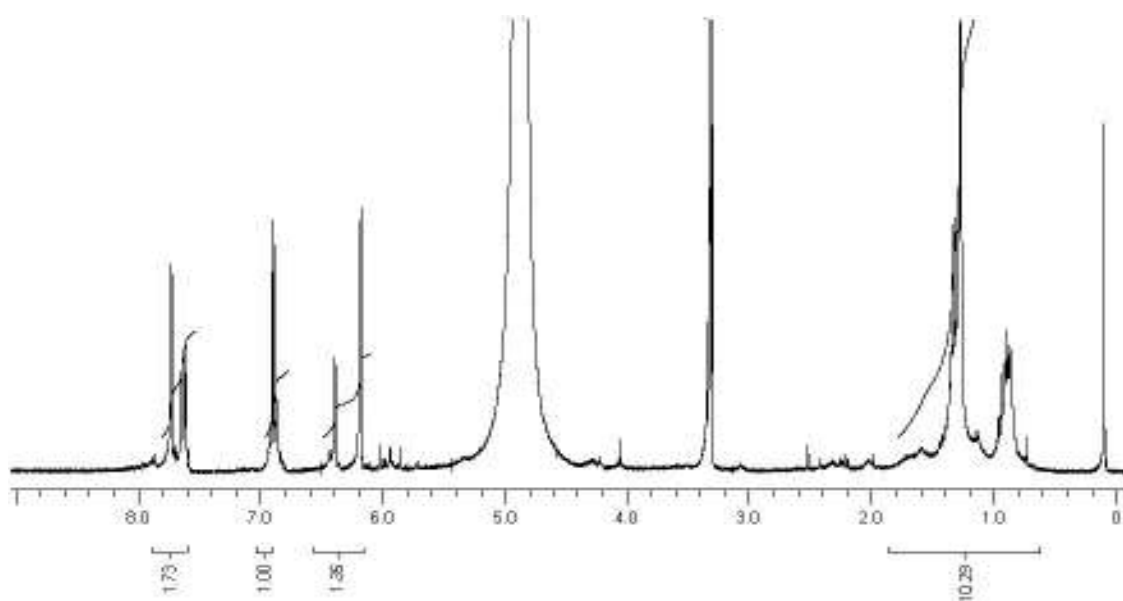


Figura 32. Espectro RMN de ^1H da substância CG 3 [CD_3OD , δ (ppm)]

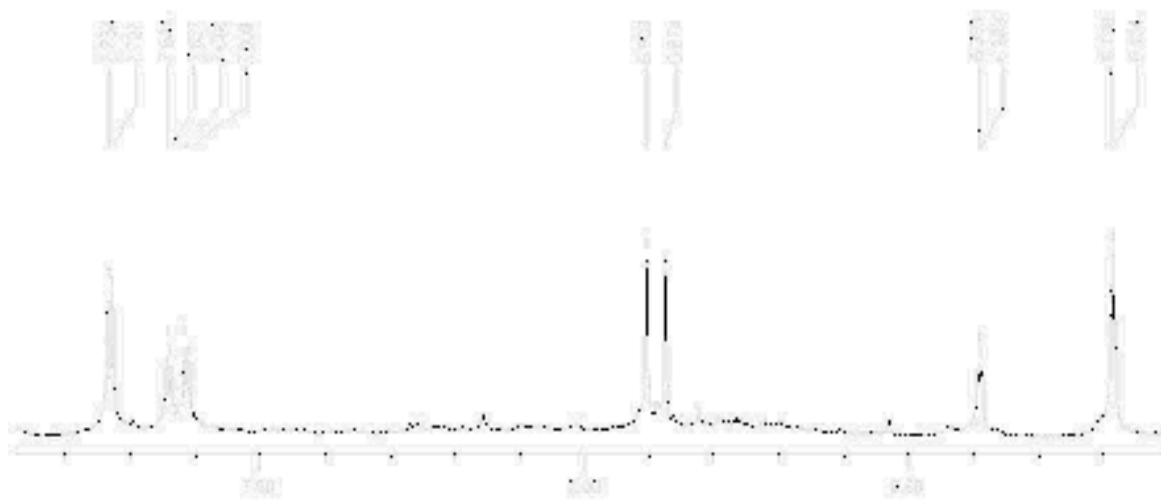


Figura 33. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 3 [CD_3OD , δ (ppm)]

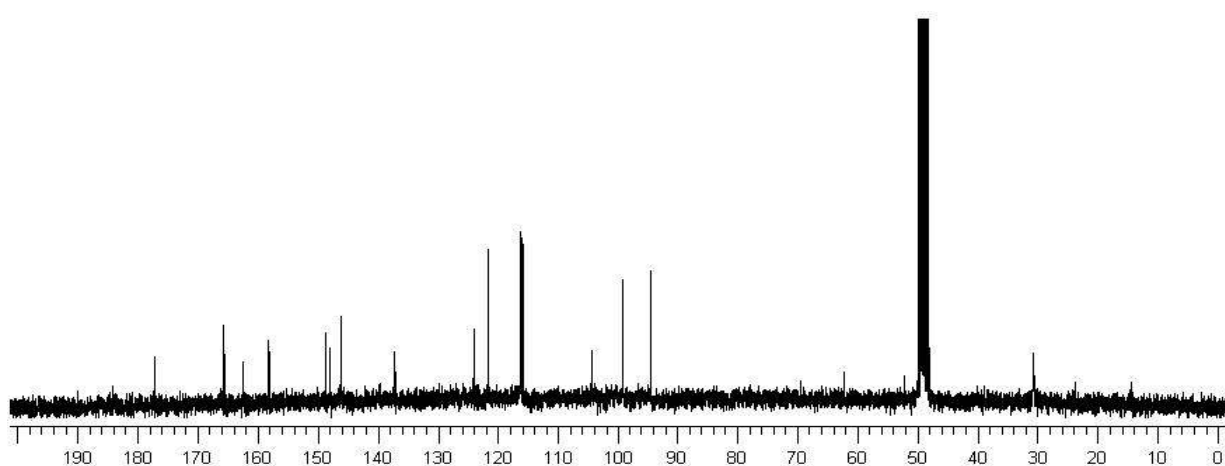


Figura 34. Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 3 [CD_3OD , δ (ppm)]

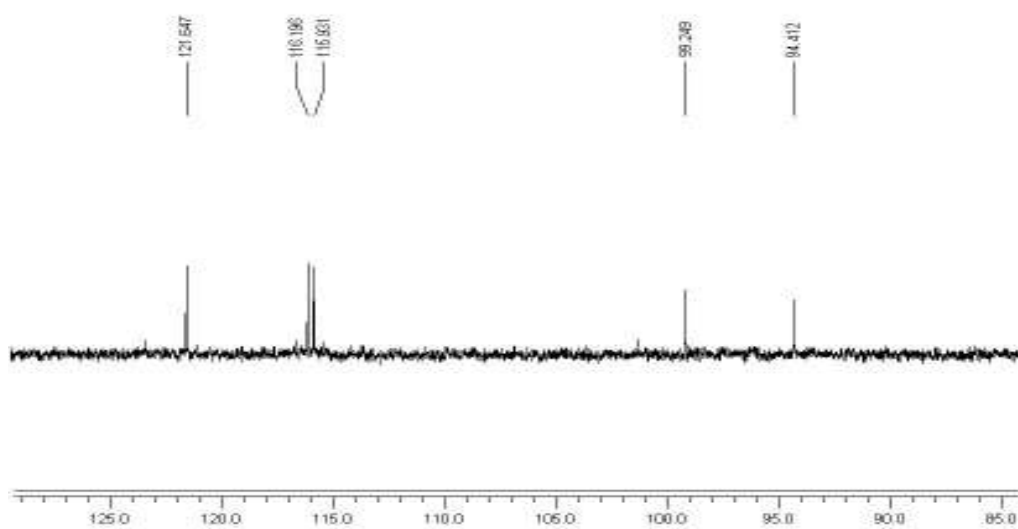


Figura 35. Espectro DEPT 135° da substância CG 3 [CD_3OD , δ (ppm)]

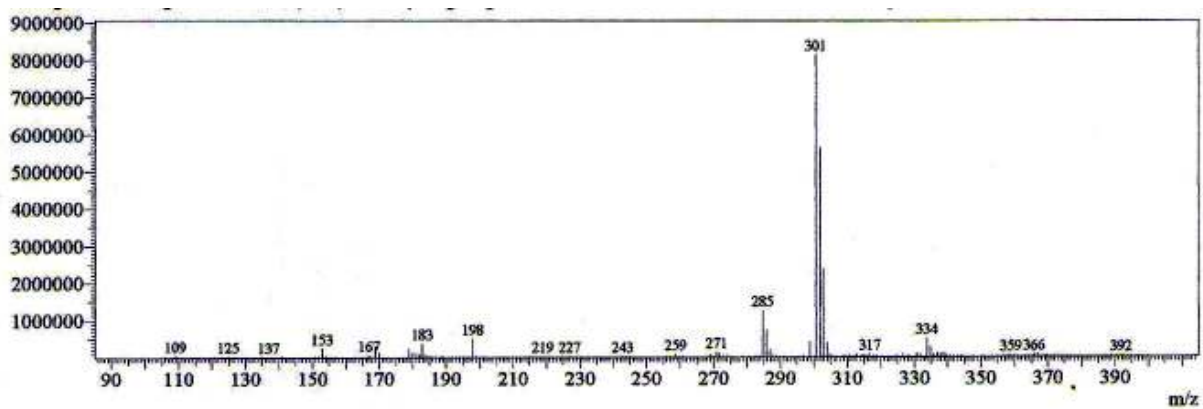
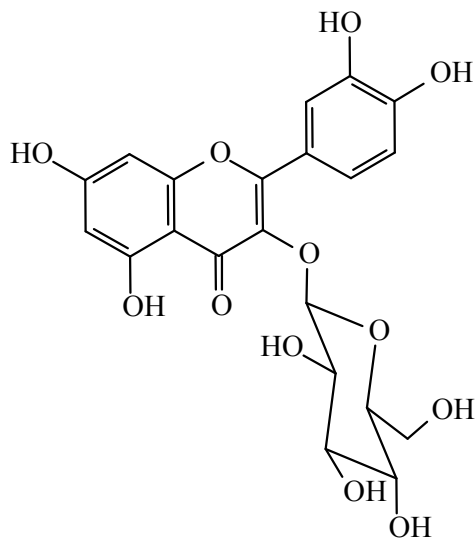


Figura 36. Espectro de Massas da substância CG 3 [APCI]

4.4.2 Identificação de CG-6



Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (CG 6)

A substância **CG 6** apresentou no espectro de massas (Figura 47, p 55) o íon *quase*-molecular [M-1] em m/z 463 (pico base), e juntamente com os dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 40 a 43, p 52-54), e RMN de ^1H (Figuras 37 a 39, p 51-52) pôde-se atribuir a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ para esta substância.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região entre (δ 7,50-6,165) similares aos hidrogênios H-2', H-6', H-5', H-8 e H-6, ligados aos carbonos aromáticos da quercetina. Este espectro revelou ainda sinais na região entre (δ 3,24-3,61), característicos para hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, e um dubleto em δ 5,215 ($J= 7,2$ Hz), característico de hidrogênio anomérico de um β -glicosídeo. Esses sinais sugeriram que **CG 6** tratava-se de um flavonol glicosilado.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C corroborou com a proposta da natureza glicosídica de **CG 6**. Assim, foi possível verificar que, além daqueles sinais similares aos observados para a substância **CG 3** (quercetina), a presença de cinco sinais adicionais de carbonos oxigenados na região entre δ 62,5-78,0, bem como um sinal em δ 104,42 correspondente ao carbono oximetínico anomérico da unidade de açúcar. A unidade osídica foi identificada como sendo a glicose, pela presença do carbono oximetilênico em δ 62,5 referente ao C-6'' e comparação com dados da literatura para este glicosídeo (AGRAWAL, 1989c). Análise do espectro HMQC (Figura 44, p 54) permitiu identificar o carbono anomérico através da correlação direta do hidrogênio em δ 5,21 ($J= 7,2$ Hz) com o carbono

em δ 104,42. A posição da ligação glicosídica foi determinada a partir da análise do espectro HMBC (Figuras 45, p 54), que apresentou uma correlação entre o hidrogênio ligado ao carbono anomérico em δ 5,21 ($J= 7,2$ Hz) com o carbono C-3 em δ 135,59 da aglicona (Figura 46, p 55). Além disso, comparação dos dados obtidos como os descritos na literatura para a quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (HARBONE, 1982) indicou que se tratava da mesma substância.

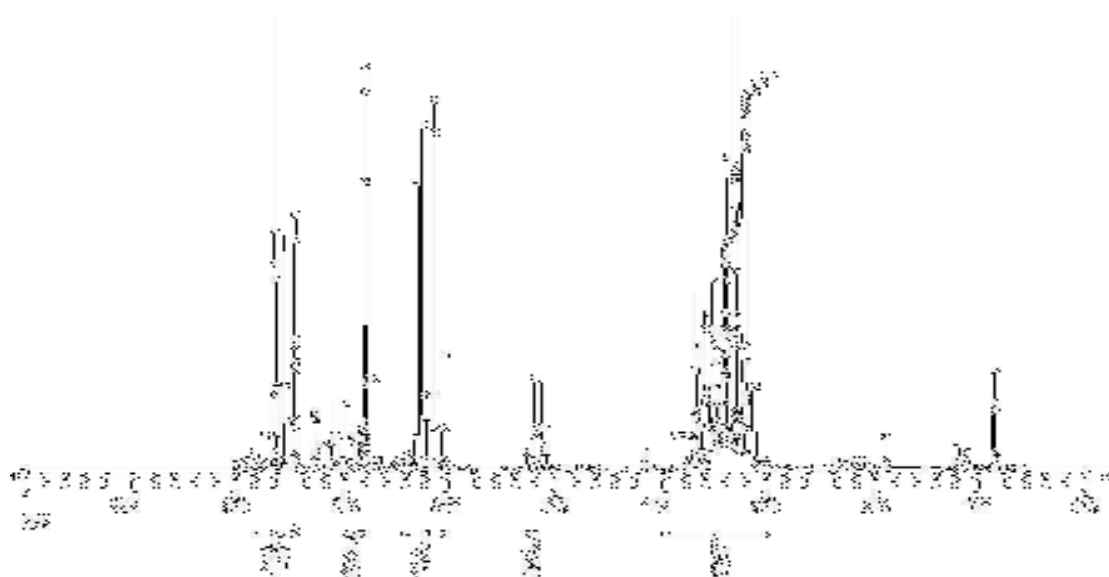


Figura 37. Espectro RMN de ^1H da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

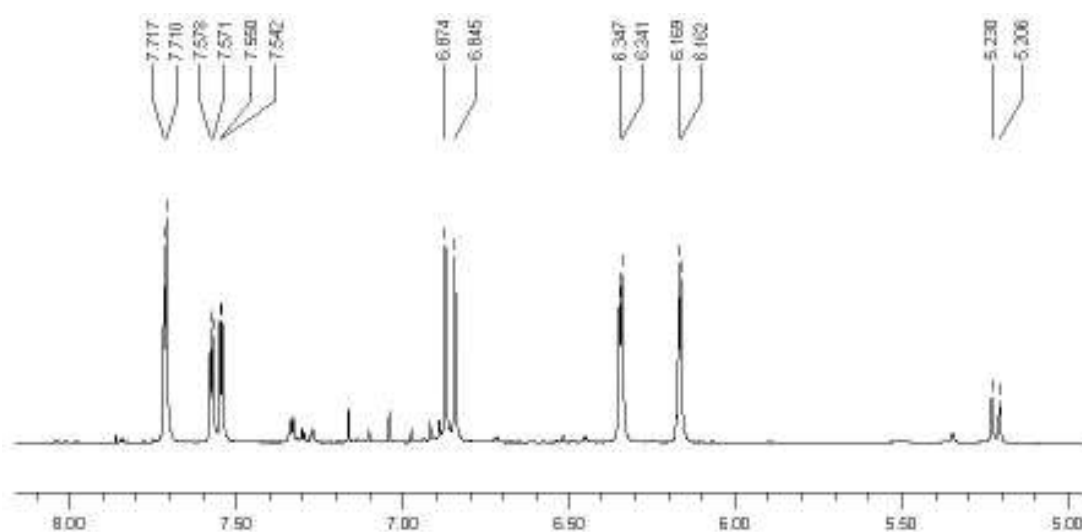


Figura 38. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

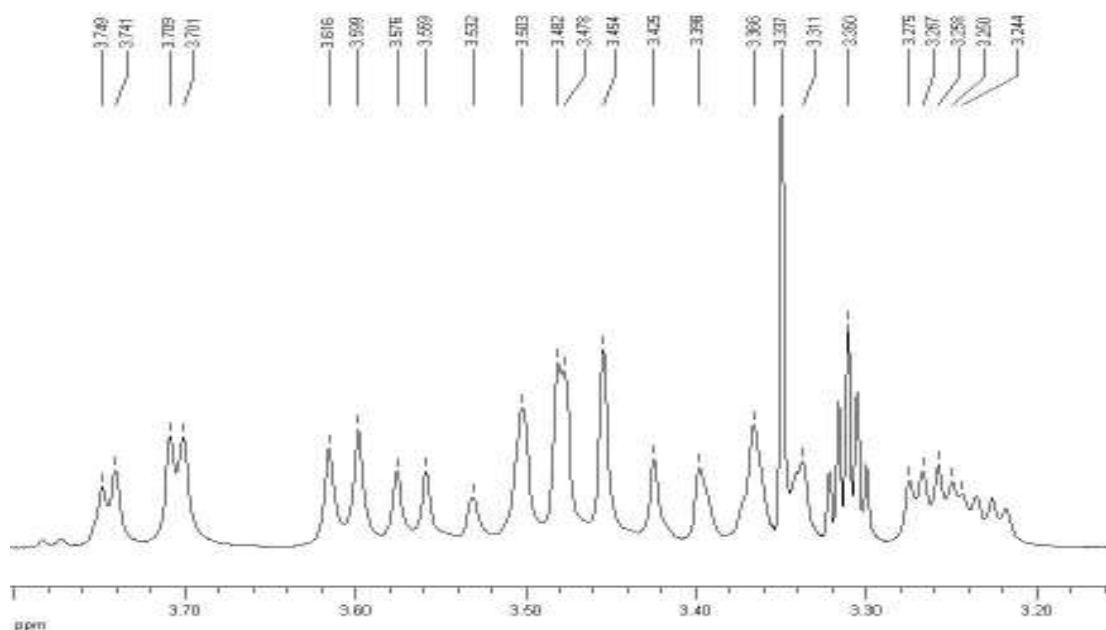


Figura 39. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

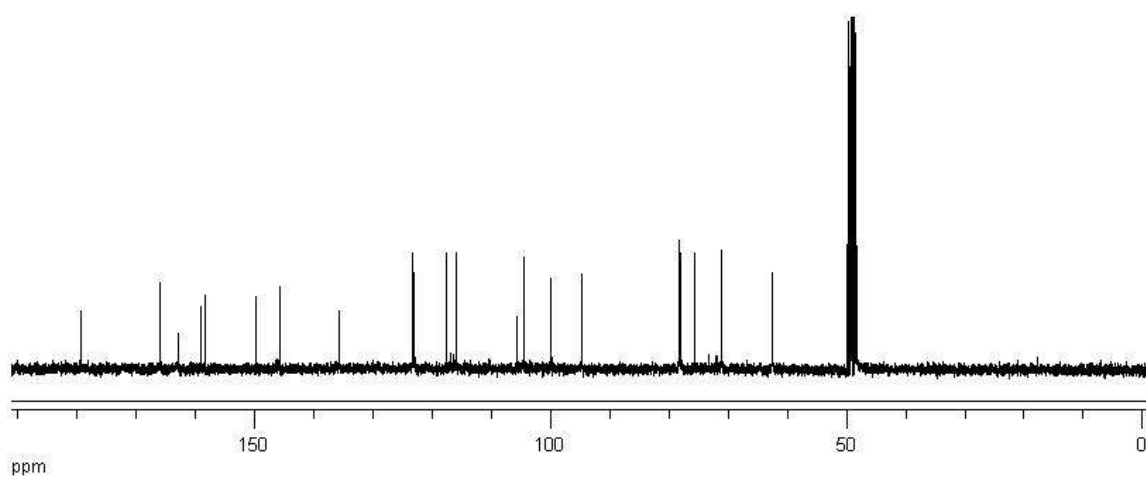


Figura 40. Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

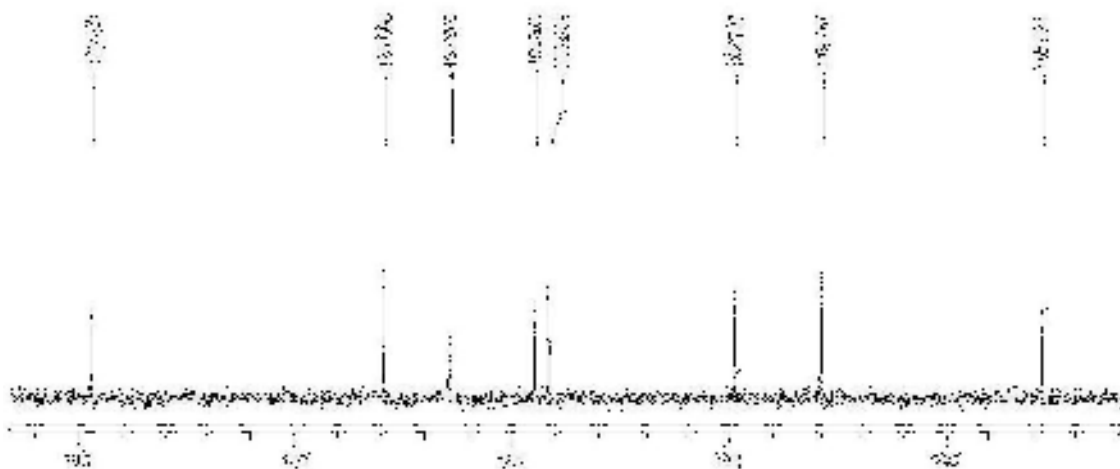


Figura 41. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

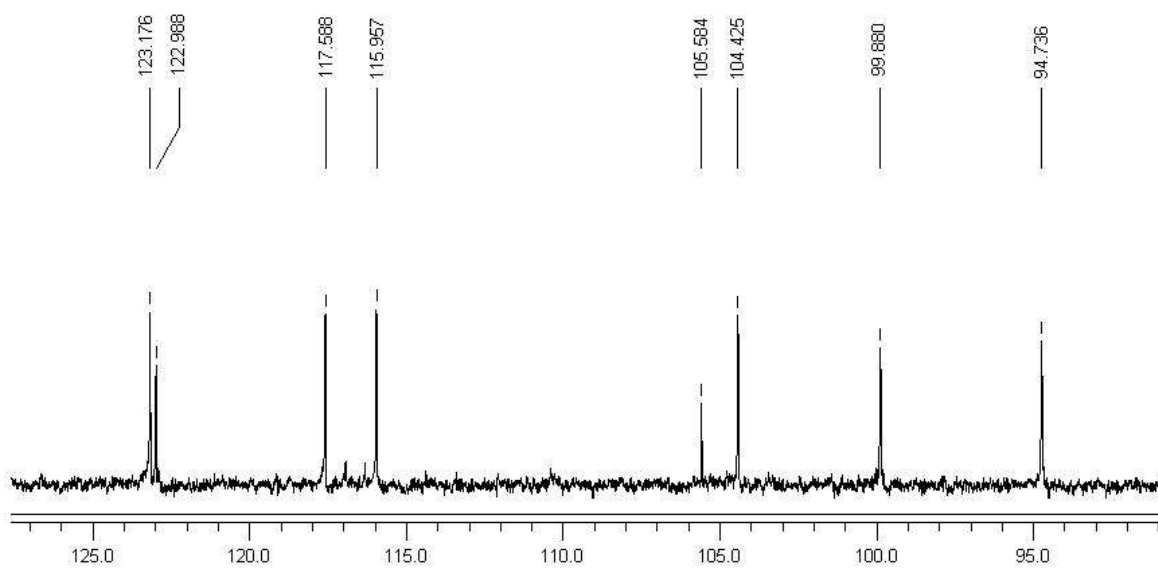


Figura 42. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

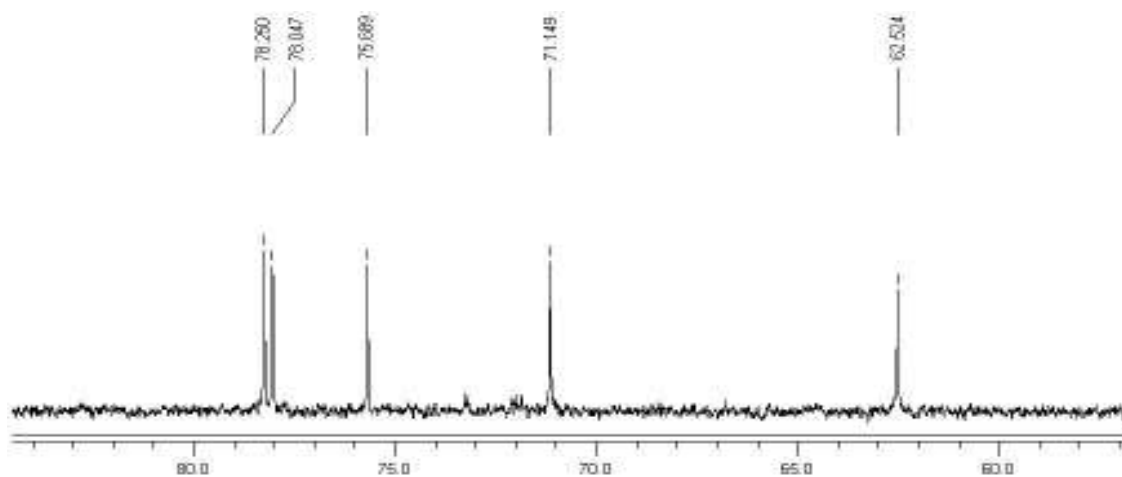


Figura 43. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

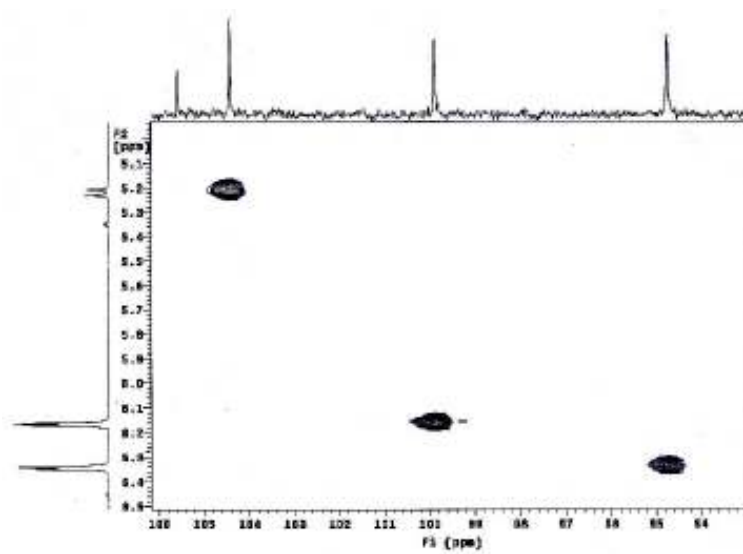


Figura 44. Experimento HMQC de CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

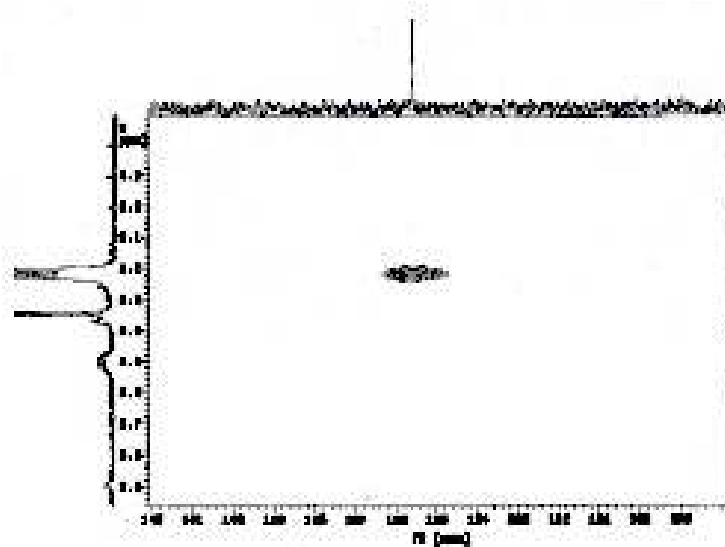


Figura 45. Experimento HMBC de CG 6 [CD_3OD , δ (ppm)]

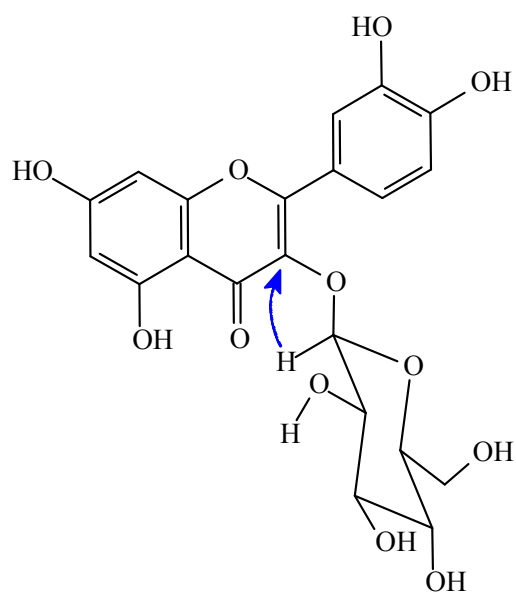


Figura 46: Correlação observada no espectro HMBC de **CG 6**

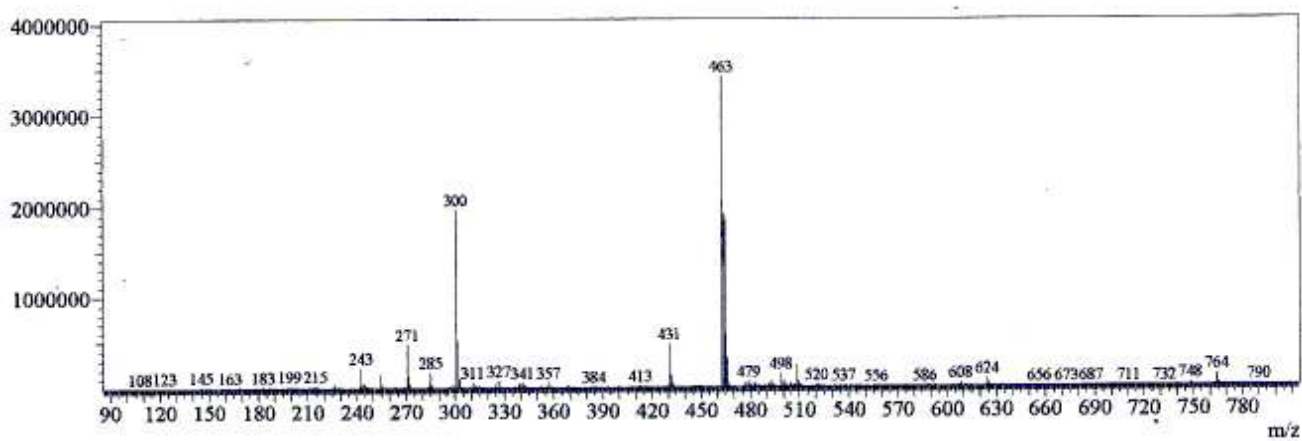
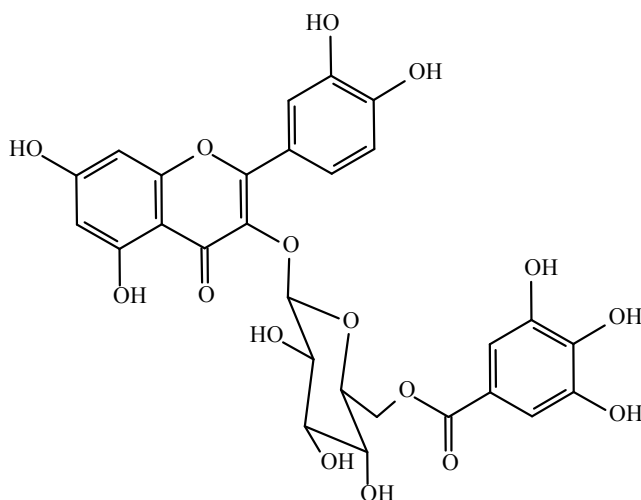


Figura 47. Espectro de Massas da substância **CG 6** [APCI]

4.4.3 Identificação de CG7



Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -D-glicopiranosídeo (**CG 7**)

O EM (Figura 56, p 60) da substância **CG 7** apresentou sinal do íon *quase*-molecular [M-1] em m/z 615 (pico base), e juntamente com os dados obtidos dos espectros RMN de ^1H (Figuras 48 a 50, p 57 e 58), de ^{13}C (Figuras 51 a 54, p 58 e 59) e DEPT 135° (Figura 55, p 60) pôde-se atribuir a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_{16}$ para esta substância.

O espectro de RMN de ^1H desta substância apresentou, além de sinais similares aos da quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**CG 6**), um singlete em δ 6,94 integrando para dois hidrogênios, similar ao observado para os hidrogênios H-2' e H-6' do anel aromático do ácido gálico.

O espectro RMN de ^{13}C mostrou a presença de vinte e seis sinais de carbono, sendo vinte e um deles similares à substância **CG 6** e cinco ao ácido gálico. Observou-se também que o sinal para o H-6'' estava mais desprotegido que o apresentado em **CG 6** cerca de $\Delta\delta$ 1,83, indicando a presença de um grupo ligado em C-6'', provocando deslocamento deste sinal para campo mais baixo. Através de comparação com os dados da literatura (MASUDA *et al.* 2001), pôde-se chegar à conclusão que a substância **CG 7** tratava-se da quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -D-glicopiranosídeo.

A Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -D-glicopiranosídeo foi isolada pela primeira vez da espécie *Tellima grandiflora* (Saxifragaceae) sendo denominada de Tellimosídeo (COLLINS *et al.*, 1975). Foi também encontrada nos gêneros *Quercus* (Fagaceae) (ROMUSSI, *et al.*, 1982), *Juniperus* (Cupressaceae) (LAMER-ZARAWSKA, 1983) e *Baseonema*

(Asclepiadaceae) (DE LEO *et al.*, 2004), porém ainda não há registros na literatura sobre sua identificação em espécies da subfamília Caesalpiniaceae.

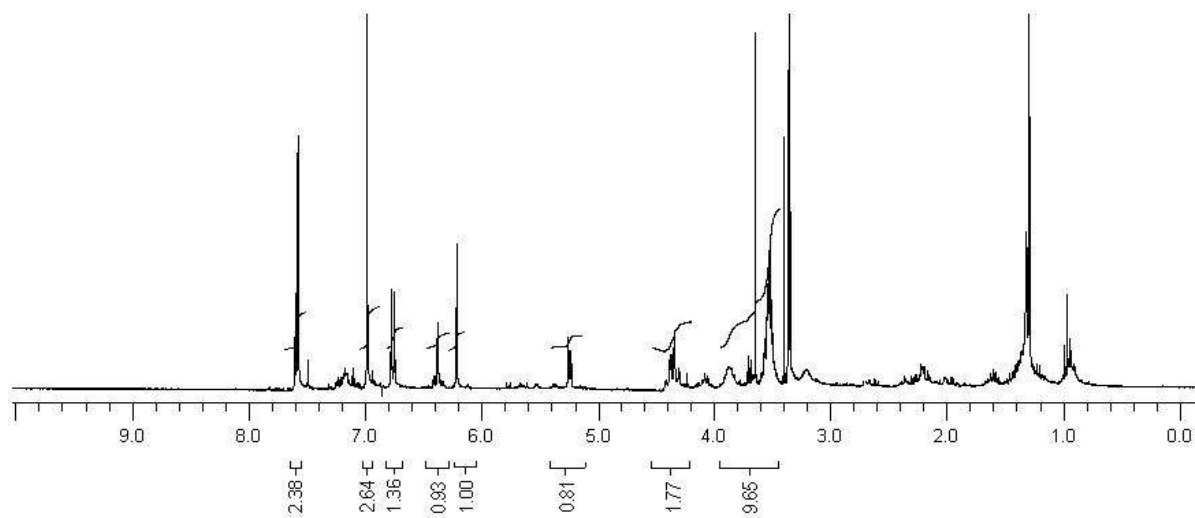


Figura 48. Espectro RMN de ^1H da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)]

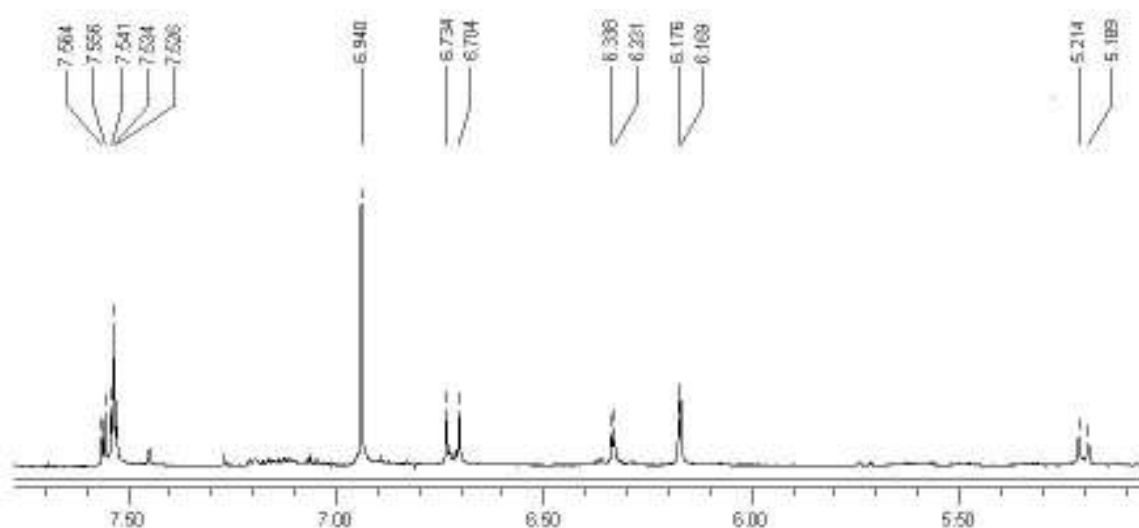


Figura 49. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)]

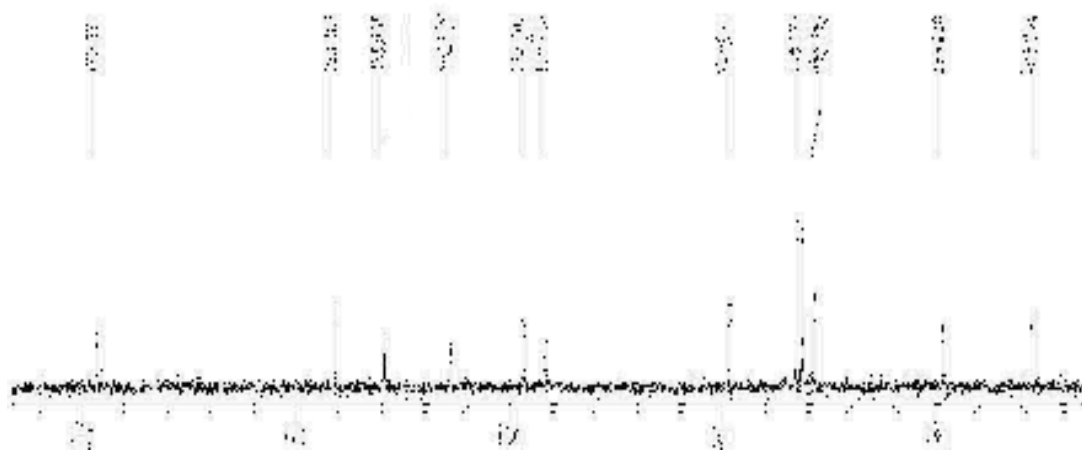


Figura 52. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)]

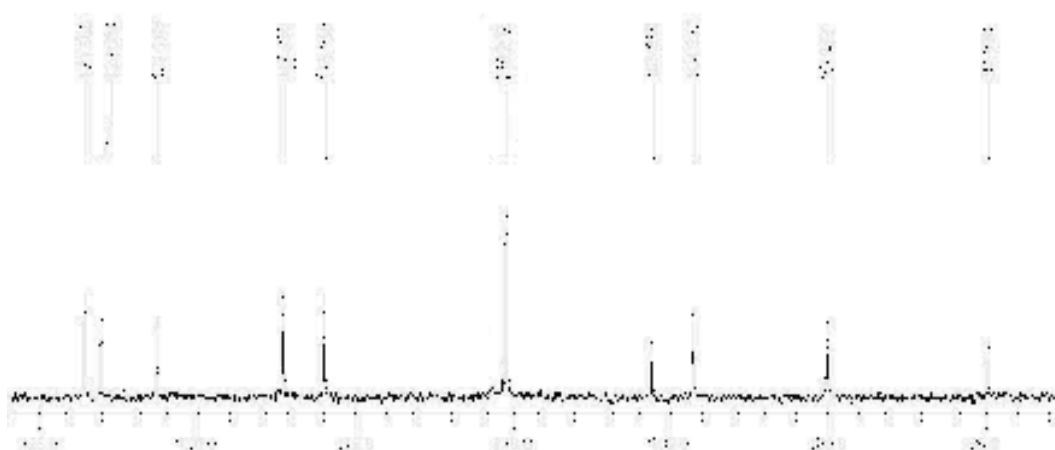


Figura 53. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)]

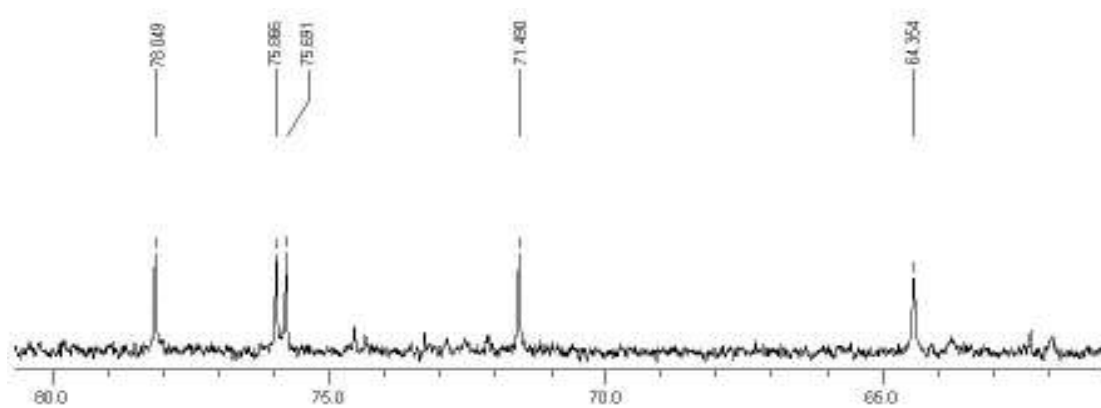


Figura 54. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 7 [CD_3OD , δ (ppm)]

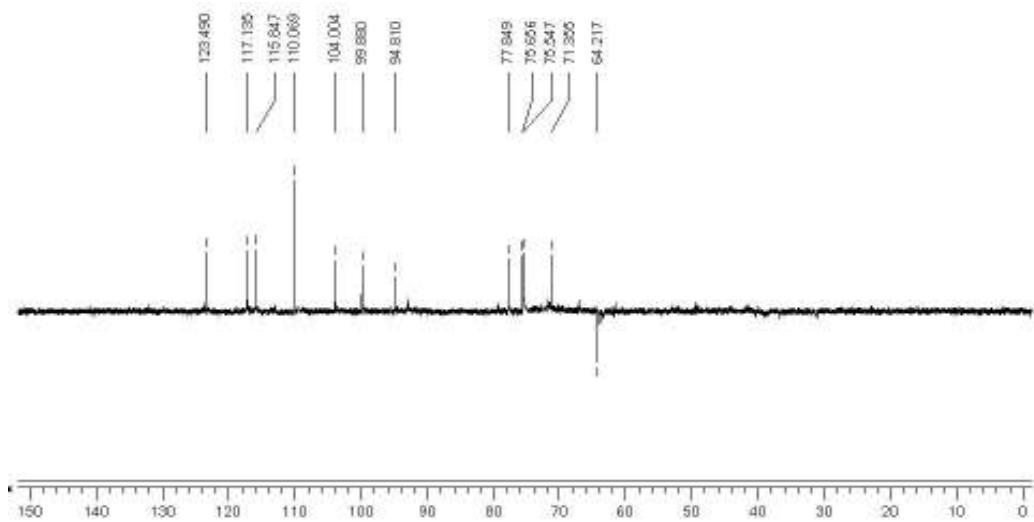


Figura 55. Espectro DEPT 135° da substância CG 7 [CD₃OD, δ (ppm)]

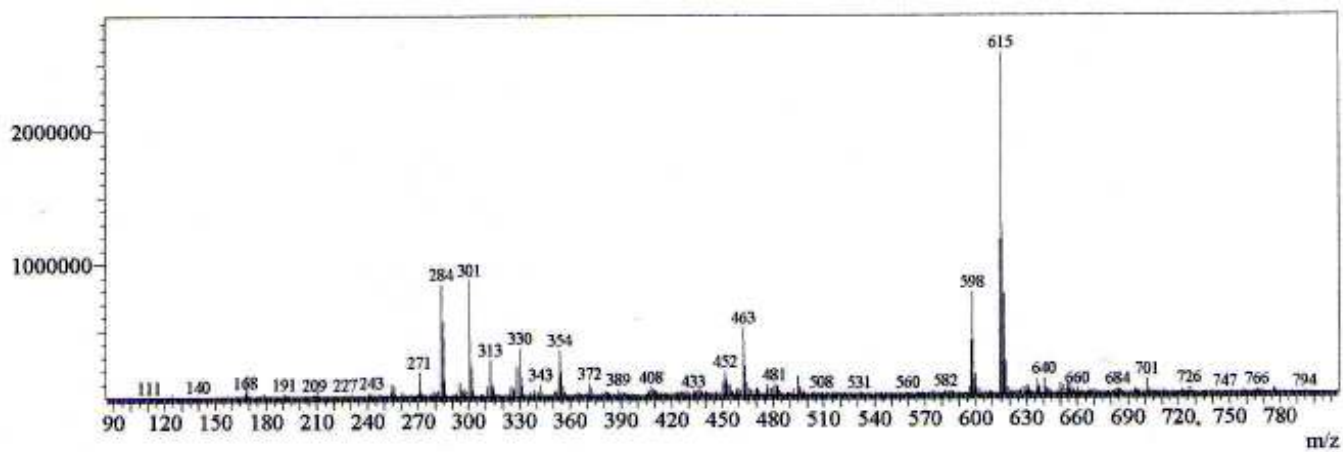
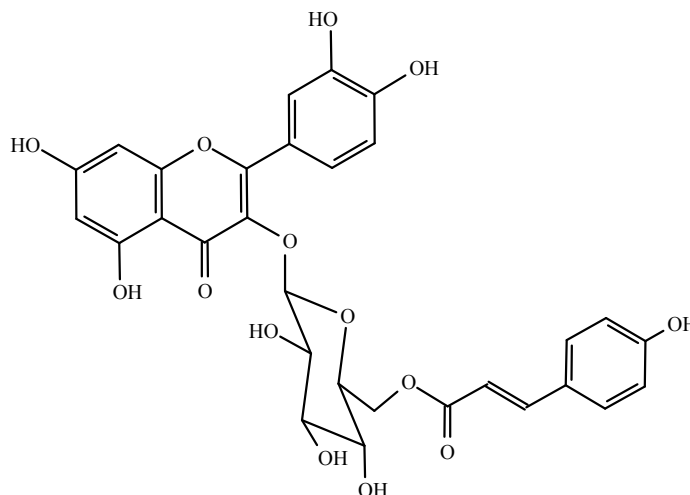


Figura 56. Espectro de Massas da substância CG 7 [APCI]

4.4.4 Identificação de CG 10



Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo (**CG 10**)

Análise do EM (Figura 65, p 65) da substância **CG 10** mostrou pico do íon *quase*-molecular em m/z 609 (pico base), e aliando aos obtidos pelos espectros RMN de ^1H (Figuras 57 a 59, 62 e 63), de ^{13}C (Figuras 60 a 63, p 63 e 64) e DEPT 135° (Figura 64, p 65), pôde-se atribuir a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{14}$ a esta substância.

No espectro de RMN de ^1H observa-se sinais similares aos apresentados nos espectros da quercetina glicosilada (**CG 6**), além de dois dubletos em δ 6,79 e δ 7,29 integrando para dois hidrogênios cada, com $J = 8,7$ Hz, característico de acoplamento orto em anel aromático dissustituído. Além disso, observou-se dois dubletos em δ 6,06 e δ 7,39 com $J = 15,9$ Hz característico de hidrogênios olefinicos com configuração *E*, em sistema carbonílico α , β insaturado.

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de trinta sinais de carbono, dentre eles vinte e um sinais similares aos da quercetina glicosilada (Figura 40, p. 52). Além destes sinais, observa-se um sinal em δ 146,53 referente a carbono olefínico, confirmado pelo experimento DEPT, característico de carbono β carbonílico (SILVERSTEIN, & WEBSTER, 2000). O sinal apresentado para o açúcar C-6'' mostrou-se mais desprotegido que para a substância **CG 6**, sugerindo uma substituição neste carbono. Em comparação com dados da literatura (SILVA *et al.*, 2006) o substituinte em O-6'' foi identificado como *E-p*-cumaroila, sendo a substância **CG 10** identificada como quercetina-3-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo.

A Quercetina-3-O-(6''-O-E-p-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo foi isolada pela primeira vez na espécie *Helichrysum kraussii* (Asteraceae) (CANDY & WRIGHT, 1975) recebendo o nome de Helichrysosídeo. Foi isolada também em outros gêneros, tais como: *Pinus* (Araucariaceae) (BENINGER & ABOU-ZAID, 1997); *Crocus* (Iridaceae) (SONG, 1990) e *Melastoma* (Magnoliopsida) (CHENG, *et al.*, 1990), porém não existem relatos sobre o isolamento desta substância na família Leguminosae.

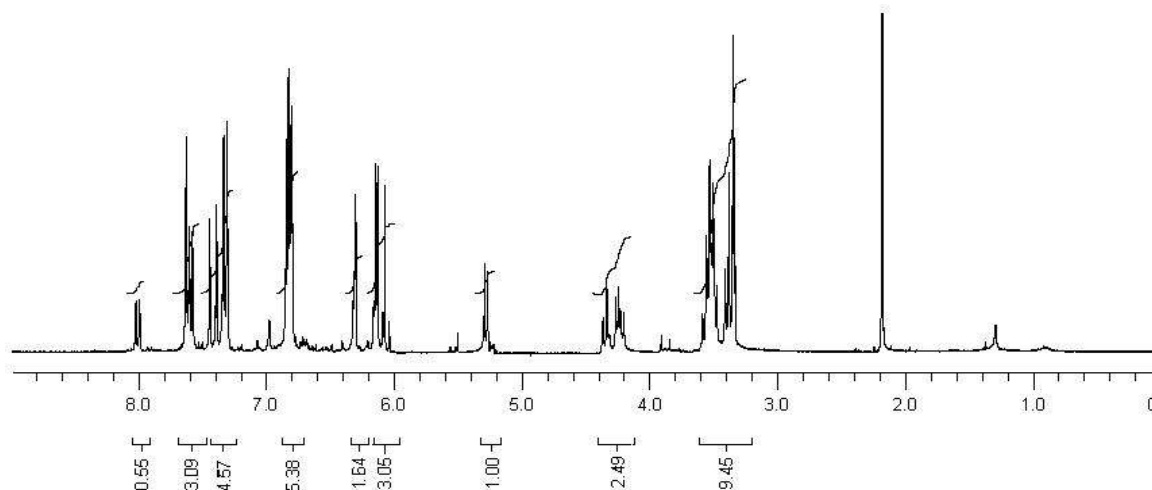


Figura 57. Espectro RMN de ^1H da substância **CG 10** [CD_3OD , δ (ppm)]

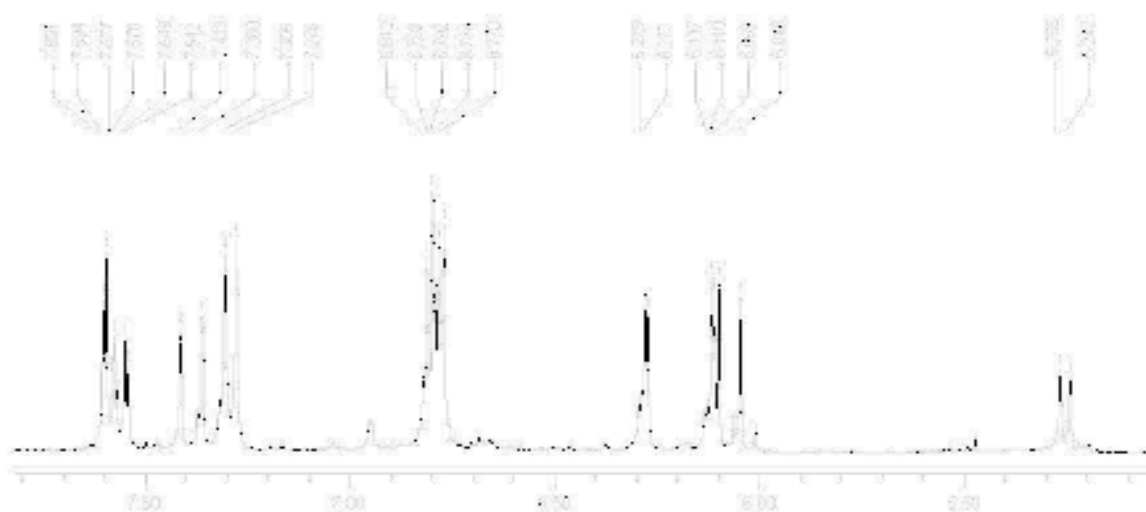


Figura 58. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância **CG 10** [CD_3OD , δ (ppm)]

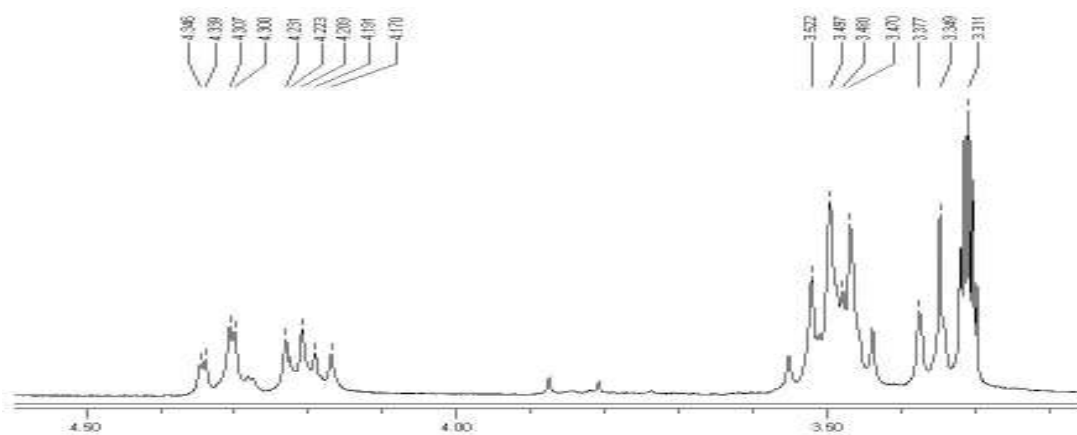


Figura 59. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância **CG 10** [CD_3OD , δ (ppm)]

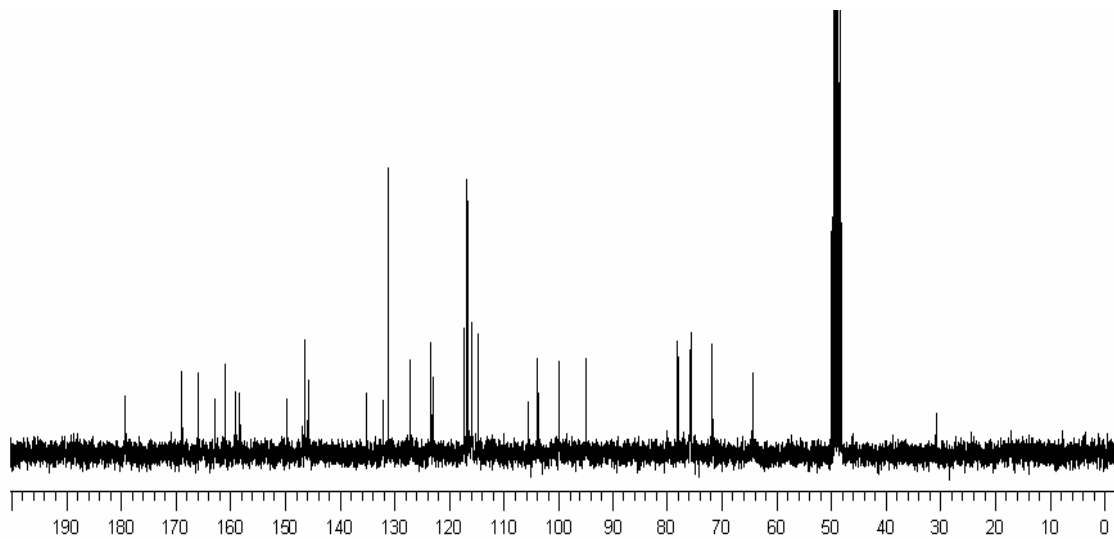


Figura 60. Espectro RMN de ^{13}C da substância **CG 10** [CD_3OD , δ (ppm)]

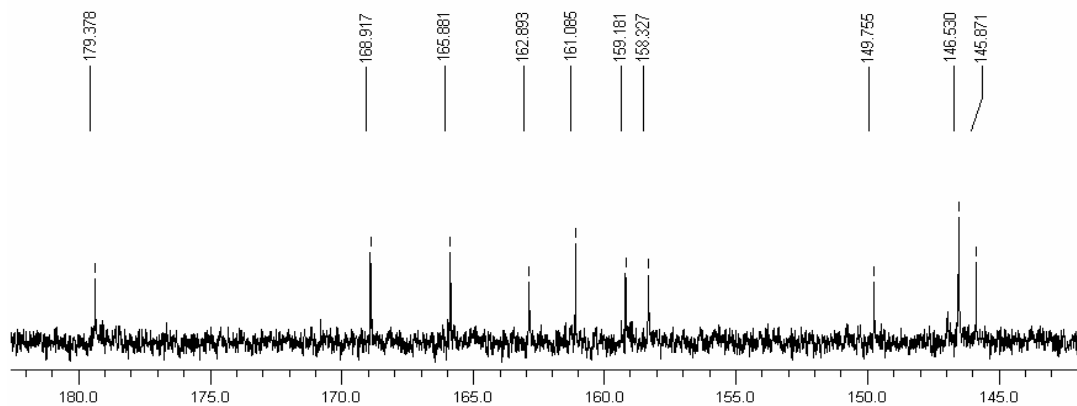


Figura 61. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)]

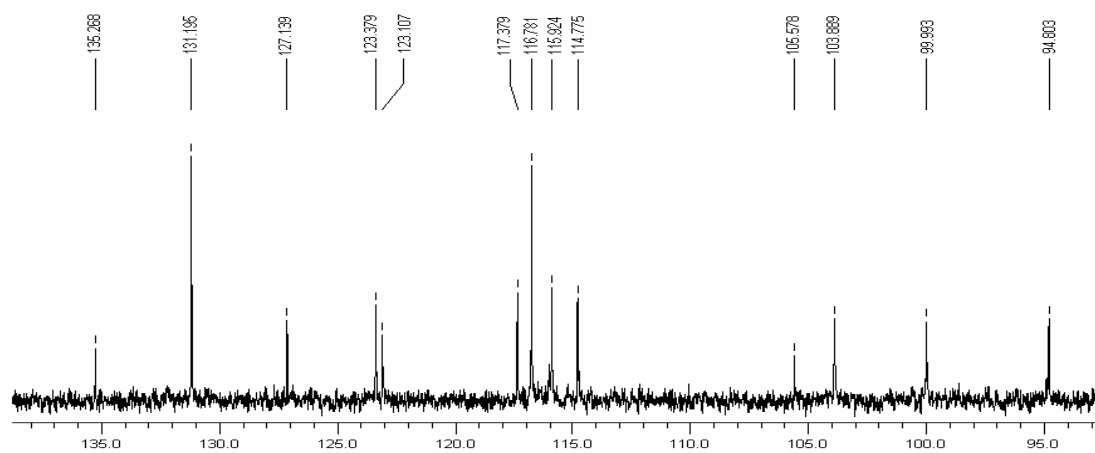


Figura 62. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)]

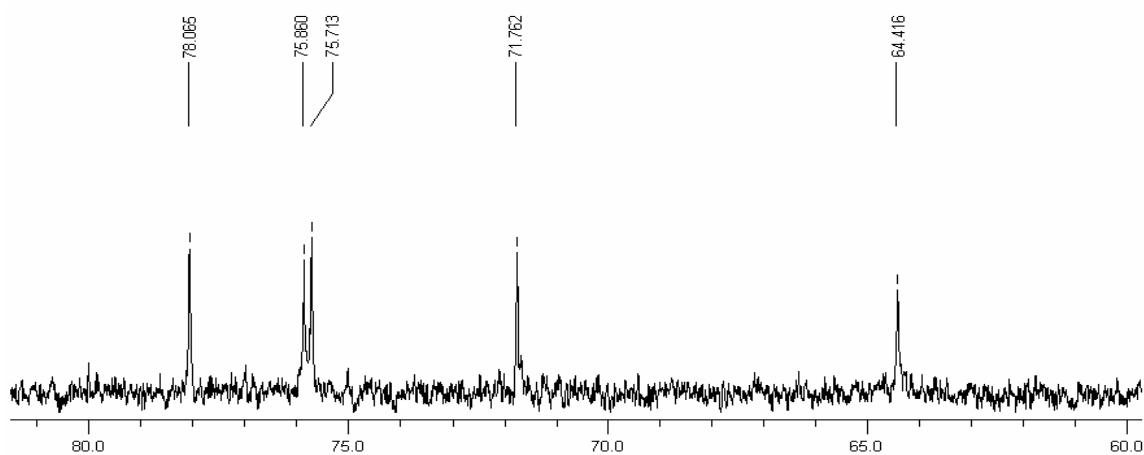


Figura 63. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 10 [CD_3OD , δ (ppm)]

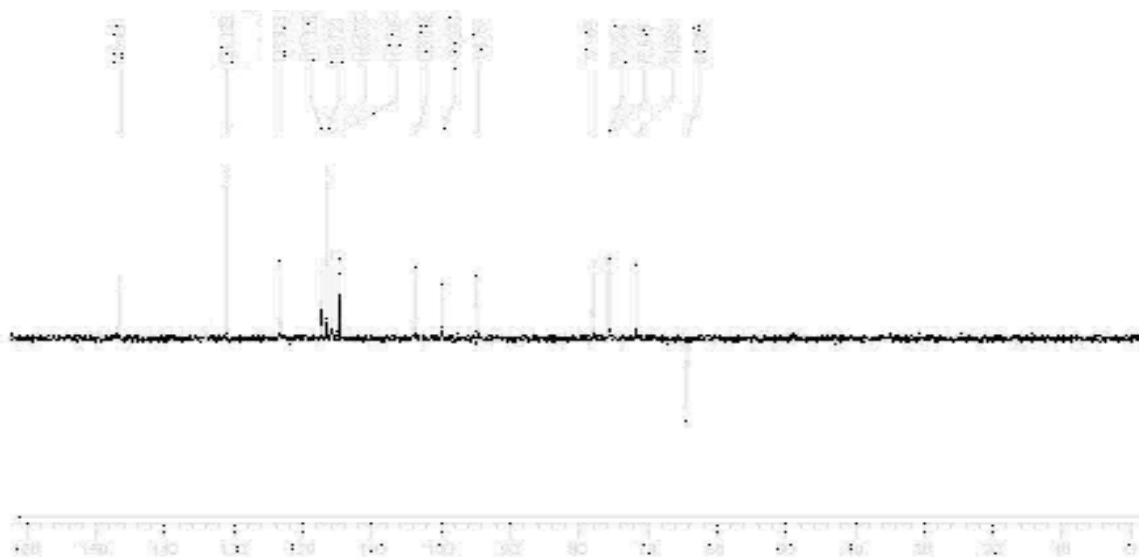


Figura 64. Espectro de DEPT da substância CG 10 [CD₃OD, δ (ppm)]

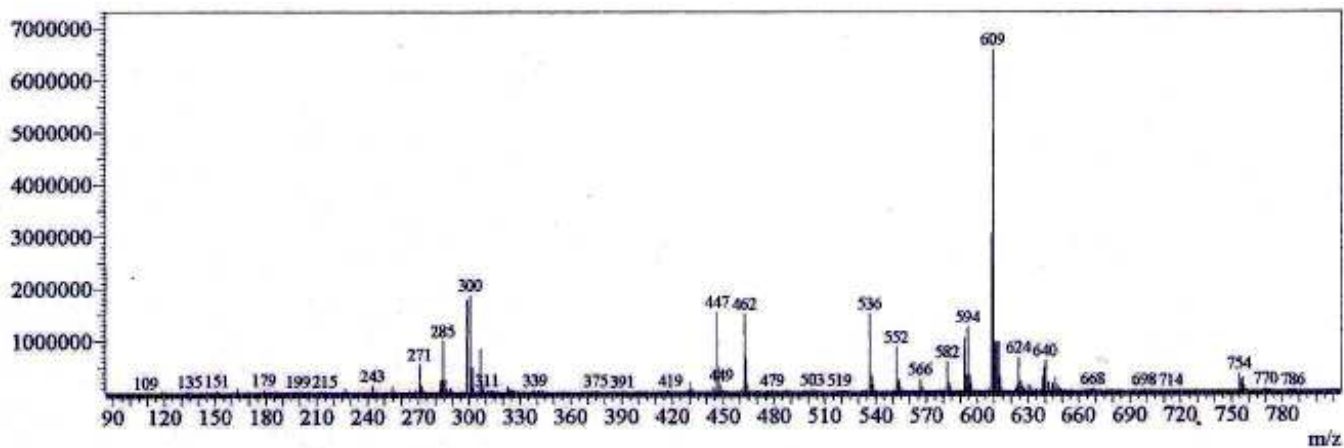


Figura 65. Espectro de Massas da substância CG 10 [APCI]

Tabela 18: Dados de RMN ^1H (300 MHz) da Quercetina (CG 3) e seus derivados obtidos dos extratos de *C. gardnerianum* [CD_3OD , δ (ppm), J (Hz)].

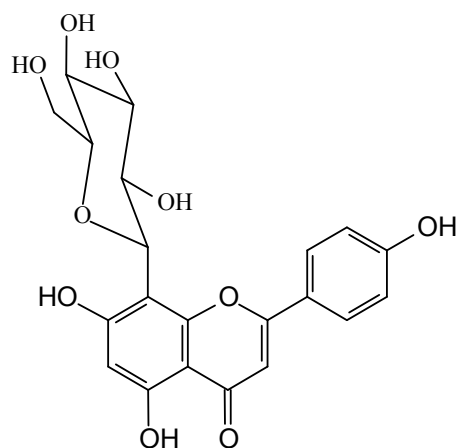
^1H	CG 3	CG 6	CG 7	CG 10
1	—	—	—	—
2	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	—	—
6	6,18 (d) 1,2	6,16 (d) 2,1	6,17 (d) 2,1	6,11 (d) 2,1
7	—	—	—	—
8	6,39 (d) 1,2	6,34 (d) 2,1	6,33 (d) 2,1	6,27 (d) 2,1
9	—	—	—	—
10	—	—	—	—
1'	—	—	—	—
2'	7,73 (d) 2,1	7,71 (d) 2,1	7,56 (d) 2,4	7,60 (d) 2,1
3'	—	—	—	—
4'	—	—	—	—
5'	6,89 (d) 8,7	6,85 (d) 8,7	6,72 (d) 9,0	6,79 (m)
6'	7,62 (dd) 2,1; 8,7	7,75 (dd) 2,1; 8,7	7,54 (m)	7,57 (dd) 2,1; 8,4
1''	—	5,21 (d) 7,2	5,19 (d) 7,5	5,25 (d) 7,2
2''	—	3,24-3,61	3,34-3,80	4,23-4,35
3''	—	3,24-3,61	3,34-3,80	4,23-4,35
4''	—	3,24-3,61	3,34-3,80	4,23-4,35
5''	—	3,24-3,61	3,34-3,80	4,23-4,35
6''	—	3,72 (dd) 2,4; 12	4,32 (m)	4,32 (dd) 2,1; 11,7
1'''	—	—	—	—
2'''	—	—	6,94 (s)	7,29 (d) 8,7
3'''	—	—	—	6,79 (m)
4'''	—	—	—	—
5'''	—	—	—	6,79 (m)
6'''	—	—	6,94 (s)	7,29 (d) 8,7
7'''	—	—	—	7,39 (d) 15,9
8'''	—	—	—	6,06 (d) 15,9

Tabela 19: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) da Quercetina (**CG 3**) e seus derivados obtidos dos extratos de *C. gardnerianum* [CD_3OD , δ (ppm)]

^{13}C	CG 3	CG 6	CG 7	CG 10
2	147,96	158,30	158,33	158,32
3	137,22	135,59	135,29	135,26
4	177,29	179,33	179,33	179,37
5	158,19	162,84	162,77	162,89
6	99,30	99,88	99,98	99,99
7	165,66	165,89	165,83	165,88
8	94,46	94,73	94,89	94,80
9	162,45	158,94	159,34	159,18
10	104,48	105,58	105,55	105,57
1°	124,13	123,17	123,03	123,10
2°	115,97	117,58	117,25	117,37
3°	146,19	145,75	145,74	145,87
4°	148,74	149,74	149,67	149,75
5°	116,23	115,96	115,95	115,92
6°	121,68	122,96	123,56	123,37
1''	—	104,42	104,23	103,88
2''	—	75,68	75,69	75,71
3''	—	78,04	78,04	78,06
4''	—	71,14	71,49	71,76
5''	—	78,25	75,86	75,86
6''	—	62,52	64,35	64,41
1'''	—	—	121,26	127,13
2'''	—	—	110,20	131,19
3'''	—	—	146,27	116,78
4'''	—	—	139,71	161,08
5'''	—	—	146,27	131,19
6'''	—	—	110,20	116,78
7'''	—	—	—	146,53
8'''	—	—	—	114,77
CO	—	—	168,18	168,91

4.5 Identificação de flavonas

4.5.1 Identificação de CG 5



Vitexina (CG 5)

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 66 a 69, p 69 e 70) da substância **CG 5** apresentou, entre outros, singlete integrando para um hidrogênio em δ 6,77 característico de hidrogênio ligado ao C-3 de flavonas. Observou-se ainda um singlete em δ 13,17 correspondente à hidroxila quelada em C-5, dois dubletos em δ 6,88 e δ 8,02 integrado para dois hidrogênios cada, com $J= 8,4$ Hz característicos de hidrogênios *orto* relacionados do anel B *para*-disubstituído de flavonóides. Além destes, observou-se ainda um singlete em δ 6,28, integrando para um hidrogênio, indicando que o anel A desta substância encontrava-se pentasubstituído. O dubleto em δ 4,94 ($J=8,4$ Hz) e os sinais entre δ 3,09 e δ 3,88 indicaram a presença de um substituinte osídico na molécula.

Análise do espectro RMN de ^{13}C (Figuras 70 a 72, p 71 e 72) e DEPT 135° (Figura 73, p 72) possibilitou a confirmação da natureza flavonoídica de **CG 5**, sugerindo ser esta uma flavona C-glicosilada, devido ao sinal em δ 182,11, atribuído ao carbono carbonílico C-4, sendo este característico desta classe de flavonóide (AGRAWAL, 1989d). O dubleto observado no espectro RMN ^1H em δ 4,94 foi atribuído ao carbono anomérico do heterosídeo e o carbono correspondente foi identificado com ajuda do espectro HMQC (Figura 74, p 72). A localização do açúcar na molécula foi possível através da análise do espectro de HMBC (Figura 75, p 73) no qual se observa a correlação entre o hidrogênio ligado ao carbono anomérico H-1'' e os carbonos em δ 104,075 e δ 156,02 do anel A desta substância (Figura

76, p 73). O açúcar foi identificado como sendo a glicose, principalmente pela presença do sinal em δ 61,35, característico para este açúcar. O EM (Figura 77, p 73) apresentou íon *quase*-molecular [M-1] m/z 431, e em conjunto com os dados apresentados pelos espectros acima citados, e através de comparação com dados da literatura (TANAKA *et al.*, 2005), tornou possível a identificação da substância **CG 5** como sendo a vitexina.

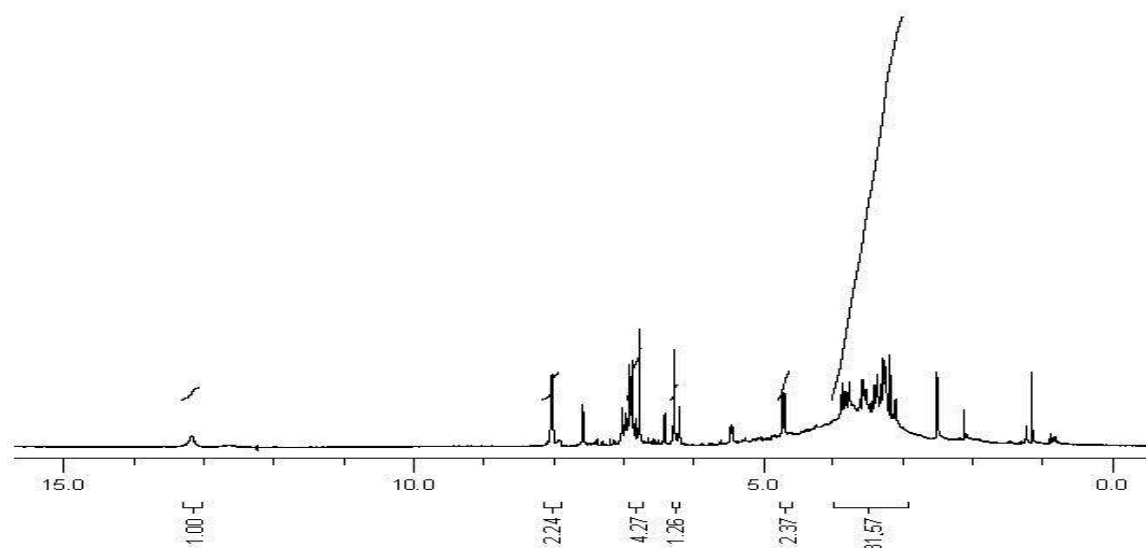


Figura 66. Espectro RMN de ^1H da substância **CG 5** [DMSO, δ (ppm)]

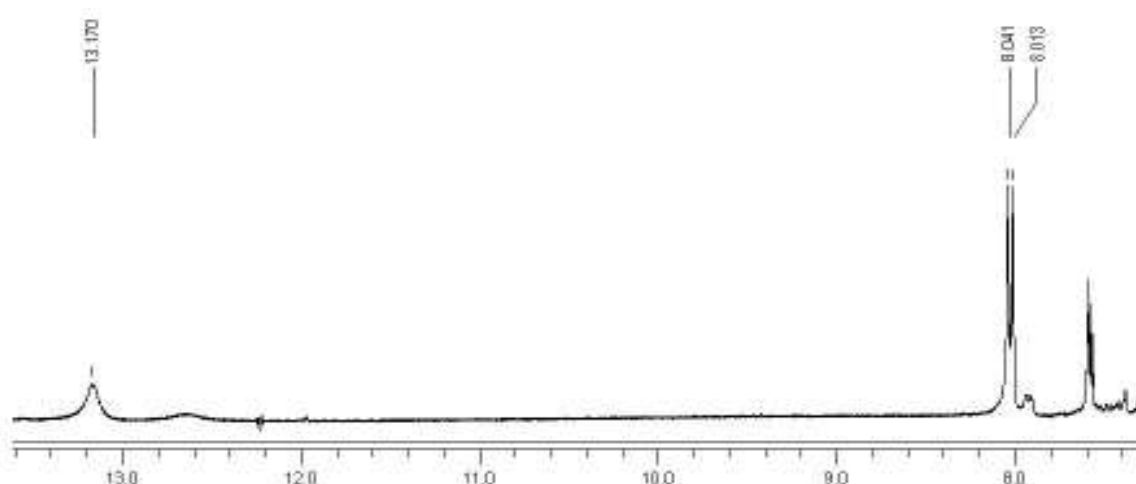


Figura 67. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância **CG 5** [DMSO, δ (ppm)]

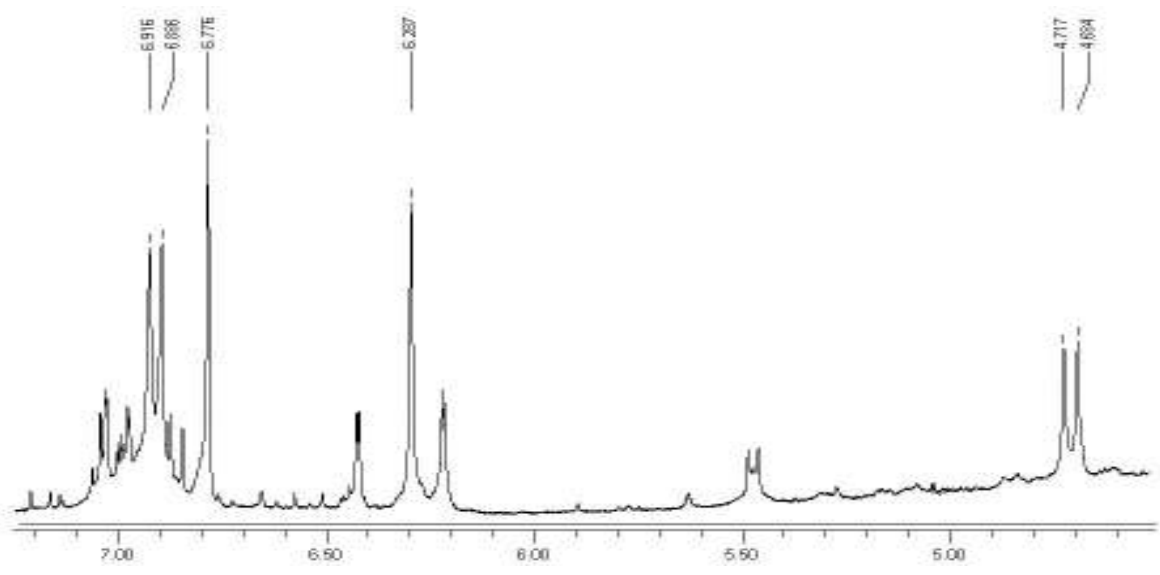


Figura 68. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância **CG 5** [DMSO, δ (ppm)]

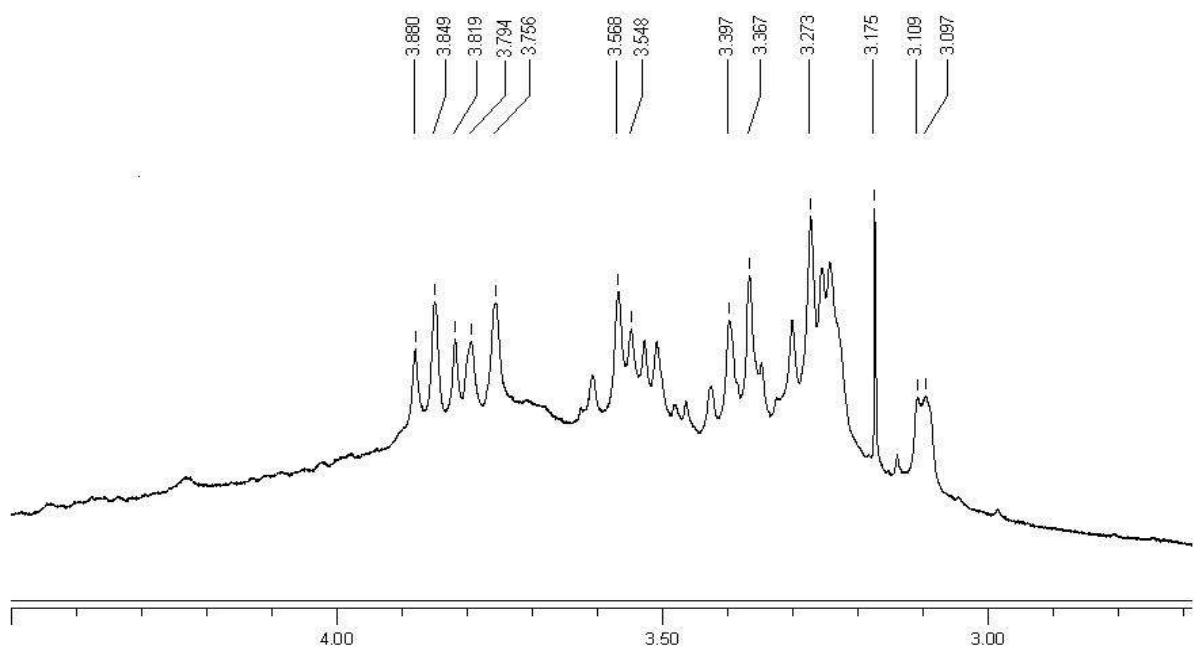


Figura 69. Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância **CG 5** [DMSO, δ (ppm)]

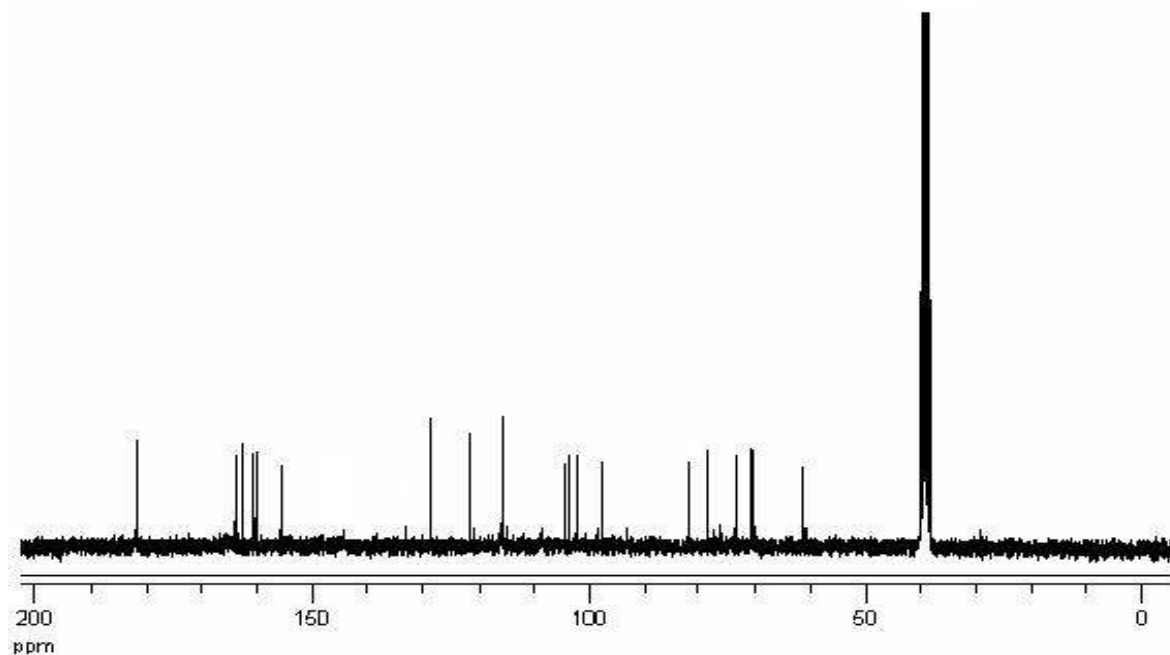


Figura 70. Espectro RMN de ^{13}C da substância CG 5 [DMSO, δ (ppm)]

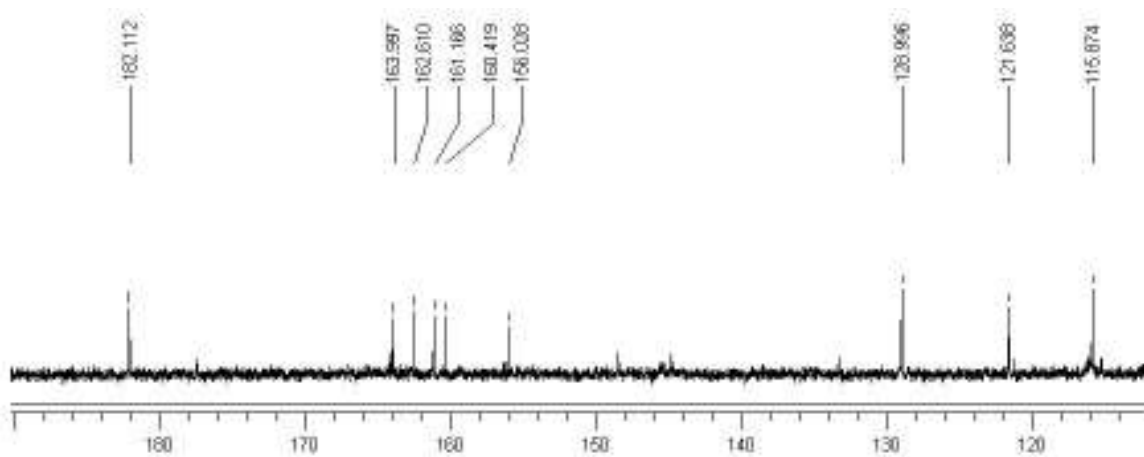


Figura 71. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 5 [DMSO, δ (ppm)]

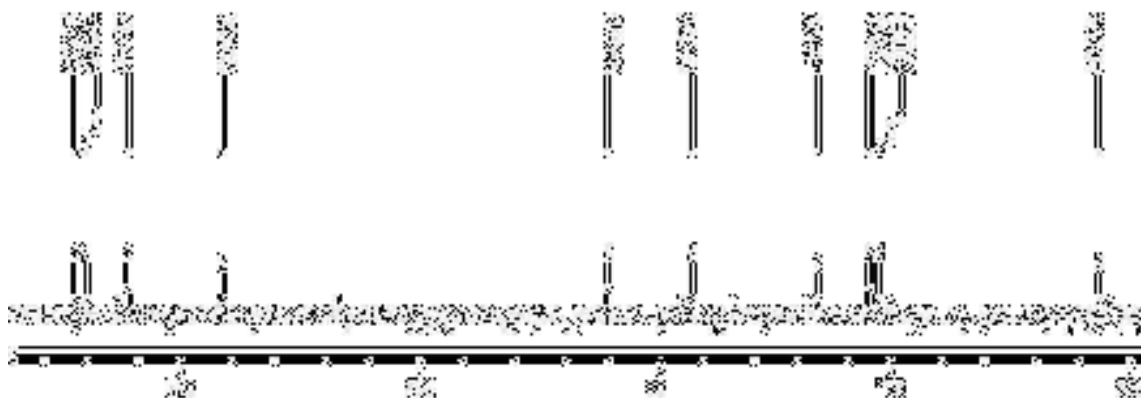


Figura 72. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância CG 5 [DMSO, δ (ppm)]

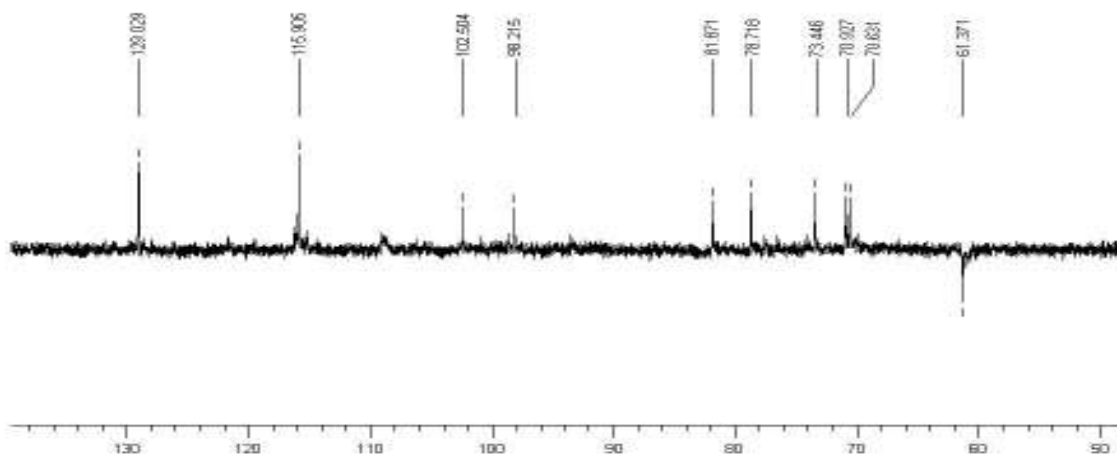


Figura 73: Espectro DEPT da substância CG 5 [DMSO, δ (ppm)]

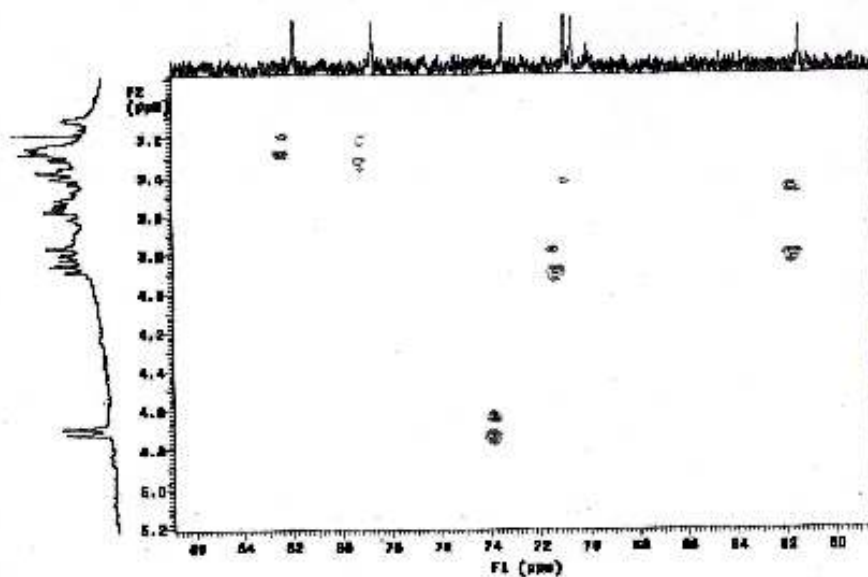


Figura 74: Espectro HMQC da substância CG 5 [DMSO, δ (ppm)]

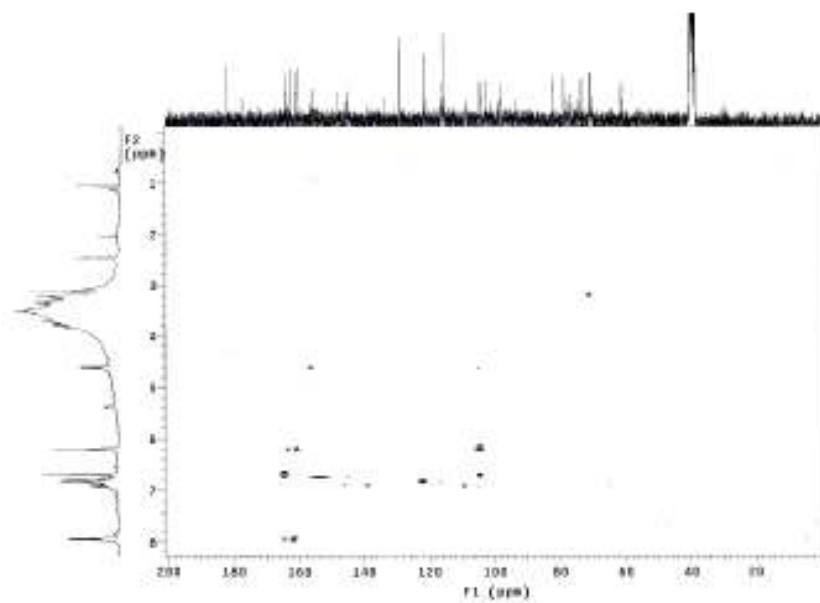


Figura 75: Espectro HMBC da substância **CG 5** [DMSO, δ (ppm)]

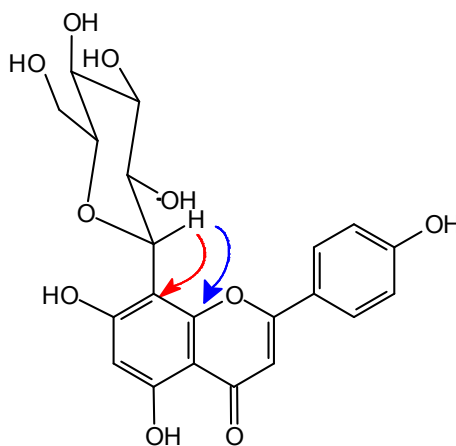


Figura 76: Correlações observadas no espectro HMBC da substância **CG 5**

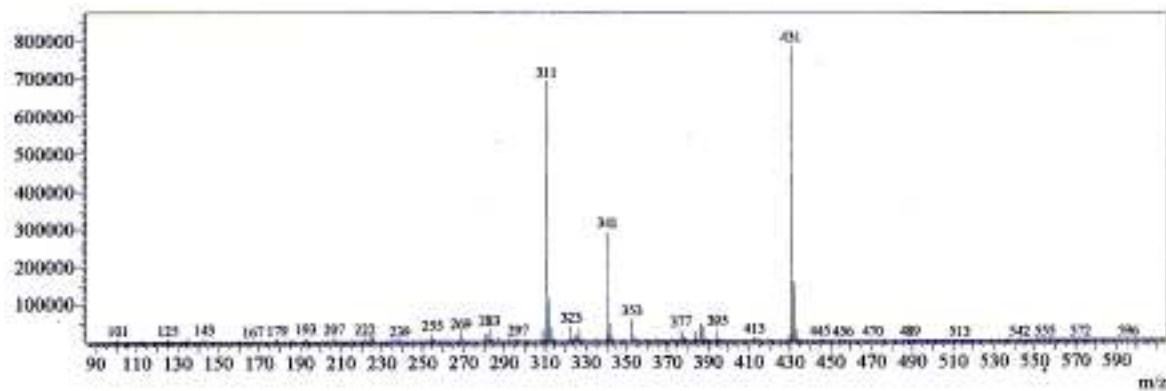
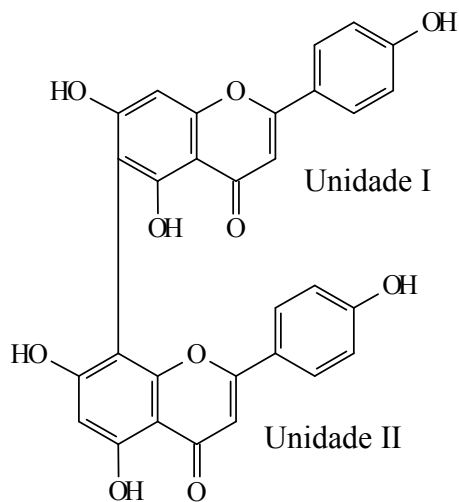


Figura 77. Espectro de Massas da substância **CG 5** [APCI]

4.5.2 Identificação de CG 9



Agathisflavona (CG 9)

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 78 a 81, p 75 e 76) desta substância apresentou sinais característicos de duas unidades flavonóidicas. Este espectro mostrou um dubleto em δ 7,96 ($J= 8,7$ Hz) e outro em δ 7,04 ($J= 8,7$ Hz) indicativo de anel B 1,4 dissubstituído de uma unidade, além dos dubletos em δ 7,63 ($J= 8,7$ Hz) e δ 6,84 ($J= 8,7$ Hz) indicativos da presença do anel B 1,4 de outra unidade flavonóidica. Os singletos em δ 6,42 (H-6 da unidade II) e δ 6,63 (H-8 da unidade I) foram indicativos da presença de dois anéis aromáticos com 5 substituições cada. Os singletos em δ 6,80 e δ 6,68 são característicos de hidrogênios olefinicos (H-3) das unidades das flavonas.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 82 a 84, p 77) apresentou um total de 26 sinais, sendo os valores de deslocamentos químicos dobrados e muito próximos. Os sinais observados em δ 183,38 e δ 183,12 são característicos de carbonilas conjugadas de flavonas, sugerindo assim a presença de duas unidades deste flavonóide (AGRAWAL, 1989d). Além disso, os dados de RMN de ^{13}C também indicaram a presença de dois anéis aromáticos 1,4 dissubstituídos, mostrando a presença de dois carbonos metínicos em δ 94,80 e δ 99,73 mais blindados, referentes aos anéis A das unidades I e II, respectivamente. Esses dados, aliados aos dados observados no espectro DEPT 135° (Figura 85, p 78), tornaram possível observar que haviam dois outros carbonos sp^2 não hidrogenados presentes em δ 103,71 e δ 99,42. Os deslocamentos destes carbonos mostraram que esta substância não era uma mistura de flavonóides, mas um dímero cujas unidades encontravam-se ligadas entre as posições C-6 da unidade I e C-8 da unidade II.

O EM (Figura 86, p 78) apresentou íon *quase*-molecular [M-1] em m/z 537 (pico base) e, através de comparação direta com os dados na literatura, (CHARI *et al*, 1977) corroborou a identificação da biflavona. Assim, a substância **CG 9** foi identificada como agatisflavona. A pequena diferença observada em alguns valores, comparados com os da literatura, foi devido à diferença do solvente utilizado (Tabela 20, p 79).

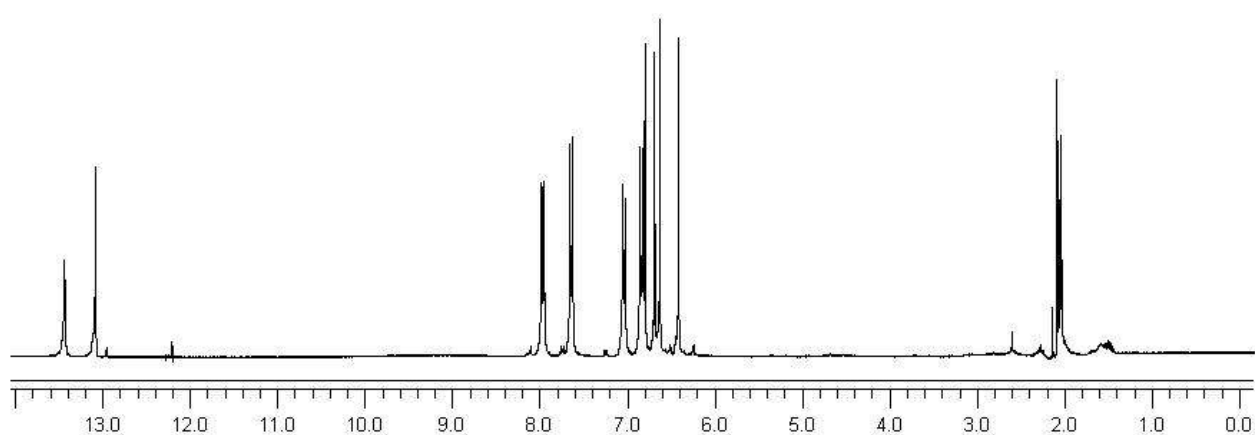


Figura 78. Espectro RMN de ^1H da substância **CG 9** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, \delta \text{ (ppm)}]$

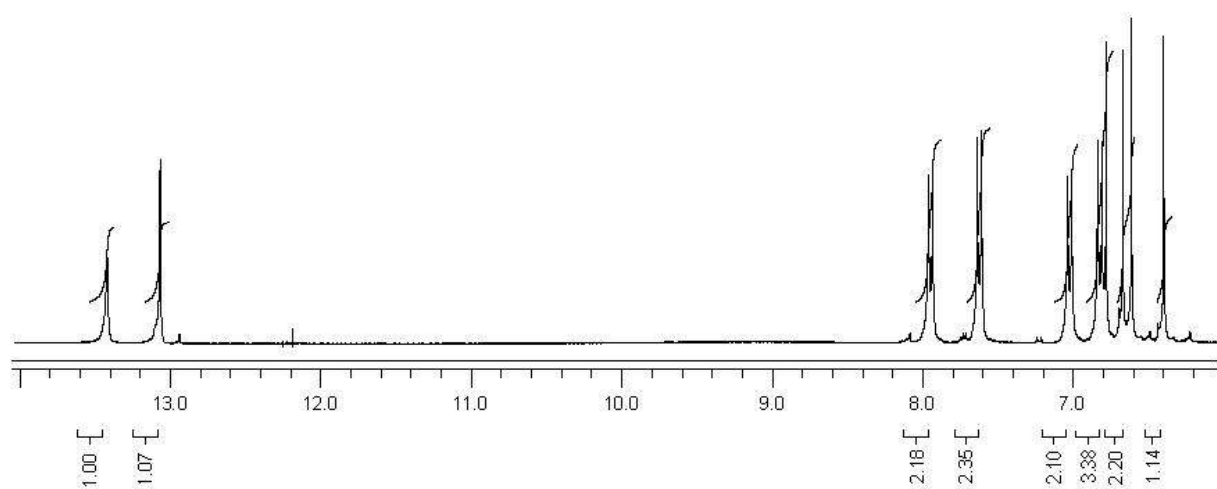


Figura 79. Espectro RMN de ^1H da substância **CG 9** (Integração) $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, \delta \text{ (ppm)}]$

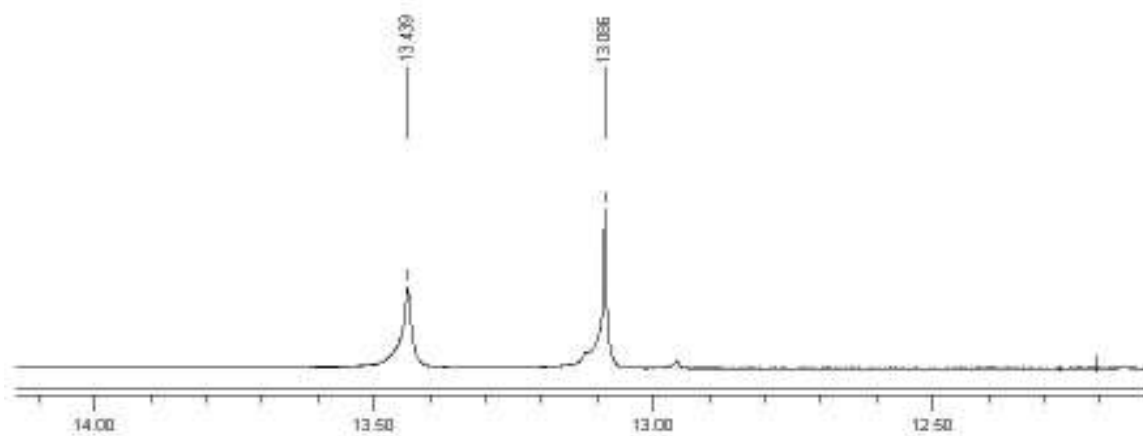


Figura 80. Ampliação do espectro RMN de ¹H da substância CG 9 [(CD₃)₂CO, δ (ppm)]

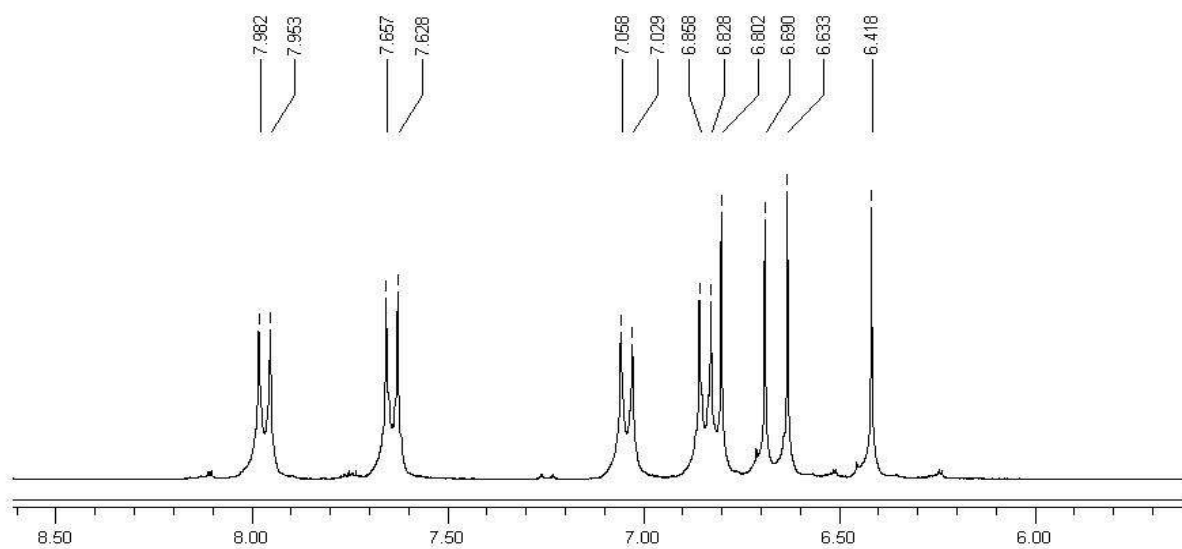


Figura 81. Ampliação do espectro RMN de ¹H da substância CG 9 [(CD₃)₂CO, δ (ppm)]

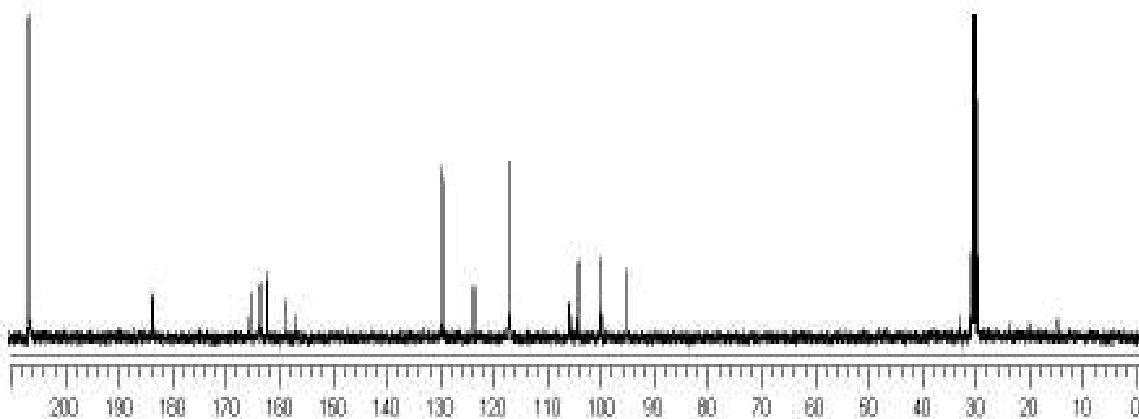


Figura 82. Espectro RMN de ^{13}C da substância **CG 9** [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

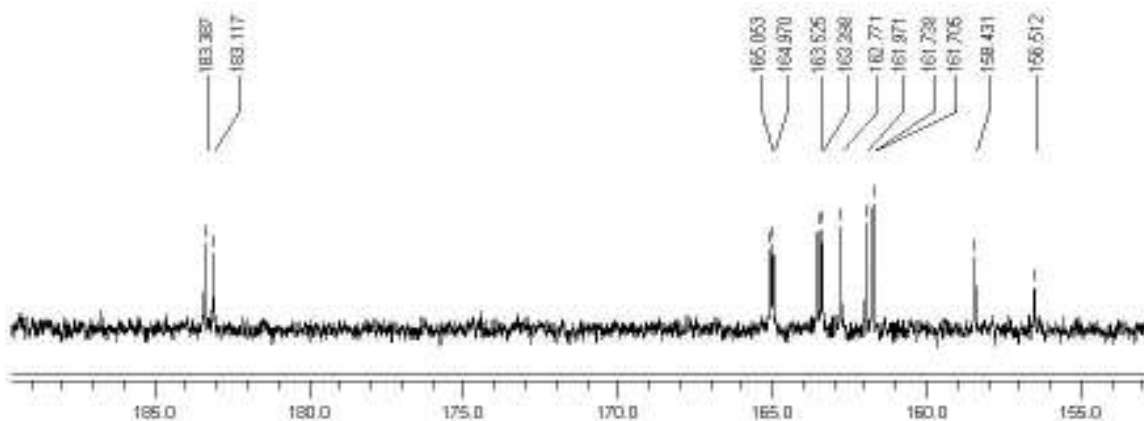


Figura 83. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância **CG 9** [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

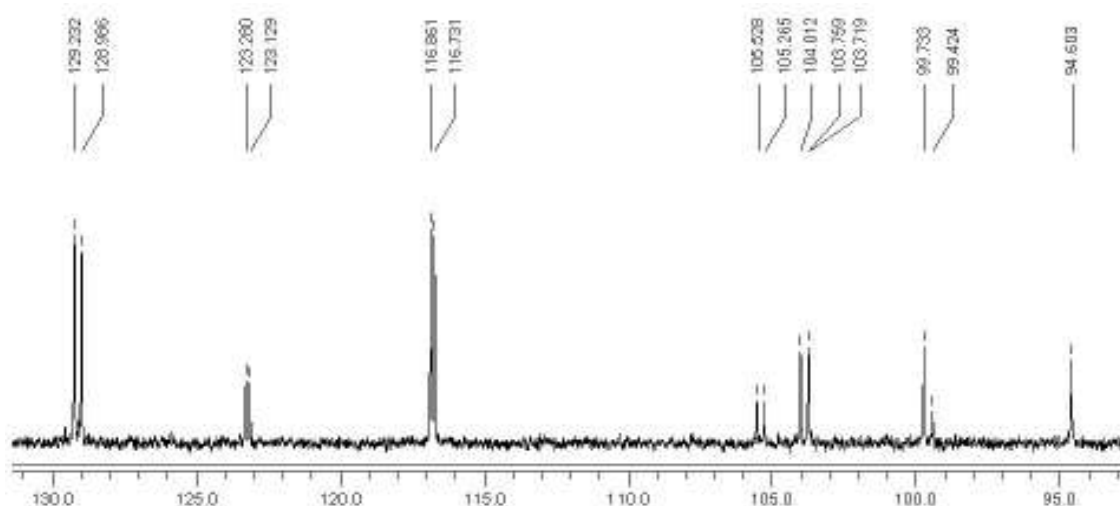


Figura 84. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C da substância **CG 9** [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

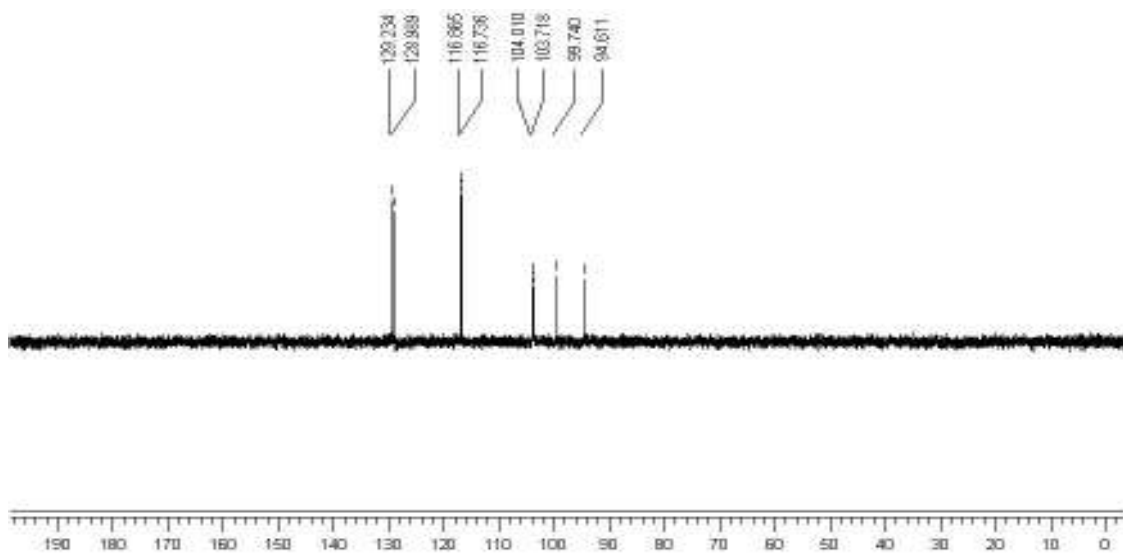


Figura 85. Espectro DEPT 135° da substância CG 9 [(CD₃)₂CO, δ (ppm)]

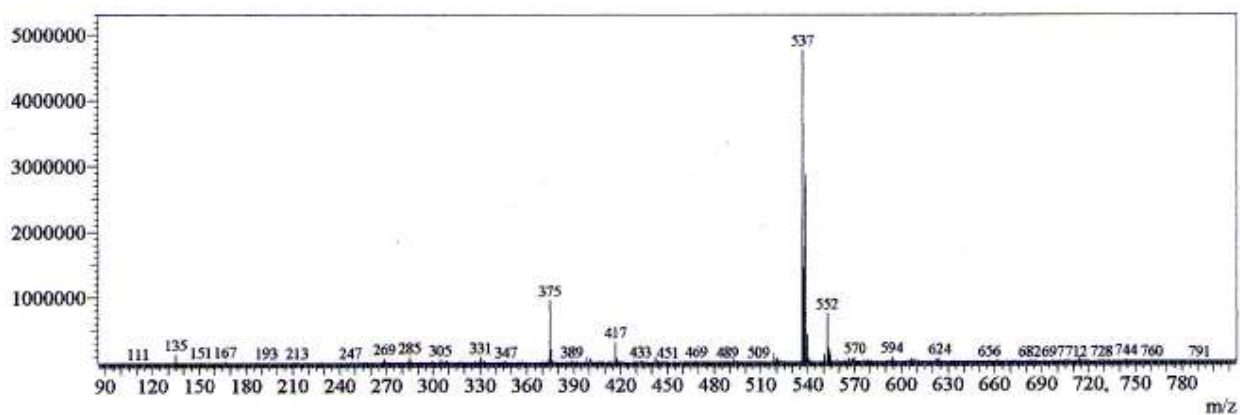


Figura 86. Espectro de Massas da substância CG 9 [APCI]

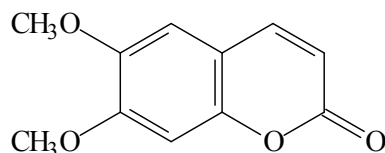
Tabela 20: Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) das flavonas **CG 5** e **CG 09** de *C. gardnerianum* [DMSO*, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ **, δ (ppm), J (HZ)].

Posição	CG 5*	
	^1H	^{13}C
2	—	163,99
3	6,77 (s)	102,49
4	—	182,11
5	—	160,41
6	6,28 (s)	98,20
7	—	163,99
8	—	104,07
9	—	156,02
10	—	104,64
1'	—	121,63
2'	8,02(d) 8,4	128,99
3'	6,88 (d) 8,4	115,87
4'		161,16
5'	6,88 (d) 8,4	115,87
6'	8,02 (d) 8,4	128,99
1''	4,94 (d) 9,9	73,35
2''	3,09-3,88	70,91
3''	3,09-3,88	78,70
4''	3,09-3,88	70,60
5''	3,09-3,88	81,86
6''	3,09-3,88	61,35

Posição	CG 09**		Literatura*
	^1H	^{13}C	^{13}C
2-I	—	165,05	164,1
3-I	6,80 (s)	104,01	103,1
4-I	—	183,38	182,3
5-I	—	161,97	160,0
6-I	—	103,71	103,6
7-I	—	163,52	162,9
8-I	6,63 (s)	94,60	93,7
9-I	—	158,43	157,0
10-I	—	105,26	103,8
1'-I	—	123,28	121,5
2'-I	7,96 (d) 8,7	129,23	128,6
3'-I	7,04 (d) 8,7	116,86	116,2
4'-I	—	161,73	161,3
5'-I	7,04 (d) 8,7	116,86	116,2
6'-I	7,96 (d) 8,7	129,23	128,2
2-II	—	164,97	163,9
3-II	6,68 (s)	103,75	102,8
4-II	—	183,11	182,1
5-II	—	162,77	160,9
6-II	6,42 (s)	99,73	98,9
7-II	—	163,39	162,7
8-II	—	99,42	99,4
9-II	—	156,51	155,1
10-II	—	105,52	104,0
1'-II	—	123,12	121,7
2'-II	7,63 (d) 8,7	128,98	128,2
3'-II	6,84 (d) 8,7	116,73	116,2
4'-II	—	161,70	161,2
5'-II	6,84 (d) 8,7	116,73	116,2
6'-II	7,63 (d) 8,7	128,96	128,2

4.6 Identificação de cumarinas

4.6.1 Identificação da Escoparona (CG 11)



Escoparona (CG 11)

No espectro RMN de ^1H (Figuras 88 a 90, p 81 e 82) da substância **CG 11** pode ser observada a presença de dois dubletos ($J= 9.6$ Hz) em δ 6,29 e δ 7,62, correspondente aos hidrogênios H-3 e H-4 de cumarinas, respectivamente. Cumarinas não substituídas no anel pirônico exibem dubletos ($J=9.5$ Hz) em δ 6,1-6,4 e δ 7,5-8,3 referentes aos hidrogênios H-3 e H-4 em configuração *Z*. O valor de H-4 mais desprotegido que H-3 é indicativo que o mesmo encontra-se na posição β de sistema carbonílico conjugado (Figura 87). Pode-se ainda observar no espectro, a presença de dois singletos em δ 6,85 e δ 6,84 integrando para um hidrogênio cada, correspondentes aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel cumárico, e dois singletos, integrando para 3H cada, em δ 3,85 e δ 3,93 característicos de hidrogênios de grupos metoxílicos. Os dados obtidos no espectro de RMN ^1H , aliados ao espectro EM (Figura 91, p 82), que apresentou íon *quase*-molecular $[\text{M}+1]$ em m/z 207, permitiu identificar **CG-11** como sendo a escoparona. A proposta estrutural foi comprovada a partir da comparação com dados descritos na literatura para esta substância (STECK & MAZUREK, 2002).

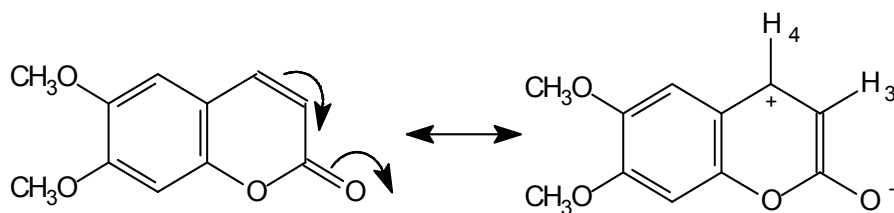


Figura 87: Estrutura de ressonância da escoparona

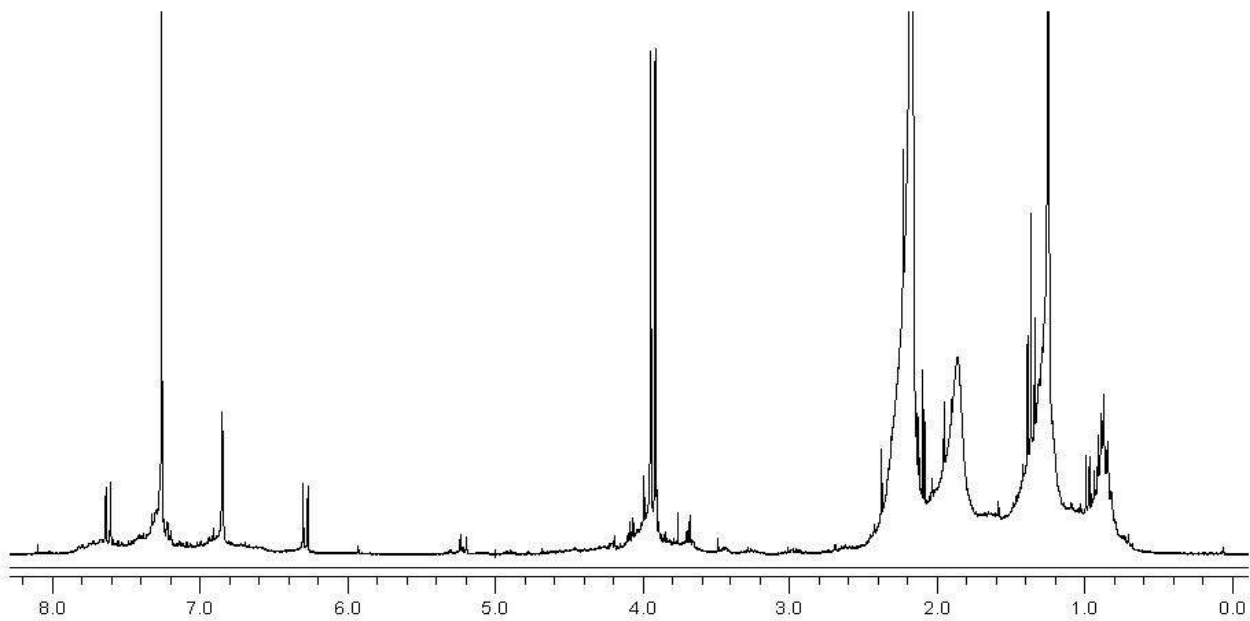


Figura 88: Espectro RMN de ^1H da substância **CG 11** [CDCl_3 , δ (ppm)]

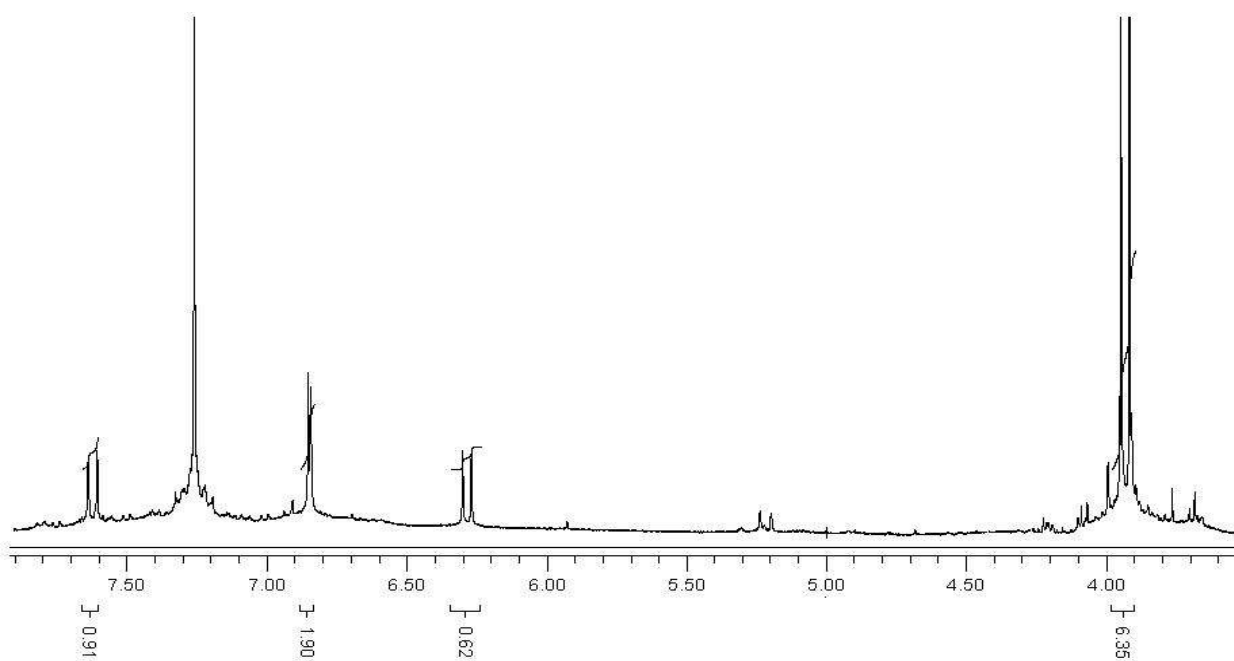


Figura 89: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **CG 11** [CDCl_3 , δ (ppm)]

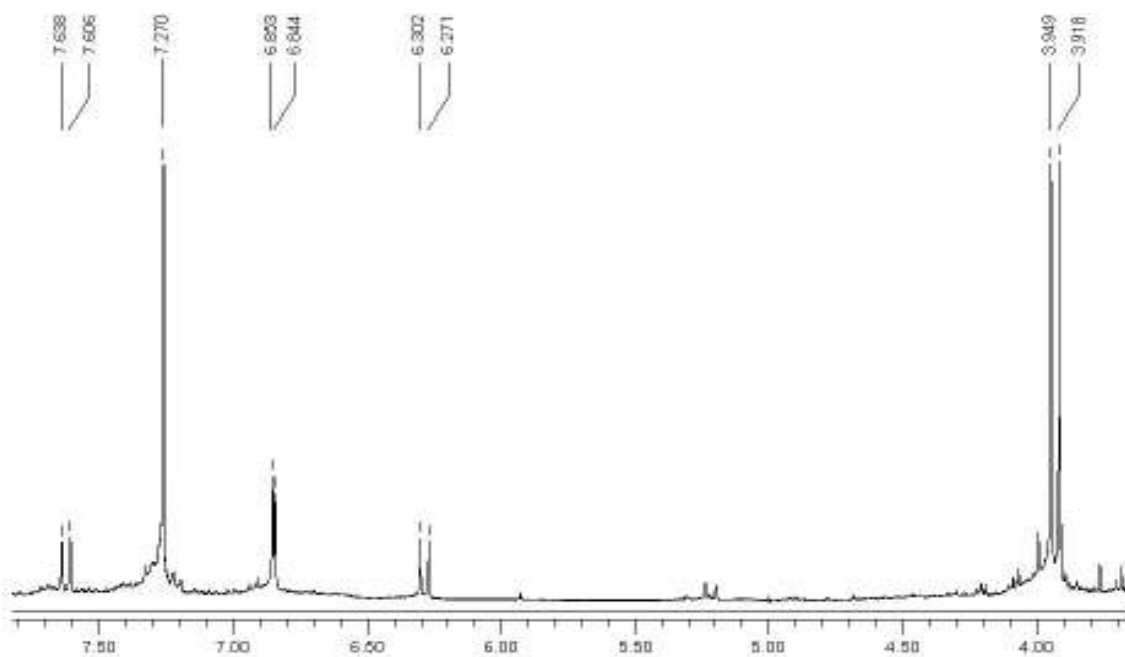


Figura 90: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância CG 11 [CDCl_3 , δ (ppm)]

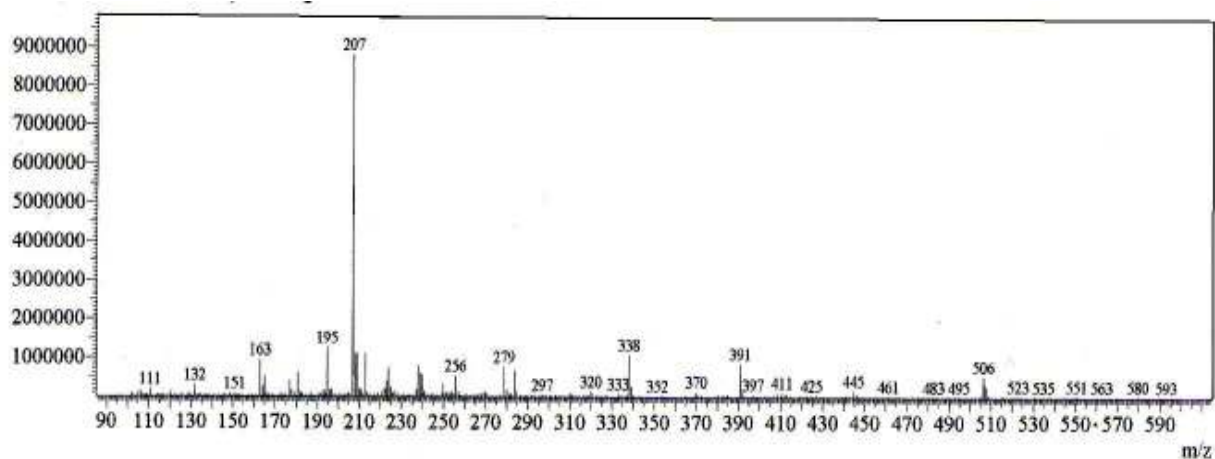


Figura 91: Espectro de Massas da substância CG 11 [APCI]

4.7 Testes de atividade antioxidante

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos, destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e o método de seqüestro de radicais livres, tais como DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Estes métodos foram utilizados para avaliar a atividade antioxidante de substâncias isoladas dos extratos polares de *C. gardnerianum*.

4.7.1 Avaliação da atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante das substâncias isoladas, expressos em percentual de inibição da oxidação (Figuras 92 e 93, p 84), mostram que algumas delas apresentam potencial antioxidante, que varia de acordo com o tipo de composto e do método utilizado.

No teste da inibição da oxidação do β -caroteno, o potencial antioxidante da substância teste é medido pela capacidade deste em seqüestrar o radical livre, gerado durante a peroxidação do ácido linoleico, ou seja, quanto mais fácil for sua oxidação, mais ele competirá com o β -caroteno na reação com os radicais, protegendo-o. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. O teste utilizando o radical estável DPPH• mede a capacidade das substâncias testadas em doar hidrogênio radicalar a este radical, assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra, maior sua atividade antioxidante. A estabilidade do radical formado é outro fator que influencia no potencial antioxidante, sendo maior nas substâncias que possuem maior capacidade de deslocalizar o radical pela estrutura (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Nos testes realizados, observamos que as substâncias **CG 4** e **CG 7** apresentaram excelente atividade antioxidante, chegando a ser, em algumas concentrações, mais efetivas que a quercetina (utilizada como padrão). A substância **CG 10** apresentou atividade moderada em ambos os métodos, e as substâncias **CG 9** e **CG 1** apresentaram baixa e nenhuma atividade, respectivamente.

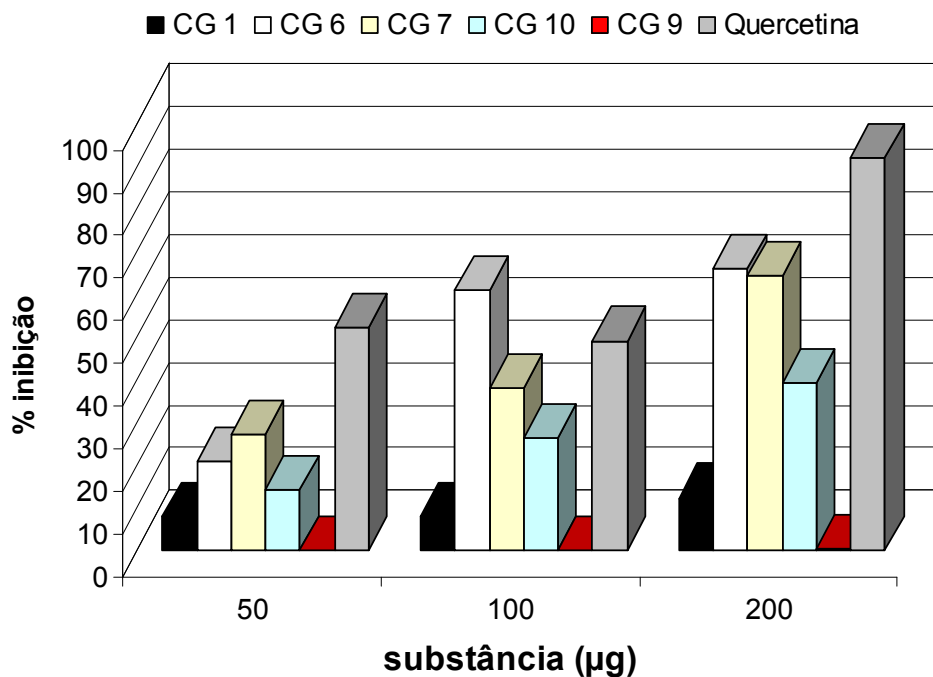


Figura 92 – Gráfico do teste da inibição da oxidação do β -caroteno pelas substâncias isoladas de *C. gardnerianum*.

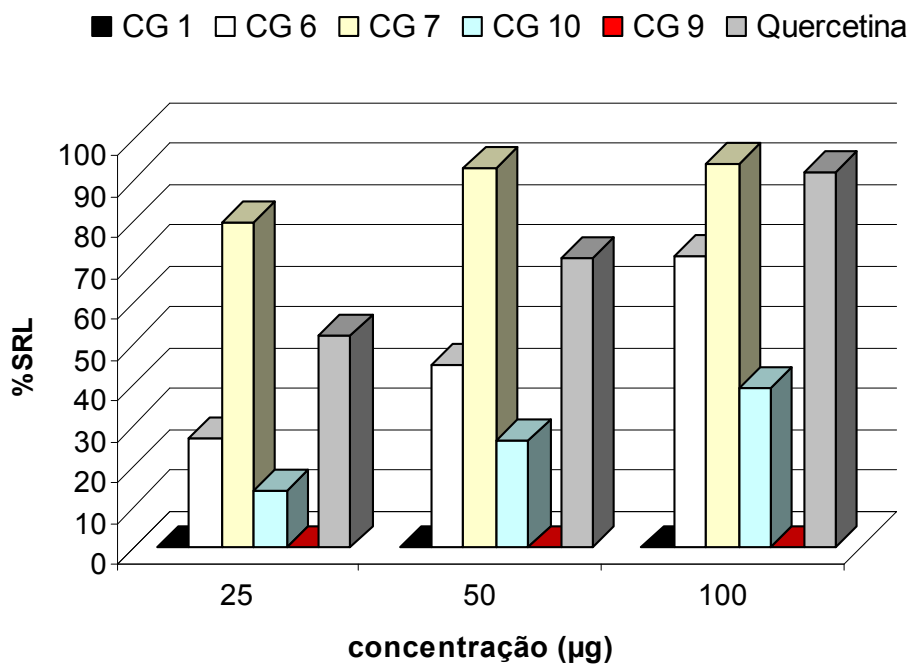


Figura 93 – Gráfico do teste do seqüestro de radicais livres (DPPH \cdot) pelas substâncias isoladas de *C. gardnerianum*.

5.0 Considerações Finais

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química das espécies do gênero *Cenostigma* que são, em sua maioria, endêmicas do Brasil. Atualmente são conhecidas quatro espécies, sendo que apenas uma delas possui estudo químico preliminar, o que faz deste trabalho um dos pioneiros no estudo deste gênero.

Pode-se verificar nos resultados obtidos neste trabalho que a maior parte das substâncias isoladas de *C. gardnerianum* são fenólicas, especialmente flavonóides. A presença desta classe de substância pode estar relacionada ao bioma peculiar onde esta espécie ocorre, a Caatinga, com grande incidência de raios solares e de onde deriva seu nome popular: “catingueira” (SILVA, 2004).

Os flavonóis constituíram, quantitativamente, a classe principal de metabólitos secundários presentes nesta espécie (quercetina e seus derivados glicosilados). Além disso, foram ainda obtidos flavonas derivadas da apigenina.

A partir do extrato AcOEt das folhas de *C. gardnerianum* foram isolados o ácido gálico (CG 4) e alguns derivados: galato de metila (CG 2) e o ácido elágico (CG 8). Estes são descritos na literatura como substâncias que possuem comprovada atividade biológica, tais como: antiinflamatória, antimutagênica, anticancerígena e antioxidante. São ainda aditivos seguros de alimentos, sendo utilizados como antioxidantes em alguns países. Além disso, o ácido elágico tem demonstrado atividade antiviral e antitumoral.

Foi isolado do extrato AcOEt das cascas do caule o novo derivado glicosilado do ácido gálico, cuja estrutura foi determinada como sendo o ácido 2-C- β -D-glicosil-4-metoxigálico (CG 1). Existem relatos destes derivados glicosilados na literatura, porém normalmente os açúcares encontram-se ligados ao oxigênio. Assim, este trabalho descreve pela primeira vez a ocorrência de um derivado C-glicosilado do ácido gálico, fazendo desta uma substância de ocorrência rara nesta classe de compostos.

Do extrato AcOEt das folhas foram ainda isoladas: quercetina (CG 3), quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (CG 6), quercetina-3-O-(6''-O-galoil)- β -D-glicopiranosídeo (CG 7) e quercetina-3-O-(6''-O-E-p-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo (CG 10).

Foi demonstrado na literatura que os flavonóides quercetina e seus derivados glicosídicos são antioxidantes conhecidos e apresentam ação mais eficaz do que o ácido ascórbico e o α -tocoferol, com concentrações equimolares (FILHO *et al.*, 2001).

Além dessas substâncias, também foi isolada do extrato AcOEt das folhas a vitexina (**CG 5**), encontrada anteriormente em outras espécies vegetais, inclusive da família Leguminosae (WEBB & HARBORNE, 1991). Porém, este é o primeiro relato da ocorrência desta substância no gênero. Entretanto a agatisflavona (**CG 09**), uma biflavona isolada também deste extrato, foi descrita anteriormente na espécie *Cenostigma macrophyllum* (COSTA *et al.*, 2002) e *Caesalpinia pyramidalis* (BAHIA *et al.*, 2005), aparecendo como um marcador taxonômico da subfamília Caesalpinioideae.

A cumarina Escoparona (**CG 11**), isolada do extrato CHCl₃, é de ocorrência comum em espécies vegetais. Esta classe de substâncias destaca-se por atuar no vegetal como Fitolexina, em resposta a estresses causados por fungos ou bactérias, exibindo atividade antifúngica e antimicotóxica (MOHANLALL *et al.* 2006).

Avaliação da atividade antioxidante das substâncias **CG 1**, **CG 6**, **CG 7**, **CG 9** e **CG 10**, obtidas a partir do ensaio da inibição da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e do seqüestro do radical livre estável DPPH, indicou que **CG 6** e **CG 7** apresentaram alta atividade antioxidante, chegando a ser, em algumas concentrações, mais efetivas que o padrão quercetina. A substância **CG 10** apresentou atividade moderada em ambos os métodos, e as substâncias **CG 9** e **CG 1** apresentaram baixa ou nenhuma atividade, respectivamente.

Desta forma, este trabalho contribui para a taxonomia de espécies endêmicas que medram o semi-árido nordestino, fornecendo um estudo fitoquímico parcial de *C. gardnerianum*. Além disso, a realização dos testes biológicos das substâncias isoladas contribui para indicar futuros candidatos a fármacos.

6.0 Referências

- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Oxford-New York, Elsevier p. 328, 1989a.
- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Oxford-New York, Elsevier p. 150-167, 1989b.
- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Oxford-New York, Elsevier p. 334, 1989c.
- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Oxford-New York, Elsevier p. 123, 1989d.
- ALCARAZ, M. J.; CARVALHO, J. C. T. Flavonóides como agentes anti-inflamatórios. In: CARVALHO, J. C. T., Fitoterápidos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.; Ribeirão Preto, SP – Tecmedd, p. 79-97, 2004
- BAHIA, M.V.; BATISTA, J. S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae) Journal of the Brazilian Chemical Society v. 16, p. 1402, 2005.
- BARBOSA, L. C. de A., Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos, Editora UFV, MG, p. 104-106, 2007.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quimica Nova v. 29, p.113-123, 2006.
- BENINGER, C. W.; ABOU-ZAID, M. M. Flavonol glycosides from four *pine* species that inhibit early instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) development. Biochemical Systematics and Ecology v. 25, p. 505-512, 1997.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie v. 28, p. 25-30, 1995.
- CANDY, H. A.; WRIGHT, W. Helichryoside, a new acylated flavonoid glycoside from *Helichrysum kraussii*. Journal of the South African Chemical Institute v. 28, p. 215-219, 1975.

- CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-Activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine* v. 22, p. 749-760, 1997.
- CHENG, J. T.; HSU, F. L.; CHEN, H. F. Antihypertensive principles from the leaves of *Melastoma candidum*. *Planta Medica* v. 59, p. 405-407, 1993.
- CHARI, V.M., ILYAS, M., WAGNER, H., NESZMÉLYI, A., CHEN, F.C., CHEN, L.K., LIN, Y.C. e LIN, Y.M. ¹³C- NMR spectroscopy of biflavonoids. *Phytochemistry* v. 16, p. 1273-1278, 1977.
- COLLINS, F. W.; BOHM, B. A.; WILKINS, C. K. Flavonol glycoside gallates from *Tellima grandiflora*. *Phytochemistry, Elsevier* v. 14, 1099-1102, 1975.
- COSTA, A. F.; SANTOS, F. J. B. dos; CHAVES, M. H. Isoprenóides e Biflavona de *Cenostigma macrophyllum* Tul. CD-ROM da 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, -. Poços de Caldas – MG, 2002.
- DAVID, J. P.; BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. Antioxidantes de Fontes Naturais. In: *Fitoterápidos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.*; Ribeirão Preto, SP – Tecmedd, p. 123-158, 2004.
- DEWICK, P. M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2nd ed. Jhon Wiley & Sons, LTD. 2002.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. dos; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante, *Ciência e Tecnologia Alimentícia*, Campinas, v. 26, p. 446-452, 2006.
- DE LEO, M.; BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; NORSCIA, I.; MORELLI, I.; BATTINELLI, L.; MAZZANTI, G. Phenolic compounds from *Baseonema acuminatum* leaves: Isolation and antimicrobial activity. *Planta Medica* v. 70, 841-846, 2004.
- FILHO, D. W.; SILVA, E. D. da; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: *Plantas Medicinais sob a Ótica da Moderna Química Medicinal*; Chapecó: Argos. p. 317-334, 2001.
- HALLIWELL, B. Oxygen and Nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by Reactive Oxygen, Chlorine and Nitrogen Species: Measurement, Mechanism and Effects of Nutrition. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* v. 443, p. 37-52, 1999.

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., CROSS, C. E. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* v. 119, p. 598-620, 1992.
- HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine* v. 16, p. 845, 1994.
- HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. *The Flavonoids: Advances in Research*. London - New York: Chapman and Hall, p. 91, 1982.
- JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 4ª ed. São Paulo: Editora Nacional, p. 777, 1977.
- LAMER-ZARAWSKA, E. Chemical and taxonomic studies on some species from the *Juniperus* L. genus. *Prace Naukowe Akademii Medycznej we Wrocławiu* v. 16, 3-43, 1983.
- LEE, J. S.; HYOUNG, J. K.; PARK, H.; LEE, Y. S. New Diarylheptanoids from the Stems of *Carpinus cordata*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p.1367-1370, 2002.
- LEWIS, G. P. *Legumes of Bahia*. England: Royal Botanic Gardens Kew p. 369, 1987.
- LI, X.C.; ELSOHLY, H.N.; HUFFORD, C.D.; CLARK, A.M. NMR assignments of ellagic acid derivatives. *Magnetic Resonance Chemistry* v. 37, p. 856-859, 1999.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants, 1968. *Journal of the American Oil Chemists' Society* v.45, p.594-598, 1968
- MASUDA, T., IRITANI, K., YONEMORI, S., OYAMA, Y., TAKEDA, Y. Isolation and Antioxidant Activity of Galloyl Flavonol Glycosides from the Seashore Plant, *Pemphis acidula*. *Bioscience Biotechnology And Biochemistry* v. 65 , p. 1302-1309, 2001.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* v. 48, p.91, 1971.
- NAWWAR, M. A. M.; BRDDRUS, J.; BAUER, H. Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix nilotica*. *Phytochemistry* v. 21, p. 1755-1758, 1982.
- NAWWAR, M. A. M.; HUSSEIN, S. A.M.; MERFORT, I. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*, *Phytochemistry* v. 36, p. 793-798, 1994.
- QUEIROZ, L. P.. *Leguminosas de Caatinga: espécies com potencial forrageiro*. Relatório final. Programa Plantas do Nordeste, Universidade Estadual de Feira de Santana, Royal Botanic Gardens Kew, Associação Plantas do Nordeste, CNPq, Weston Fondation. Feira de Santana – BA, 1998.

- QUEIROZ, L. P. Distribuição das espécies de leguminosae na caatinga. In: EVSB Sampaio et al. (eds). Vegetação e flora da caatinga. Recife: Associação Plantas do Nordeste-APNE/ Centro Nordestino de informações sobre Plantas- CNIP. 2002
- RIBEIRO, R. C.; PELACANI, C. R. Influência do manitol e NaCl na germinação de sementes de duas espécies de leguminosas com importância no semi-árido baiano. *Sitientibus Série Ciências Biológicas* v.6, p. 105-109, 2006.
- ROMUSSI, G.; CAFAGGI, S.; BIGNARDI, G. Polyphenolic compounds from *Quercus ilex* L. Part 4. Constituents of Cupuliferae. *Pharmazie* v. 37, 738-739, 1982.
- SANTOS, F. J. B. dos; COSTA, A. F.; COSTA, C. L. S. da; CHAVES, M. H. Constituintes químicos da *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Caesalpiniaceae). CD-ROM da 24ª RASBQ. Poços de Caldas – MG, 2001
- SARMA, A. D., SHARMA, R. Anthocyanin-DNA Co pigmentation Complex: Mutual Protection against Oxidative Damage. *Phytochemistry* v. 52, p. 1313-1318, 1999.
- SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas medicinais. In: CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.; Ribeirão Preto, SP – Tecmedd, p. 40-41, 2004.
- SILVA, H. R.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; FERREIRA, J. H. L.; SOARES, M. J. S. Estudo químico e atividade antimicrobiana do extrato etanólico, frações e biflavonas da espécie *Cenostigma macrophyllum* Tul. CD-ROM da 27ª RASBQ, Poços de Caldas-MG, 2004.
- SILVA, M. F. da. Nomes populares das Leguminosas do Brasil; Manaus: EDUA/IMPA/FAPEAM, 2004.
- SILVA, D. A., SILVA, T. M. S. DA, LINS, A. C. S., COSTA, D. A. DA, CAVALCANTE, J. M., MATIAS, W. N., SOUZA, M. F. V. DE, FILHO, R. B. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante de *Sida Galheirensis* Ulbr. (Malvaceae), *Química Nova* v. 29, p. 1250-1254, 2006.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de Compostos orgânicos. Sexta edição. Ed. LTC, RJ, p. 213, 2001.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Editora da Universidade, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.
- SPINKS, A.; *Chemistry and Industry*. 1973, 12, p.885. Extraído do livro Plantas Medicinais, sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, p. 24, 2001.

- SONG, C. Chemical constituents of saffron (*Crocus sativus*). II. The flavonol compounds of petals. *Zhongcaoyao* v. 21, p. 439-441, 1990.
- SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry* v. 97, p. 524-530, 2006.
- STECK, M.; MAZUREK, M. Identification of Natural Coumarins by NMR Spectroscopy, *Lloydia* v. 35, p. 418-431, 1972.
- SUNG, D.; ZHAO, Z.; WONG, H.; FOO, L. Y. Tanins and other phenolics from *Myrica esculenta* Bark. *Phytochemistry* v. 27, p. 579-583, 1988
- TANAKA, J. C. A., SILVA, C. C., FILHO, B. P. D., NAKAMURA, C. V., CARVALHO, J. E. DE, FOGLIO, M. A. Constituintes Químicos de *Luehea divaricata* Mart.. (Tiliaceae). *Química Nova* v. 28, p. 834-837, 2005.
- VISIOLI, F., KEANEY Jr., J. F., HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? *Cardiovascular Research* v. 47, p. 409-409, 2000.
- YUNES, R. A.; FILHO, V. C. Breve análise histórica da Química de Plantas Mediciniais, In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas Mediciniais, sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, p. 18-43, 2001.