



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS VERDES
DE *CLUSIA PARALICOLA* (CLUSIACEAE)**

RAFAELA OLIVEIRA FERREIRA

RECIFE, PERNAMBUCO
JULHO DE 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS VERDES DE *CLUSIA PARALICOLA*
(CLUSIACEAE)**

RAFAELA OLIVEIRA FERREIRA

Sob a Orientação da Professora: Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Química. Área
de Concentração em Química
Orgânica.

RECIFE, PERNAMBUCO
JULHO DE 2011

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS VERDES DE *CLUSIA PARALICOLA*
(CLUSIACEAE)**

RAFAELA OLIVEIRA FERREIRA

Aprovada em _____ / _____ / _____

Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva
(DQ - UFRPE)
(Orientadora)

Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima
(DBR – UFPE)

Dr. Lothar Wilhelm Bieber
(DQF – UFPE)

Dra. Maria de Fátima Agra
(LTF – UFPB)

Dr. Clécio Souza Ramos
(DQ – UFRPE)
Suplente

RECIFE, PERNAMBUCO
JULHO DE 2011

Dedico este trabalho aos meus pais Adrivan Morais Ferreira e Marileuza Oliveira Ferreira por me ensinarem valores essenciais para a vida, pelo amor sempre compartilhado e por acreditarem e investirem em meus sonhos, a minha irmã Lorena Oliveira Ferreira “uma segunda mãe”, um exemplo de força e sensibilidade unidas, a meu sobrinho e afilhado Afonso Ferreira Gil de Oliveira pela fonte de amor e inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar nas trilhas da vida e por ser meu fiel companheiro nesta estadia;

A toda minha família, pelo amor, carinho, apoio, confiança e torcida, amo todos vocês;

A minha orientadora Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa, pelo incentivo, apoio e orientação;

Ao programa de pós-graduação em química da UFRPE, pela oportunidade;

Ao CNPq, pela bolsa concedida;

Aos professores Jeferson Chagas do Nascimento e Vanderlúcia Fonseca de Paula, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante a minha iniciação científica na UESB, que muito contribuíram na concretização deste trabalho;

Aos meus amigos da saudosa Bahia, em especial aos de Urus e da “Cidade Sol” Jequié, que apesar da distância estiveram sempre presentes na forma de boas recordações, obrigada pela torcida;

Aos meus amigos e colegas do BIOFITO, em especial, Tamiris, Mitaliene de Deus, Milena, Natália, Telma, Silvana, Patrícia, Franciana, Raquel, Maria, Girliane, Fernanda, Dário, seu Paulo, Antônio e John pelo acolhimento, pelos conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração nas horas ruins;

Aos meus colegas do curso de pós-graduação, em especial, Marcílio e Edmilson;

A Dona Marlene por ter me acolhido tão bem em sua casa aqui no Recife, e a Nilda por arrumar a minha “grande bagunça”;

Aos professores do programa de pós-graduação em química da UFRPE, em especial, ao prof. Clécio Ramos pelos ensinamentos em CG/MS e CD e ao prof. Celso Camara pelos ensinamentos em química orgânica;

Ao CENAPESQ, em especial ao Jeizon, pela realização e acompanhamento em alguns experimentos;

A botânica Dra. Maria de Fátima Agra pela identificação da espécie vegetal;

A Bruna pela ajuda nos experimentos de rotação específica;

Desde já, agradeço à banca examinadora, pelas críticas, sugestões e correções sugeridas a este trabalho.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que direta e indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade, é saber que os outros crêm em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos”. **Albert Einstein**

“Só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.” **Antoine de Saint-Exupéry**

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	IX
Índice de Esquemas.....	XIV
Índice de Tabelas.....	XV
ABREVIATURAS.....	XVI
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DOS FRUTOS DE <i>CLUSIA PARALICOLA</i>	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Gênero <i>Clusia</i> e a espécie <i>Clusia paralicola</i>	21
1.1.2. Biossíntese e ocorrência de benzofenonas no gênero <i>Clusia</i>	23
1.2. Estresse oxidativo e a busca por antioxidantes de origem natural.....	28
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Geral.....	32
2.2. Específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Material vegetal.....	33
3.2. Obtenção dos extratos.....	33
3.3. Métodos Cromatográficos.....	33
3.3.1. Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	33
3.3.2. Cromatografia Líquida de Alto Eficiência (CLAE).....	34
3.3.3. Cromatografia Gasosa (CG) acoplada e Espectrometria de Massas (EM).....	34
3.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	35
3.5. Espectroscopia no Infravermelho.....	35
3.6. Dicroísmo Circular (CD).....	35
3.7. Rotação Específica $[\alpha]$	35
3.8. Reagentes empregados nos testes antioxidantes.....	35
3.9. Isolamento dos constituintes químicos.....	36
3.10. Avaliação da atividade antioxidante.....	40
3.10.1. Teor de fenólicos totais.....	40
3.10.2. Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH.....	40
3.10.3. Avaliação da atividade sequestradora do radical ABTS ⁺	41

3.10.4. Ensaio da atividade antioxidante frente ao sistema β-caroteno/ácido linoléico.....	42
3.10.5. Análises estatísticas.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Identificação estrutural dos constituintes químicos.....	44
4.1.1. Fenilpropanóide.....	44
4.1.2. Esteróides.....	45
4.1.3. Triterpeno.....	51
4.1.4. Catequina.....	58
4.1.5. Biflavonóides.....	69
4.2. Testes antioxidantes.....	97
4.2.1. Determinação do teor de fenólicos totais.....	97
4.2.2. Atividade sequestradora do radical livre DPPH'.....	98
4.2.3. Atividade sequestradora frente ao cátion radical ABTS⁺.....	101
4.2.4. Atividade antioxidante utilizando o sistema β-caroteno/ácido linoléico.....	102
5. CONCLUSÕES.....	106
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Clusia paralicola</i>	22
Figura 2. Estruturas de algumas benzofenonas isoladas de espécies do gênero <i>Clusia</i>	26
Figura 3. Extresse Oxidativo.....	28
Figura 4. Núcleo flavonoídico (I) e núcleo 4-oxo-flavonóide (II).....	30
Figura 5. Espectro de massas de FCH2 obtido por CG/MS (70 eV).....	44
Figura 6. Espectro de IV (ATR) de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol).....	46
Figura 7. Espectro de RMN de ^1H de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (500 MHz).....	46
Figura 8. Espectro de RMN de ^1H de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (125 MHz). Expansão em campo baixo.....	47
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (125 MHz). Expansão em campo alto.....	47
Figura 10. Espectro de APT de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (125 MHz).....	48
Figura 11. Espectro de APT de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (125 MHz). Expansão em campo baixo.....	48
Figura 12. Espectro de APT de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (125 MHz). Expansão em campo alto.....	49
Figura 13. Espectro de IV (ATR) de FCH5 (β -amirina).....	52
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCH5 (β -amirina).....	52
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCH5 (β -amirina). Expansão em campo baixo.....	53
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCH5 (β -amirina). Expansão em campo alto.....	53
Figura 17. Espectro de APT em CDCl_3 (100 MHz) de FCH5 (β -amirina).....	54
Figura 18. Espectro de APT em CDCl_3 (100 MHz) de FCH5 (β -amirina). Expansão em campo baixo (C e CH_2 para cima; CH e CH_3 para baixo).....	54

Figura 19. Espectro de APT em CDCl_3 (100 MHz) de FCH5 (β -amirina). Expansão em campo alto (C e CH_2 para cima; CH e CH_3 para baixo).....	55
Figura 20. Espectro de massas de FCH5 (β -amirina) obtido por CG/MS (70 eV).....	56
Figura 21. Proposta de fragmentação para FCH5 (β -amirina).....	56
Figura 22. Cromatogramas (HPLC-DAD, 320 e 254 nm) da subfração FCAE7.....	59
Figura 23. Espectro de IV (ATR) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>).....	59
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>).....	60
Figura 25. Espectro de RNM de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo baixo.....	60
Figura 26. Espectro de RNM de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo baixo.....	61
Figura 27. Espectro de RNM de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo baixo.....	61
Figura 28. Espectro de RNM de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo alto.....	62
Figura 29. Espectro de HOMOCOSY ^1H , ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo alto.....	62
Figura 30. Espectro de NOESY ^1H , ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo alto.....	63
Figura 31. Espectro de APT em acetona- d_6 (125 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>).....	63
Figura 32. Espectro de APT em acetona- d_6 (125 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo baixo (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima).....	64
Figura 33. Espectro de APT em acetona- d_6 (125 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo baixo (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima).....	64
Figura 34. Espectro de APT em acetona- d_6 (125 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo alto (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima).....	65
Figura 35. Espectro de HSQC em acetona- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C :125 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo baixo.....	65
Figura 36. Espectro de HSQC em acetona- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C :125 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>). Expansão em campo baixo.....	66

Figura 37. Algumas correlações ($^{2,3}J$) observadas no espectro de HMBC de FCAE1 (<i>epicatequina</i>).....	66
Figura 38. Espectro de HMBC em acetona- d_6 (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>).....	67
Figura 39. Espectro de IV (ATR) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	73
Figura 40. Espectro de IV (ATR) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''- <i>O</i> -glicosídeo)....	73
Figura 41. Cromatograma (CLAE-DAD; 320 nm) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo)74	
Figura 42. Cromatograma (CLAE-DAD; 320 nm) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	74
Figura 43. Espectro de UV em MeOH de FCAE4 (GB1-7- <i>O</i> -glicosídeo).....	75
Figura 44. Espectro de UV em MeOH de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7- <i>O</i> -glicosídeo).....	75
Figura 45. Espectro de massas por ionização em eletrospray (LC-ESIMS) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	76
Figura 46. Proposta de fragmentação de FCAE4 (GB1-7- <i>O</i> -glicosídeo). Adaptada de JACKSON <i>et al.</i> 1971.....	77
Figura 47. Espectro de massas por ionização em eletrospray (ESIMS) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	78
Figura 48. Proposta de fragmentação de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7- <i>O</i> -glicosídeo). Adaptada de JACKSON <i>et al.</i> 1971.....	79
Figura 49. Espectro de RMN de 1H em DMSO- d_6 (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	80
Figura 50. Espectro de RMN de 1H em DMSO- d_6 (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo baixo.....	80
Figura 51. Espectro de RMN de 1H em DMSO- d_6 (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo baixo.....	81
Figura 52. Espectro de RMN de 1H em DMSO- d_6 (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo alto.....	81
Figura 53. Espectro de RMN de 1H em DMSO- d_6 (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo alto.....	82
Figura 54. Espectro de HOMOCOSY 1H , 1H em DMSO- d_6 (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	83

Figura 55. Espectro de APT em DMSO- <i>d</i> ₆ (75 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	84
Figura 56. Espectro de APT em DMSO- <i>d</i> ₆ (75 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo baixo (C e CH ₂ para cima; CH e CH ₃ para baixo).84	
Figura 57. Espectro de APT em DMSO- <i>d</i> ₆ (75 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo baixo (C e CH ₂ para cima; CH e CH ₃ para baixo)..85	
Figura 58. Espectro de APT em DMSO- <i>d</i> ₆ (75 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo alto (C e CH ₂ para cima; CH e CH ₃ para baixo)....85	
Figura 59. Espectro de HSQC em DMSO- <i>d</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	86
Figura 60. Espectro de HSQC em DMSO- <i>d</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	87
Figura 61. Algumas correlações (^{2,3} J _{CH}) observadas no espectro de HMBC de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	87
Figura 62. Espectro de HMBC em DMSO- <i>d</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	88
Figura 63. Espectro de HMBC em DMSO- <i>d</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo baixo.....	89
Figura 64. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (500 MHz) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	90
Figura 65. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (500 MHz) de FCAE5(3,8''-binaringenina-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo baixo.....	90
Figura 66. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (500 MHz) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo baixo.....	91
Figura 67. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (500 MHz) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''- <i>O</i> -glicosídeo). Expansão em campo alto.....	91
Figura 68. Espectro de APT em DMSO- <i>d</i> ₆ (75 MHz) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''- <i>O</i> -glicosídeo).....	92
Figura 69. Espectro de Dicroísmo Circular (CD) em MeOH (—) e DMSO (···) e UV em MeOH (—) de GB-4 FERRARI <i>et al.</i> (2003) e FCAE4 (GB1-7- <i>O</i> -glicosídeo). Abreviaturas: f= flavanona e hf= 3-hidroxi flavanona.....	93
Figura 70. Espectro de Dicroísmo Circular (CD) em MeOH (—) e DMSO (···) e UV em MeOH (—) de <i>ent</i> -naringenina-(I-3α, II-8)-4'- <i>O</i> -methylnaringenin MBWAMBO <i>et</i>	

<i>al.</i> (2006) e FCAE5 (3,8''-binaringenina-7-O-glicosídeo).....	94
Figura 71. Teor de Fenólicos Totais (FT) do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH:H ₂ O (100 µg/mL) dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	97
Figura 72. Atividade seqüestradora do radical DPPH do extrato EtOH, das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H ₂ O e dos biflavonóides dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	99
Figura 73. Atividade seqüestradora do cátion radical ABTS ⁺ do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt, MeOH/H ₂ O e biflavonóides dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	101
Figura 74. Correlação de Pearson ($r = 0,958$; $p=0,042$) entre os valores de CE ₅₀ dos testes radiculares de ABTS ⁺ e DPPH dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	102
Figura 75. Atividade antioxidante (sistema β-caroteno/ácido linoléico) do extrato EtOH (100 µg mL ⁻¹) dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	103
Figura 76. Atividade antioxidante (sistema β-caroteno/ácido linoléico) da fração hexânica (100 µg mL ⁻¹) dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	104
Figura 77. Atividade antioxidante (sistema β-caroteno/ácido linoléico) da fração AcOEt (100 µg mL ⁻¹) dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	104
Figura 78. Atividade antioxidante (sistema β-caroteno/ácido linoléico) da fração MeOH/H ₂ O (100 µg mL ⁻¹) dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	105
Figura 79. Atividade antioxidante (sistema β-caroteno/ácido linoléico) dos biflavonóides (100 µg mL ⁻¹) isolados dos frutos verdes de <i>C. paralicola</i>	105

Índice de Esquemas

Esquema 1. Marcha para o isolamento das substâncias da fração hexânica de <i>C. parvicola</i>	38
Esquema 2. Marcha para o isolamento das substâncias de fração acetato de etila de <i>C. parvicola</i>	39

Índice de Tabelas

Tabela 1. Ocorrência de benzofenonas em espécies do gênero <i>Clusia</i> , família Clusiaceae.....	23
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H em CDCl_3 (500 MHz) de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol).....	49
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (500 MHz e 125 MHz, respectivamente) de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol).....	50
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 MHz e 100 MHz, respectivamente) de FCH5 (β -amirina).....	57
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em acetona- d_6 (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCAE1 (<i>epicatequina</i>).....	68
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- d_6 (500 e 75 MHz, respectivamente) de FCAE4 (GB1-7''- <i>O</i> -Glicosídeo).....	95
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- d_6 (500 e 75 MHz, respectivamente) de FCAE5.....	96
Tabela 8. Teor de fenólicos totais de extratos e frações de espécies da família Clusiaceae.....	98

ABREVIATURAS

δ	deslocamento químico (ppm)
ABTS	ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico]
ABTS ^{•+}	cátion radical ABTS
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	duplete
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
FT	Fenólicos Totais
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
HOMOCOSY	Homonuclear Correlated Spectroscopy
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
MHz	Megahertz
NP	ácido difenilbórico etanolamina
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	simpleto
sl	simpleto largo
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

RESUMO

Contribuição ao estudo químico e avaliação da atividade antioxidante dos frutos verdes de *Clusia paralicola* (Clusiaceae)

Programa de Pós-graduação em Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rafaela Oliveira Ferreira (rafaella.oliveira@hotmail.com)

Clusia paralicola (Clusiaceae) têm ocorrência nas florestas nordestinas, especialmente do semi-árido e dos brejos de altitude, é conhecida popularmente como pororoca. Este trabalho descreve o estudo químico e a avaliação da atividade antioxidante dos frutos verdes de *Clusia paralicola*. O estudo químico resultou no isolamento e identificação de dois biflavonóides (GB-1-7''-*O*-glicosídeo e 3,8''-binaringenina-7''-*O*- β -glicosídeo), uma catequina (*epicatequina*), dois esteróides (β -sitosterol e estigmasterol), um fenilpropanóide (1,3,5-trimetoxi-2-propenilbenzeno) e um triterpeno (β -amirina). As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas pelas análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo 2D e LC-ESI-MS. A estereoquímica absoluta dos biflavonoides foi determinada através da análise de dicroísmo circular e a elucidação estrutural completa foi realizada com GB1-7-*O*-glicosídeo. Para a determinação do teor de fenólicos totais foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu e para avaliar o potencial antioxidante foram realizados os ensaios com DPPH, ABTS e o sistema β -caroteno/ácido linoléico com o extrato EtOHe frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada também com a mistura dos biflavonoides. Para o teor de fenólicos totais, atividade antiradicalar (ABTS e DPPH) e atividade antioxidante com o sistema β -caroteno/ácido linoléico foram mais ativos o extrato EtOH e a fração AcOEt. O extrato EtOH e frações testadas apresentaram correlação com o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante. Com exceção da β -amirina, previamente identificada no látex de *C. paralicola*, todas as substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez nesta espécie. A esteroquímica absoluta foi determinada como sendo (2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*)- GB1-7-*O*-glicosídeo e (2*R*, 3*S*, 2''*R*)-3,8''-binaringenina-7-*O*-glicosídeo. Estes biflavonóides são inéditos no gênero *Clusia*.

ABSTRACT

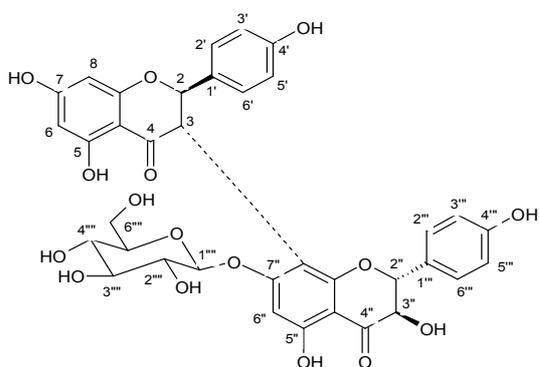
Contribuição ao estudo químico e avaliação da atividade antioxidante dos frutos verdes de *Clusia paralicola* (Clusiaceae)

Programa de Pós-graduação em Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rafaela Oliveira Ferreira (rafaella.oliveira@hotmail.com)

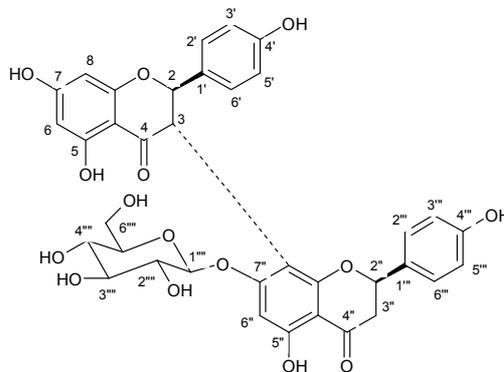
Clusia paralicola (Clusiaceae) occurs in forests from northeastern Brazil, especially in the semi-arid and wet forests, is popularly known as pororoca. This work describes the chemical and antioxidant activity of the green fruits from *Clusia paralicola* G. Mariz Cunha and resulted in the isolation and identification of two biflavonoids (GB1-7"-*O*-glucoside and 3,8'-binaringenin-7"-*O*- β -glucoside), a catechin (epicatechin), two steroids (β -sitosterol and stigmasterol), a phenylpropanoid (1,3,5-trimethoxy-2-propenilbenzen) and a triterpene (β -amyrin). The structures of isolated compounds were elucidated by analysis of NMR spectra of ^1H and ^{13}C , including 2D and LC-ESI-MS. The absolute stereochemistry of biflavonoids was determined by circular dichroism analysis and complete structural elucidation was performed to GB1-7-*O*-glucoside. To determine the total phenolic content was used Folin-Ciocalteu test and to evaluate the antioxidant potential were used DPPH, ABTS and the system β -carotene/ linoleic acid with the EtOH extract and hexane, EtOAc and MeOH/H₂O fractions. Evaluation of antioxidant activity was also performed with mixtures of two biflavonoids. For the total phenolic content, antiradicalar activity (DPPH and ABTS) and antioxidant activity with the system β -carotene/linoleic acid were more active the EtOH extract and EtOAc fraction. The EtOH extract and fractions tested showed correlation with the total phenolic content and activity antioxidant. With the exception of β -amyrin, previously identified in the latex of *C. paralicola*, all substances are being reported for the first time in this species. The absolute stereochemistry was determined as (2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*)-GB1-7-*O*-glucoside and (2*R*, 3*S*, 2''*R*)-3,8'-binaringenina-7-*O*-glycoside. These biflavonoids are inedited in the *Clusia* genus.

SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DOS FRUTOS DE *CLUSIA PARALICOLA*

Biflavonóides:

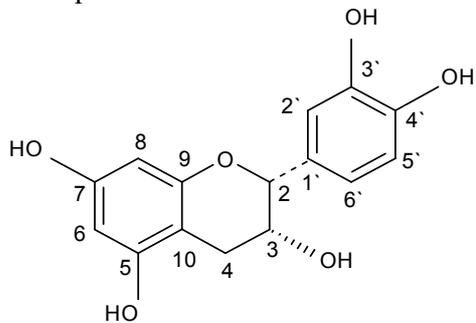


(-)-2R,3S,2''R,3''S- GB1-7''-O-glicosídeo



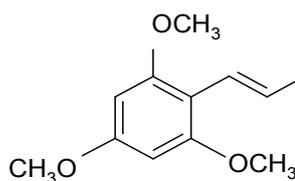
(-)-2R,3S,2''R-3,8''-Binaringenina-7''-O-glicosídeo

Catequina:



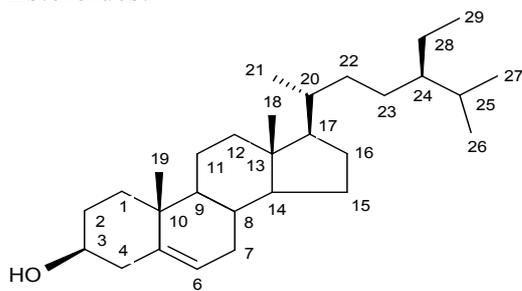
Epicatequina

Fenilpropanóide:

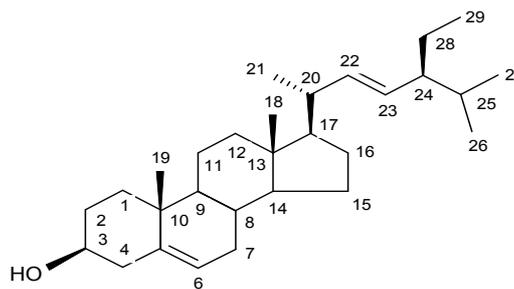


1,3,5-trimetoxi-2-propenilbenzeno

Esteróides:

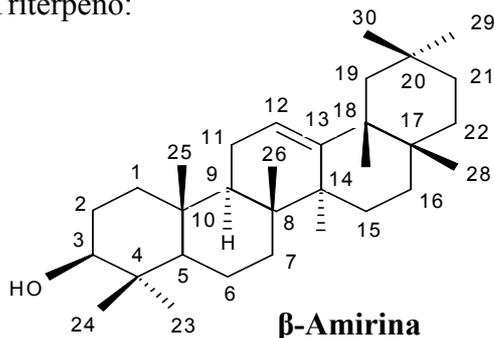


β-Sitosterol



Estigmasterol

Triterpeno:



β-Amirina

1. INTRODUÇÃO

A família Clusiaceae pertence à ordem das Malpighiales e compreende cerca de 40 gêneros e mais de 1200 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais úmidas de todo o mundo (DE OLIVEIRA *et al.*, 1996; CAMPANA *et al.*, 2010). As espécies desta família são em sua maioria lenhosas, arbóreas ou arbustivas, incluindo algumas herbáceas. Suas flores são geralmente vistosas, apresentando-se isoladas ou reunidas em inflorescência (JOLY, 1983). Suas folhas apresentam cavidades secretoras resiníferas, sendo algumas delas produtoras de resinas aromáticas que, somadas aos canais secretores, promovem o acúmulo de diversos tipos de metabólitos secundários, tais como xantonas e cumarinas (CARDONA *et al.*, 1990; CORTEZ *et al.*, 1999). São caracterizadas pela produção de látex, muitas vezes coloridos. Embora algumas espécies ofereçam néctar ou pólen como recurso para os polinizadores, a ocorrência de recompensas raras, como resinas (*Clusia*) e óleos aromáticos (*Tovomita*), com o intuito de atrair polinizadores, como abelhas, beija-flores e besouros é freqüente nesta família (DA CAMARA, 2001).

Plantas produtoras de resina (*Clusia*) têm um papel importante na comunidade ecológica, por fornecerem matéria prima básica para a construção de ninhos de várias espécies de abelhas, que podem estar coletando este material em conjunto com os grãos de pólen e assim realizando a polinização em outras espécies vegetais que dependem da polinização cruzada. Além da função estrutural, a resina usada nos ninhos ainda serve como proteção contra invasores e desempenha também função antimicrobiana (CARMO & FRANCESCHINELLI, 2002).

Espécies da família Clusiaceae contendo constituintes derivados de compostos fenólicos, especialmente os derivados de floroglucinol e benzofenonas (BEERHUES & LIU, 2009; COMPAGNONE *et al.*, 2008), têm despertado o interesse por apresentarem diversas atividades biológicas promissoras, a exemplo das atividades antioxidantes relatadas para *Garcinia assigu* (ITO *et al.*, 2003), *Garcinia cambogia* (KALODZIECZYK *et al.*, 2009) e *Symphonia globulifera* (NGOUELA *et al.*, 2006). Além de apresentarem em sua composição química outros metabólitos bioativos, pertencentes à classe dos flavonóides, triterpenos, esteróides, tocotrienóis, tocoferóis, dentre outros (DA CAMARA, 2001; TEXEIRA *et al.*, 2006; LEAL *et al.*, 2010).

1.1. Gênero *Clusia* e a espécie *Clusia paralicola*

O gênero *Clusia* (Subfamília Clusioideae) abrange cerca de 250 espécies distribuídas do sul da Florida até o sul do Brasil (DE OLIVEIRA, 1999), sendo conhecidas popularmente como “cebolos-das-matas” (ENGLER, 1888). A maioria das espécies é dióica e caracterizam-se por produzir grande quantidade de látex na maioria dos seus tecidos e resinas florais ricas em benzofenonas polipreniladas (STEVENS, 2002). As resinas florais são oferecidas como recompensa aos polinizadores, como as abelhas, que as utilizam para a construção de seus ninhos devido às características de polimerização das benzofenonas polipreniladas (ARMBRUSTER, 1984; ROUBIK, 1989).

O uso popular de plantas deste gênero está relacionado à presença do látex e da resina, sendo utilizadas popularmente no tratamento de reumatismo, problemas estomacais e como purgativos (SALAMA, 1986). A resina extraída dos frutos de *C. rosea* é empregada na cicatrização de ferimentos por nativos da Venezuela (PITTER, 1970). As flores de *C. insignis*, popularmente conhecida como “apuí”, são empregadas como purgativas (BALBACH, 1986). Já o extrato aquoso das folhas de *C. coclensis* é usado na medicina popular no tratamento de hipertensão arterial (GARCÍA-GONZALEZ & MATAMOROS, 1998).

Investigações fitoquímicas com *C. rosea* (GUSTAFSON *et al.*, 1992), *C. nemorosa* (CERRINI *et al.*, 1993) e *C. grandiflora* (LOKVAM *et al.*, 2000) tem revelado a presença de benzofenonas poliisopreniladas nos frutos, raiz, folhas e látex. Substâncias pertencentes a esta classe de produto natural mostraram atividade inibitória sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GUSTAFSON *et al.*, 1992; HUERTA-REYES *et al.*, 2004). A atividade anticâncer mostrada também por *Clusia rosea* é atribuída à presença de benzofenonas isopreniladas e tem como alvo a enzima topoisomerase (DIAZ-CARBALLO *et al.*, 2003). Clusianona e seus derivados também apresentaram atividade anticâncer e contra doenças virais, sendo inibidores da topoisomerase e telomerase (SEEBER *et al.*, 2003a; SEEBER *et al.*, 2003b). Estes fatos têm despertado o interesse pelo estudo de espécies de *Clusia* de diferentes habitats nos ecossistemas do Brasil (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

Clusia paralicola G. Mariz Cunha (Figura 1, p. 22) tem ocorrência nas florestas nordestinas, especialmente nas florestas de altitude do semi-árido ou brejos de altitude

(ALCOFORADO-FILHO *et al.*, 2003). Caracteriza-se, como a maioria das espécies do gênero por ser dióica, apresentando flores grandes e vistosas (CAMPANA *et al.*, 2010).

O estudo químico com *Clusia paralycola* mostra-se de grande importância, pois há poucos relatos na literatura envolvendo esta espécie. Investigações sobre o potencial biológico do extrato acetônico da raiz de *C. paralycola* revelaram significativa ação antimicrobiana e estudos fitoquímicos deste extrato levaram ao isolamento do fenantreno prenulado paralicolina A que, em testes “*in vitro*”, demonstraram promissora atividade citotóxica (DELLE MONACHE *et al.*, 1987). Também das raízes de *C. paralycola* foram isoladas três novas diarilas com potente atividade citotóxica sobre linhagens de células KB (linfócitos B Killer) e atividade de cisão de fita do DNA (SEO *et al.*, 1999). Além disso, DE OLIVEIRA *et al.* (1996) verificaram a presença de benzofenonas isopreniladas nos extratos etanólicos metilados das resinas florais desta espécie.



Figura 1. *Clusia paralycola*.

1.1.2. Biossíntese e ocorrência de benzofenonas no gênero *Clusia*

As benzofenonas são compostos cetônicos de origem natural e de distribuição restrita, ocorrendo principalmente na família Clusiaceae e Gentianaceae. A família Clusiaceae se destaca pelas suas benzofenonas geralmente substituídas por isoprenóides ou geranóides, que podem estar ciclizados ou não (KUSTER & ROCHA, 2000). As benzofenonas poliisopreniladas e outras substâncias benzofenônicas e alquil-aril-cetonas poliisopreniladas foram isoladas dos gêneros *Garcinia*, *Rheedia* e *Clusia*, em diversos órgãos das plantas (DE OLIVEIRA *et al.*, 1996; MACHADO, 2002; ITO *et al.*, 2003).

As benzofenonas são compostos formados por síntese mista a partir das vias do ácido chiquímico e do acetato (CUESTA-RUBIO *et al.*, 1999; GROSSMAN & JACOBS, 2000). Esses compostos são produzidos nas plantas superiores pela benzofenona sintase (BPS), uma enzima policetideo sintase (PKS), que cicliza o produto formado pela condensação de benzoil-CoA e três unidades de malonil-CoA. Dessa forma ocorre a formação do esqueleto C₁₃ das benzofenonas. O produto da reação da BPS e seus derivados hidroxilados podem sofrer prenilações utilizando unidades C₅ e C₁₀ de isoprenóides como doadores de prenilas. A reação de ciclização intramolecular das benzofenonas origina as xantonas (HAMED *et al.*, 2006; BEERHUES & LIU, 2009). A seguir (Tabela 1, p. 23) são listadas algumas benzofenonas isoladas do gênero *Clusia*.

Tabela 1. Ocorrência de benzofenonas em espécies do gênero *Clusia*, família Clusiaceae.

Benzofenona	Espécie de <i>Clusia</i>	Referência
7 – epi – Clusianona (1)	<i>C. sandinensis</i>	PICCINELLI <i>et al.</i> , 2005
	<i>C. torresii</i>	
Clusianona (2)	<i>C. fluminensis</i>	PORTO <i>et al.</i> , 2000
	<i>C. burchellii</i>	
	<i>C. lanceola</i>	
	<i>C. pana-panari</i>	
	<i>C. pernambucensis</i>	

	<i>C. paralicola</i>	
	<i>C. weddelliana</i>	
	<i>C. congestiflora</i>	
	<i>C. torresii</i>	
	<i>C. sandinensis</i>	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1996
	<i>C. spiritu-santensis</i>	
18-19-di-hidroxi-Clusianona(3)	<i>C. torresii</i>	PICCINELLI <i>et al.</i> , 2005
Gutiferona E (4)	<i>C. rosea</i>	GUSTAFSON <i>et al.</i> , 1992
Cambogina/Isogarcinol	<i>C. rosea</i>	PROTIVA <i>et al.</i> , 2008
Isoxantoquimol (5)		
Sampsoniona A (6)	<i>C. plukenetti</i>	CIOCHINA & GROSSMAN, 2006
	<i>C. havetiodes</i>	
Sampsoniona B (7)	<i>C. obdeltifolia</i>	CRUZ & TEXEIRA, 2004
Sampsoniona G (8)	<i>C. obdeltifolia</i>	CRUZ & TEXEIRA, 2004
	<i>C. havetiodes</i>	CHRISTIAN <i>et al.</i> , 2001
Nemorosona (9)	<i>C. torresii</i>	PICCINELLI <i>et al.</i> , 2005
	<i>C. rosea</i>	
	<i>C. grandiflora</i>	
	<i>C. insignis</i>	
	<i>C. nemorosa</i>	
7- epi- Nemorosona (10)	<i>C. nemorosona</i>	HU & SIM, 1999
	<i>C. grandiflora</i>	
	<i>C. insignis</i>	
	<i>C. rósea</i>	
	<i>C. renggerioides</i>	
Nemorosona II (11)	<i>C. nemorosona</i>	HU & SIM, 1999
	<i>C. grandiflora</i>	
	<i>C. rosea</i>	
	<i>C. renggerioides</i>	
	<i>C. insignis</i>	
Hidroxi-nemorosona (12)	<i>C. nemorosona</i>	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1996
Grandona (13)	<i>C. grandiflora</i>	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1996
Vedelianona A (14)	<i>C. weddelliana</i>	PORTO <i>et al.</i> , 2000

	<i>C. lanceolata</i>	
	<i>C. fluminensis</i>	
	<i>C. burchelli</i>	
	<i>C. hilariana</i>	
	<i>C. pana-panari</i>	
	<i>C. pernambucensis</i>	
Vedelianona B (15)	<i>C. weddelliana</i>	PORTO <i>et al.</i> , 2000
	<i>C. lanceolata</i>	
	<i>C. pana-panari</i>	
	<i>C. paralicola</i>	
Lanceolata (16)	<i>C. weddelliana</i>	PORTO <i>et al.</i> , 2000
	<i>C. lanceolata</i>	
	<i>C. fluminensis</i>	
	<i>C. burchellii</i>	
	<i>C. hilariana</i>	
	<i>C. pana-panari</i>	
	<i>C. paralicola</i>	
	<i>C. pernambunensis</i>	
Vismiafenona B (17)	<i>C. ellipticifolia</i>	GONZALEZ <i>et al.</i> , 1983
Plucenetiona A (18)	<i>C. plukenetii</i>	HENRY <i>et al.</i> , 1999
Plucenetiona B (19)	<i>C. plukenetii</i>	HENRY <i>et al.</i> , 1999
Plucenetiona C (20)	<i>C. plukenetii</i>	HENRY <i>et al.</i> , 1999
Plucenetiona D (21)	<i>C. plukenetii</i>	HENRY <i>et al.</i> , 1999
Plucenetiona E (22)	<i>C. havetiodes</i>	CHRISTIAN <i>et al.</i> , 2001
	<i>C. plukenetii</i>	HENRY <i>et al.</i> , 1999
Plucenetiona F (23)	<i>C. plukenetii</i>	HENRY <i>et al.</i> , 1999
	<i>C. havetiodes</i>	CHRISTIAN <i>et al.</i> , 2001
Plucenetiona G (24)	<i>C. plukenetii</i>	HENRY <i>et al.</i> , 1999
Propolona A (25)	<i>C. torresii</i>	PICCINELLI <i>et al.</i> , 2005
Propolona D (26)	<i>C. minor</i>	MARIN <i>et al.</i> , 2008
Hiperibona B (27)	<i>C. minor</i>	MARIN <i>et al.</i> , 2008

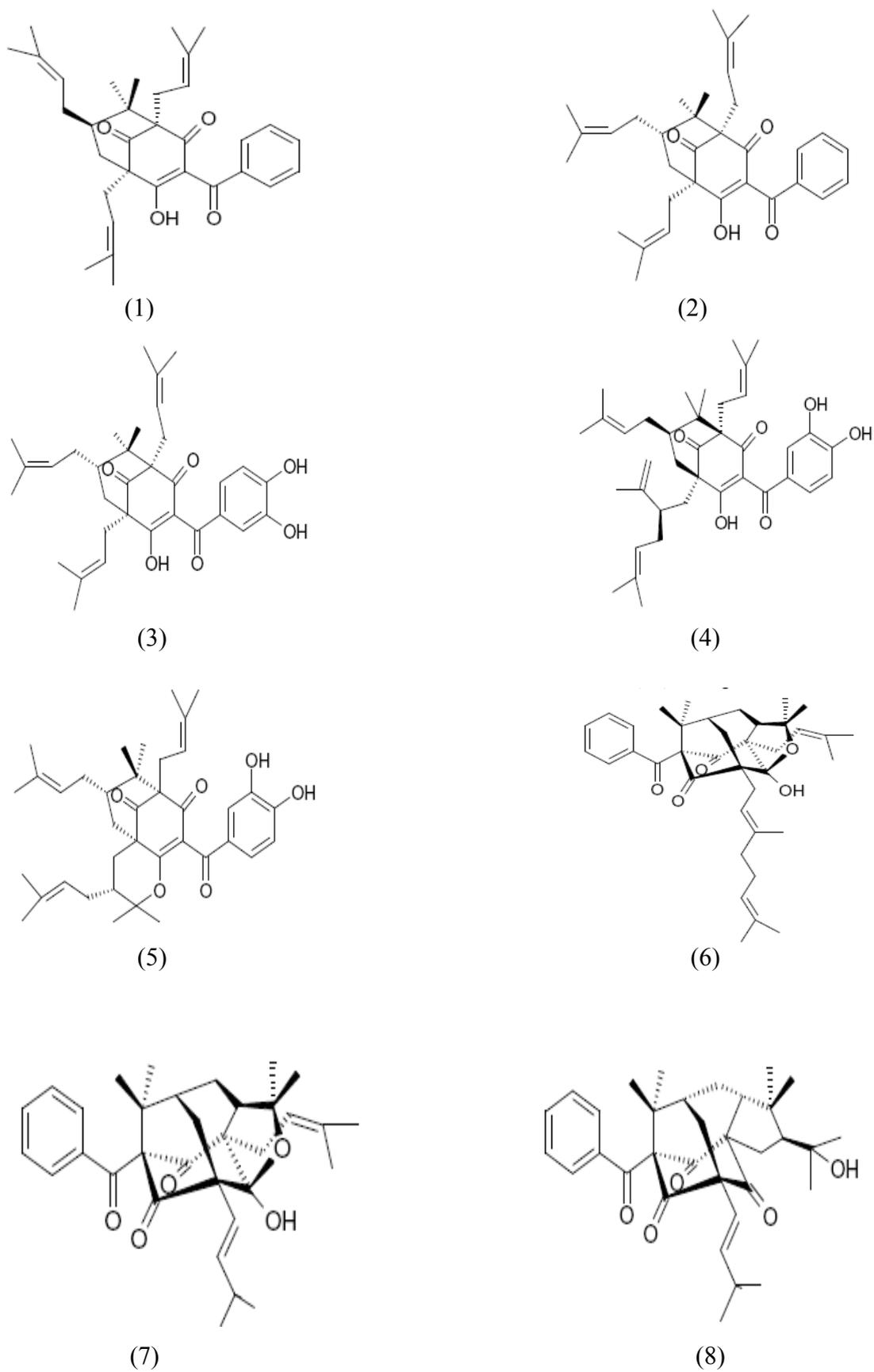
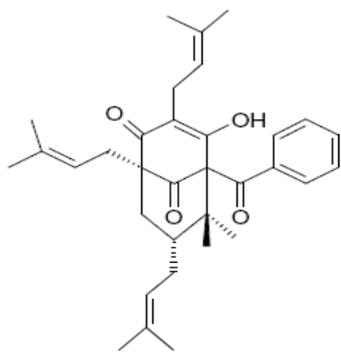
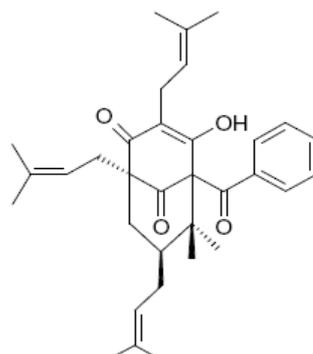


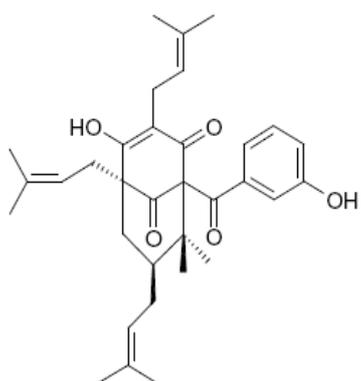
Figura 2. Estruturas de algumas das benzofenonas isoladas de espécies do gênero *Clusia*.



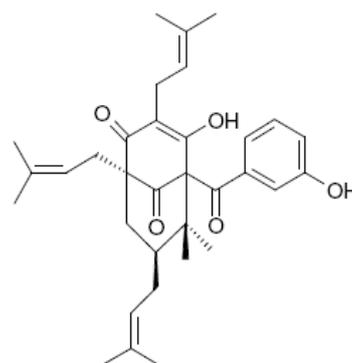
(9)



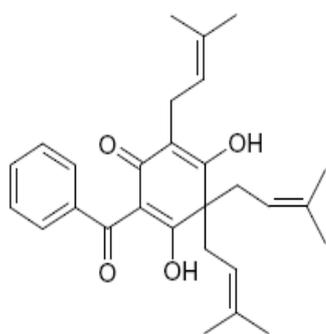
(10)



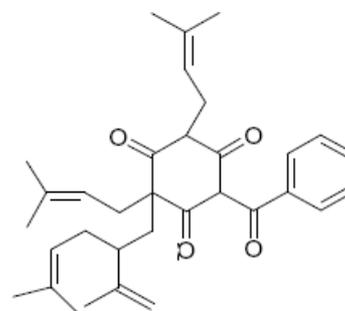
(11)



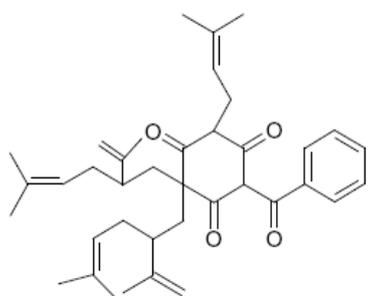
(12)



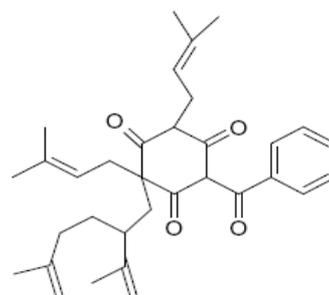
(13)



(14)



(15)



(16)

Figura 2. Estruturas de algumas das benzofenonas isoladas de espécies do gênero *Clusia*.

As benzofenonas polipreniladas têm demonstrado diferentes propriedades biológicas, dentre elas: citoproteção contra HIV *in vitro*, propriedades antimicrobianas, atividade antioxidante e citotóxica (LENTA *et al.*, 2007).

1.2. Estresse oxidativo e antioxidantes de origem natural

O estresse oxidativo em animais (Figura 3, p. 28) é causado pelo desbalanço entre os sistemas antioxidantes e a produção de compostos oxidativos (radicais livres) e está associado com diversas doenças, especialmente vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e desordens inflamatórias (KAWANISHI *et al.*, 2002; ATOUI *et al.*, 2005; LAGUERRE *et al.*, 2007). Embora as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) atuem de forma crucial em muitos processos biológicos e de defesa do organismo, sua superprodução pode contribuir para os fenômenos imunopatológicos relacionados ao estresse oxidativo (AWAH *et al.*, 2010).

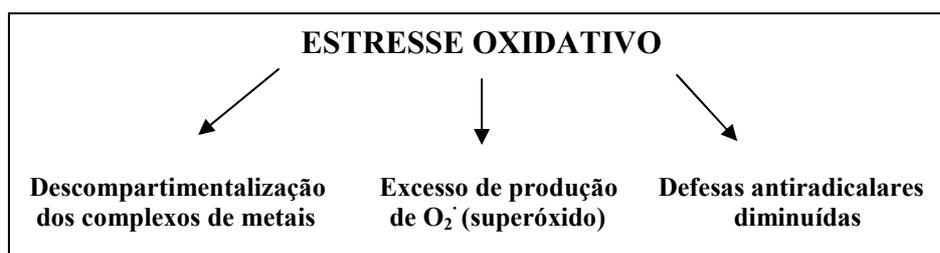


Figura 3. Estresse Oxidativo (PÓVOA FILHO, 1995).

O oxigênio molecular e seus radicais são os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. O termo “espécies reativas de oxigênio” (ERO) inclui os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($HO\cdot$), o radical peroxila ($ROO\cdot$) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2), os quais são freqüentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos (GULCIN *et al.*, 2003).

As espécies reativas (ERO) atuam como mediadores da transferência de elétrons e em vários processos bioquímicos, como a fagocitose, processo em que espécies reativas de oxigênio são produzidas para eliminar o agente agressor por oxidação (HALLIWELL, 1995).

As ERO podem atacar as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidios e do colesterol, iniciando assim a peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com o oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos. Os hidroperóxidos formados durante a peroxidação lipídica podem reagir com metais, formando aldeídos e epóxidos, os quais são reativos e podem danificar o DNA (HASLAM, 1996; MULLER *et al.* 2007; SOUSA *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são responsáveis por combater o excesso de radicais livres no organismo, sendo produzidos pelo próprio corpo ou absorvidos pela dieta. O termo antioxidante pode ser definido como *“qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”* (HALLIWELL, 2000).

Os antioxidantes podem atuar em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos, dentre estes, podemos citar a doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, ligações de íons metálicos (alteração de valência), conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV (MAISUTHISAKUL *et al.*, 2007)

Estudos epidemiológicos têm associado dietas ricas em frutas e hortaliças com a redução do risco de doenças crônicas, cardíacas, neurológicas e cardiovasculares, bem como diversos tipos de câncer (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2001; PODSEDEK, 2007). Os principais antioxidantes em vegetais são os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides (MOURE *et al.*, 2001; PODSEDEK, 2007; LIU *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos geralmente apresentam ampla distribuição no reino vegetal. Sua principal característica é a presença do núcleo fenólico, podendo apresentar mais de uma hidroxila ligada ao anel benzênico, sendo assim, denominados de polifenóis. Essas substâncias são fruto do metabolismo secundário das plantas, e apresentam como funções fisiológicas nos vegetais atividades de defesa, incluindo relatos sobre supressão de apetite em insetos e também da inibição na germinação de sementes (CARVALHO *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos de plantas abrangem diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico), cumarinas,

flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Acredita-se que a propriedade antioxidante de compostos fenólicos esteja relacionada à suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, atuando tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOUZA *et al.*, 2007).

Os flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides (4-cumarilCoA) e derivados do malonil-CoA (MANN, 1987; DEWICK, 2001). Sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C₆-C₃-C₆), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 4, p. 30) (DI CARLO *et al.*, 1999). Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON & HARRISON, 1990).

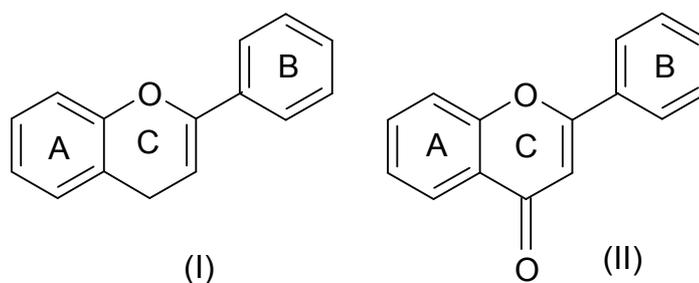


Figura 4. Núcleo flavonoídico (I) e núcleo 4-oxo-flavonóide (II).

Esta classe de metabólitos apresenta elevado potencial antioxidante e estudos epidemiológicos evidenciaram que seu consumo diário está associado à redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares e exibem ainda ação antimicrobiana, antiviral e antiinflamatória. Entretanto, seu mecanismo de ação *in vivo* ainda não é conhecido (WANG & HUANG, 2004; GATTUSO *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante de flavonóides depende de sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de **H** e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com membranas (BARREIROS *et al.*, 2006).

A elevada atividade antioxidante conferida aos flavonóides pode ser atribuída à presença de hidroxilas adjacentes (orto-difenóis) localizadas em várias posições dos anéis A, B e C, ao sistema de conjugação eletrônica dos anéis aromáticos e a ligação dupla da função oxo (-C=O). Estudos indicam que agliconas, incluindo quercetina, luteolina, miricetina e kanferol têm apresentado maior potencial antioxidante que na respectiva forma heterosídica, visto que a presença do açúcar influencia no processo de interação dessas moléculas com as membranas celulares (RICE-EVANS *et al.*, 1996; WANG & HUANG, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006; DORNAS *et al.*, 2007).

Estudos têm revelado que alguns antioxidantes sintéticos empregados em indústrias alimentícias com o intuito de inibir a peroxidação lipídica dos alimentos, tais como, butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e galato de propila (GP), têm apresentado alguns efeitos tóxicos (SOARES, 2002; SOUSA *et al.*, 2007). Uma vez que os consumidores vêm apresentando rejeição pelo uso de antioxidantes sintéticos, há um crescente interesse na obtenção de substâncias antioxidantes provenientes de produtos naturais (LIU *et al.*, 2011; MURCIA *et al.*, 2004).

Devido à freqüente ocorrência de benzofenonas polipreniladas bioativas e outros fenólicos em estudos com espécies de *Clusia* e a reduzida quantidade de relatos científicos sobre a composição química de *Clusia paralicola*, decidimos conduzir um estudo químico e a análise do potencial antioxidante desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Contribuir para o conhecimento da composição química e atividade antioxidante dos frutos verdes de *Clusia paralicola* G. Mariz Cunha (Clusiaceae).

2.2. Específicos

- Estudar quimicamente os frutos verdes de *C. paralicola* pelo isolamento e determinação estrutural dos constituintes;
- Avaliar o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante através dos testes de DPPH, ABTS⁺ e do sistema β -caroteno/ácido linoléico do extrato e frações dos frutos verdes de *C. paralicola*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Clusia paralicola é comumente encontrada nos estados da Paraíba e Pernambuco. Os frutos verdes de *Clusia paralicola* G. Mariz Cunha foram coletados em 21 de maio de 2010, no município de Cruz do Espírito Santo – Paraíba, e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Lauro Xavier, UFPB. A amostra foi identificada pela profa. Dra. Maria de Fátima Agra, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros, UFPB, João Pessoa, Paraíba.

3.2. Obtenção dos extratos

O material coletado, frutos verdes (280 g), foi triturado em liquidificador e submetido à extração à frio com etanol (15 vezes, 300 mL) até completa exaustão mostrada pela descoloração da solução extrativa. O material extraído foi filtrado e concentrado em rotavapor a 45 °C sob pressão reduzida e foi obtido o extrato etanólico (40 g). Parte do extrato etanólico (30 g) foi dissolvido em MeOH:H₂O (1:1) (500 mL) em banho de ultrassom (30 min.). A solução obtida foi submetida a sucessivas extrações com hexano (5x 200 mL) e acetato de etila (5x 200 mL). As fases obtidas foram filtradas e concentradas em rotavapor, obtendo-se as frações hexânica (11 g), acetato de etila (10 g) e MeOH:H₂O (7 g).

3.3. Métodos Cromatográficos

3.3.1. Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

A cromatografia em coluna foi realizada tendo como suporte Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Suécia) e sílica gel (230-400 mesh, Merck). Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de sílica gel 60F₂₅₄ (Merck) e como reveladores foram utilizados, além da detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), reagentes de Liebermann; soluções de cloreto férrico e ácido difenilbórico etanolamina-MeOH (reagente NP).

3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) o sistema consistiu em duas bombas de solvente modelo LC-6AD, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne 7125i com um loop de 20 µL. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna Supelcosil LC-18 (125 cm x 10mm x 5µm, Supelco, Bellefonte, USA), pré-coluna C-18 ODS SHIMADZU 4,0 mm, solvente (MeOH e acetonitrila) da Tedia (Tedia Brazil) grau HPLC/Espectro UV-visível e ácido fórmico Tedia (Tedia Brazil). Foram usados cartuchos com membrana Millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro (SUPELCO, USA) para filtração das amostras e solventes a serem analisados.

A análise da amostra FCAE7 por CLAE-DAD em método analítico foi realizada com o seguinte sistema de eluição: Ácido fórmico (1%, solvente A) e acetonitrila (solvente B) como fase móvel e gradiente crescente de 0-5 min. 80-100% de B e de 5-20 min. 100% de B, com o fluxo de 1,0 mL/min. Para o monitoramento foram utilizados os comprimentos de onda de 254 e 320 nm e temperatura de 40 °C. Já a análise das amostras FCAE4 e FCAE5 foram realizadas com o seguinte sistema de eluição: Ácido fórmico 1% (solvente A) e MeOH (solvente B) como fase móvel e gradiente de 0.01-10 min. 37% de B e de 10-15 min 100% de B. Para o monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 320 nm e temperatura de 40 °C.

As análises em CLAE-MS foram realizadas em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas da marca Bruker Daltonics (Billerica), modelo Esquire 3000 Plus, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador *ion trap*, operando no modo positivo.

3.3.3. Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massa de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo a gás Varian 431 GC acoplado a espectrômetro de massas computadorizado Varian 220 MS de analisador *ion trap* e ionização por impacto de elétrons, 70 eV. A programação utilizada foi a seguinte:

Temp. Forno	Temp. Injetor	Fluxo na Col.	Gás de Arraste	Rampa (r)	Temp. Corrida
50- 240 °C	260 °C	1 mL/min.	Hélio	5 °C/min.	68.5 min.

3.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ^1H e ^{13}C (incluindo experimentos bidimensionais) foram obtidos na UFPE e na USP, sendo registrados em espectrômetros Varian VNMRS-400 operando a 400 e 100 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente; Bruker DRX500 (500 e 125 MHz) e Bruker DPX-300 (300 e 75 MHz). Como referência interna foi usado tetrametilsilano ou resíduo de solvente como CHCl_3 , DMSO e acetona.

3.5. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em filme sobre cela de KBr ($6000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) e ATR, empregando-se um espectrômetro Varian 640-IR com transformada de Fourier.

3.6. Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos na USP e no CETENE, empregando-se um espectrômetro JASCO J-715.

3.7. Rotação Específica $[\alpha]$

A rotação específica foi medida em um polarímetro KRUSS OPTRONIC GERMANY.

3.8. Reagentes empregados nos testes antioxidantes

Para a realização dos testes antioxidantes e teor de fenólicos totais foram usados os reagentes: Folin-Ciocalteu (Sigma) e ácido gálico (Fluka) (avaliação do teor de fenólicos totais); radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Alfa Aesas USA) e ácido ascórbico (Nuclear) (atividade antiradicalar com o radical livre DPPH); radical ABTS

(2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio (98%) (Fluka), Trolox (6-hidroxi- 2, 5, 7, 8 – tetrametilcromano-2- ácido carboxílico 97%) (Aldrich) e persulfato de potássio (Sigma) (atividade antiradicalar com o radical cátion ABTS); *trans*- β-caroteno- tipo I sintético (Sigma Aldrich), ácido linoléico (Fluka) e tween 20 (atividade antioxidante com o sistema β-caroteno/Ácido Linoléico). A leitura de absorvância das soluções para as atividades anti-radicalares, ácido linoléico/β-caroteno, e o teor de fenólicos totais foi realizada no aparelho espectrofotômetro UV-visível (Agilent, 8453), com as amostras colocadas em cubetas de quartzo. Os solventes utilizados foram da marca Cinética e Tedia (BRASIL).

3.9. Isolamento dos constituintes químicos

A fração hexânica (10 g) foi cromatografada em Sephadex LH-20 (Coluna A) usando como eluente CH₂Cl₂ : MeOH (3:7) resultando em 5 frações, reunidas de acordo com os fatores de retenção (R_f) observados em CCDA. A quarta fração (A-4, 2,6 g) foi submetida a sucessivas filtrações em Sephadex LH-20 e a CC em sílica gel tendo como eluentes: hexano, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade, fornecendo 23 frações. A segunda fração (A-4.2) forneceu cristais brancos em forma de agulhas, substância **FCH2** (1,5 mg). A sexta fração forneceu cristais incolores em forma de agulhas, substância **FCH3** (11 mg, P. F. 128-130 °C; P. F. 130-132 °C, DE PAULA *et al.* 1998).

A quinta fração (A-5, 6,5 g) foi submetida a sucessivos fracionamentos em Sephadex LH-20 e a CC em sílica gel fornecendo cristais brancos, substância **FCH5** (35 mg, P. F. 190-192 °C; P. F. 195-197 °C, SILVA 2002), de cor roxa quando corado com o reagente Liebermann, revelando sua natureza triterpênica. O esquema 1, p. 38, mostra o procedimento usado para o isolamento das substâncias da fração hexânica dos frutos de *C. paralicola*.

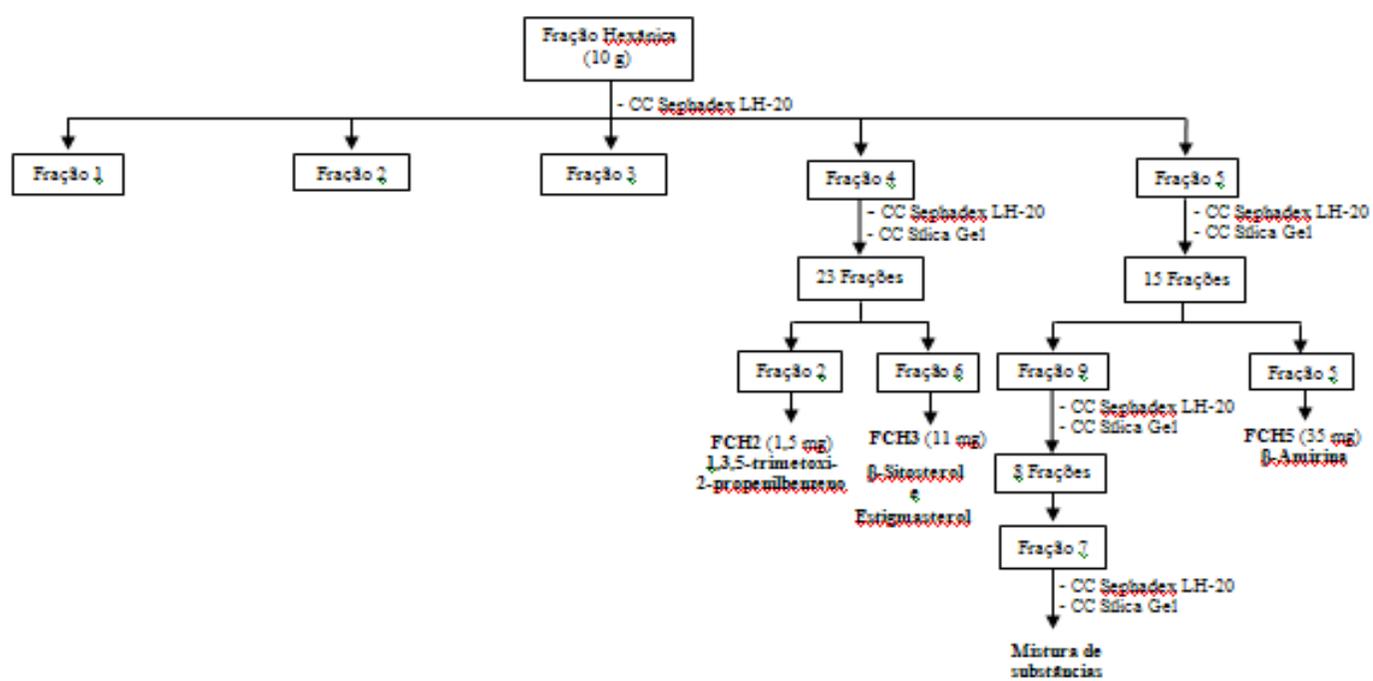
A fração acetato de etila (8 g) foi fracionada em Sephadex LH-20 (Coluna B) usando como eluente CHCl₃:MeOH (1:1), resultando em 8 frações. A sétima fração (B-7, 560 mg) foi submetida a sucessivas filtrações em Sephadex LH-20 fornecendo um precipitado (188 mg) que foi submetido a análise por HPLC-DAD, as condições operacionais estão descritas no **Item 3.3.2.** (p. 34). O cromatograma obtido (Figura 22, p. 59) revelou a presença de seis picos, sendo o pico majoritário característico de polifênóis com base na análise dos espectros de ultravioleta com lambdas máximos e

perfil de absorção característico de flavonóides. Esse precipitado foi cromatografado em sílica-gel, tendo como eluentes: CHCl₃ e MeOH em gradiente crescente de polaridade, fornecendo 6 frações. A terceira fração (B-7.3) forneceu cristais amarelos, substância **FCAE1** (25 mg, P. F. 235-237 °C; P. F. 230-232 °C, CHOI *et al.* 2008).

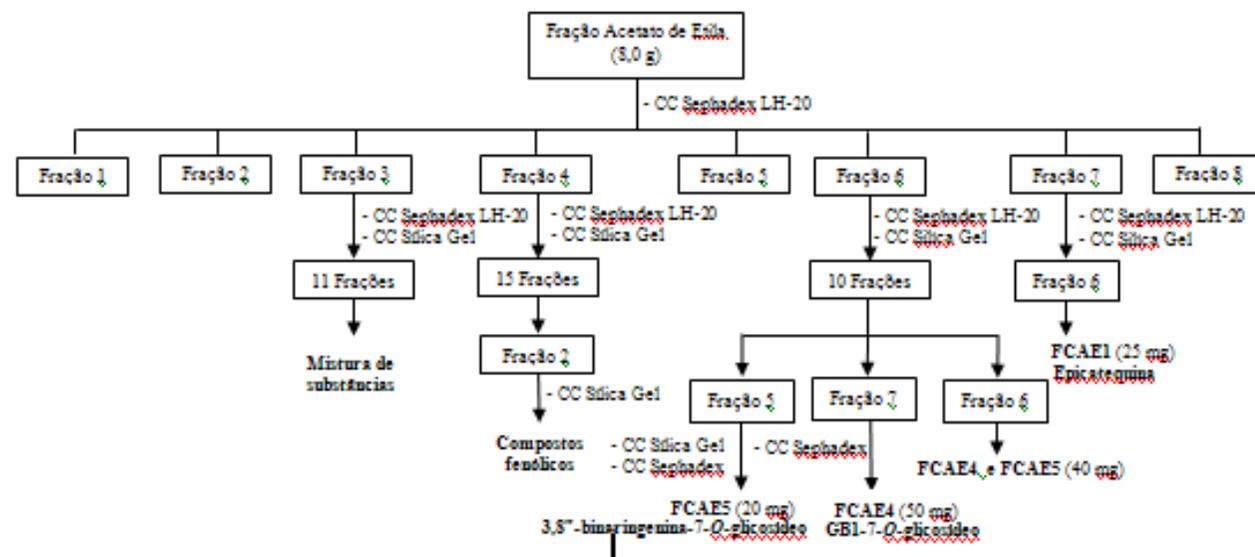
A sexta fração (B-6, 500 mg) foi submetida a filtração em Sephadex LH-20 e a CC em sílica gel, tendo como eluentes: hexano, CH₂Cl₂ e MeOH, fornecendo 10 frações. A sétima fração (B-6.7) foi filtrada em Sephadex LH-20 fornecendo um sólido amarelo, substância **FCAE4** (50 mg, P. F. 223-225 °C). A quinta fração (B-6.5) foi filtrada em Sephadex LH-20 e cromatografada em sílica gel fornecendo um sólido amarelo claro, substância **FCAE5** (20 mg, P. F. 218-220 °C; P. F. 218-221 °C, CHEN *et al.* 1975). A sexta fração (B-6.6) forneceu uma mistura de **FCAE4** e **FCAE5** (40 mg). As substâncias **FCAE4** e **FCAE5** foram analisadas por CLAE-DAD e CLAE-MS, as condições operacionais encontram-se descritas no **Item 3.3.2** (p. 34) e os cromatogramas correspondentes encontram-se na Figura 41, p. 74 e na Figura 42, p. 74.

A terceira (B-3, 1,7 g) e a quarta fração (B-4, 2,8 g) foram submetidas a sucessivas filtrações em Sephadex LH-20 e a CC em sílica gel e não resultaram em isolamento. O esquema 2, p. 39, mostra o procedimento usado para o isolamento das substâncias da fração acetato de etila dos frutos de *C. paralicola*.

Esquema 1. Marcha para o isolamento das substâncias da fração hexânica de *C. parviflora*.



Esquema 2. Marcha para o isolamento das substâncias da fração acetato de etila de *C. parviflora*.



3.10. Avaliação da atividade antioxidante

3.10.1. Teor de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais presentes no extrato EtOH e nas frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O dos frutos verdes de *C. paralicola* foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau (SLINKARD & SINGLETON, 1977; GULCIN *et al.*, 2004) com modificações, empregando o ácido gálico como composto fenólico padrão.

Inicialmente, uma alíquota de 300 µL de cada solução etanólica (1,0 mg/mL) do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O foi transferida para um tubo de ensaio, adicionando-se 60 µL do reagente de Folin-Ciocalteau e 2460 µL de água destilada, agitando-se por 1 min. Em seguida, 180 µL de Na₂CO₃ (15%) foram acrescentados a mistura e agitados por 30 segundos, resultando na concentração final de 100 µg/mL para as amostras. Após duas horas, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro de UV-Vis em 760 nm, empregando-se cubetas de quartzo. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de fenólicos totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (1 a 15 µg/mL) e expressos como miligramas equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g), considerando-se o erro padrão da média (E. P. M.). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi: $Y = 0,121x + 0,047$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,996$, onde x é a concentração do ácido gálico e Y é a absorbância a 760 nm.

3.10.2. Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH

O teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por SILVA *et al.* (2006). Cada solução estoque do extrato, frações e biflavonóides foi preparada a 1,0 mg/mL. Através de triagem preliminar quantidades apropriadas da solução de DPPH (23,6 µg/mL em EtOH) foram adicionadas às amostras afim de obter concentrações finais que variaram de 2,5 a 120,0 µg/mL. Cada concentração foi testada em triplicata. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultra-som, a quantidade de radicais DPPH foi registrada em espectrofotômetro UV-Visível em comprimento de onda de 517 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. Como controle positivo foi empregado o ácido

ascórbico. A percentagem de atividade seqüestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão ácido ascórbico. A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm D.P.$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade seqüestradora dos radicais DPPH.

3.10.3. Avaliação da atividade seqüestradora do radical $ABTS^{+\cdot}$

O cátion radical $ABTS^{+\cdot}$ foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS com uma solução de persulfato de potássio em água destilada, a fim de obter concentrações finais de 7 mM e 2,45 mM, respectivamente. A solução foi mantida no escuro e à temperatura ambiente durante um período de 12-16 h antes do uso. Então a solução de $ABTS^{+\cdot}$ foi diluída com etanol (1:100 v/v, aproximadamente) até uma absorbância (A) de $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível, 30 °C. As soluções estoque do extrato EtOH, das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O e dos biflavonóides foram preparadas em EtOH a concentração de 1,0 mg/mL. Através de triagem preliminar, quantidades apropriadas da solução de $ABTS^{+\cdot}$, foram adicionadas às amostras a fim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 100,0 µg/mL. Cada concentração foi testada em triplicata. As soluções foram agitadas e, após 10 minutos, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. A percentagem de atividade seqüestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução alcoólica do radical ABTS^+ , e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão trolox. A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $\text{CE}_{50} \pm \text{D.P.}$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade seqüestradora dos radicais ABTS^+ . A determinação da CE_{50} do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O dos frutos verdes de *C. parvicola* foi realizada pela metodologia descrita por RE *et al.* (1999), utilizando o Trolox como composto padrão, um análogo da vitamina E solúvel em água.

3.10.4. Ensaio da atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico

A solução do sistema β -caroteno/ácido linoléico foi preparada adicionando-se uma alíquota de 50 μL da solução de β -caroteno (20 mg mL^{-1} em clorofórmio) em um erlenmeyer de 250 mL com 80 μL de ácido linoléico e 660 μL de Tween 20 (monopalmitato de polioxietileno sorbitan). Ao erlenmeyer foram adicionados 90 mL de água destilada (previamente submetida a tratamento em atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A absorbância da emulsão foi ajustada entre 0,7 a 0,6 nm a 470 nm. Alíquotas dos extratos (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e ao Trolox (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), utilizado como antioxidante padrão. Uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema visando à determinação do tempo zero. Posteriormente, a absorbância foi monitorada a cada 20 minutos, durante o período de 120 minutos. As amostras foram mantidas em banho-maria a 40 °C durante as leituras. A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da oxidação. O decréscimo da leitura da absorbância das amostras é comparado com o sistema e estabelece a porcentagem de oxidação:

$$\text{Redução da absorbância} = \text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}$$

$$\% \text{ Oxidação} = [(\text{Redução da Abs})_{\text{amostra}} \times 100] / (\text{Redução Abs})_{\text{sistema}}$$

$$\% \text{ Proteção} = 100 - (\% \text{ Oxidação})$$

3.10.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas MS Office MICROSOFT Excel (2007) e GraphPad Prism[®] versão 5.0 (DEMO) (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Foi realizada a análise por ANOVA e o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as amostras ($p < 0,05$). Foram analisadas as correlações entre os testes anti-radicalares e o teor de fenólicos totais pela correlação de Pearson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação estrutural dos constituintes químicos

4.1.1. Fenilpropanóide

A proposta de elucidação estrutural de **FCH2** foi baseada em análise de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/MS). O espectro de massas de FCH2 apresentou íon molecular e pico base em m/z 208 (Figura 5, p. 44). O fragmento intenso em m/z 179 sugeriu perda do fragmento $-C_2H_5$, proveniente da cadeia alquílica lateral. Já o fragmento em m/z 177 sugeriu perda de fragmento metoxila ($-OCH_3$). A presença do anel aromático pode ser confirmada pelos fragmentos em m/z 91, 77 e 65. Esses fragmentos e a ausência de outros fragmentos intensos nos levaram a propor que FCH2 é o **1,3,5-trimetoxi-2-propenilbenzeno**. Esta proposta foi sugerida pela comparação do EM com a biblioteca de espectros do aparelho, que mostrou coincidência superior a 90%. Este fenilpropanóide está sendo relatado pela primeira vez em *Clusia paralicola*.

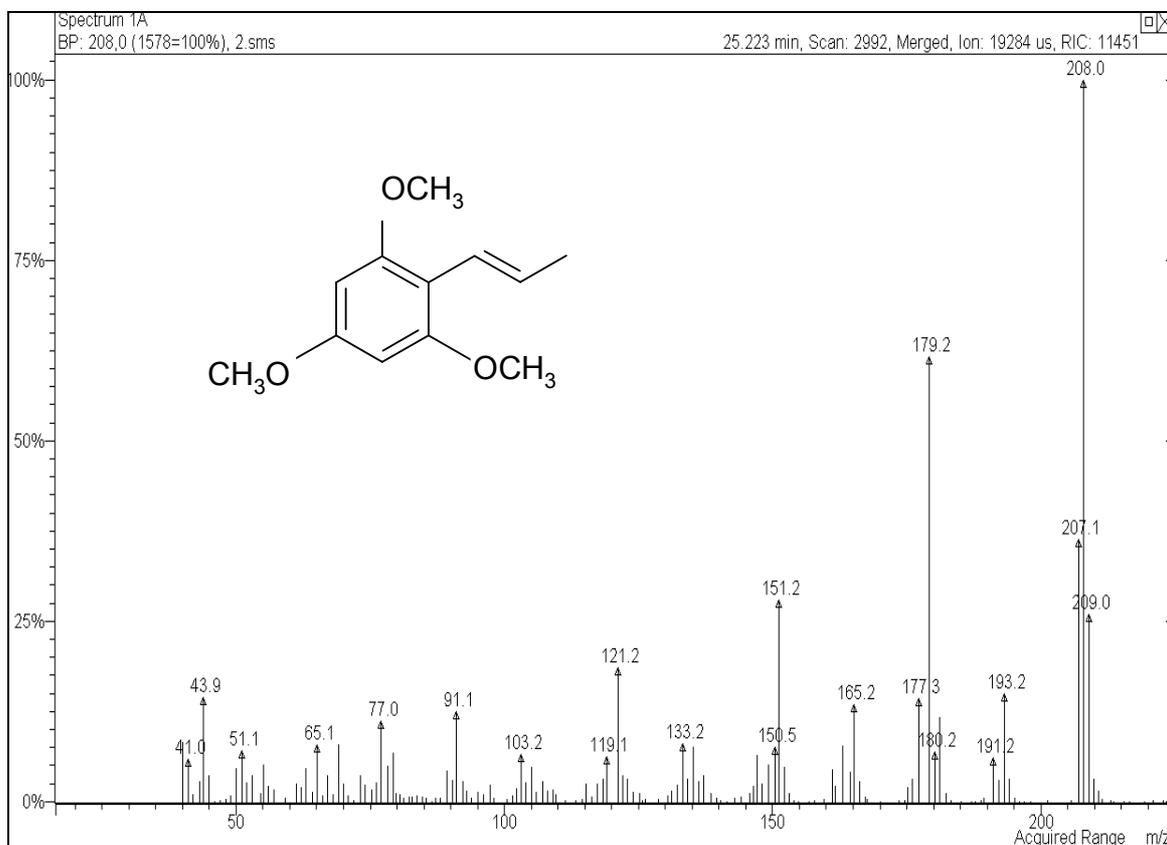


Figura 5. Espectro de massas de FCH2 obtido por CG/MS (70 eV)

4.1.2. Esteróides

A análise do espectro de IV de **FCH3** (Figura 6, p. 46) revelou bandas de absorção para grupos hidroxila (3440 cm^{-1} , estiramento OH), grupamentos CH_2 e CH_3 (2940 e 2860 cm^{-1}) e C-O (1040 cm^{-1}). O espectro de RMN de ^1H de **FCH3** (Figura 7, p. 46) apresenta sinais entre δ_{H} 0,8 e 2,0 referentes a grupos metínicos, metilênicos e metílicos, um multipletto em δ_{H} 3,52 que pode ser de hidrogênio ligado a carbono carbinólico (H-3) e um dupletto em δ_{H} 5,25 de hidrogênio olefínico (H-6). O conjunto destes dados, mais a presença de dois duplos-dupletos em δ_{H} 5,16 ($J= 8,5$ e 15 Hz , H-22) e em 5,02 ($J= 8,5$ e 15 Hz , H-23), levam a sugerir que a amostra é uma mistura de esteróides comumente encontrados no reino vegetal, **β -sitosterol** e **estigmasterol**. No espectro de APT (Figura 10, p. 48) destacam-se os sinais referentes aos carbonos olefínicos comuns aos dois esteróides em δ_{C} 140,79 (C-5) e em 121,73 (C-6), além do carbono oximetínico em δ_{C} 71,83 para C3-OH. O estigmasterol apresenta ainda sinais referentes aos carbonos olefínicos da ligação dupla em sua cadeia lateral em δ_{C} 138,23 (C-23) e 129,31 (C-22). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão descritos na Tabela 2, p. 49 e na Tabela 3, p. 50, respectivamente, e estão de acordo com os dados da literatura (LIMA, 2000). As porcentagens aproximadas dos dois constituintes na mistura foram calculadas de acordo como descrito por GOULART *et al.* (1993) e permitiram deduzir que a mistura contém 68,5% de β -sitosterol e 33,5% de estigmasterol. Estes compostos são encontrados na maioria das plantas e importantes atividades tem sido descritas na literatura, como anti-androgênicos e alelopáticos (KLIPPEL *et al.*, 1997; INOUE *et al.*, 2010). Estas substâncias estão sendo relatados pela primeira vez em *C. paralicola*.

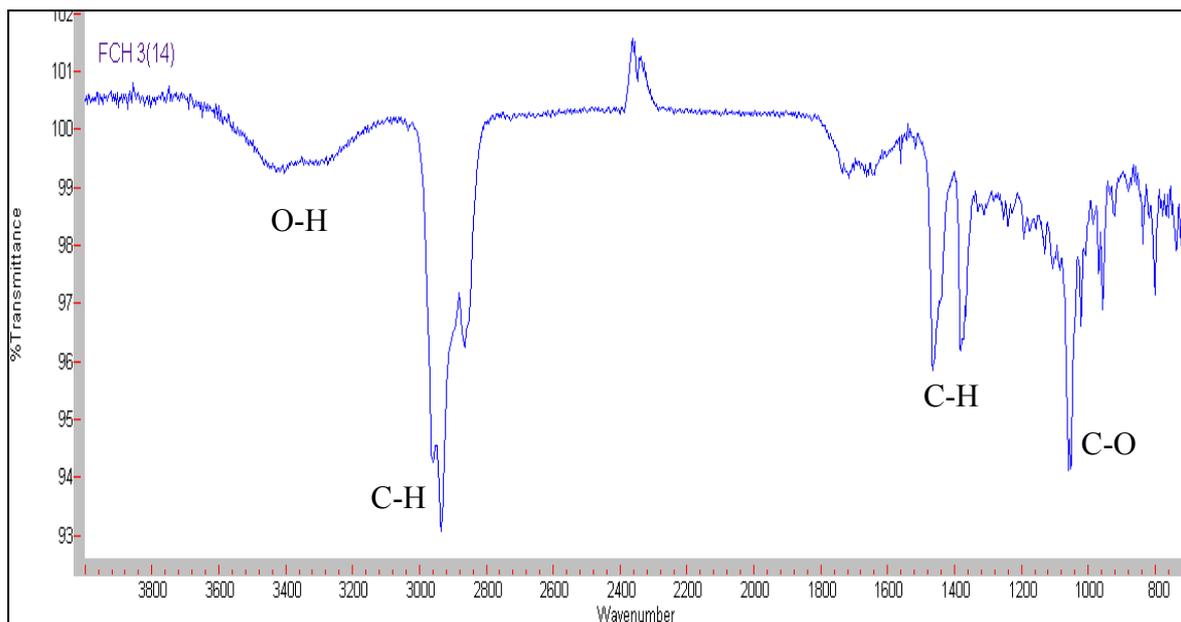


Figura 6. Espectro de IV (ATR) de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol)



Figura 7. Espectro de RMN de ^1H de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (500 MHz)

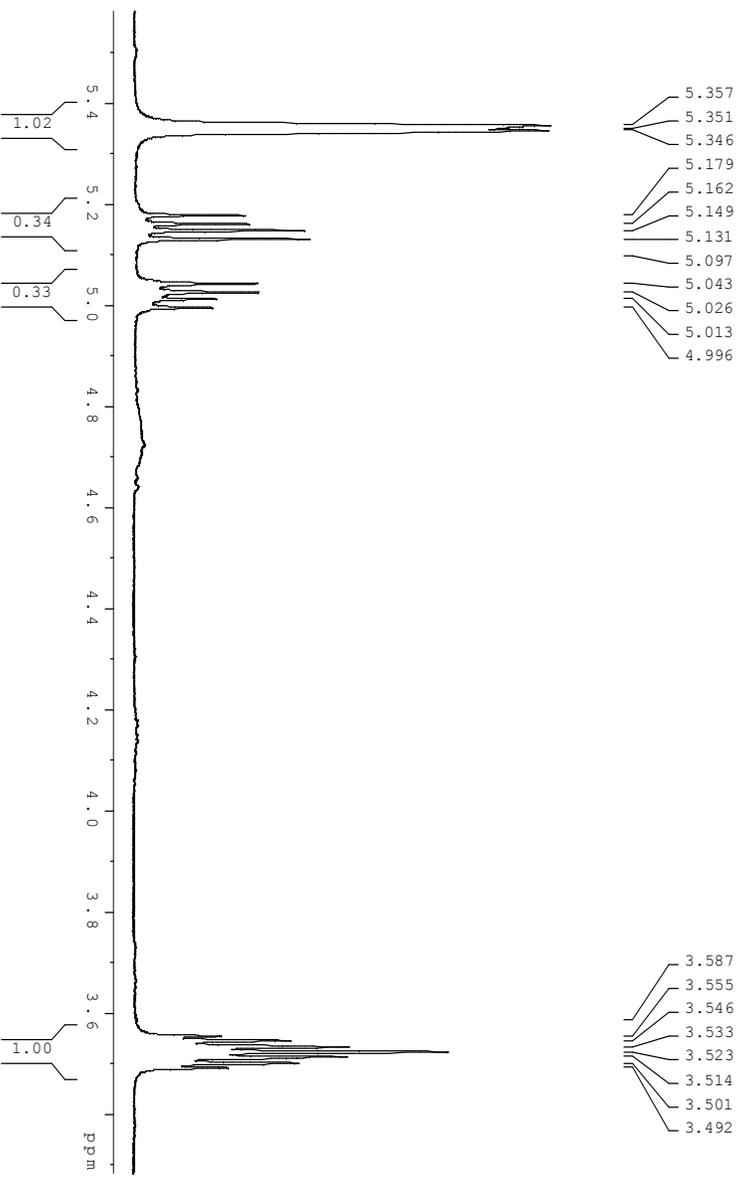


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H de FCH3 (β -sitosterol e stigmasterol) em CDCl_3 (500 MHz). Expansão em campo baixo

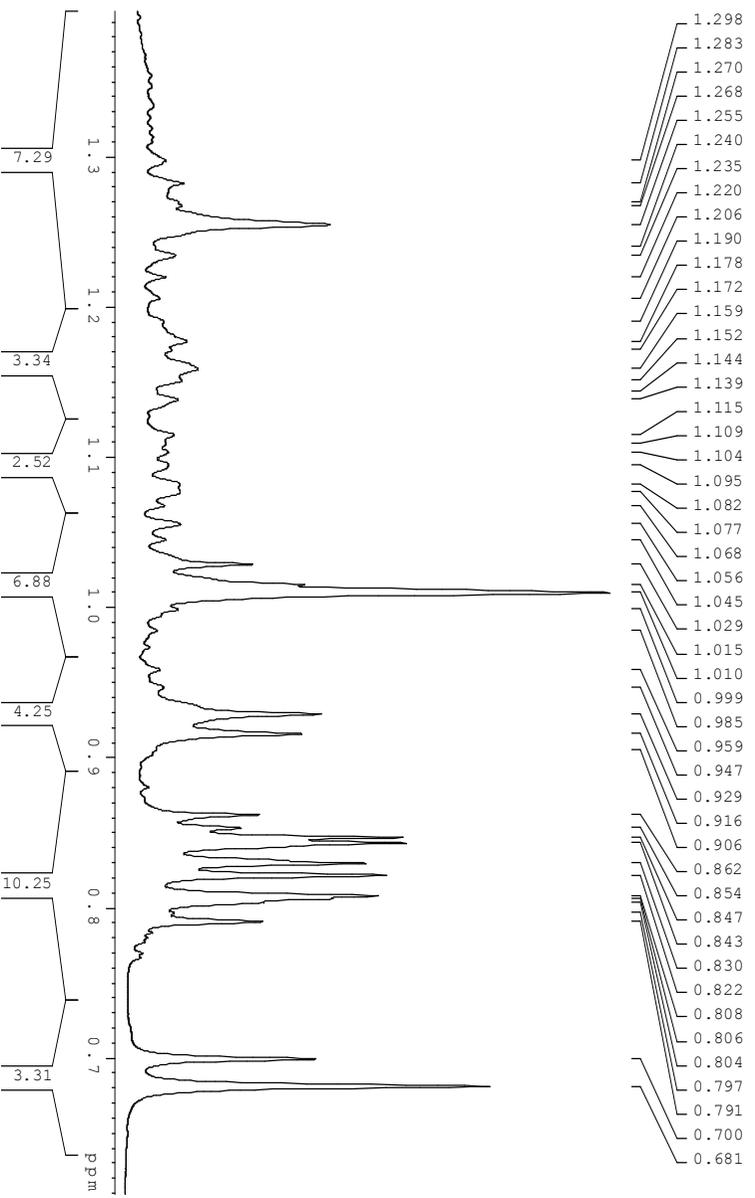


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H de FCH3 (β -sitosterol e stigmasterol) em CDCl_3 (500 MHz). Expansão em campo alto

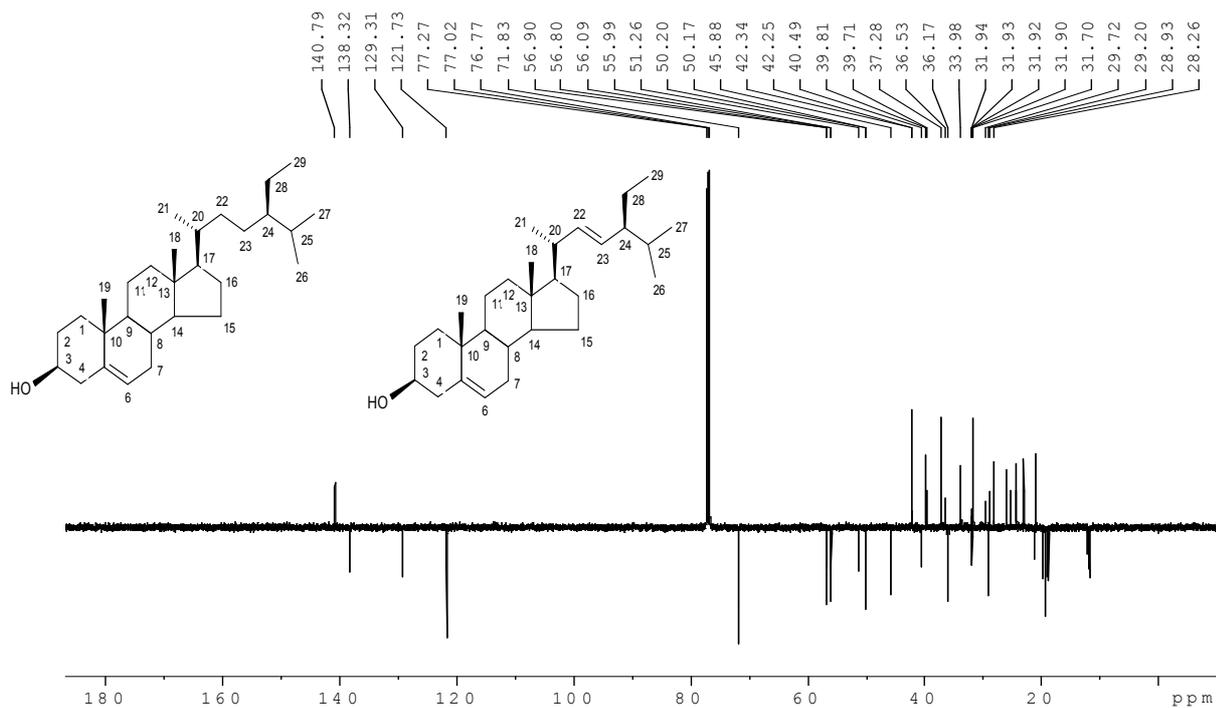


Figura 10. Espectro de APT de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (125 MHz)

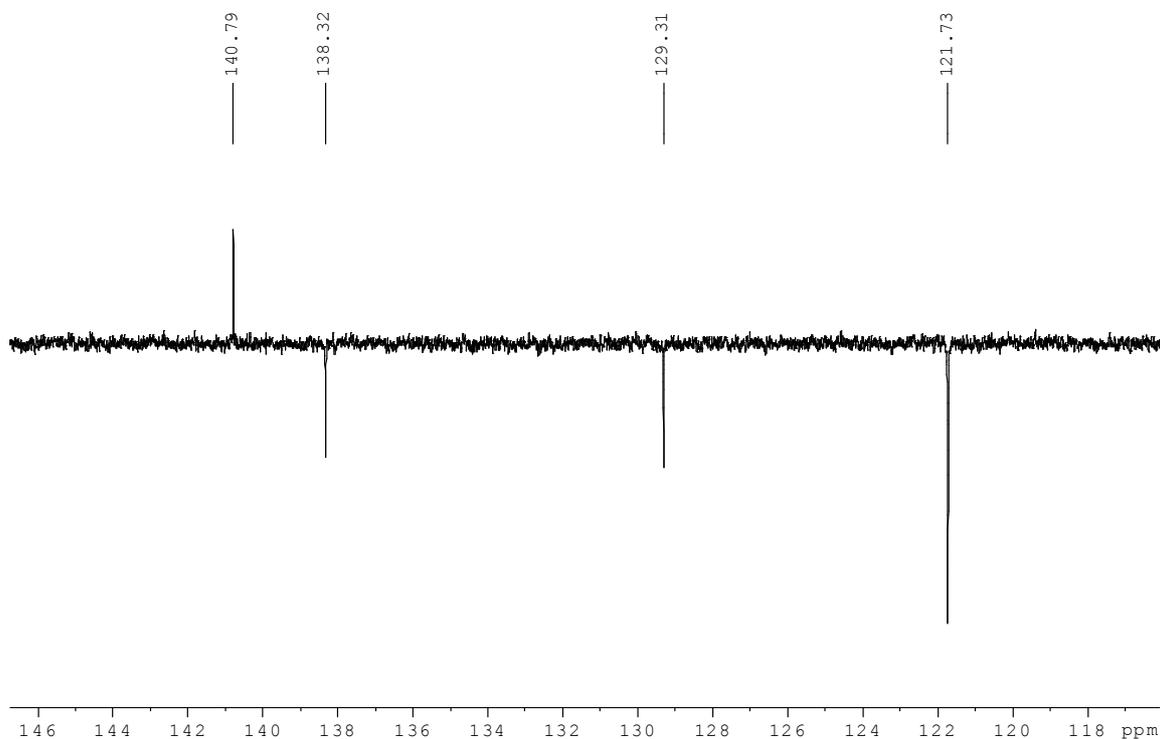


Figura 11. Espectro de APT de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (125 MHz). Expansão em campo baixo (C, CH_2 para cima; CH e CH_3 para baixo)

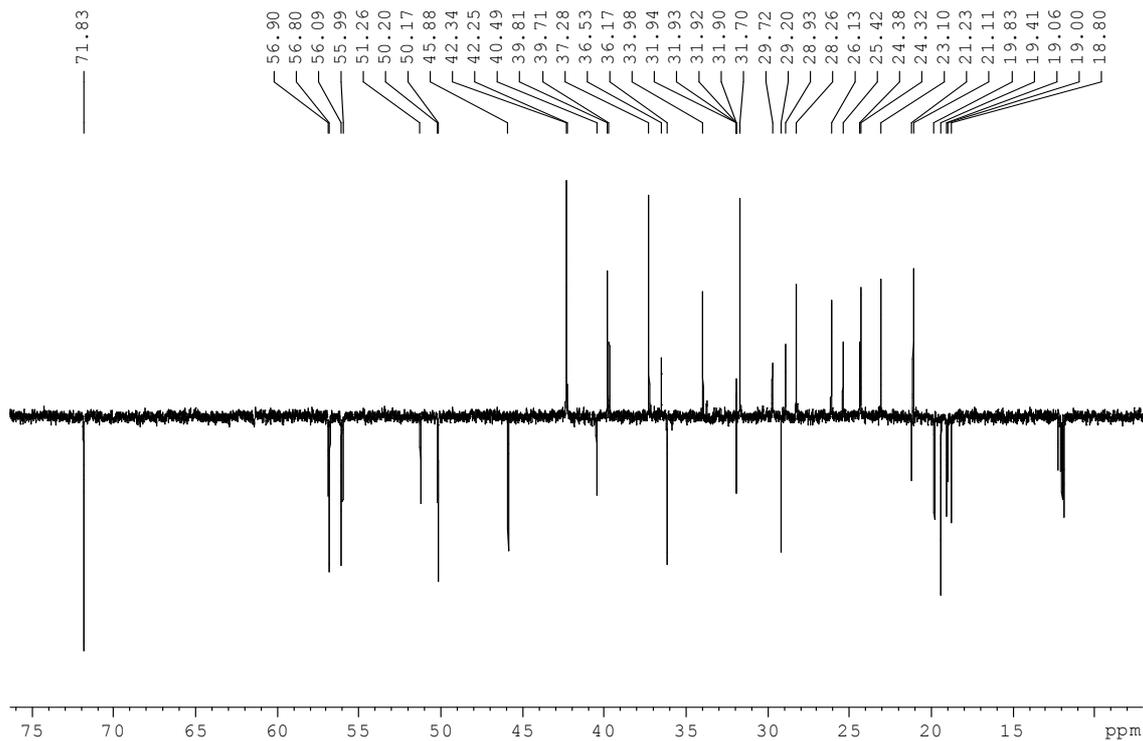
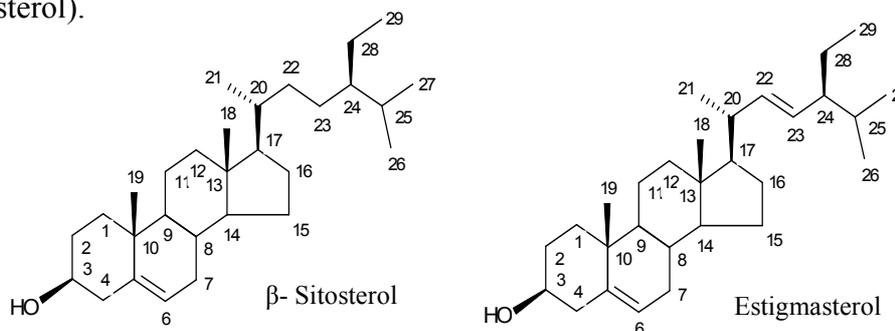


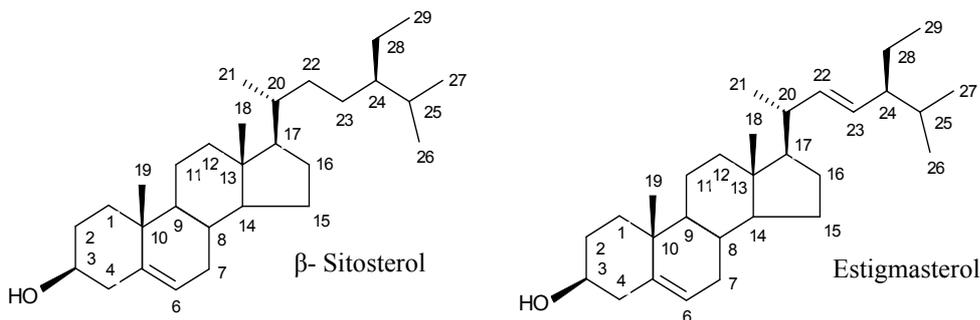
Figura 12. Espectro de APT de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol) em CDCl_3 (125 MHz). Expansão em campo alto (C, CH_2 para cima; CH e CH_3 para baixo).

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H em CDCl_3 (500 MHz) de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol).



H	δ_{H}	β - Sitosterol		Estigmasterol	
		δ_{H}	δ_{H} (LIMA, 2000)	δ_{H}	δ_{H} (LIMA, 2000)
H-3	3,53 (m)		3,52 (m)	3,53 (m)	3,52 (m)
H-6	5,35 (d)		5,35 (m)	5,35 (d)	5,35 (m)
H-22	-		-	5,16 (dd, $J= 15; 8,5$)	5,16 (dd, $J= 15; 8,1$)
H-23	-		-	5,02 (dd, $J= 15; 8,5$)	5,01 (dd, $J= 15; 8,1$)
Me-18	0,68 (s)		0,68 (s)	0,70 (s)	0,69 (s)
Me-19	1,01 (s)		1,01 (s)	1,01 (s)	1,01 (s)
Me-21	0,92 (d, $J= 6,5$)		0,92 (d, $J= 6,3$)	1,02 (d, $J= 7,0$)	1,02 (d, $J= 5,9$)

Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (125 MHz) de FCH3 (β -sitosterol e estigmasterol).



C	β – Sitosterol		Estigmasterol	
	δ_{C}	δ_{C} (LIMA, 2000)	δ_{C}	δ_{C} (LIMA, 2000)
5	140,79	140,73	140,79	140,73
10	36,53	36,49	36,53	36,98
13	42,25	42,28	42,25	42,28
CH				
3	71,83	71,78	71,83	71,78
6	121,73	121,69	121,73	121,69
8	31,90	31,88	31,92	31,88
9	50,17	50,11	50,20	50,11
14	56,80	56,74	56,90	56,74
17	56,09	56,05	55,99	56,05
20	36,17	36,12	40,49	40,48
22	-	-	138,32	138,32
23	-	-	129,31	129,27
24	45,88	45,83	51,26	51,23
25	28,93	29,14	29,72	31,44
CH₂				
1	37,28	37,24	37,28	37,24
2	31,70	31,64	31,70	31,64
4	42,34	42,28	42,34	42,19
7	31,93	31,88	31,94	31,88
11	21,11	21,07	21,07	21,07
12	39,81	39,76	39,71	39,76
15	24,32	24,28	24,38	24,34
16	29,20	28,22	29,20	28,90
22	33,98	33,93	-	-
23	26,13	26,05	-	25,39
28	23,10	23,04	25,42	25,39
CH₃				
18	11,88	11,84	12,00	12,03
19	19,41	19,38	19,41	19,38
21	18,80	18,75	21,23	21,19
26	19,83	19,80	19,83	21,07
27	19,06	19,01	19,00	18,95
29	12,07	11,95	12,26	12,23

4.1.3. Triterpeno

O espectro de IV (Figura 13, p. 52) de **FCH5** revelou bandas de absorção características de deformações axiais de C-H (2960-2840 cm^{-1}), deformações angulares de C-H (1500-1400 cm^{-1}), hidroxilas (3290 cm^{-1}) e C-O (1040 cm^{-1}). A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 14, p. 52) de **FCH5** mostrou padrões de deslocamentos químicos característicos para triterpenos do tipo oleanano, com um simpleto largo em δ_{H} 5,19 pertencente ao hidrogênio olefínico em C-12, além de sinais referentes a grupos metínicos, metilênicos e metílicos na faixa de δ_{H} 0,5 a 1,8. No espectro de APT (Figura 17, p. 54) destacam-se os sinais referentes aos carbonos olefínicos em δ_{C} 145,19 (C-13) e em 121,72 (C-12), além de 8 carbonos metílicos e do carbono oximetínico em δ_{C} 79,02 para OH-3. O espectro de massas (Figura 20, p. 56) obtido por CG-MS revelou o pico referente ao íon molecular em m/z 426 (M^+ $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$), além dos fragmentos de Retro-Diels-Alder (RDA) em m/z 218, 203 (100%) e 189 (Figura 21, p. 56). Em geral, o EM dos triterpenos oleananos apresentam íon molecular pouco intenso e fragmentos principais característicos, derivados da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder (RDA) do anel C, que confirmam a presença da insaturação entre C-12 e C-13 (MENDES *et al.*, 1999). Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13 (Tabela 4, p. 57) com os da literatura (SILVA, 2002) levaram a confirmação de que **FCH5** é a β - **amirina**, previamente identificada no látex de *C. paralicola* (DA CAMARA, 2001). Dentre os triterpenos conhecidos, os pentacíclicos são os mais largamente distribuídos no reino vegetal, principalmente os de esqueletos oleanano, lupano e ursano (SCHENKEL *et al.*, 2000).

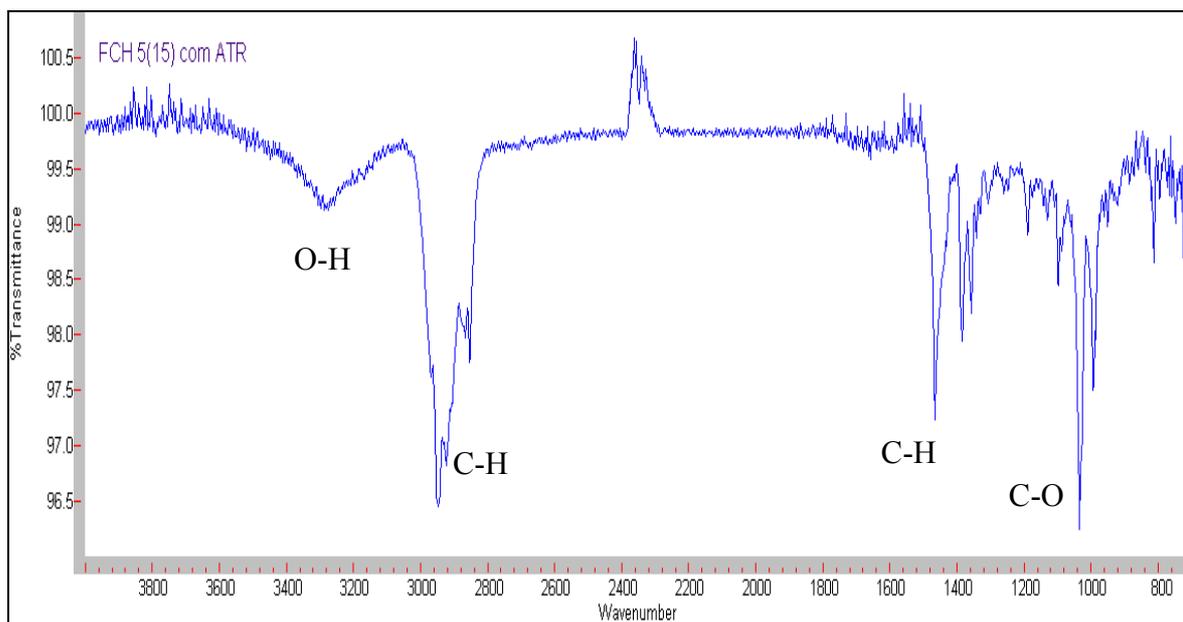


Figura 13. Espectro de IV (ATR) de FCH5 (β -amirina)

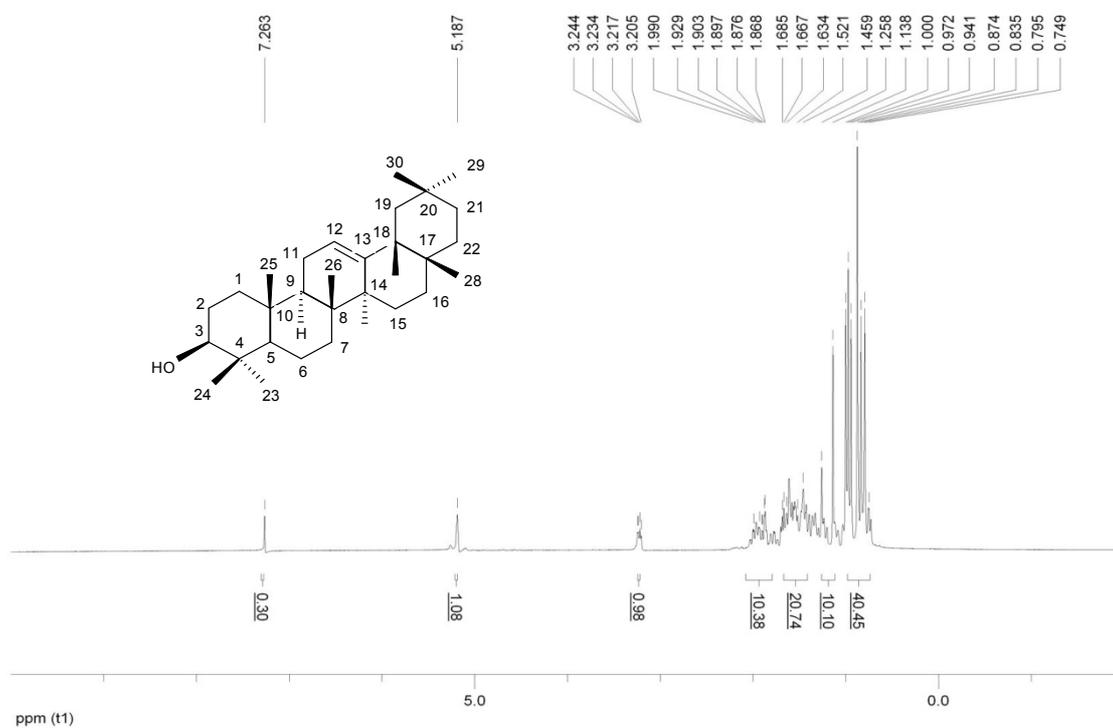


Figura 14. Espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ (400 MHz) de FCH5 (β -amirina)

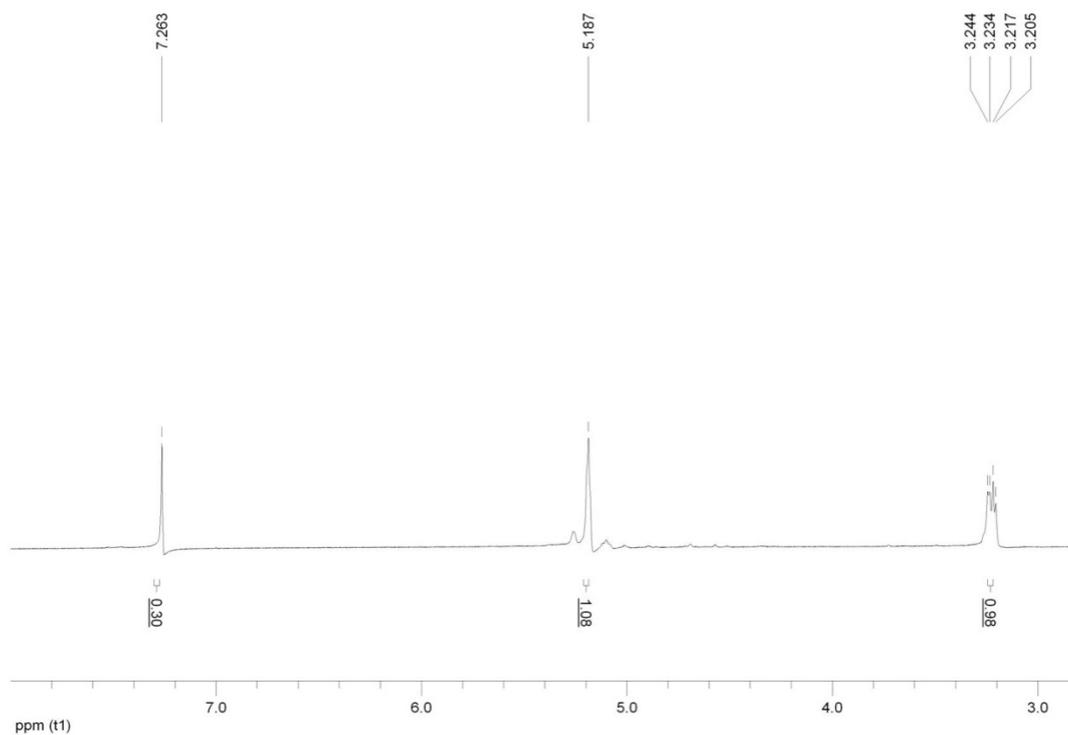


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCH5 (β -amirina).
Expansão em campo baixo

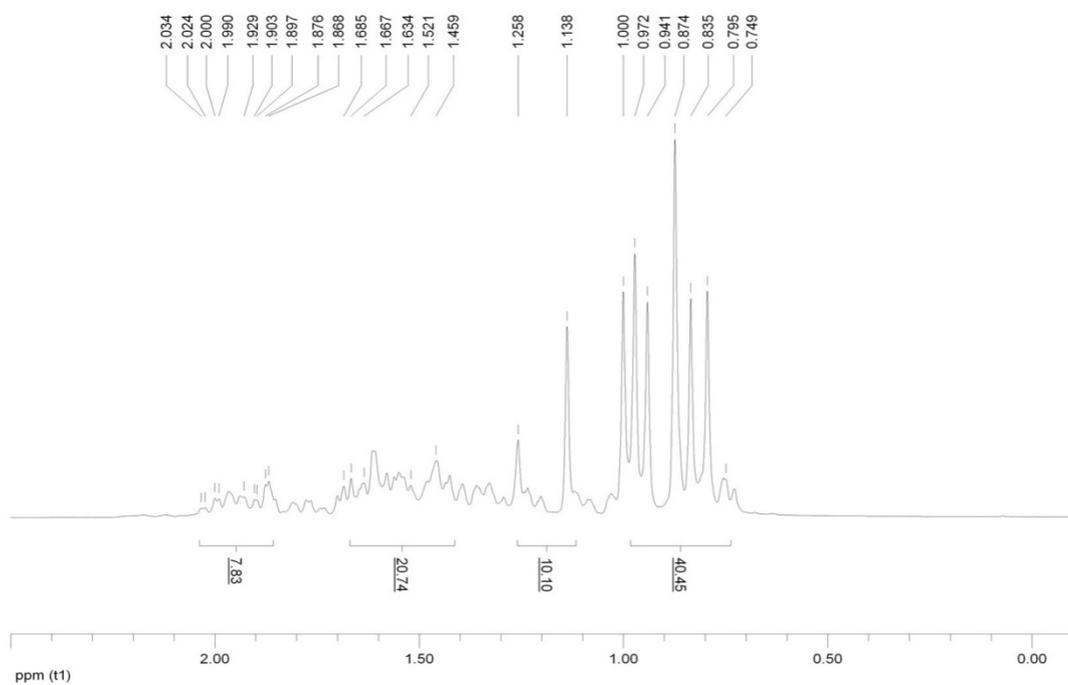


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCH5 (β -amirina).
Expansão em campo alto

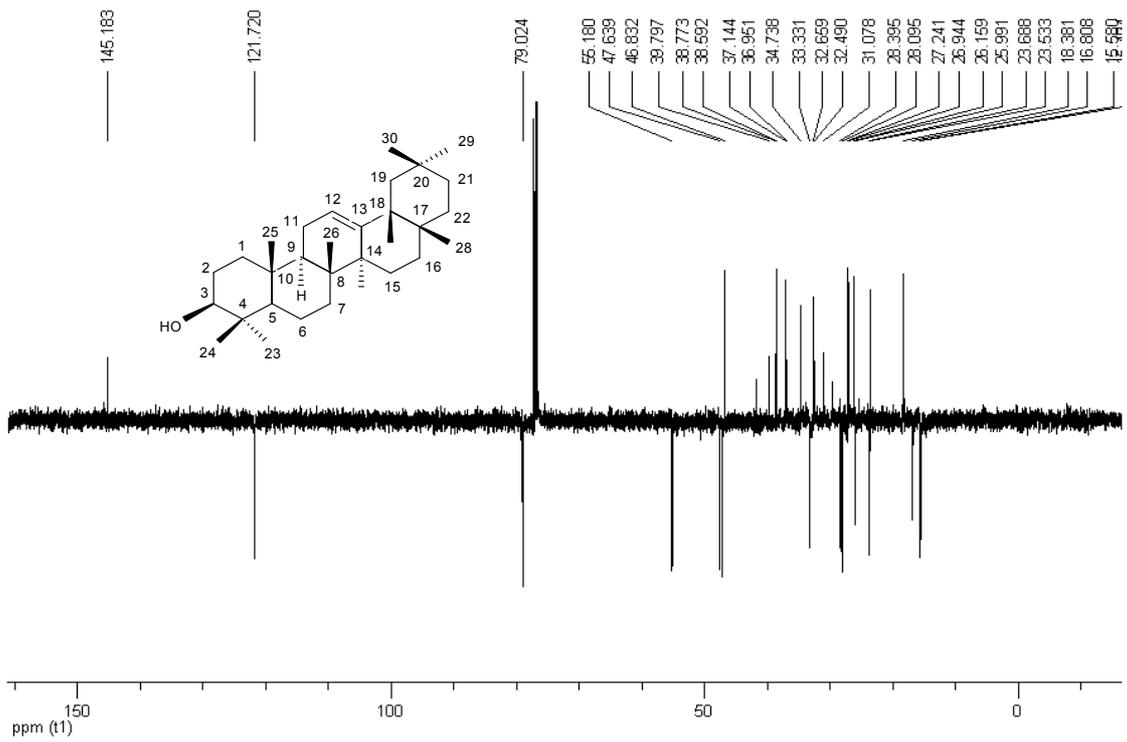


Figura 17. Espectro de APT em CDCl_3 (100 MHz) de FCH5 (β -amirina)

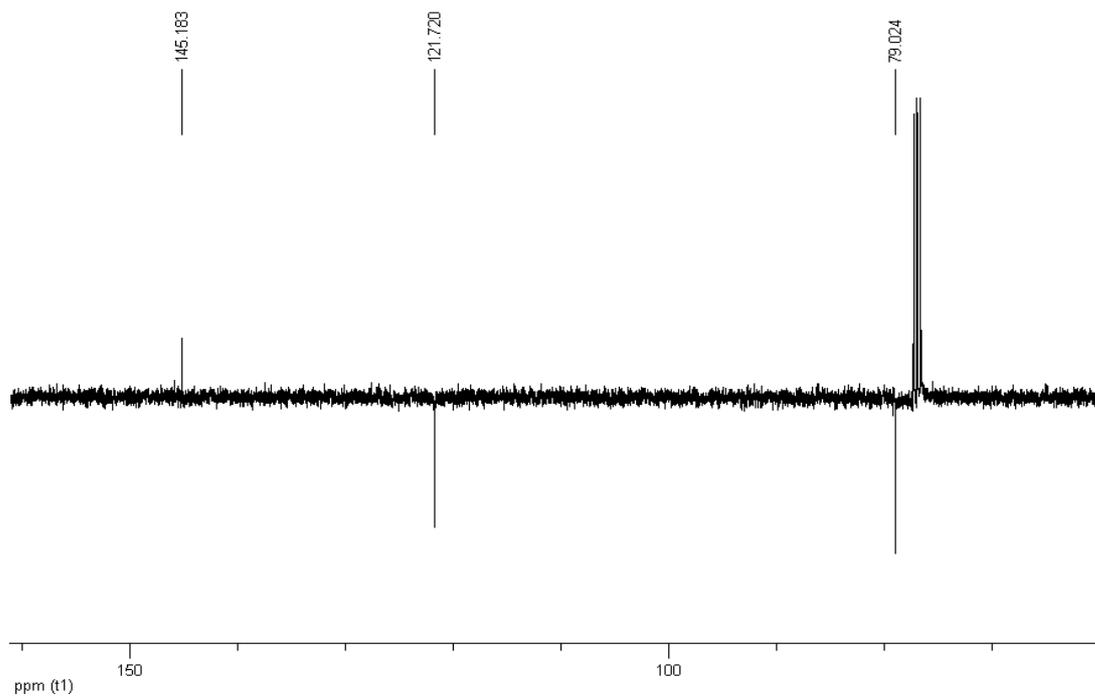


Figura 18. Espectro de APT em CDCl_3 (100 MHz) de FCH5 (β -amirina). Expansão em campo baixo (C e CH_2 para cima; CH e CH_3 para baixo)

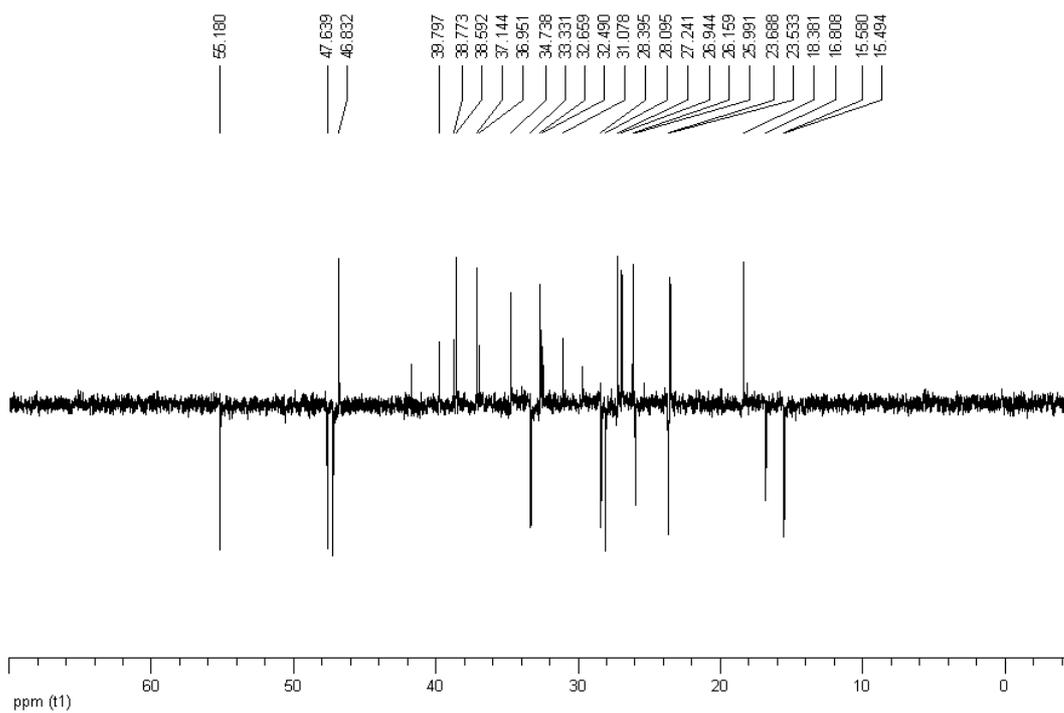


Figura 19. Espectro de APT em CDCl_3 (100 MHz) de FCH5 (β -amirina). Expansão em campo alto (C e CH_2 para cima; CH e CH_3 para baixo)

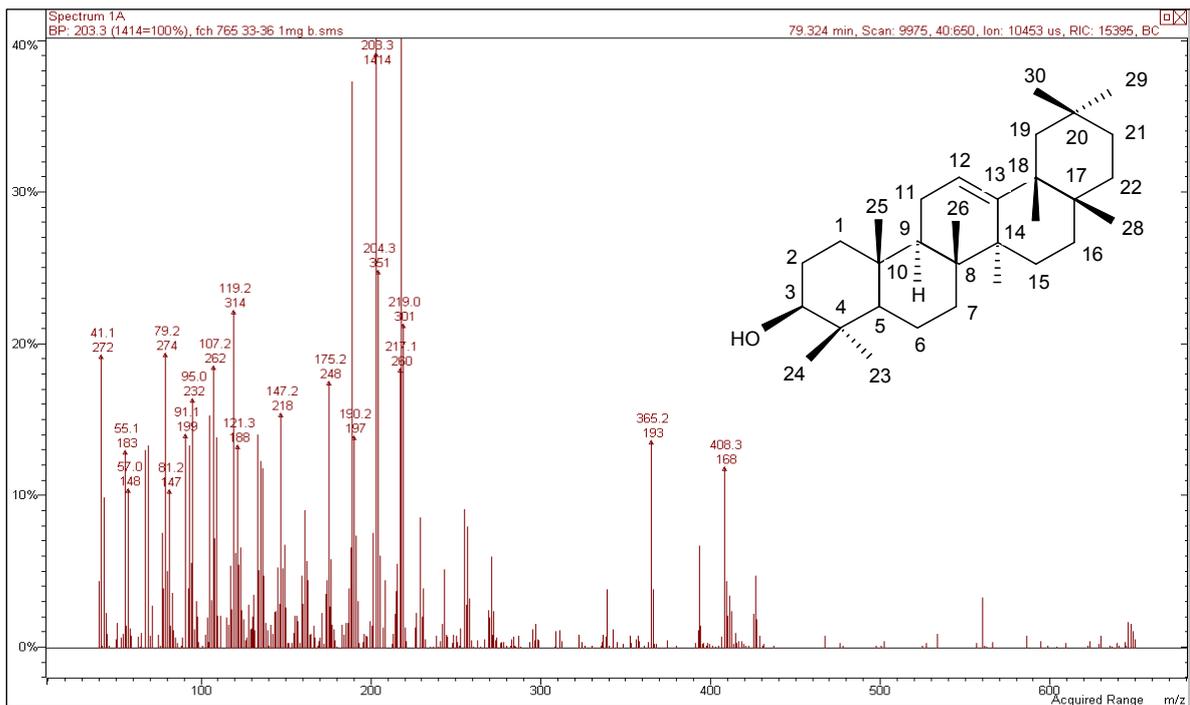


Figura 20. Espectro de massas de FCH5 (β -amirina) obtido por CG/MS (70 eV)

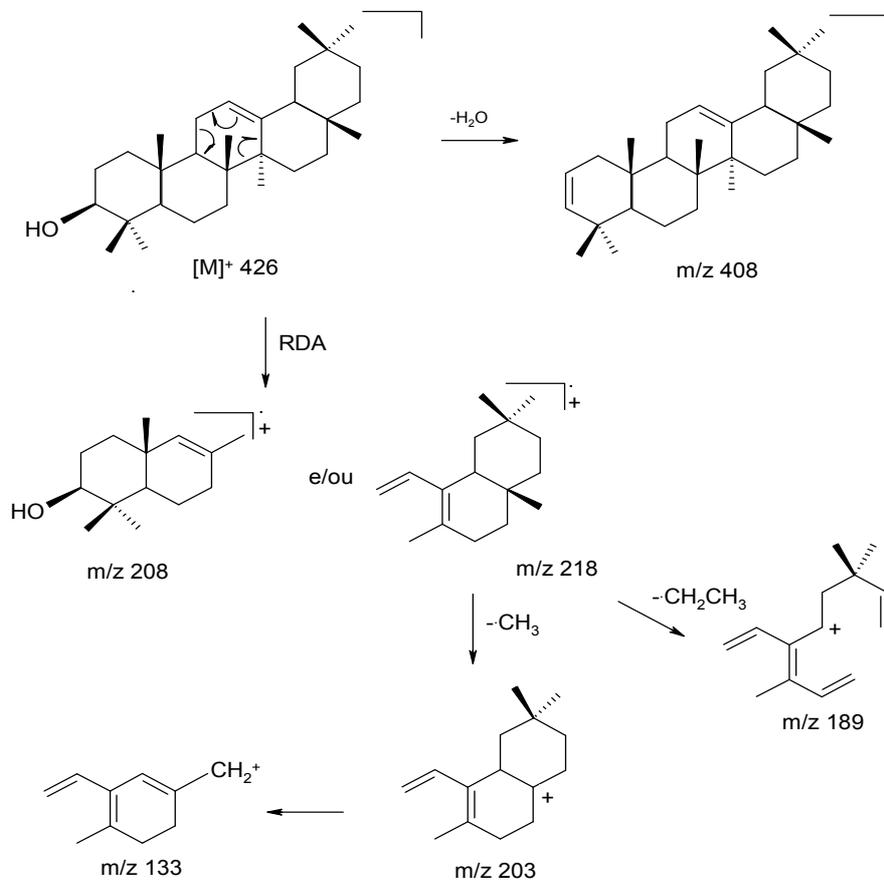
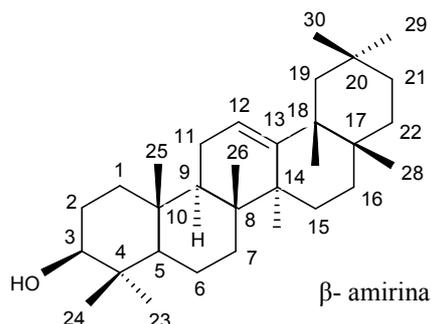


Figura 21. Proposta de fragmentação para FCH5 (β -amirina)

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 MHz e 100 MHz, respectivamente) de FCH5 (β -amirina).



C	δ_{C}	δ_{H} (multi)	C	δ_{C}^*	δ_{H}^* (multi)
4	38,77	-	4	38,69	-
8	39,79	-	8	39,70	-
10	36,95	-	10	36,85	-
13	145,19	-	13	145,10	-
14	41,73	-	14	41,61	-
17	32,49	-	17	32,43	-
20	31,08	-	20	31,03	-
CH			CH		
3	79,02	3,22 (m)	3	78,98	3,22 (m)
5	55,18	0,75	5	55,08	0,77
9	47,64	1,69 (s)	9	47,54	1,66 (sl)
12	121,72	5,19 (t)	12	121,73	5,18 (t)
18	47,23	2,01(dd, $J=4,0; 13,6$)	18	47,13	1,98
CH₂			CH₂		
1	38,59	1,88 (dd, $J=3,2; 11,6$)	1	38,49	1,88 (dd, $J=3,5; 11,3$)
2	27,24	1,61	2	27,05	1,63
6	18,38	1,46	6	18,30	1,48
7	32,66	1,52	7	32,55	1,52
11	23,53	1,93	11	23,45	1,90
15	26,15	1,26	15	26,85	1,25
16	26,94		16	27,05	
19	46,83	1,67	19	46,73	1,64
21	34,73		21	34,66	
22	37,14		22	37,06	
CH₃			CH₃		
23	28,09	1,00 (s)	23	28,03	0,99 (s)
24	15,49	0,80 (s)	24	15,44	0,79 (s)
25	15,58	1,14 (s)	25	15,57	1,13 (s)
26	16,81	0,94 (s)	26	16,72	0,96 (s)
27	25,99	0,97 (s)	27	25,94	0,97 (s)
28	28,39	0,84 (s)	28	28,36	0,83 (s)
29	33,33	0,87 (s)	29	33,30	0,93 (s)
30	23,69	0,87 (s)	30	23,63	0,87 (s)

* Fonte: SILVA, 2002

4.1.4. Catequina

O espectro de IV (Figura 23, p. 59) de **FCAE1** revelou bandas de absorção características de deformações axiais de grupamentos O-H ($3400-3200\text{ cm}^{-1}$), vibrações de deformações axiais de ligações C=C de sistemas aromáticos ($1600-1400\text{ cm}^{-1}$) e C-O de fenóis ($1200-1000\text{ cm}^{-1}$). O espectro de RMN de ^1H (Figura 24, p. 60) de **FCAE1** apresentou padrões de deslocamentos químicos característicos de catequinas, com dois duplos dupletos em δ_{H} 2,86 (H-4 α) e 2,74 (H-4 β), característicos de hidrogênios de grupo metilênico ligado a carbono oximetínico, um multipeto em δ_{H} 4,21 atribuído ao hidrogênio H-3 e um simpleto largo em δ_{H} 4,88 referente ao hidrogênio oximetínico-benzílico H-2. Esse conjunto de sinais é típico do anel C da **epicatequina**. O espectro de RMN de ^1H mostra ainda três sinais de hidrogênios aromáticos participando de um sistema de acoplamento ABX em δ_{H} 7,05 (*d*, $J = 2,0\text{ Hz}$, H-2'), 6,83 (*dd*, $J = 8,0$ e $2,0\text{ Hz}$, H-6') e 6,78 (*d*, $J = 8,0\text{ Hz}$, H-5'), bem como dois dupletos em *meta* em δ 6,02 ($J = 2,5\text{ Hz}$, H-6) e 5,92 ($J = 2,0\text{ Hz}$, H-8), caracterizando o anel A da **epicatequina**. A análise do espectro de APT (Figura 31, p. 63), em conjunto com o espectro de HMBC (Figura 38, p. 67), bem como a comparação com os dados da literatura (LÔBO *et al.*, 2008), permitiu atribuir os quinze sinais observados aos quinze carbonos da estrutura da **epicatequina**, em destaque para os sinais atribuídos aos C-2 (δ_{C} 79,5) e C-3 (δ_{C} 67,04), caracterizando a estereoquímica relativa 3-OH α da **epicatequina** que a diferencia de seu epímero catequina, esta estereoquímica relativa sugerida também foi comprovada pela análise do espectro de NOESY (Figura 30, p. 63), onde foi verificada a interação espacial entre os hidrogênios H-2 e H-3, mostrando a relação axial-equatorial, respectivamente. Os flavan-3-óis, também denominados catequinas, pertencem à classe dos flavonóides que não possuem o grupo 4-C=O nem conjugação entre os anéis A e B (AGRAWAL, 1989). A **epicatequina** já foi isolada no gênero *Clusia* (DA CAMARA, 2001), porém está sendo relatada pela primeira vez em *C. paralicola*.

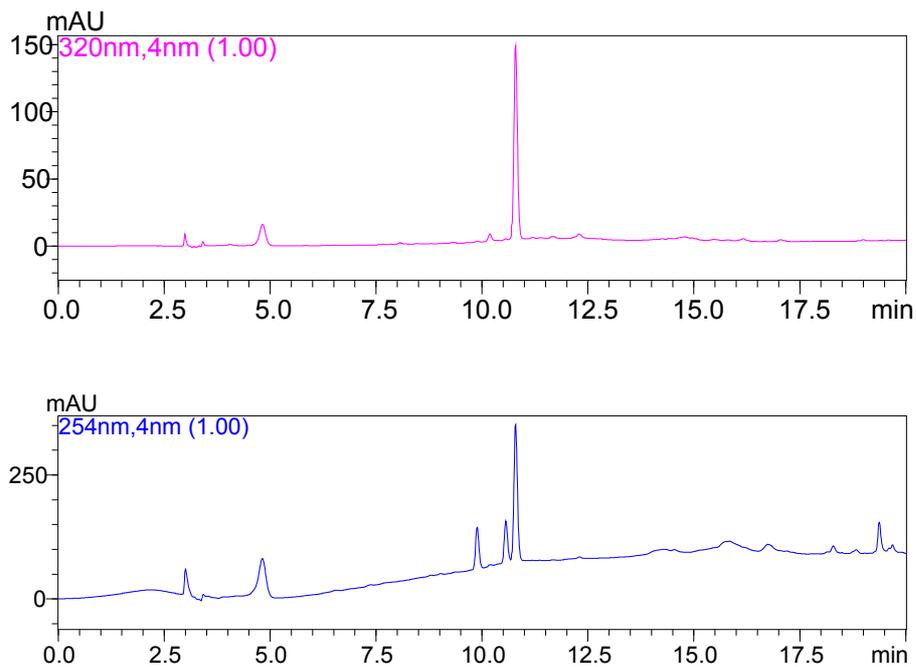


Figura 22. Cromatogramas (HPLC-DAD, 320 e 254 nm) da subfração FCAE7

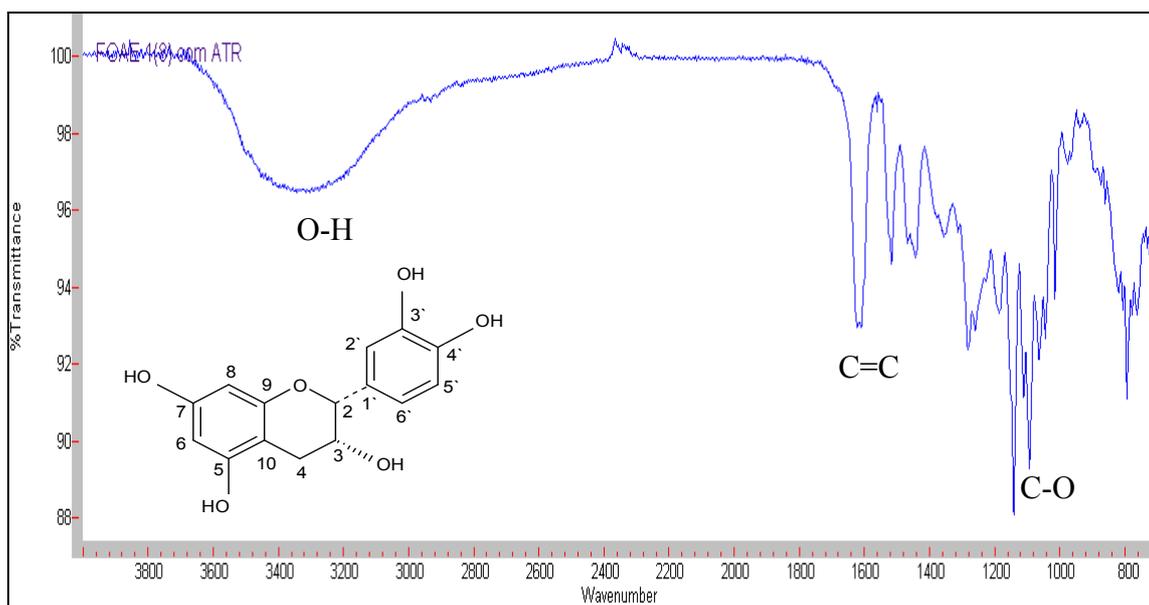


Figura 23. Espectro de IV (ATR) de FCAE1 (*epicatequina*)

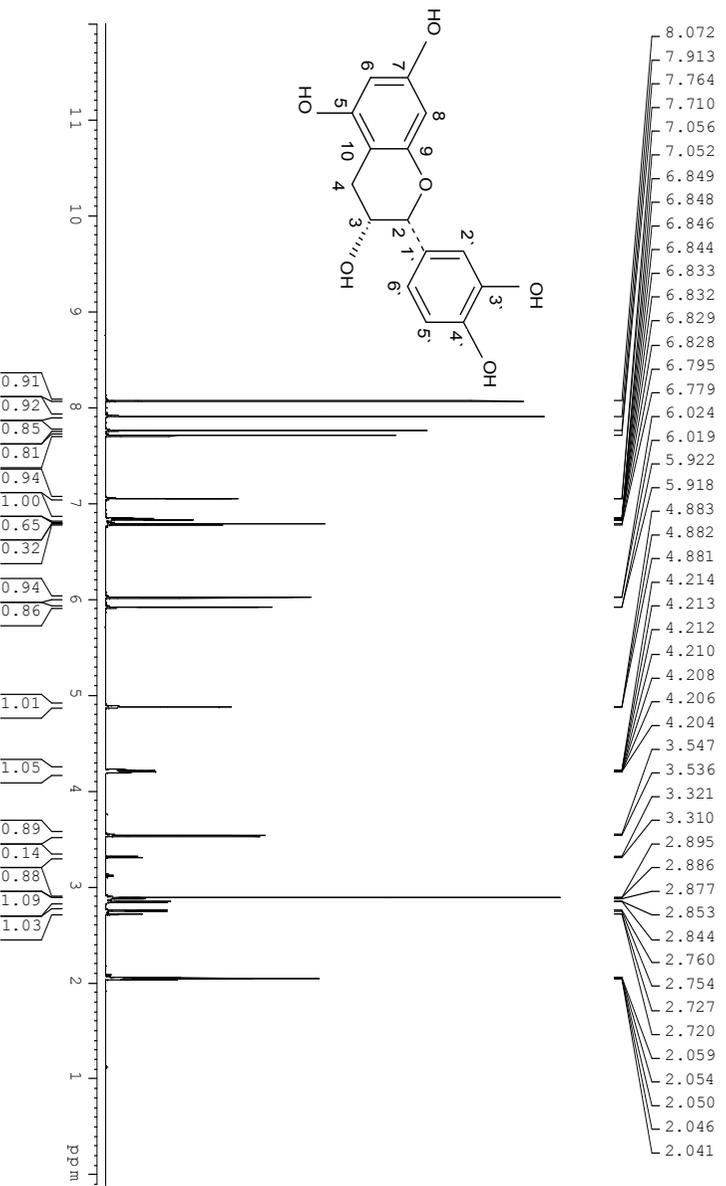


Figura 24. Espectro de RMN de ¹H em acetona-*d*₆ (500 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*)

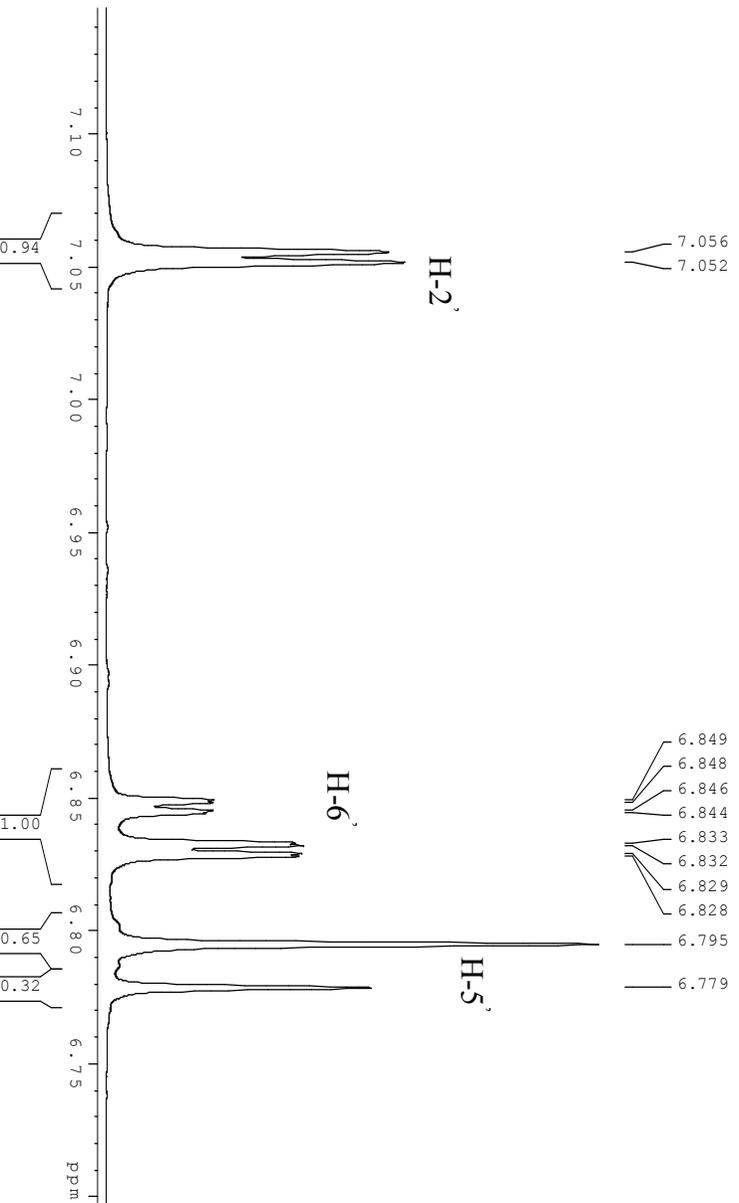


Figura 25. Espectro de RMN de ¹H em acetona-*d*₆ (500 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*). Expansão em campo baixo

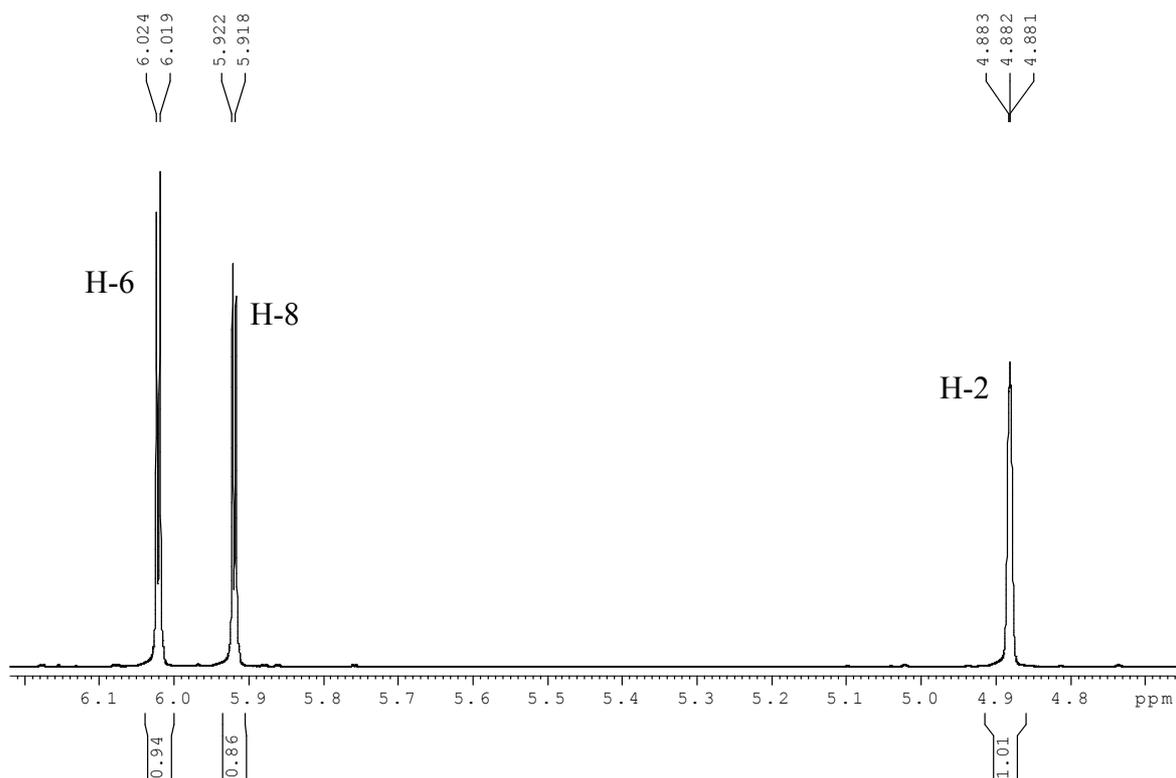


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*). Expansão em campo baixo

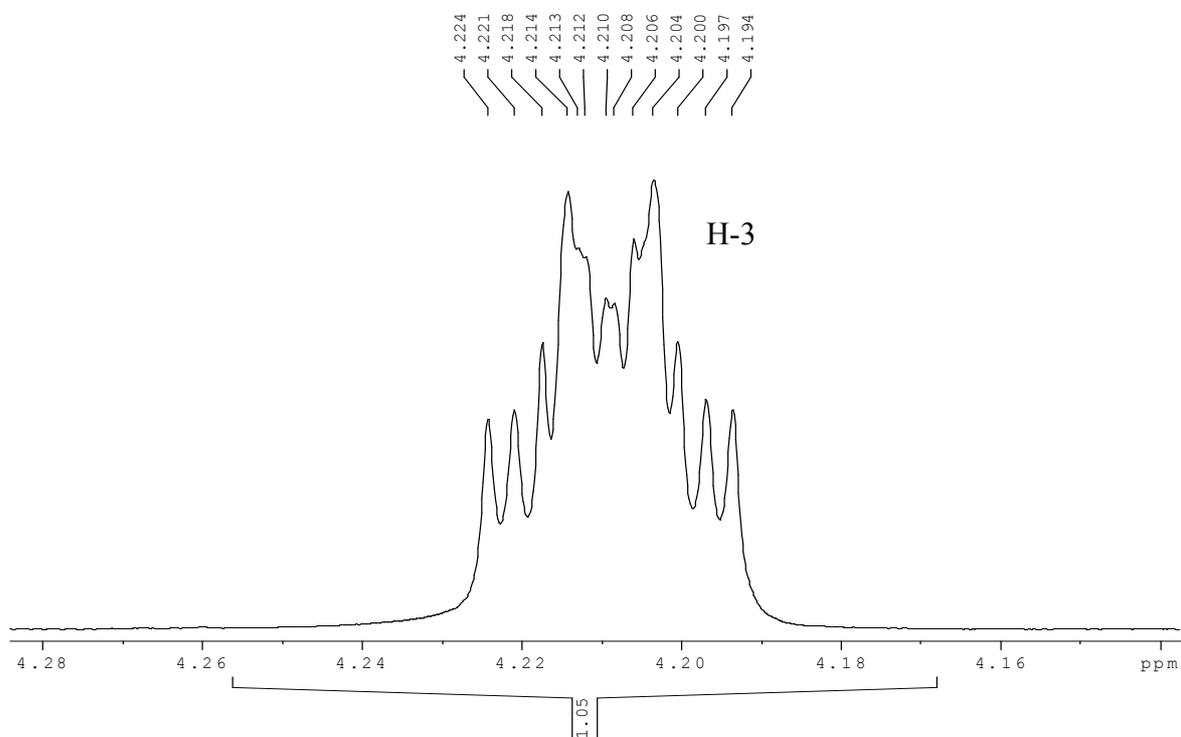


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*). Expansão em campo baixo

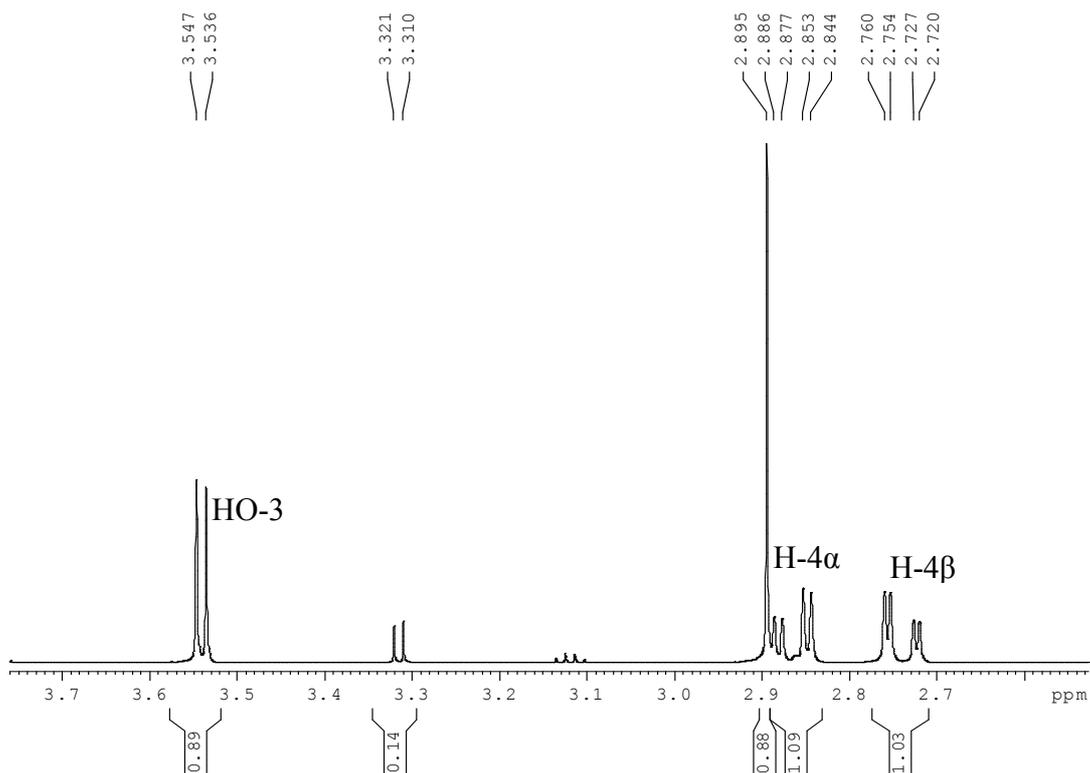


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*). Expansão em campo alto

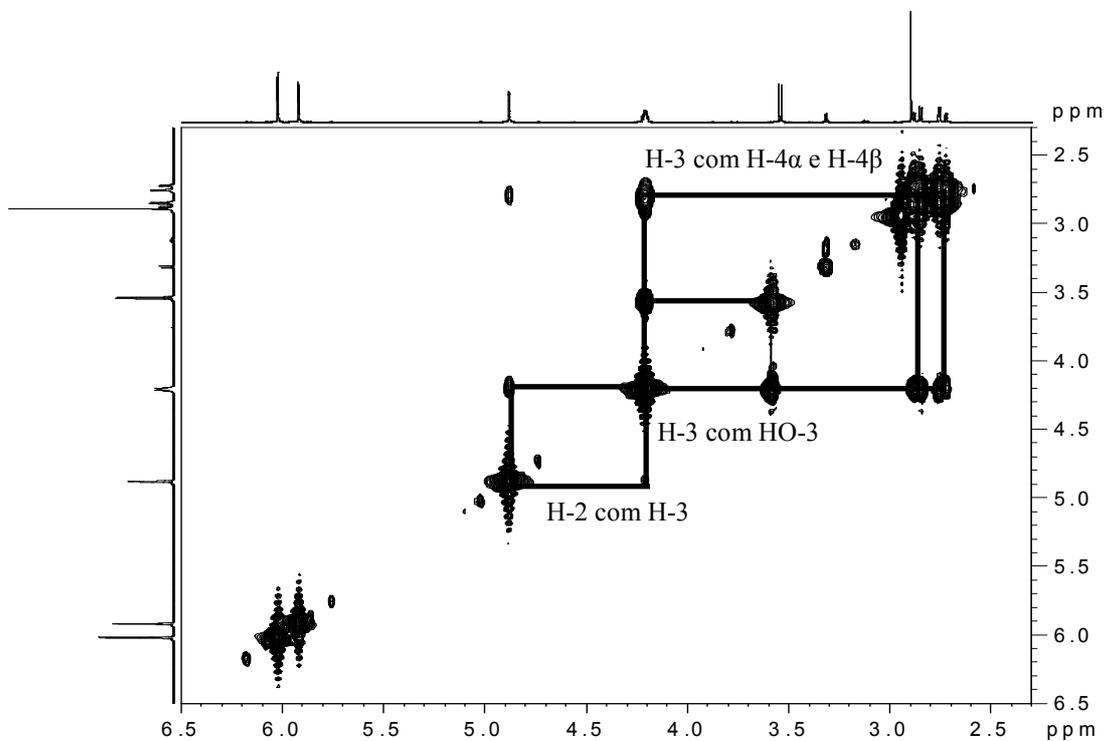


Figura 29. Espectro de HOMOCOSY ^1H , ^{13}C em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*). Expansão em campo alto

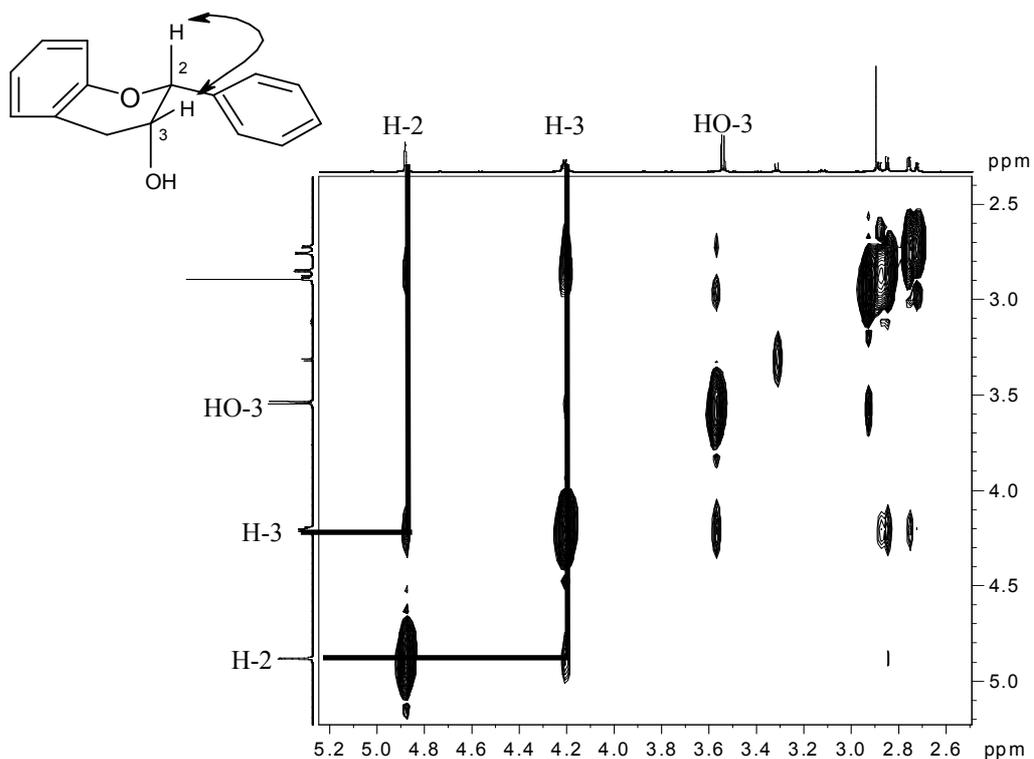


Figura 30. Espectro de NOESY ^1H , ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*). Expansão em campo alto

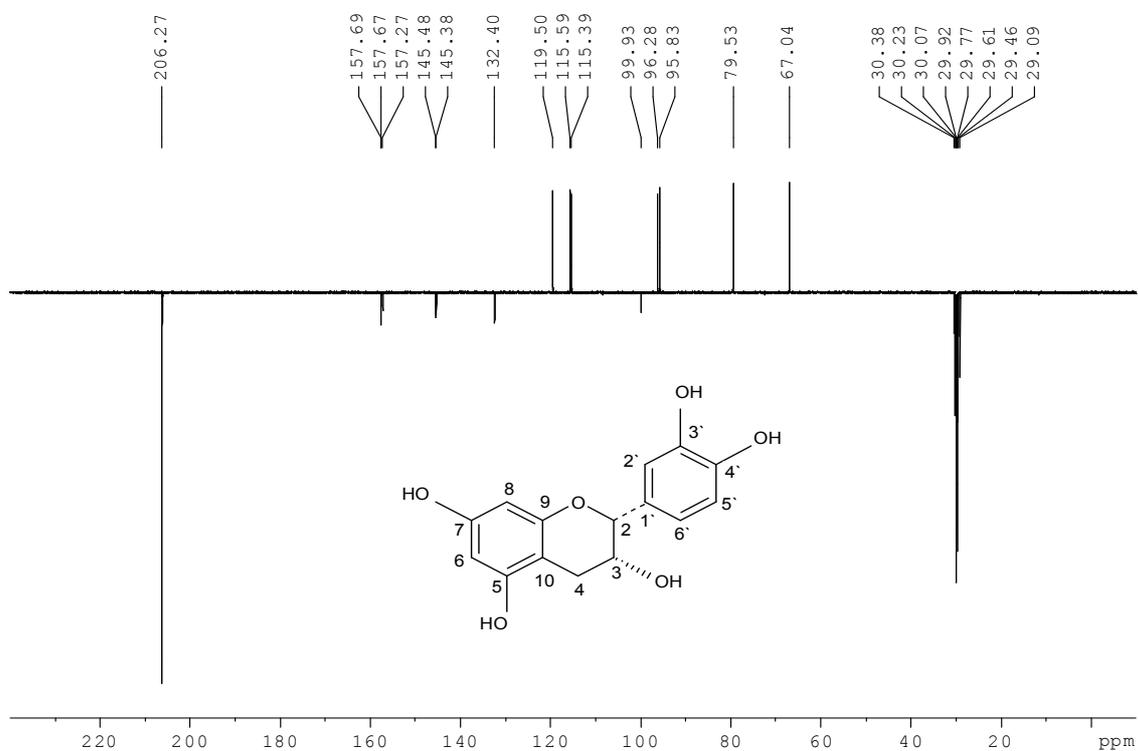


Figura 31. Espectro de APT em acetona- d_6 (125 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*)

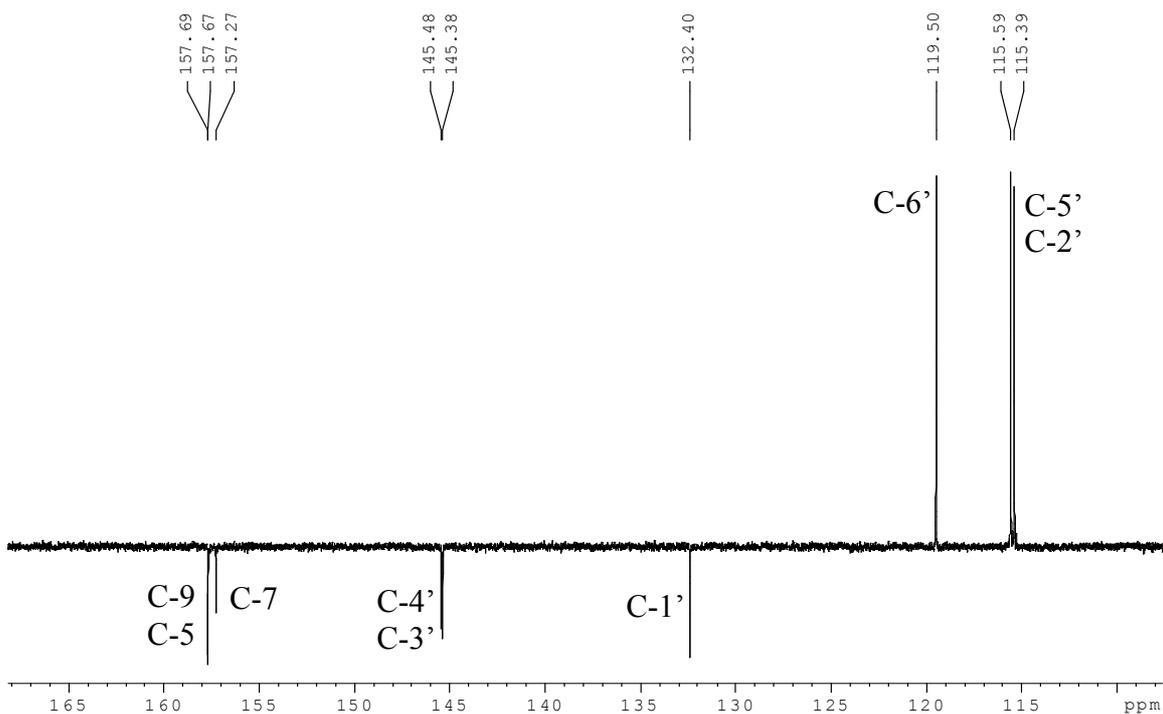


Figura 32. Espectro de APT em acetona-d₆ (125 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*).
Expansão em campo baixo (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima)

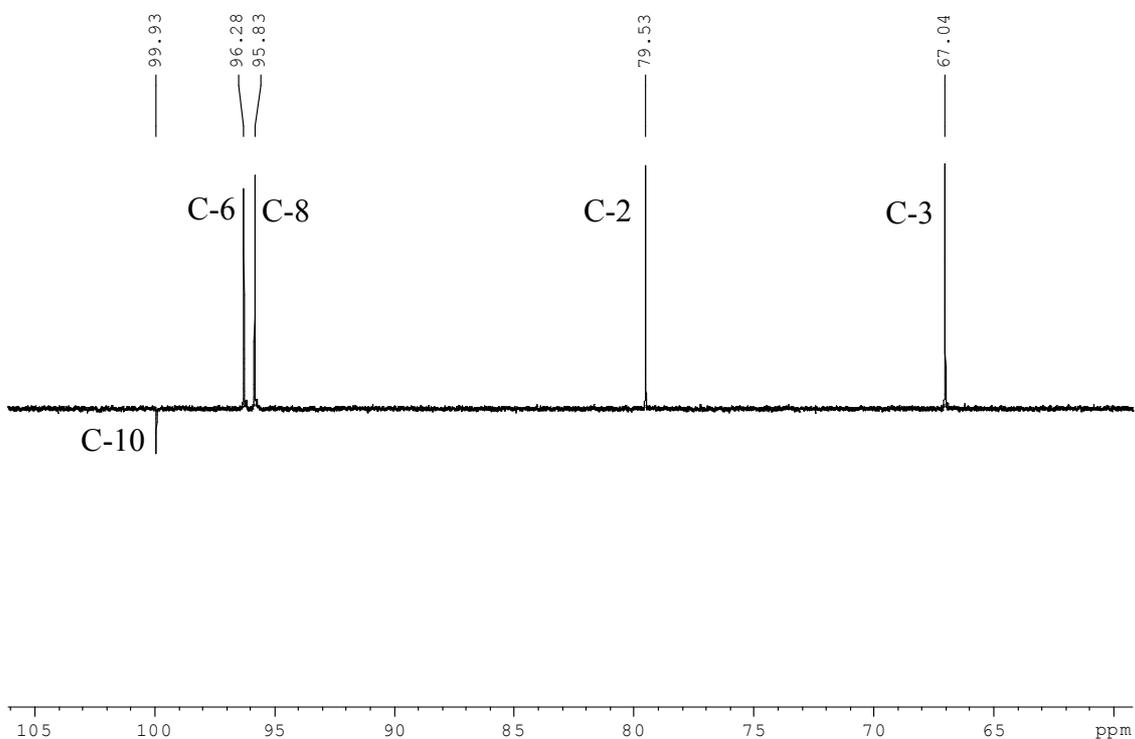


Figura 33. Espectro de APT em acetona-d₆ (125 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*).
Expansão em campo baixo (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima)

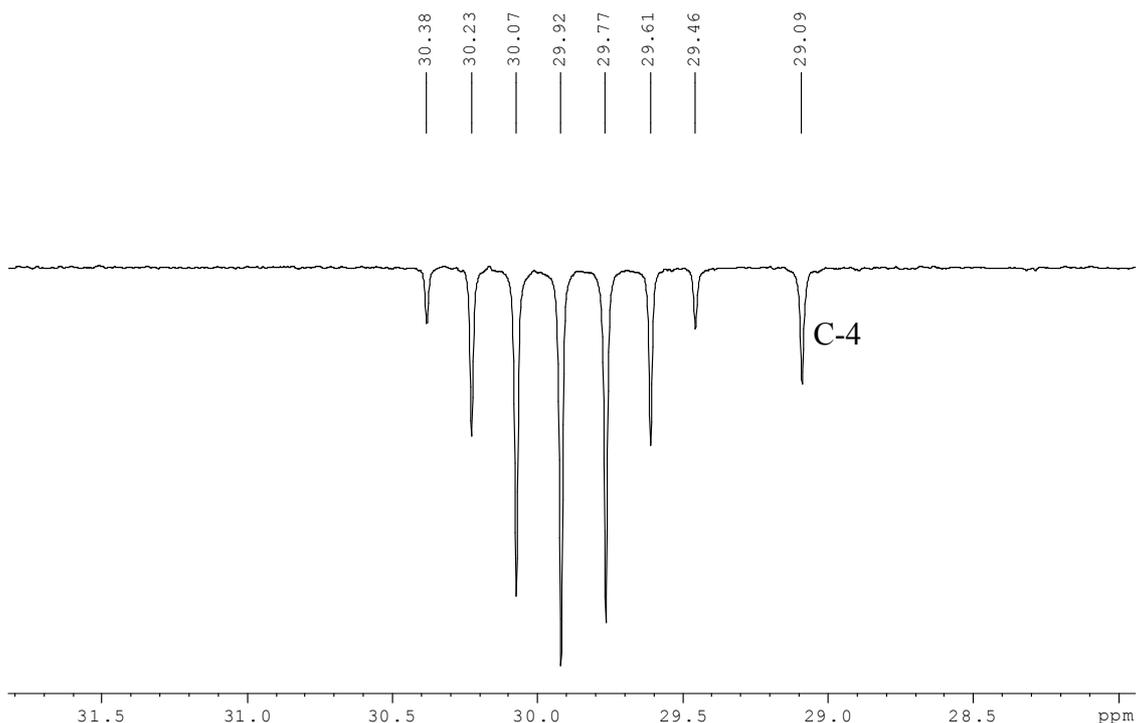


Figura 34. Espectro de APT em acetona- d_6 (125 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*).
Expansão em campo alto (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima)

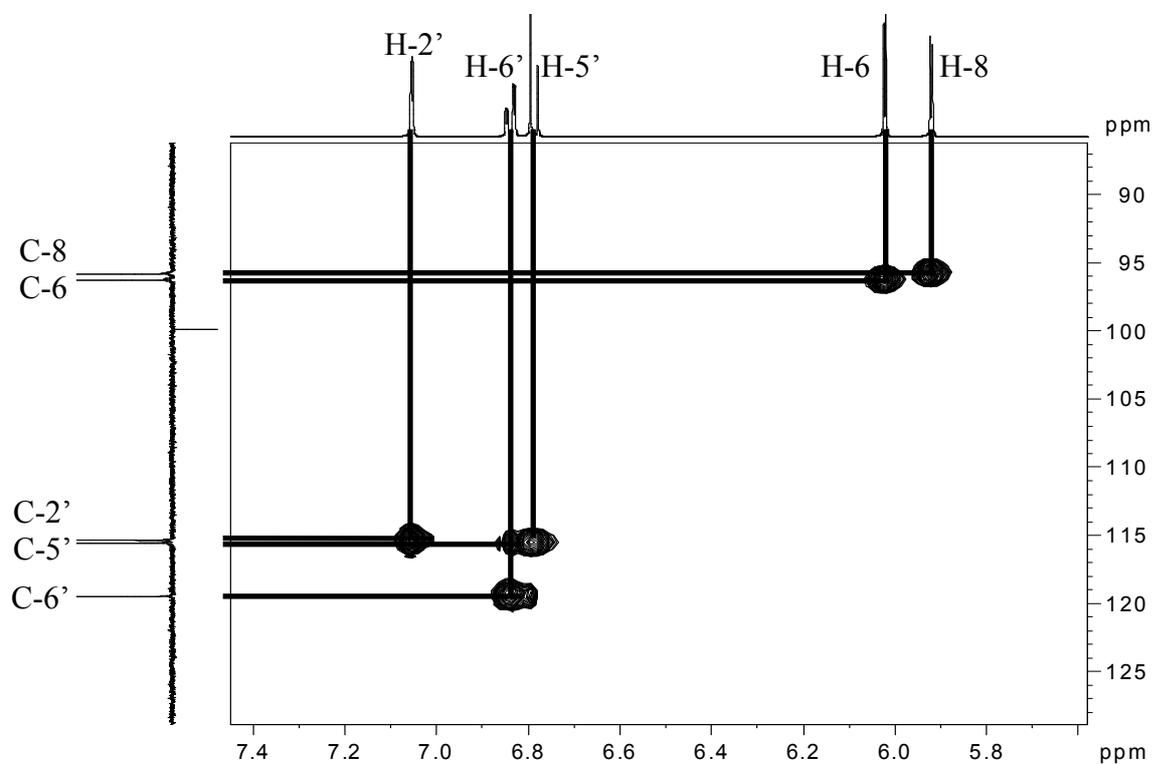


Figura 35. Espectro de HSQC em acetona- d_6 (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C :125 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*). Expansão em campo baixo

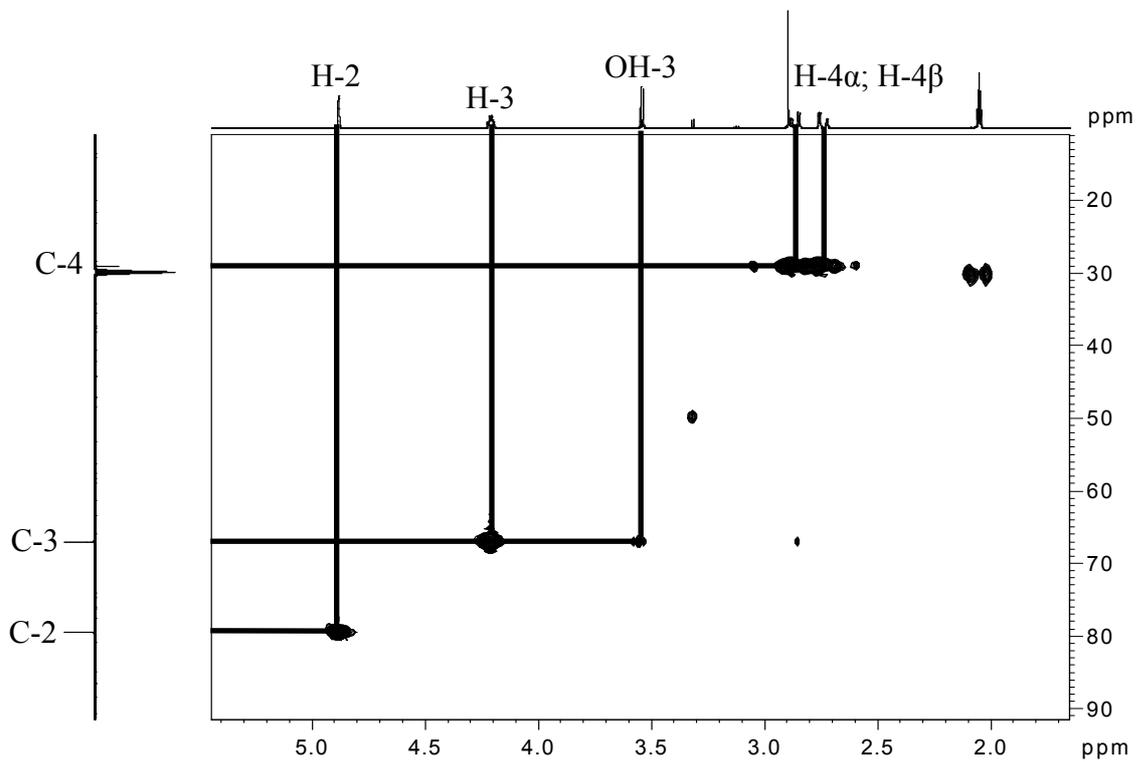


Figura 36. Espectro de HSQC em acetona- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C :125 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*). Expansão em campo baixo

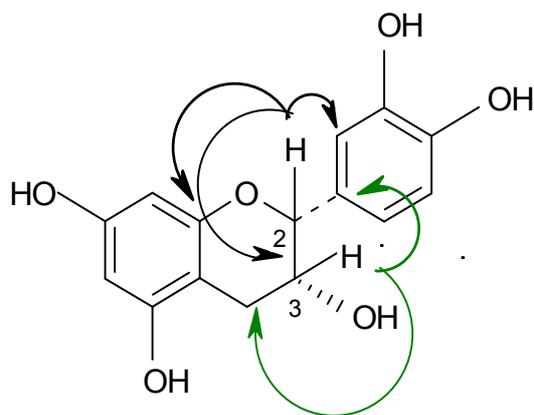


Figura 37. Algumas correlações ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) observadas no espectro de HMBC de FCAE1 (*epicatequina*)

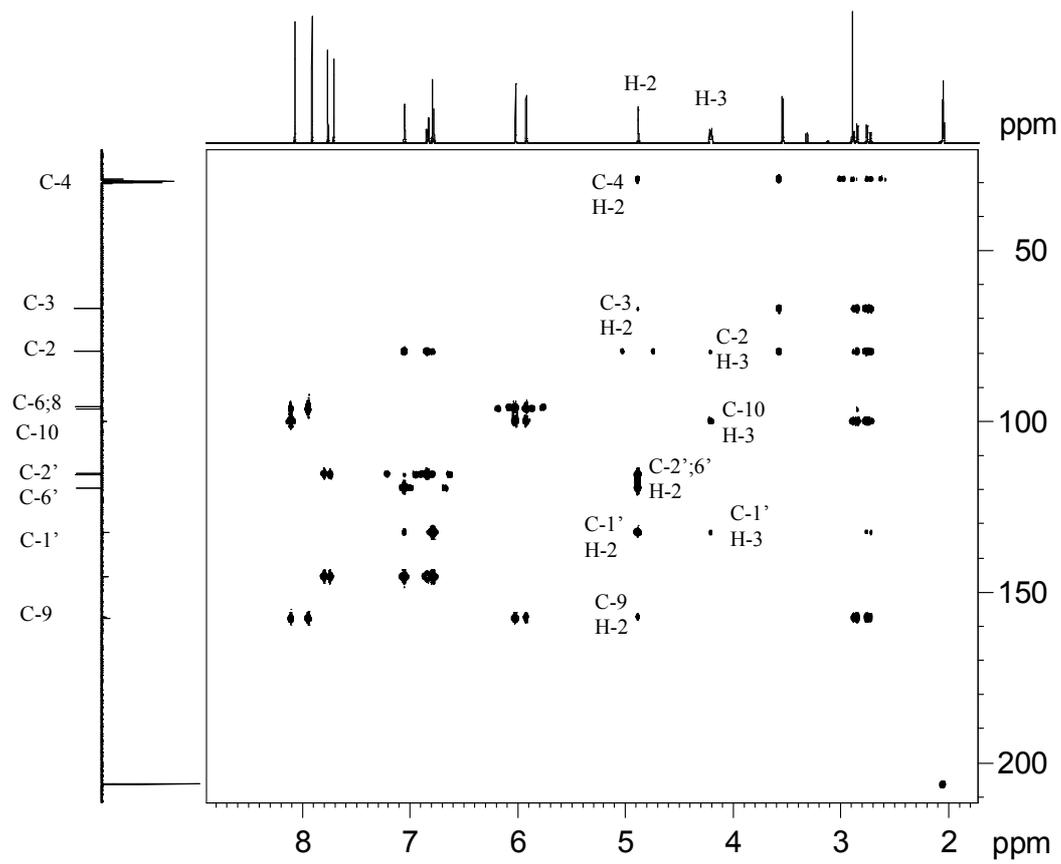
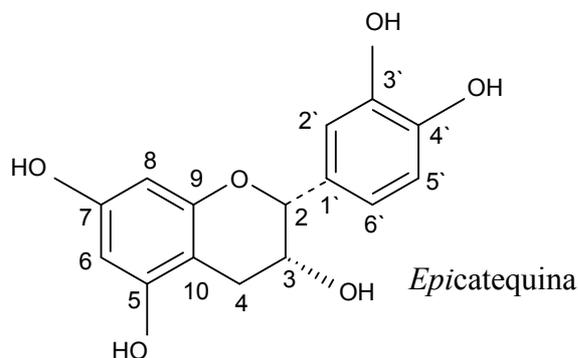


Figura 38. Espectro de HMBC em acetona-*d*₆ (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C:125 MHz) de FCAE1 (*epicatequina*)

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em acetona- d_6 (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCAE1 (*epicatequina*).



C	δ_{C}	δ_{H} (multi)	C	δ_{C}^*	δ_{H}^* (multi)
1'	132,40	-	1'	131,70	-
3'	145,38	-	3'	145,0	-
4'	145,48	-	4'	145,1	-
5	157,67	-	5	157,3	-
7	157,27	-	7	156,7	-
9	157,69	-	9	157,1	-
10	99,93	-	10	99,5	-
CH			CH		
2	79,53	4,88 (sl)	2	79,1	4,82 (sl)
2'	115,39	7,05 (d, $J=2,0$)	2'	115,0	6,97 (d, $J=1,2$)
3	67,04	4,20 (m)	3	66,6	4,17 (sl)
5'	115,59	6,78 (d, $J=8,0$)	5'	115,4	6,75 (d, $J=8,1$)
6	96,28	6,02 (d, $J=2,5$)	6	96,0	5,93 (d, $J=1,8$)
6'	119,50	6,84 (dd, $J=8,0; 2,0$)	6'	119,0	6,79 (dd, $J=8,1; 1,2$)
8	95,83	5,9 (d, $J=2,0$)	8	95,3	5,91 (d, $J=1,8$)
CH₂			CH₂		
4	29,09	2,86 (dd, $J=16,5; 4,5$) 2,74 (dd, $J=16,5; 3,0$)	4	28,5	2,85 (dd, $J=16,8; 4,5$) 2,72 (dd, $J=16,8; 2,4$)

* Fonte: LÔBO *et al.* (2008)

4.1.5. Biflavonóides

Os espectros de IV de **FCAE4** (Figura 39, p. 73) e **FCAE5** (Figura 40, p. 73) evidenciam bandas de absorção em 3420 cm^{-1} (estiramento O-H), 1650 cm^{-1} (estiramento de carbonila conjugada), 1600 cm^{-1} (estiramento C=C de anel aromático) e em 1360 cm^{-1} (estiramento C-O).

Os espectros de UV dos compostos **FCAE4** (Figura 43, p. 75) e **FCAE5** (Figura 44, p. 75) são típicos de flavanonas com máximo de absorbância em 290 e 288 nm, respectivamente seguidos de um ombro em torno de 334 nm (MABRY *et al.*, 1970). Nos espectros de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) (Figura 45, p. 76; Figura 47, p. 78) foram observados os picos referentes aos íons $[M+H]^+$ com m/z 721 e 705 correspondentes a fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ e $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$, respectivamente. Adicionalmente, foram observados os picos com m/z 559 e 543 para **FCAE4** e **FCAE5**, sugerindo a perda de uma molécula de glicose, além de outros fragmentos característicos de Retro-Diels-Alder (RDA) (Figura 46, p. 77; Figura 48, p. 79). As estruturas foram elucidadas por análises detalhadas dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 49, p. 80; Figura 64, p. 90; Figura 55, p. 84; Figura 68, p. 92) em conjunto com experimentos de RMN bidimensionais (^1H - ^1H COSY, HSQC e HMBC) (Figura 54, p. 83; Figura 59, p. 86; Figura 62, p. 88).

Os sinais duplicados (na razão de 1:0.6) observados no espectro de RMN de ^1H em DMSO-d_6 sugere a existência de dois confôrmeros que coexistem em temperatura ambiente. Esta observação já havia sido relatada para o biflavonóide GB-1 (HAN *et al.*, 2005). Neste tipo de molécula, a existência de isômeros rotacionais em temperatura ambiente é explicada pela formação de fortes ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares entre os grupos hidroxilas. LI *et al.* (2002) mostrou que um experimento de RMN de ^1H com biflavonóides isolados de *Rheedia acuminata* realizado sob aquecimento de 80 °C simplifica o espectro, com o desaparecimento das linhas espectrais duplicadas. O aquecimento acelera a velocidade de interconversão, facilitando a superação da barreira energética, favorecendo a formação exclusiva do confôrmero mais estável. Esta metodologia foi empregada sem êxito com os biflavonóides **FCAE4** e **FCAE5** no presente estudo.

O biflavonóide **FCAE4** exibiu simpletos referentes a hidrogênios de grupos OH, dois sinais em campo baixo δ_{H} 12.13 e 11.66 característicos de hidroxilas queladas a carbonila OH-C(5) e OH-C(5''), dois sinais em δ_{H} 9.49 e 9.44 atribuídos a hidroxilas

livres, e ainda um duplete em campo alto δ_H 5.85 ($J=6,5$ Hz) referente a OH-3". Os dupletos observados em δ_H 7.23, 7.18, 6.68 e 6.60 ($J= 8.5$ Hz) podem ser atribuídos ao sistema de spins do tipo AA'BB' correspondentes aos anéis B *para*-substituídos H-2"/6"', H-2'/6', H-3"/5"' e H-3'/H-5', respectivamente. Dois dupletos referentes a dois hidrogênios em δ_H 5.89 e 5.76 ($J= 2,0$ Hz) foram atribuídos aos H-6 e H-8. O H-6" exibiu um simpleto em δ_H 6.21. Similarmente, os três dupletos remanescentes observados em δ_H 5.45 ($J= 12$ Hz), 5.06 ($J= 12$ Hz), 5.03 ($J= 11$ Hz) e um duplo duplete em δ_H 4.30 ($J= 11$ e 6 Hz), integrando para um hidrogênio cada, foram atribuídos aos H-2, H-2", H-3 e H-3", respectivamente. A constante de acoplamento vicinal (11-12 Hz) J (H-C(2), H-C(3)) e J (H-C(2"), H-C(3")) estabelece um arranjo trans-diaxial para estes pares. Os sinais para a β -D-glicose foram bem característicos. O hidrogênio anomérico apareceu em δ_H 4.72 (d, $J= 7,5$ Hz), os hidrogênios metilênicos H-6"' em δ_H 3.44 (m) e 3.7 (dd, $J= 10,5$ e 5,0 Hz) e os demais hidrogênios se concentraram na região de δ_H 3.15 – 3.48. O espectro de APT (Figura 55, p. 84) exibiu sinais em campo baixo em δ_C 198.21 e 196.91 típicos de grupos carbonilas de flavanonas substituídas em C-3. Os sinais em δ_C 129.76, 128.32, 114.95 e 114.80 podem ser atribuídos aos carbonos 2',6',2"',6"',3',5',3"' e 5"' dos anéis IB e IIB do sistema AA'BB', respectivamente. Os sinais em δ_C 72.43 e 46.70 são referentes aos carbonos alifáticos das unidades 3-hidroxi-flavanona e flavanona, respectivamente. Similarmente, os sinais em δ_C 82.75 e 82.07 são atribuídos ao C-2" e C-2. Por comparação com os dados de RMN de ^{13}C de 3,8"-biflavonóide com GB-1 (biflavonóides de *Garcinia*) (HAN *et al.*, 2005), os espectros de RMN de FCAE4 são compatíveis com o 3,8"-biflavonóide e consiste em unidades de flavanona e 3-hidroxi-flavanona, respectivamente. A conectividade dos átomos na molécula, particularmente a conexão-3,8" das unidades flavonoídicas, foi confirmada por correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 62, p. 88). A ligação glicosídica entre a β -D-glicose e o C-7" foi verificada por HMBC, onde o hidrogênio anomérico em δ_H 4.73 está correlacionando com o sinal do C-7" em δ_C 162.79. Análises detalhadas dos espectros de HSQC (Figura 59, p. 86) e HMBC permitiram as corretas atribuições dos sinais de RMN de 1H e ^{13}C das unidades aglicona e glicosídeo, respectivamente. Os sinais de RMN de 1H e ^{13}C para o composto FCAE5 são similares aos de FCAE4, exceto pelos sinais observados em δ_H 5.48 (1H, dd, $J= 12,5$ e 3 Hz), 3.05 (1H, dd, $J= 17,5$ e 13 Hz) e 2.75 (1H, dd, $J= 17,5$ e 3 Hz) e δ_C 42,12. Este é o segundo relato sobre o biflavonóide **GB1-7"-O-Glicosídeo (FCAE4)** que foi previamente sugerido existir

em *Garcinia kola* (Clusiaceae), porém sem nenhum relato de elucidação estrutural completa (OKUNJI *et al.*, 2002), já **3,8''-binaringenina-7''-O-glicosídeo (FCAE5)** foi previamente isolado de *Garcinia multiflora* (Clusiaceae) (CHEN *et al.*, 1975).

A substância **GB1-7''-O-Glicosídeo (FCAE4)** apresentou $[\alpha_D^{25}] = - 11,8$ (c= 0,23, MeOH) em e **3,8''-binaringenina-7''-O-glicosídeo (FCAE5)** apresentou $[\alpha_D^{25}] = - 35.1$ (c= 0,67, MeOH).

As configurações absolutas dos biflavonóides foram determinadas com o auxílio das análises de Dicroísmo Circular (CD) e por comparação com dados da literatura (FERRARI *et al.*, 2003). Em análises de CD, as unidades flavanonas e 3-hidroxi-flavanonas destes biflavonóides podem ser consideradas sistemas cromóforos independentes, as quais possibilitam a atribuição configuracional. De acordo com GAFFIELD (1970), as conformações dos anéis heterocíclicos de flavanonas e 3-hidroxi-flavanonas podem ser relacionadas com os sinais das transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ observadas em CD. Sendo estabelecido que transições $n \rightarrow \pi^*$ que exibem Efeito Cotton (CE) positivo para 3-hidroxi-flavanonas e negativo para flavanonas definem a configuração absoluta como (2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*) considerando o arranjo diequatorial para os substituintes 2,3 do anel heterocíclico, a qual é confirmada por transições $\pi \rightarrow \pi^*$ com CE negativo para 3-hidroxi-flavanonas e positivo para flavanonas. Neste caso, os sinais das respectivas transições eletrônicas para as duas unidades flavonoídicas foram assinalados nos espectros de CD feitos em DMSO-*d*₆ e MeOH (Figura 69, p. 93; Figura 70, p. 94) e considerando o exposto anteriormente estabelecido foi possível atribuir a configuração absoluta 2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R* para FCAE4 e 2*R*, 3*S*, 2''*R* para FCAE5. Desta forma, foi possível identificar FCAE4 como sendo 2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*-GB1-7-*O*-glicosídeo e FCAE5 como 2*R*, 3*S*, 2''*R*-3,8''-binaringenina-7-*O*-glicosídeo.

FERRARI *et al.* (2003) fizeram uma revisão sobre a configuração absoluta dos biflavonóides GB1, GB2, GB4 e GB4a e propuseram os sinais dos efeitos Cottons de cada estereoisômero. Para GB1, a configuração absoluta foi definida como 2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*, semelhante a atribuída a GB1-7-*O*-glicosídeo (FCAE4). GAFFIELD (1970) sugeriu que flavanonas glicosiladas possuindo unidade aglicona quiral, como no caso de FCAE4, exibem efeito Cotton similar as respectivas agliconas (GB1). Vale a pena ressaltar, que o presente estudo consiste na primeira investigação a respeito de CD destes biflavonóides, além de ser o primeiro a disponibilizar os dados de IV, UV, CD, RMN de ¹H e ¹³C (incluindo 2D) e massas do biflavonóide GB1-7-*O*-glicosídeo.

Os biflavonóides são encontrados principalmente em gimnospermas e angiospermas, com destaque para as famílias Guttiferae (Clusiaceae), Ochnaceae e Anacardiaceae, sendo a ocorrência de biflavonóides glicosilados menos freqüente (ZUANAZZI, 2000). Os 3,8''-biflavonóides foram principalmente isolados de espécies do gênero *Garcinia*, *Rheedia* e *Allanblackia* (Clusiaceae), sendo recentemente relatados em uma espécie do gênero *Clusia* (COMPAGNONE *et al.*, 2008). Esta classe de metabólitos secundários têm apresentado um notável potencial terapêutico, atuando como antiinflamatórios, analgésicos, antimicrobianos, anticancerígenos, dentre outras atribuições farmacológicas (KIM *et al.*, 2008).

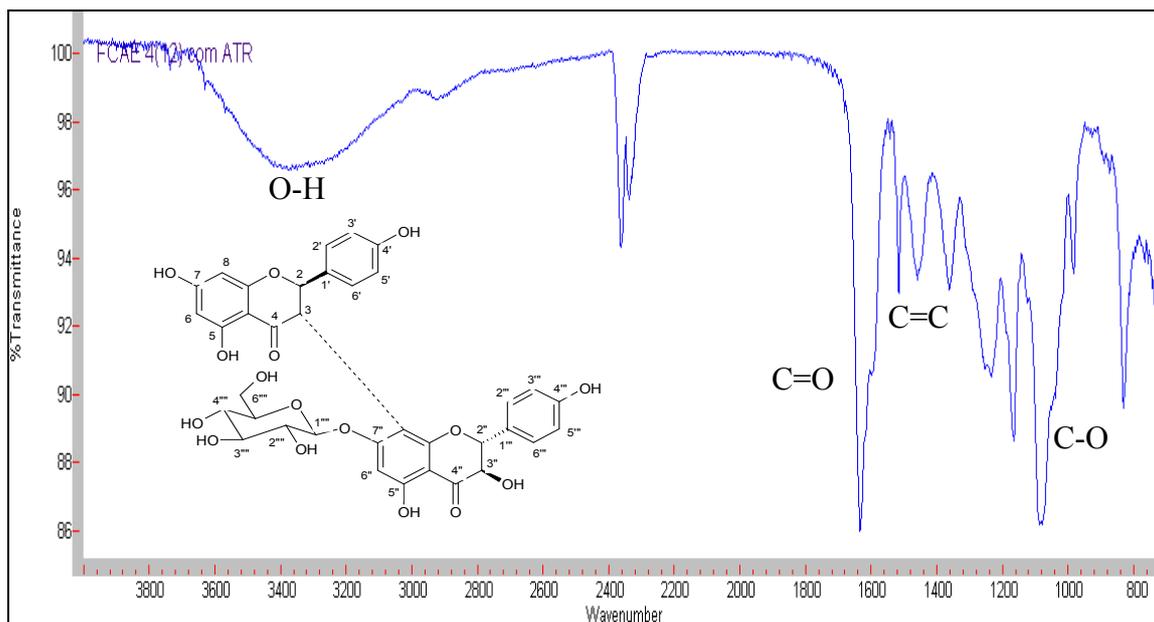


Figura 39. Espectro de IV (ATR) de FCAE4 (GB1-7''-*O*-glicosídeo)

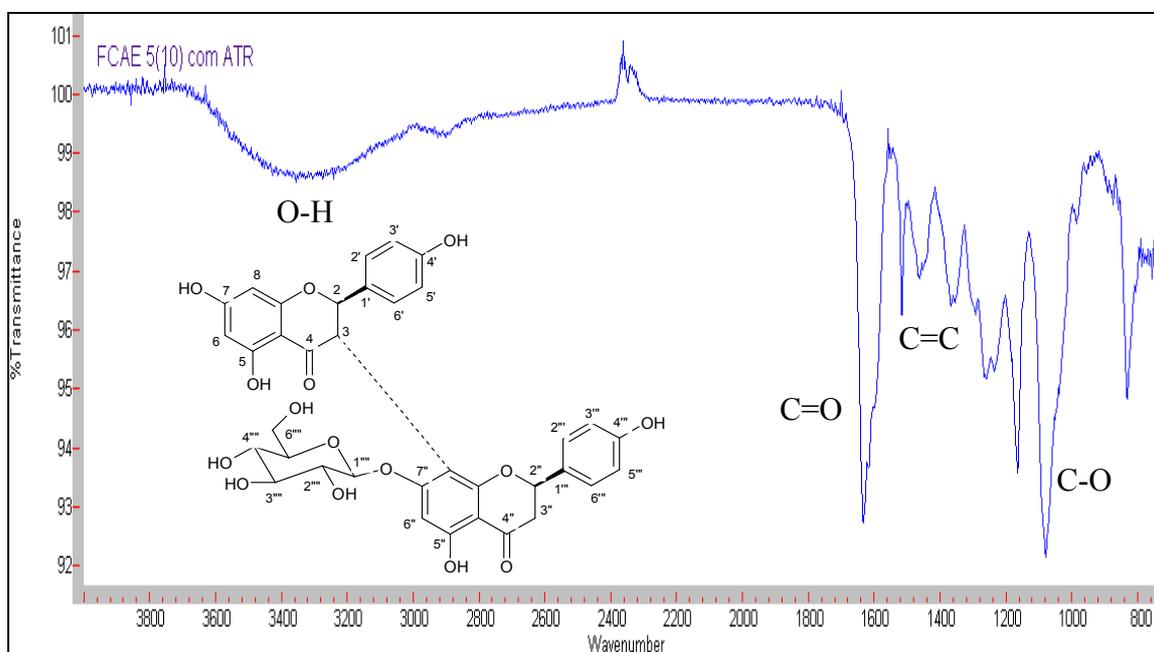


Figura 40. Espectro de IV (ATR) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''-*O*-glicosídeo)

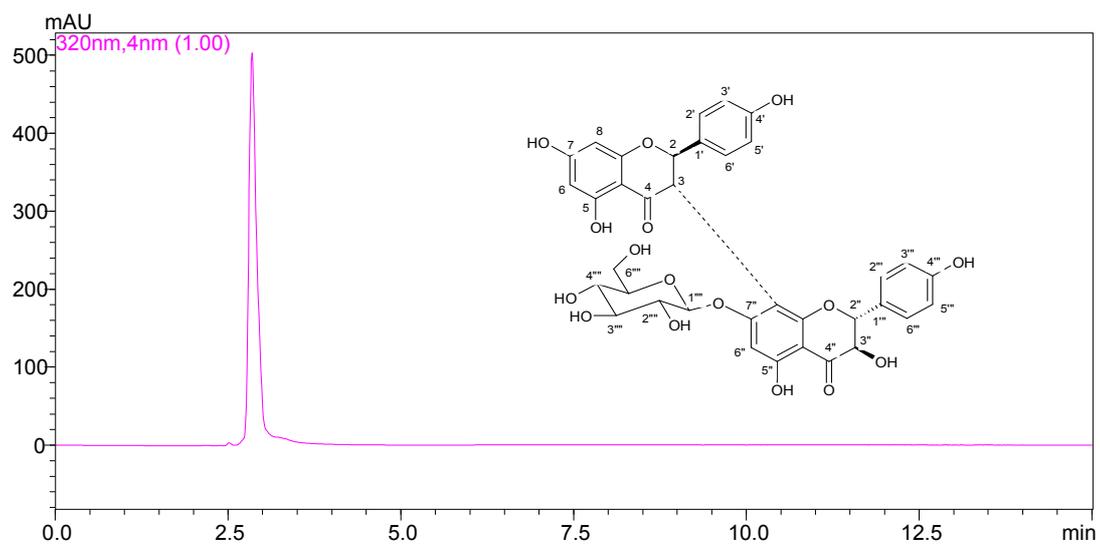


Figura 41. Cromatograma (CLAE-DAD; 320 nm) de FCAE4 (GB1-7''-*O*-glicosídeo)

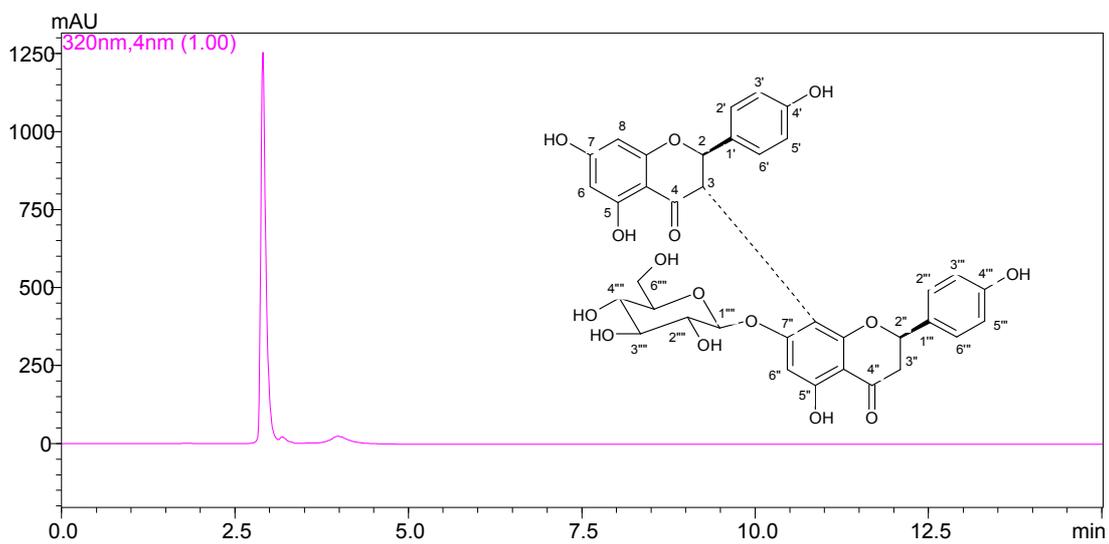


Figura 42. Cromatograma (CLAE-DAD; 320 nm) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''-*O*-glicosídeo)

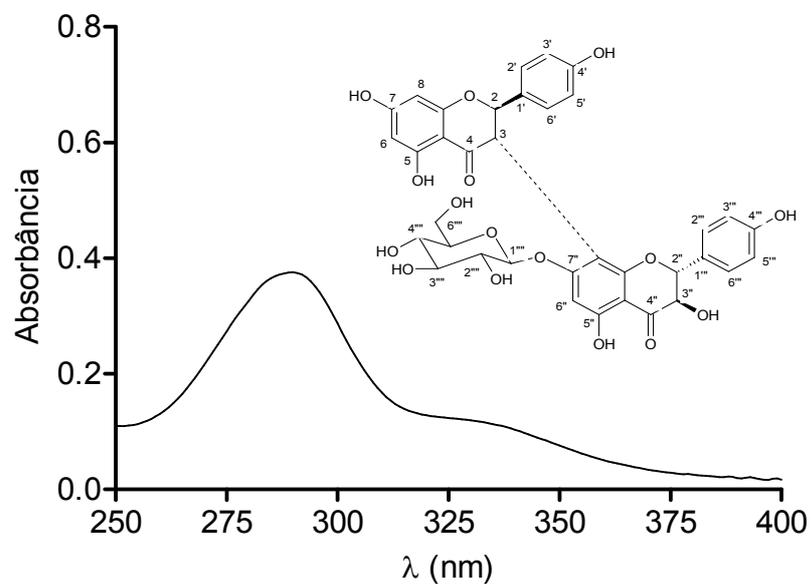


Figura 43. Espectro de UV em MeOH de FCAE4 (GB1-7-*O*-glicosídeo)

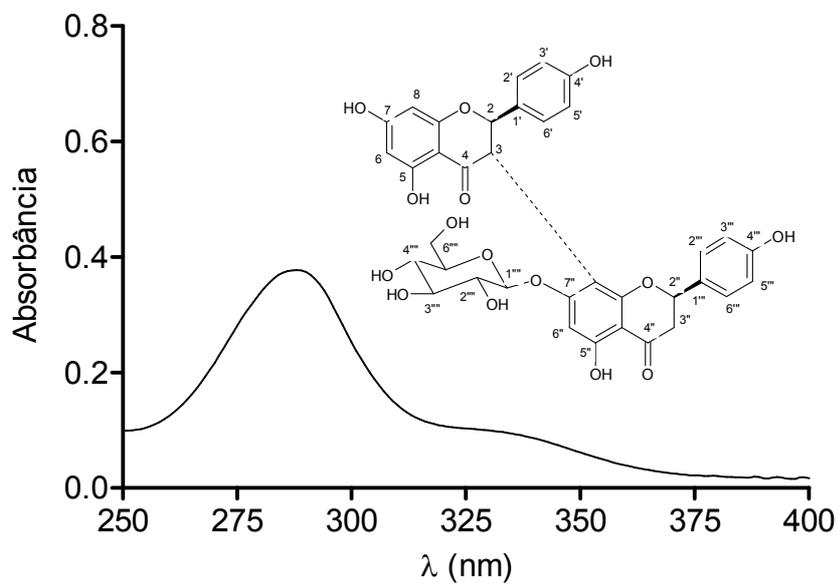


Figura 44. Espectro de UV em MeOH de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7-*O*-glicosídeo)

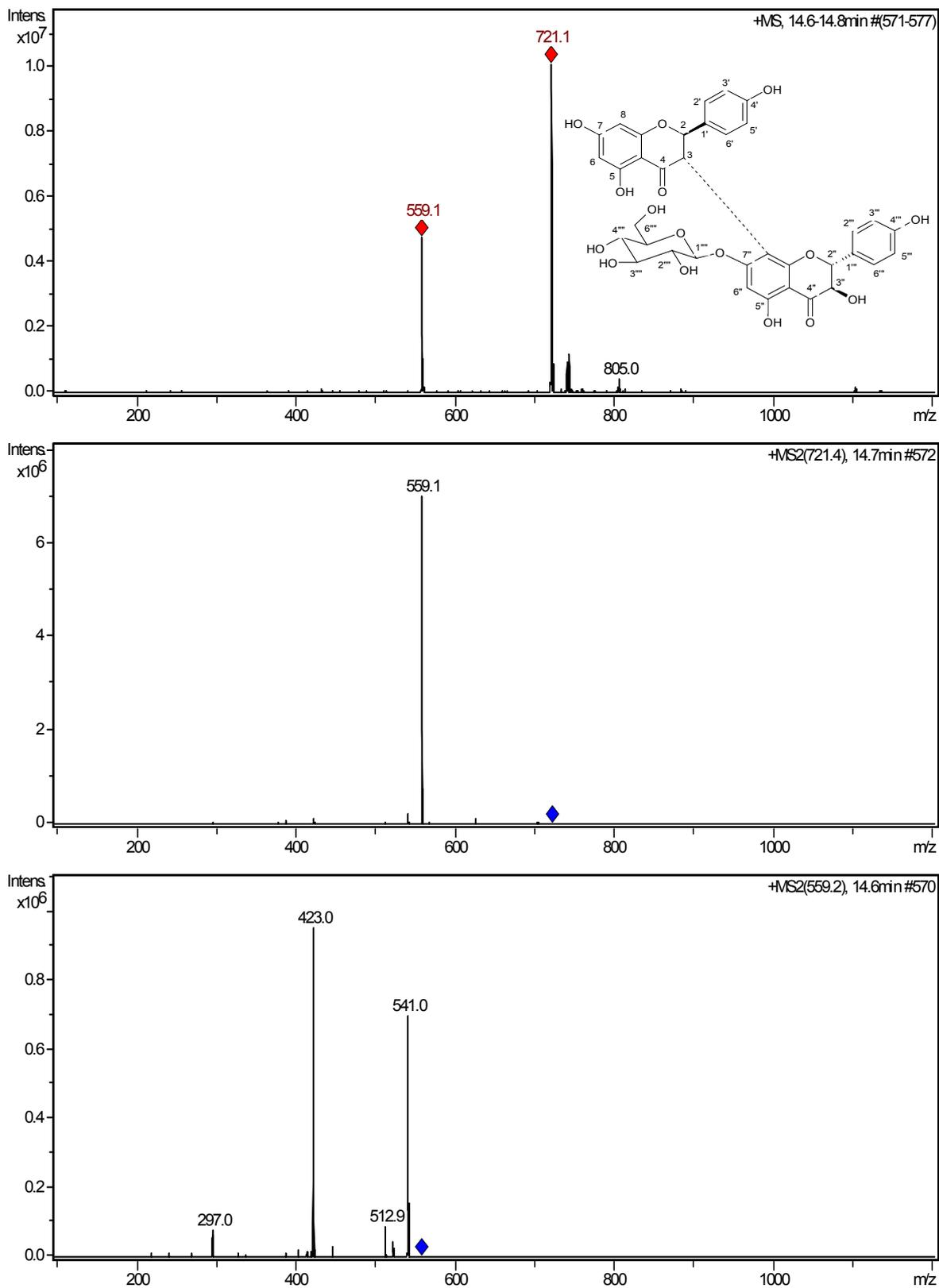


Figura 45. Espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo)

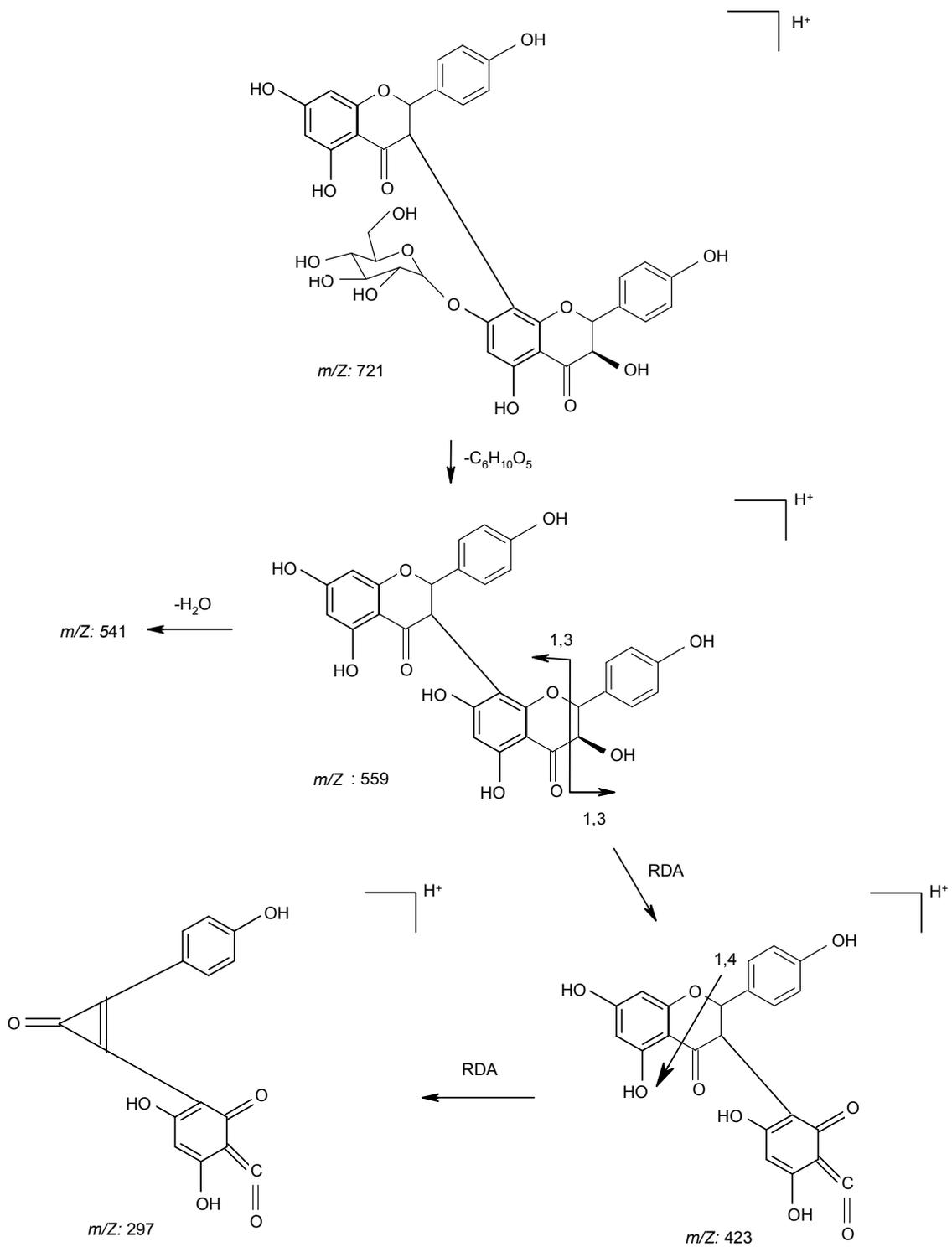


Figura 46. Proposta de fragmentação de FCAE4 (GB1-7-O-glicosídeo). Adaptada de JACKSON *et al.* 1971

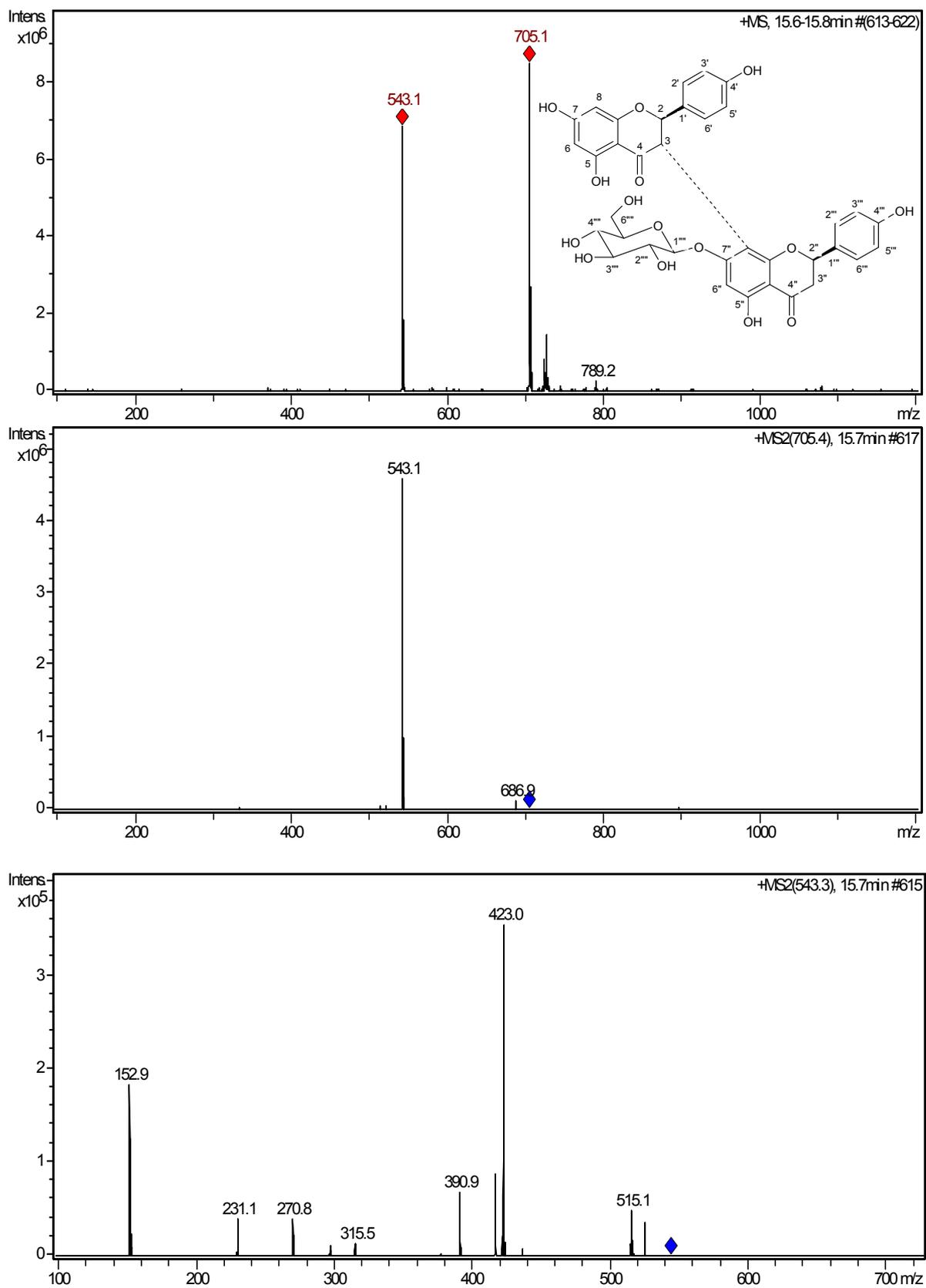


Figura 47. Espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''-O-glicosídeo)

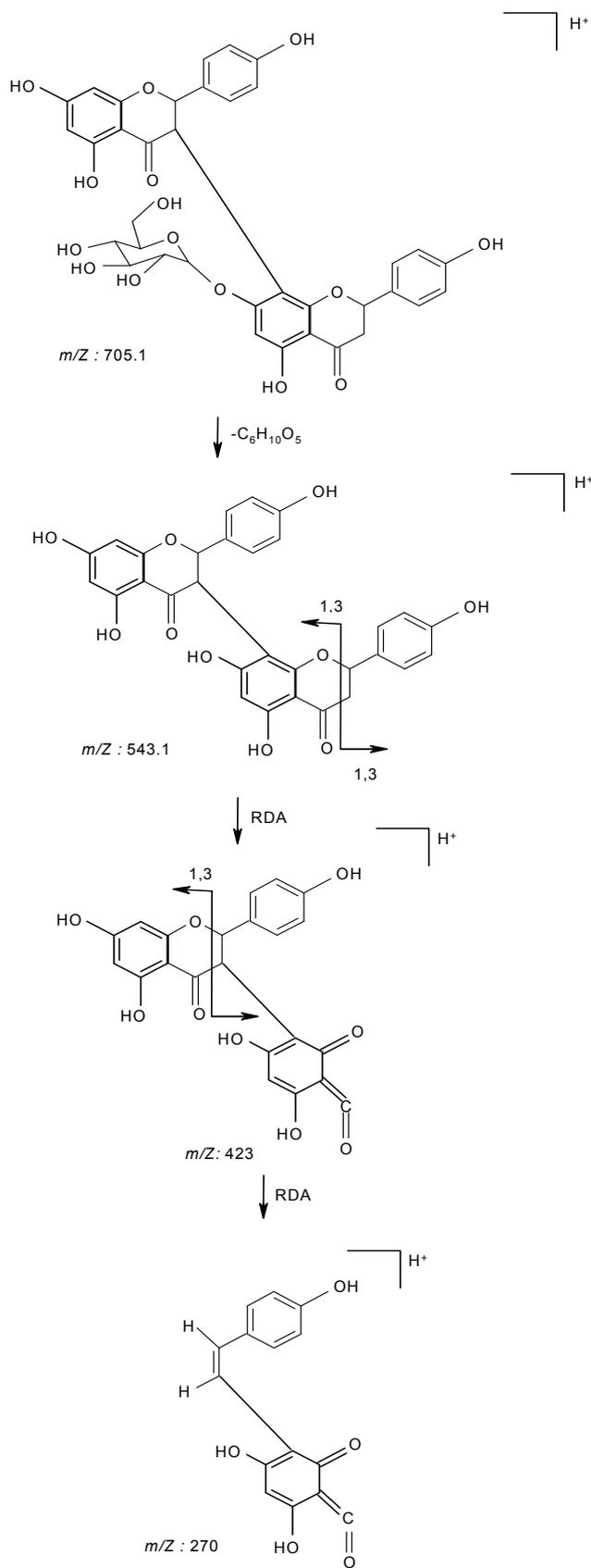


Figura 48. Proposta de fragmentação de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7-O-glicosídeo).
 Adaptada de JACKSON *et al.* 1971

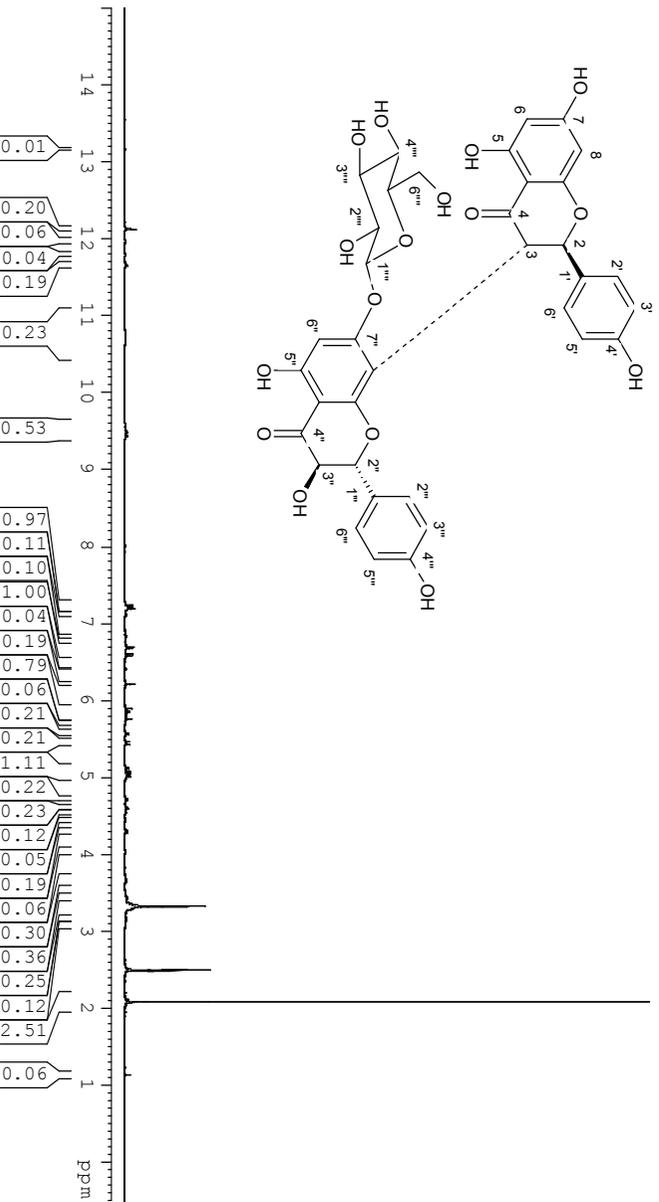
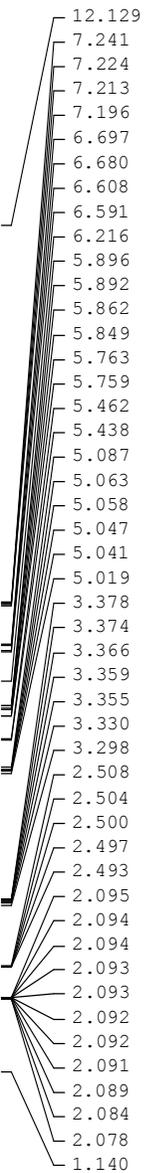


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo)

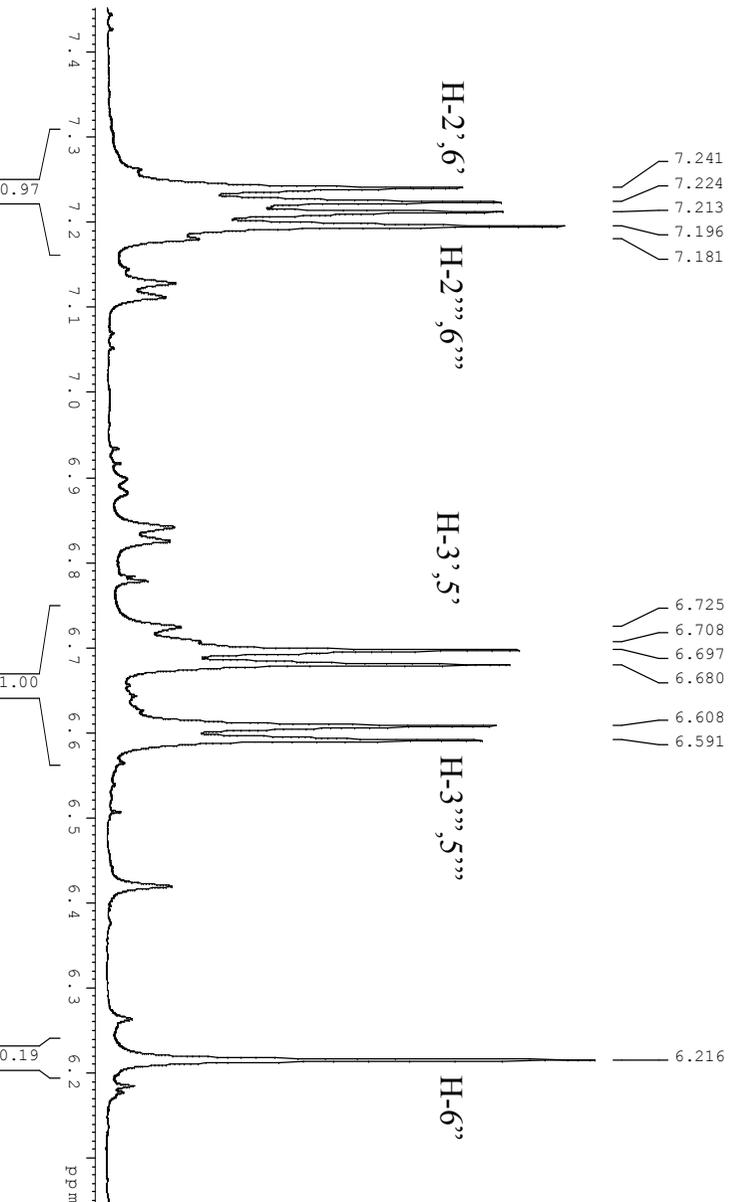


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo baixo

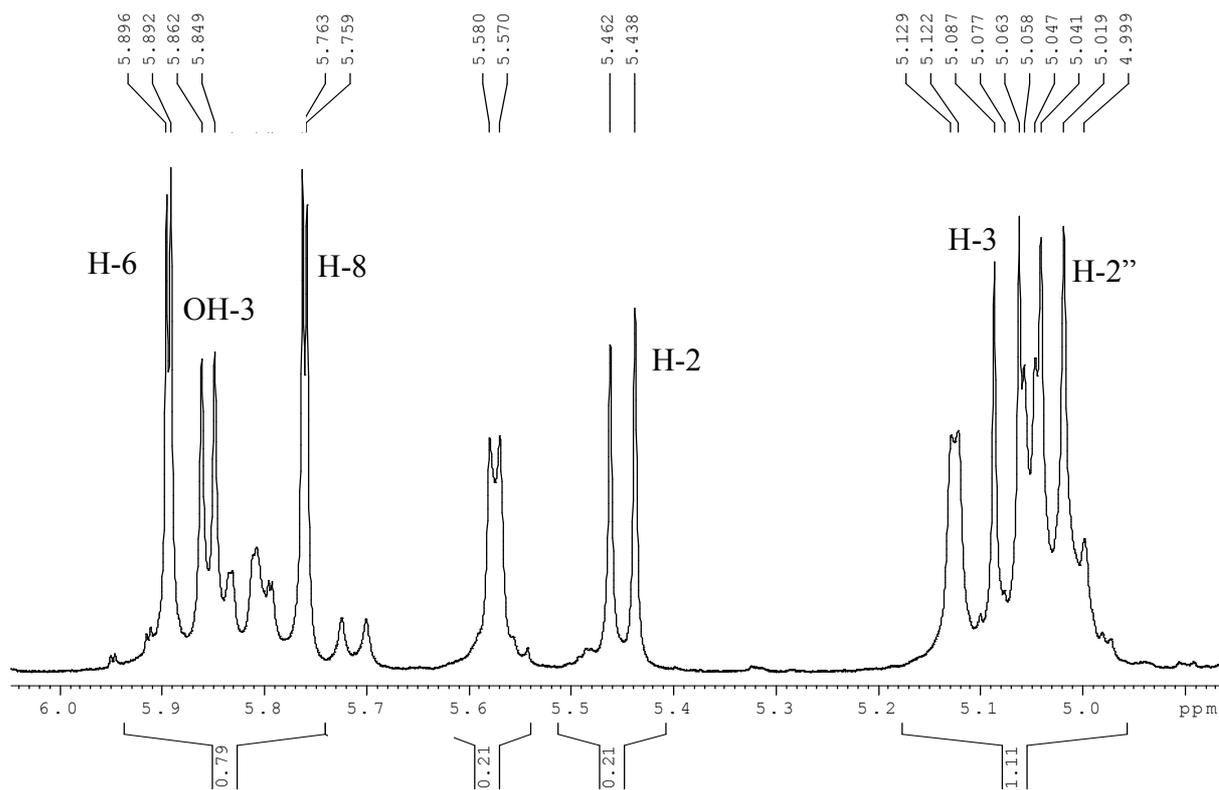


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo baixo

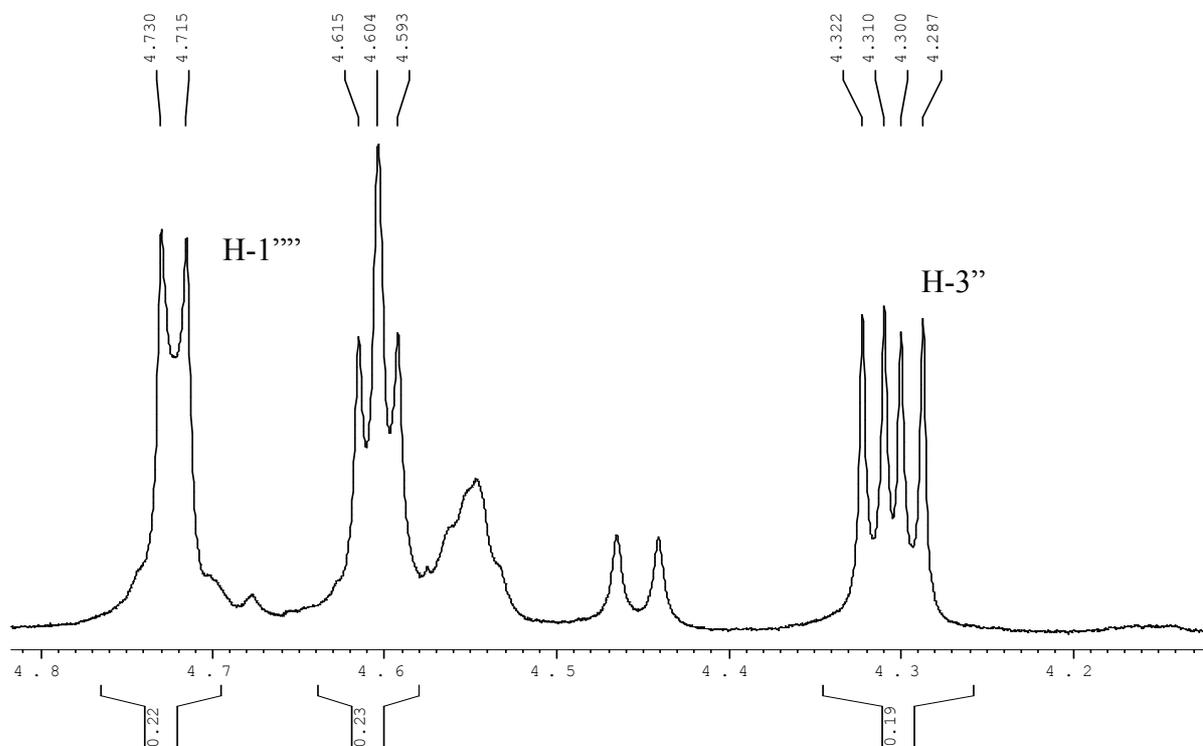


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo alto

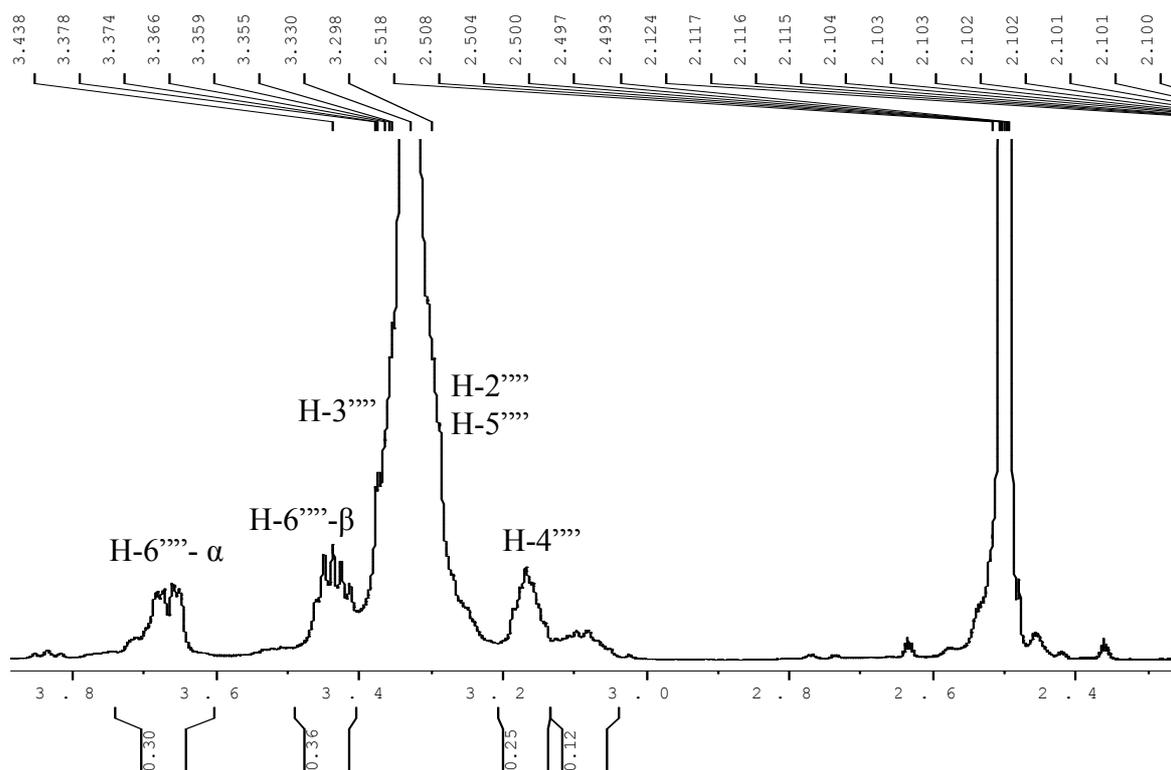


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo alto

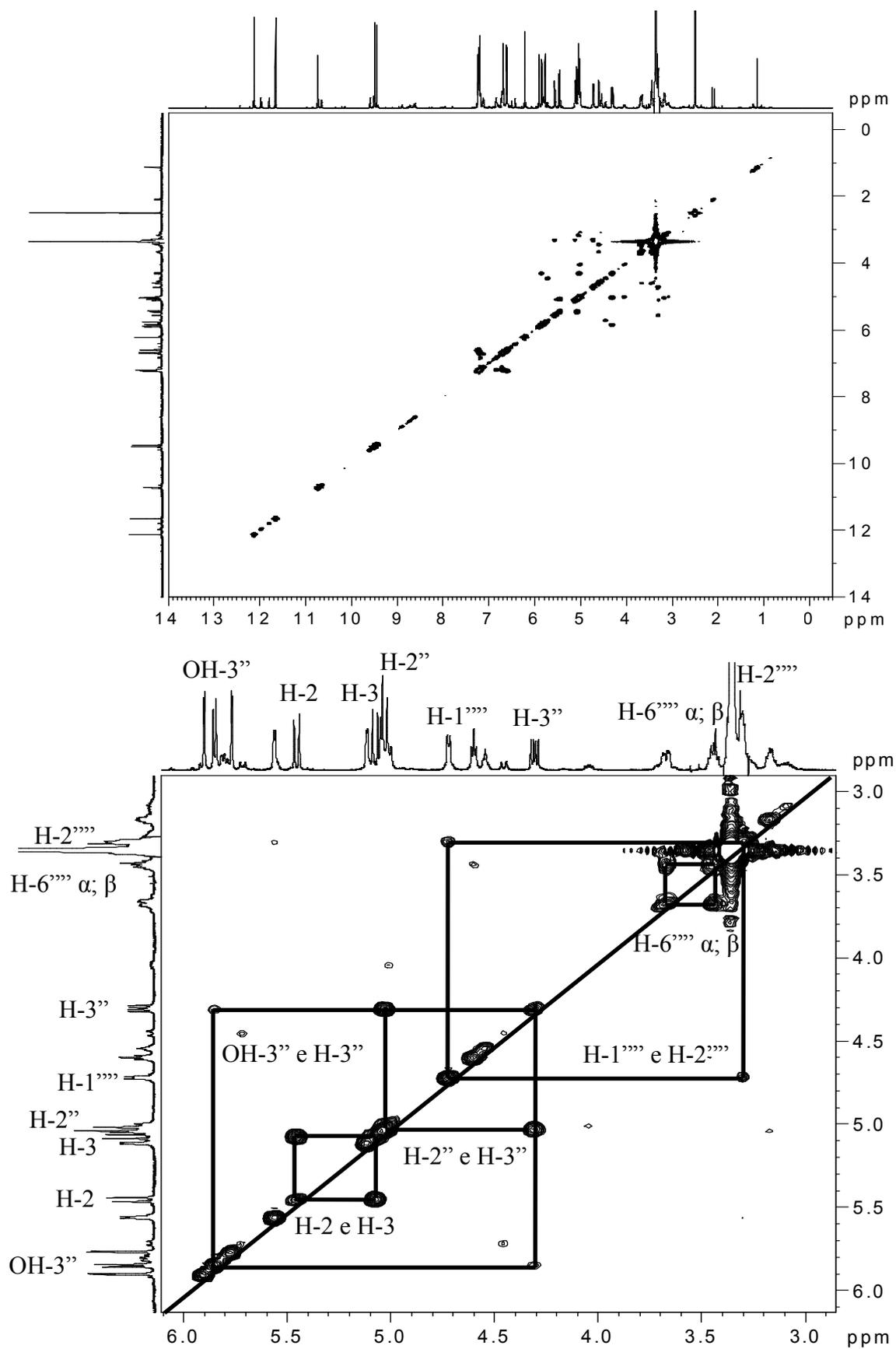


Figura 54. Espectro de HOMO-COSY ^1H , ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo)

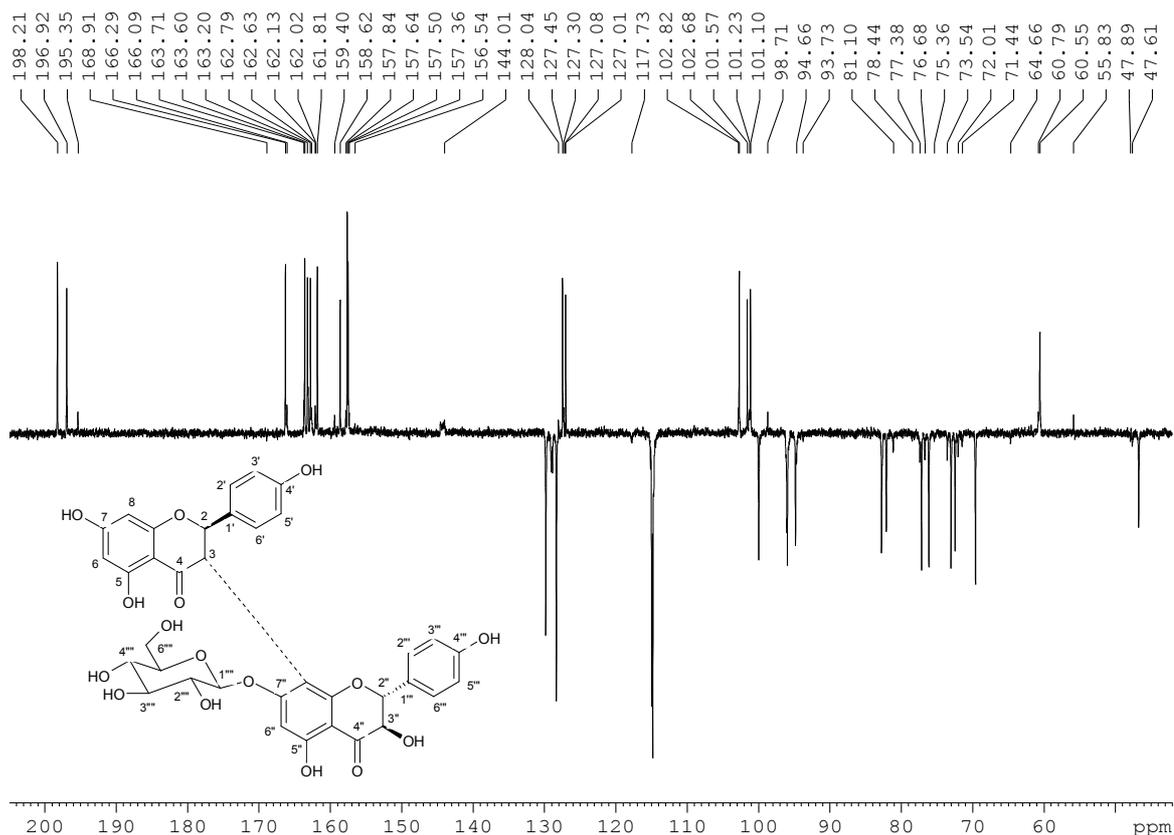


Figura 55. Espectro de APT em DMSO- d_6 (75 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo)

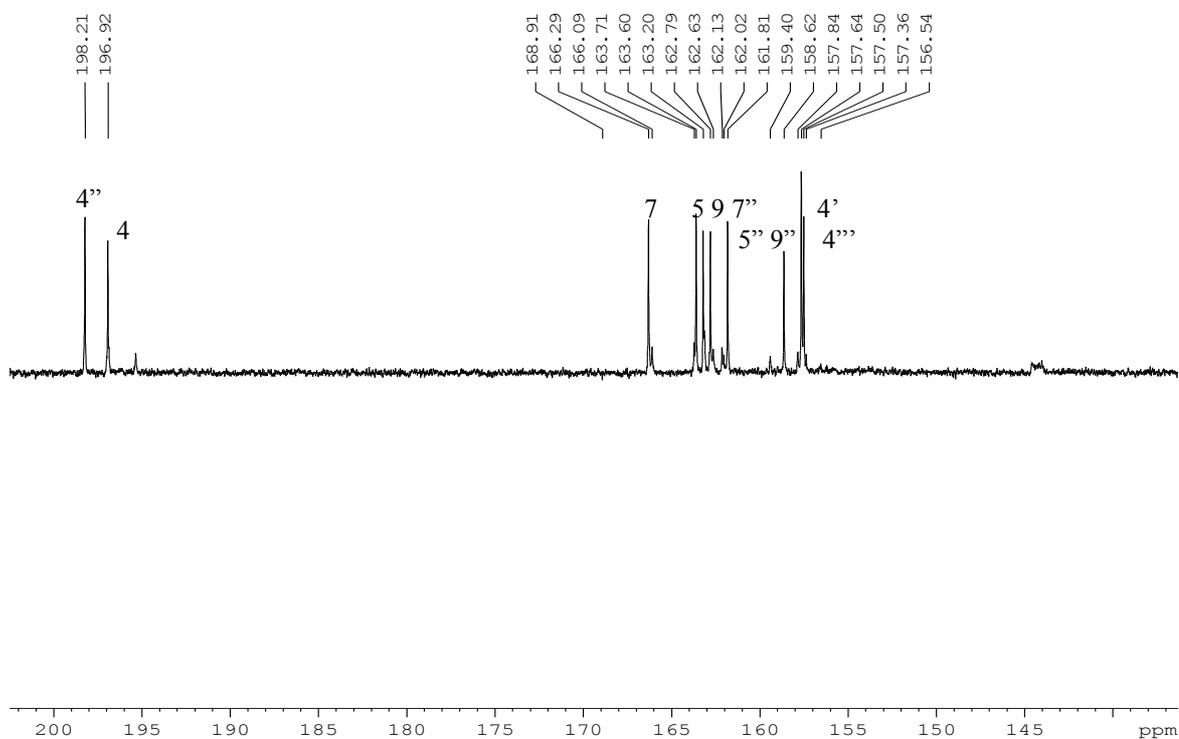


Figura 56. Espectro de APT em DMSO- d_6 (75 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo baixo (C e CH₂ para cima; CH e CH₃ para baixo)

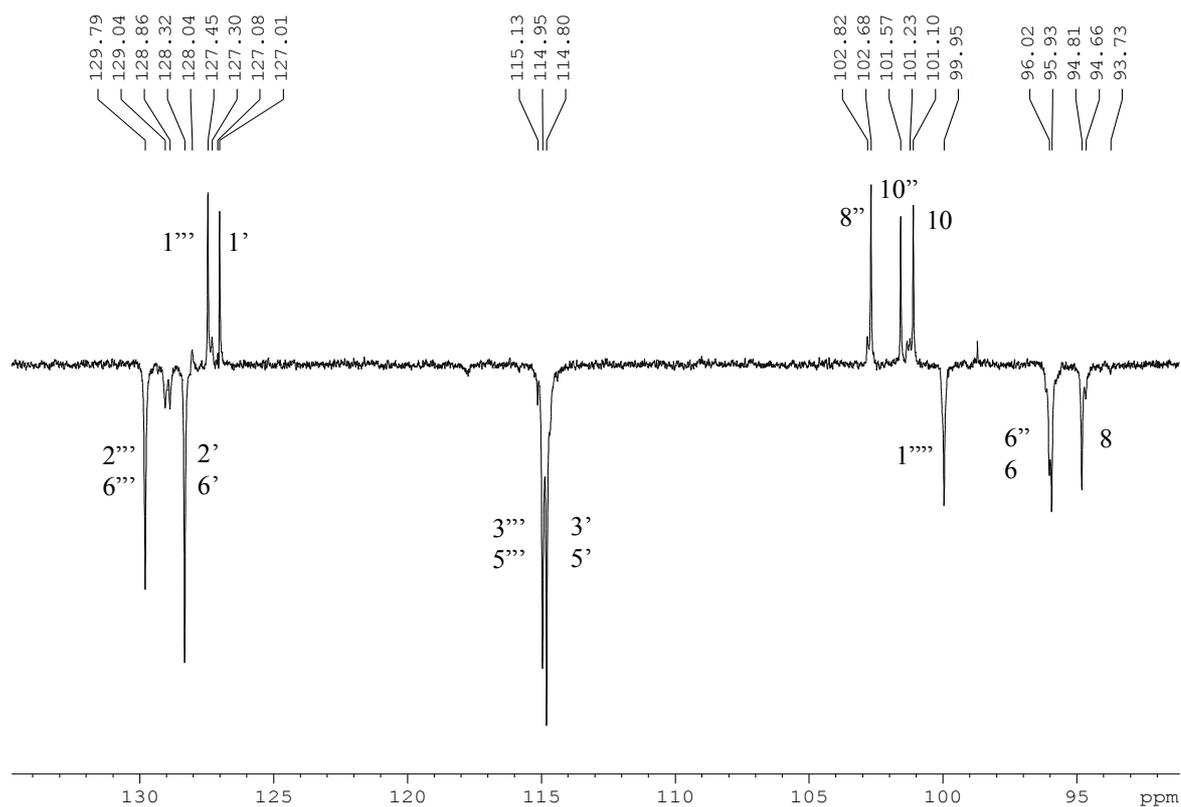


Figura 57. Espectro de APT em DMSO- d_6 (75 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo baixo (C e CH₂ para cima; CH e CH₃ para baixo)

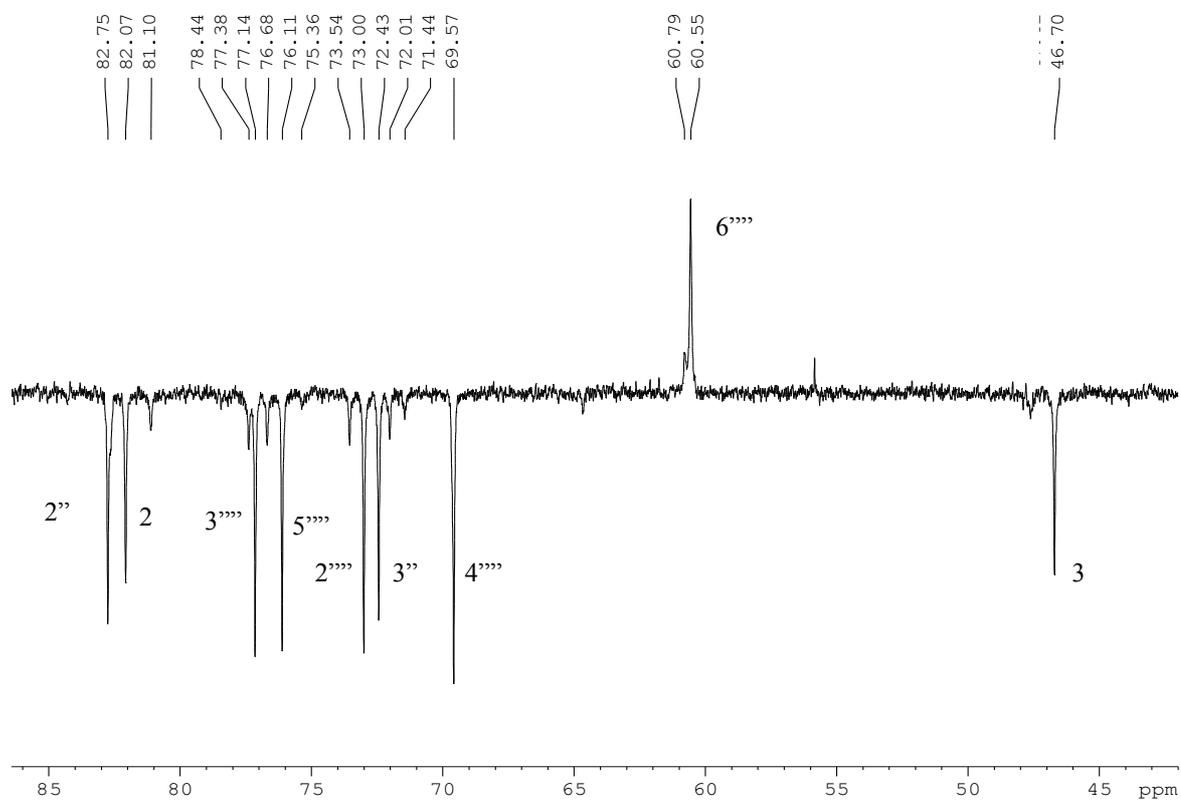


Figura 58. Espectro de APT em DMSO- d_6 (75 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo alto (C e CH₂ para cima; CH e CH₃ para baixo)

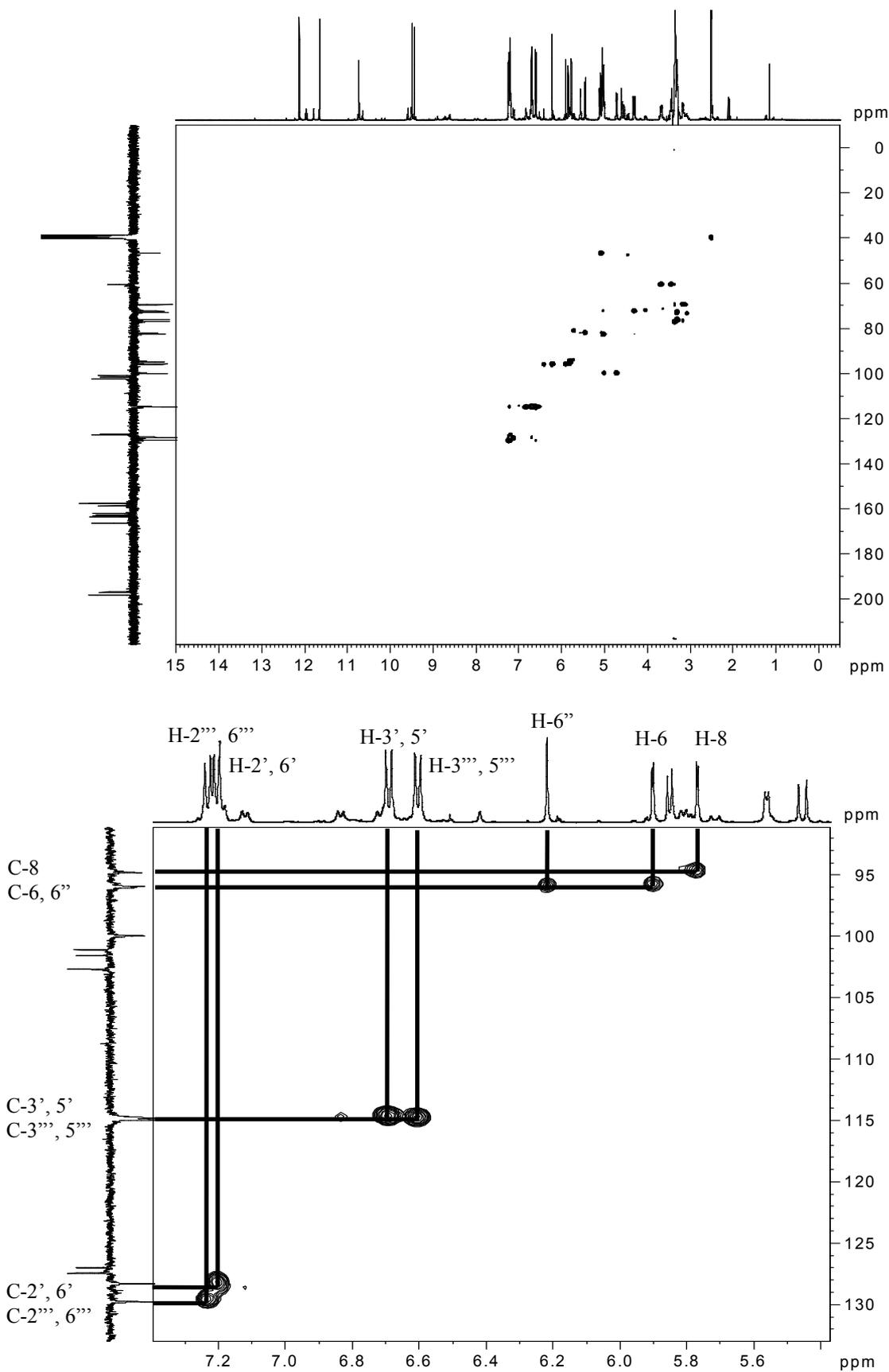


Figura 59. Espectro de HSQC em $\text{DMSO-}d_6$ (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-*O*-glicosídeo)

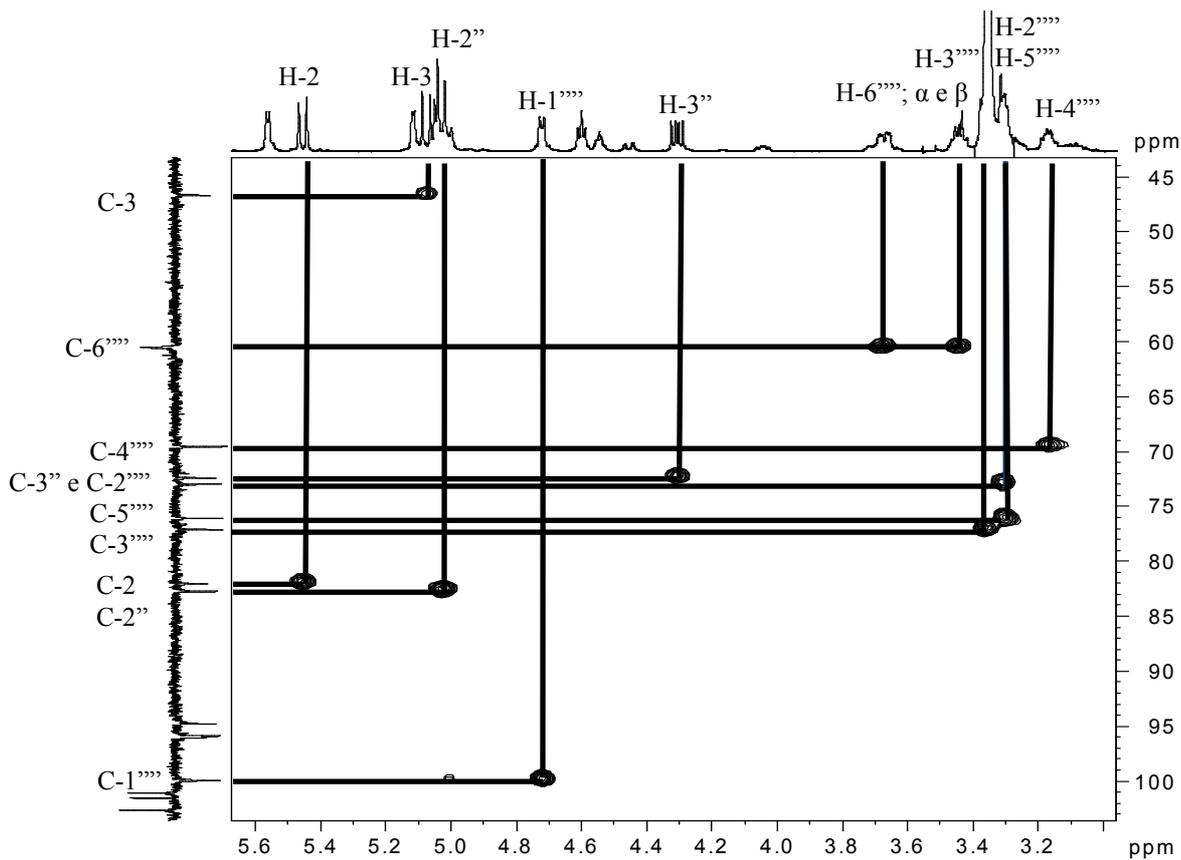


Figura 60. Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-*O*-glicosídeo)

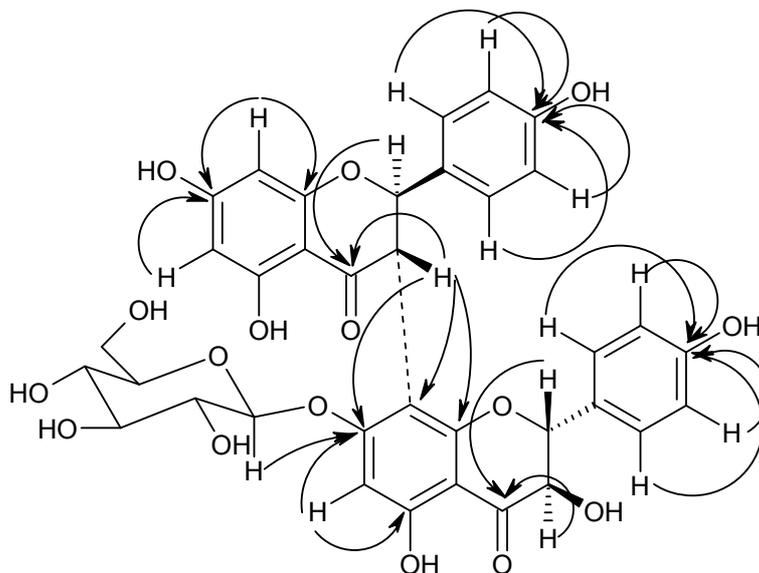


Figura 61. Algumas correlações ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) observadas no espectro de HMBC de FCAE4 (GB1-7''-*O*-glicosídeo)

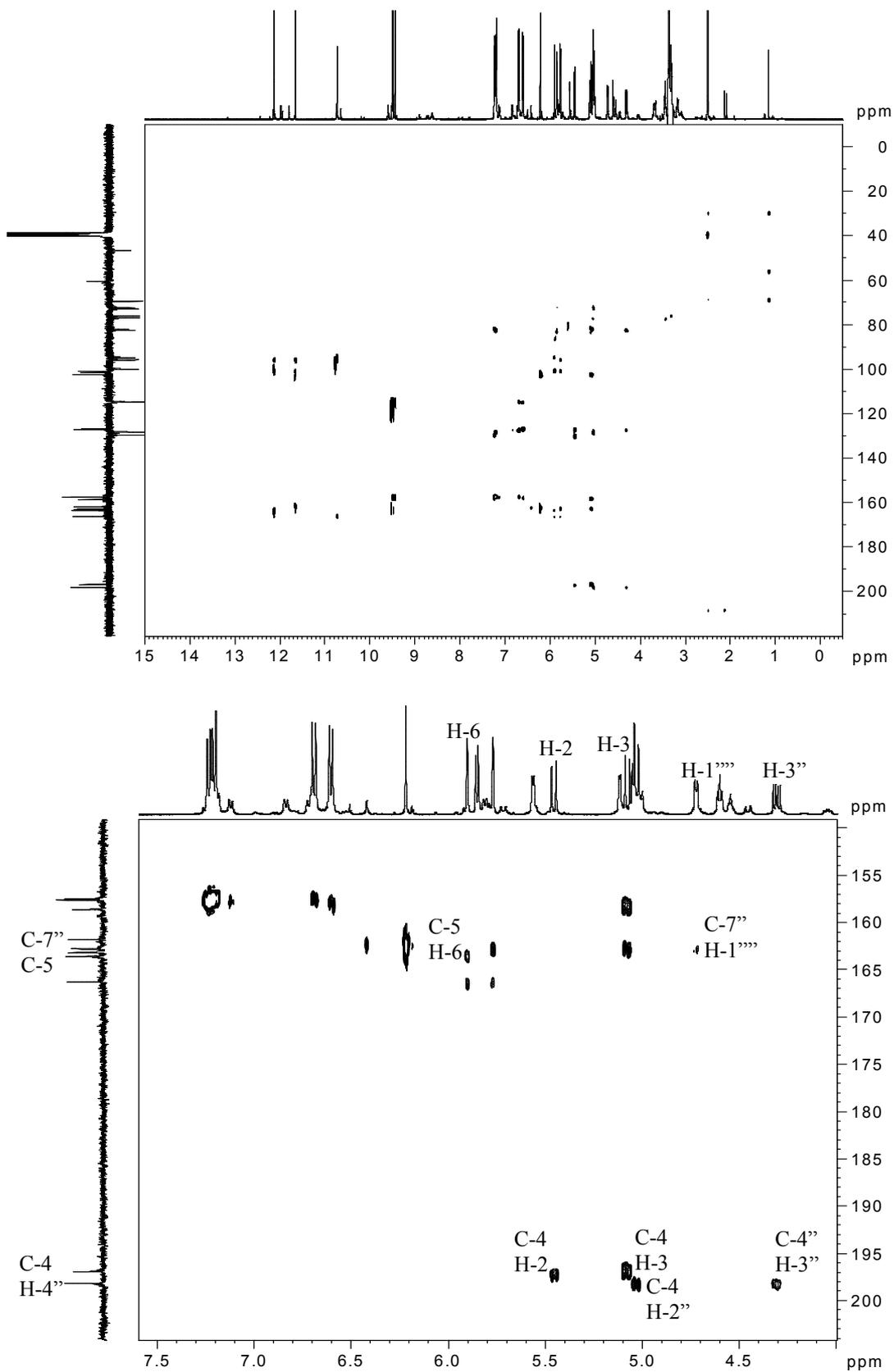


Figura 62. Espectro de HMBC em DMSO-*d*₆ (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FCAE4 (GB1-7''-*O*-glicosídeo)

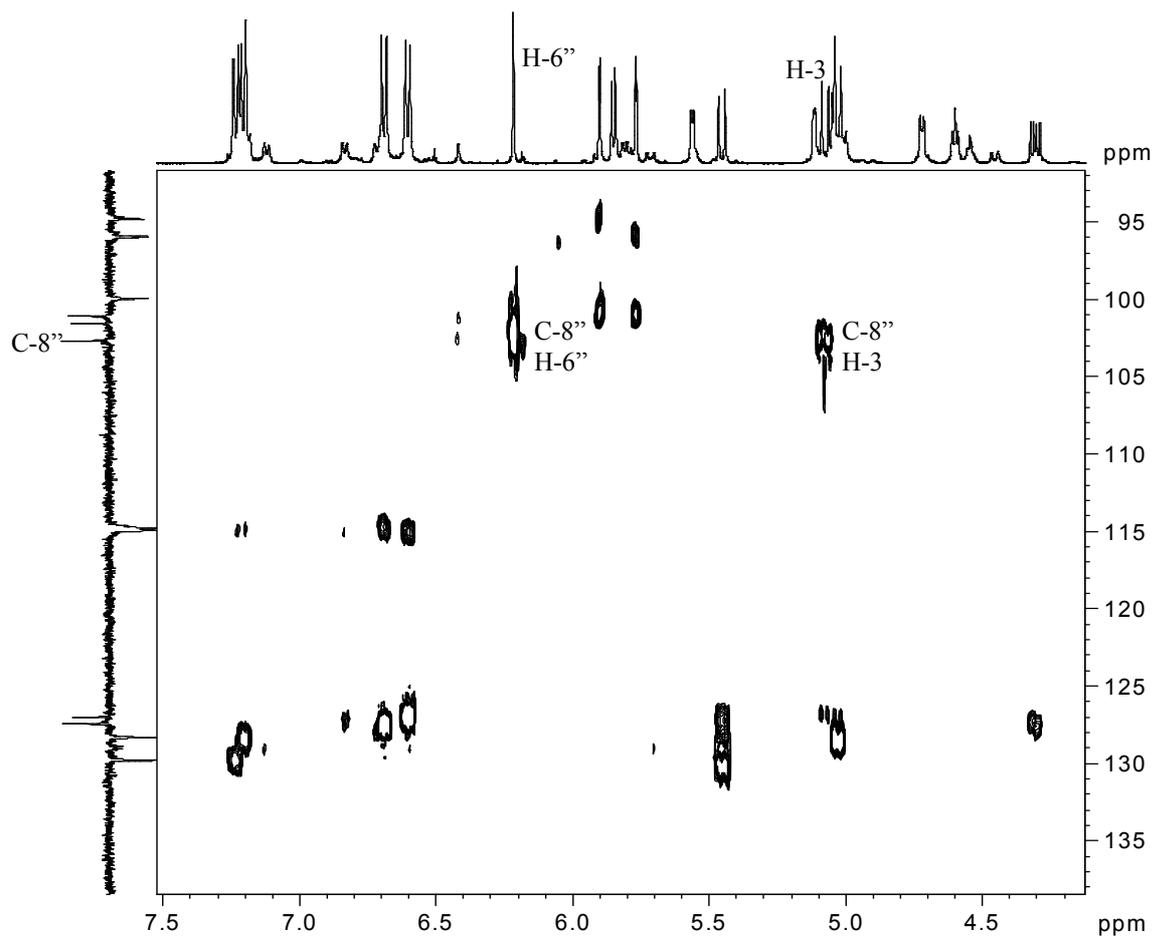


Figura 63. Espectro de HMBC em $\text{DMSO-}d_6$ (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCAE4 (GB1-7'-*O*-glicosídeo). Expansão em campo baixo

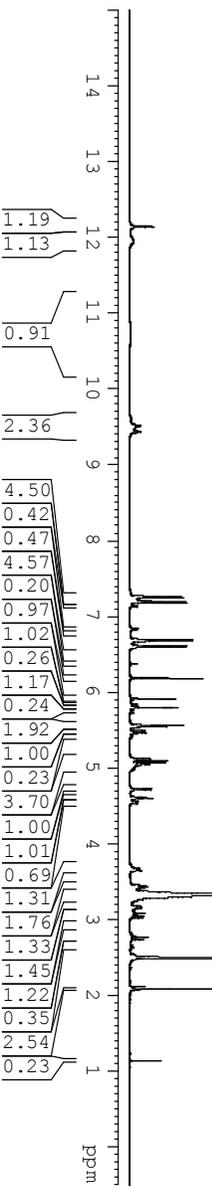
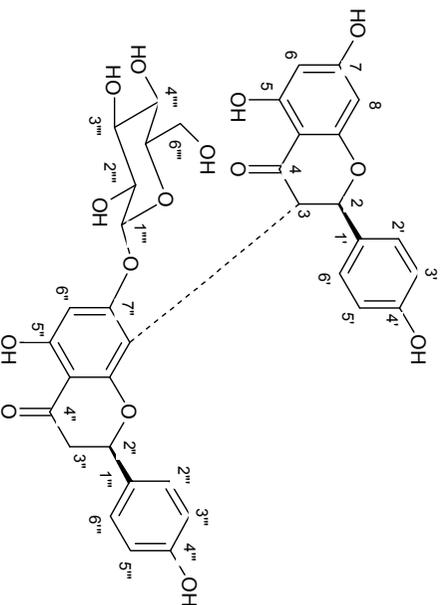
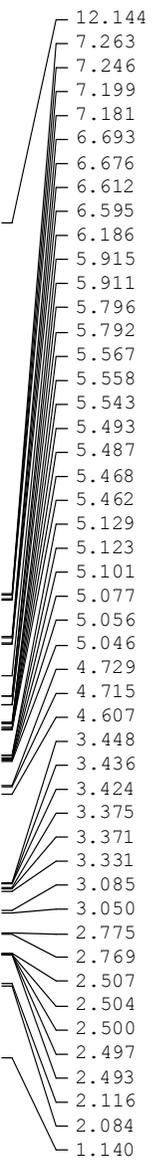


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''-O-glicosídeo)

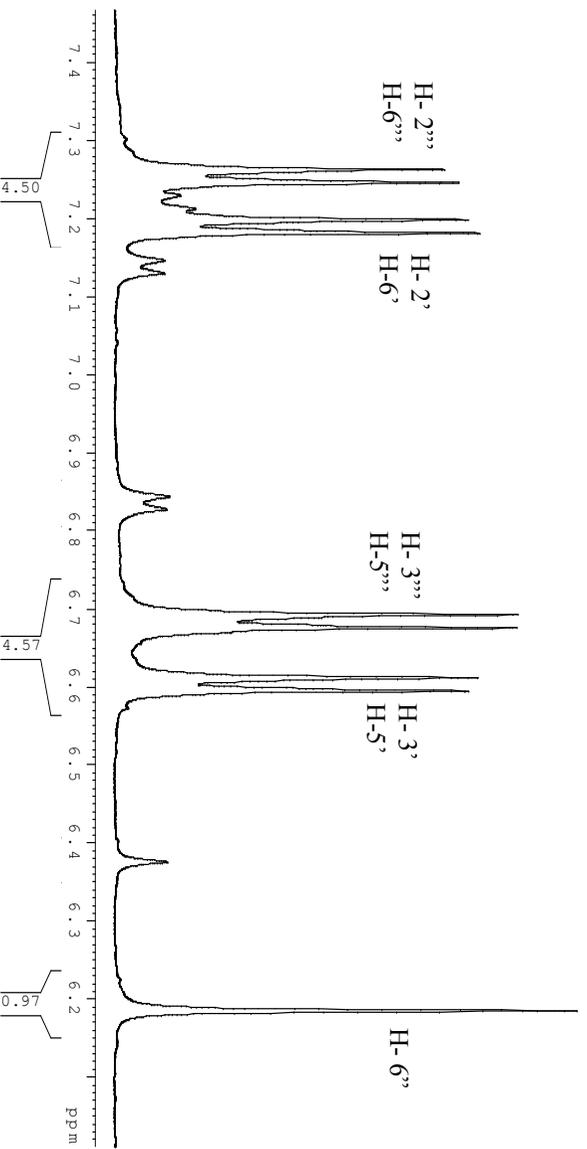
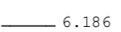
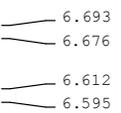
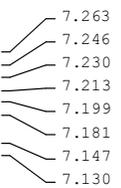


Figura 65. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE5(3,8''-binaringenina-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo baixo

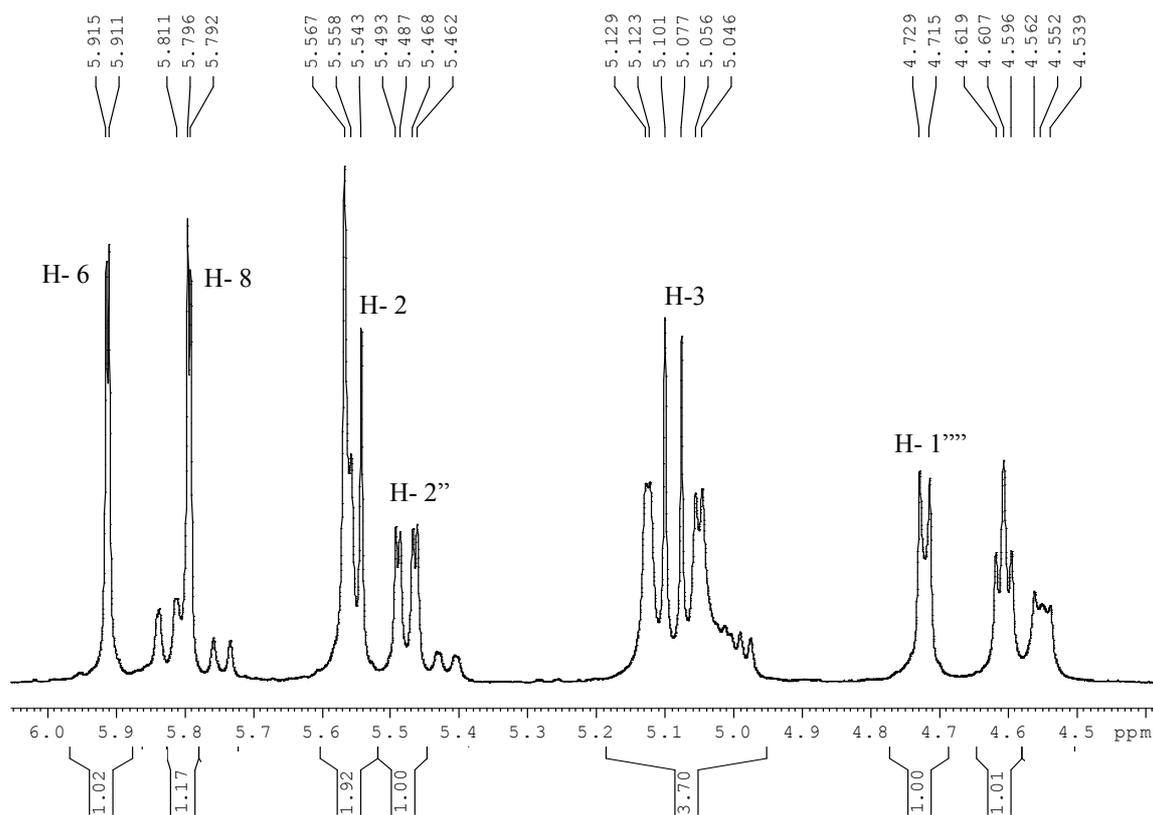


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE5 (3,8''-binaringina-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo baixo

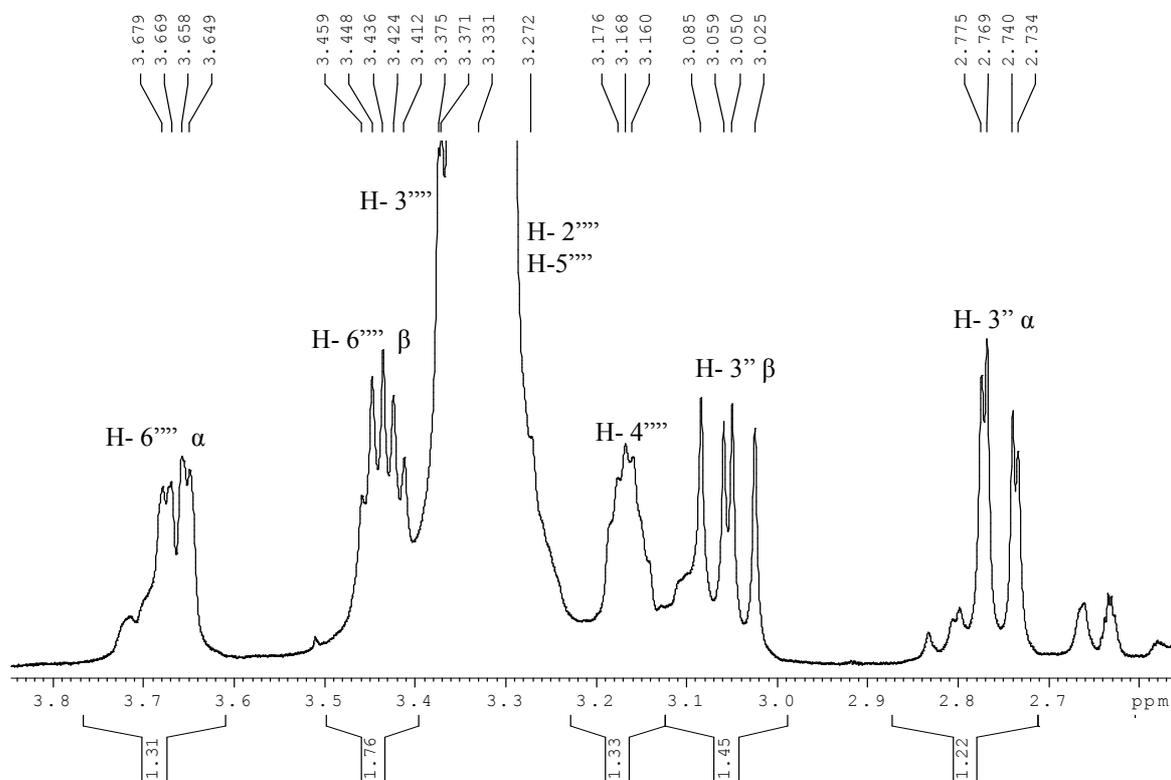


Figura 67. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) de FCAE5 (3,8''-binaringina-7''-O-glicosídeo). Expansão em campo alto

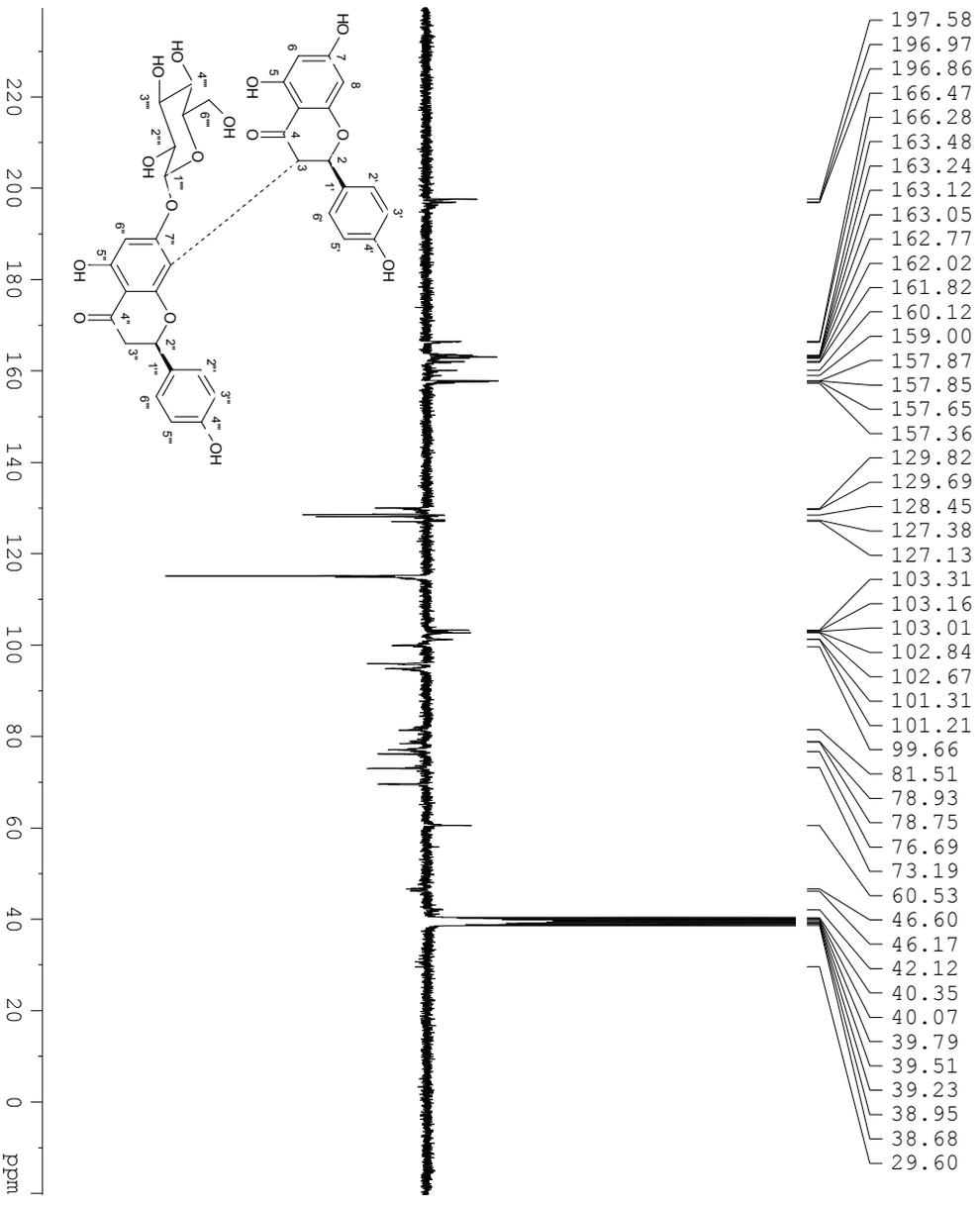


Figura 68. Espectro de APT em DMSO-*d*₆ (75 MHz) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''-O-glicosídeo)

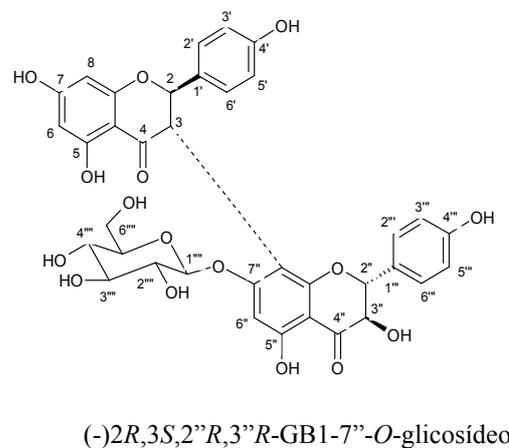
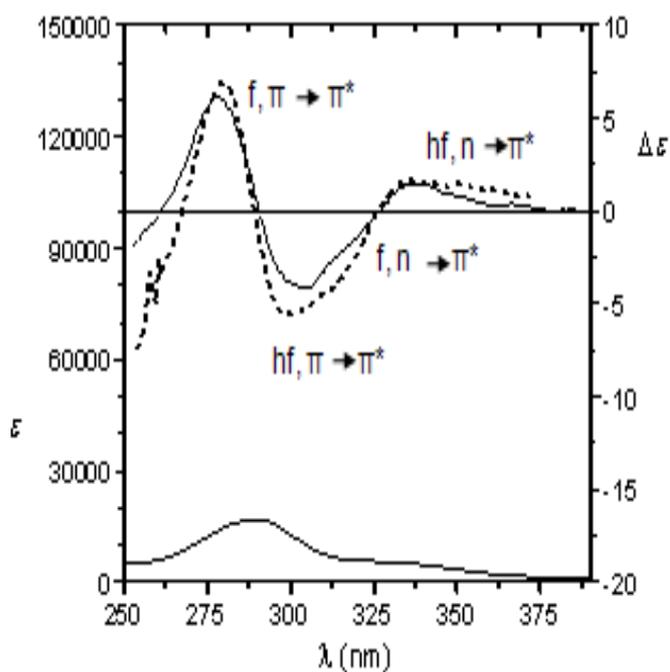
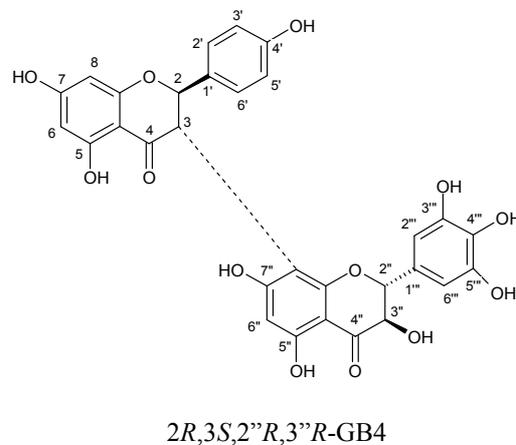
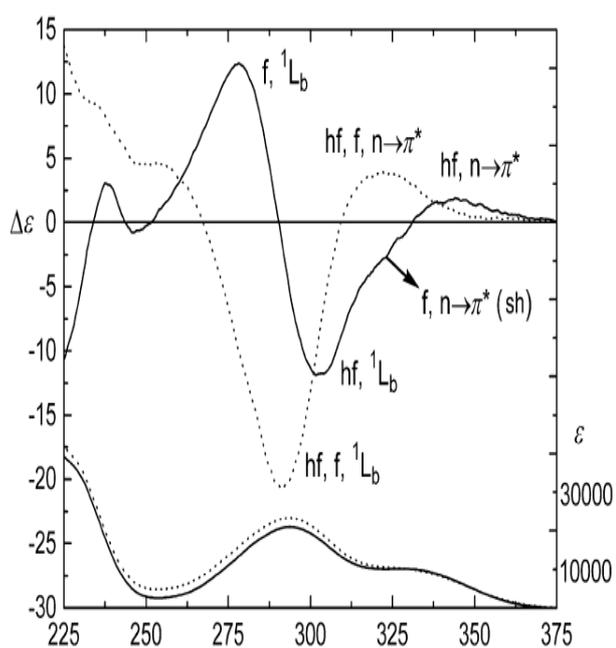


Figura 69. Espectro de Dicroísmo Circular (CD) em MeOH (—) e DMSO (···) e UV em MeOH (—) de GB-4 FERRARI *et al.* (2003) e de FCAE4 (GB1-7-O-glicosídeo). Abreviaturas: f= flavanona e hf= 3-hidroxi flavanona

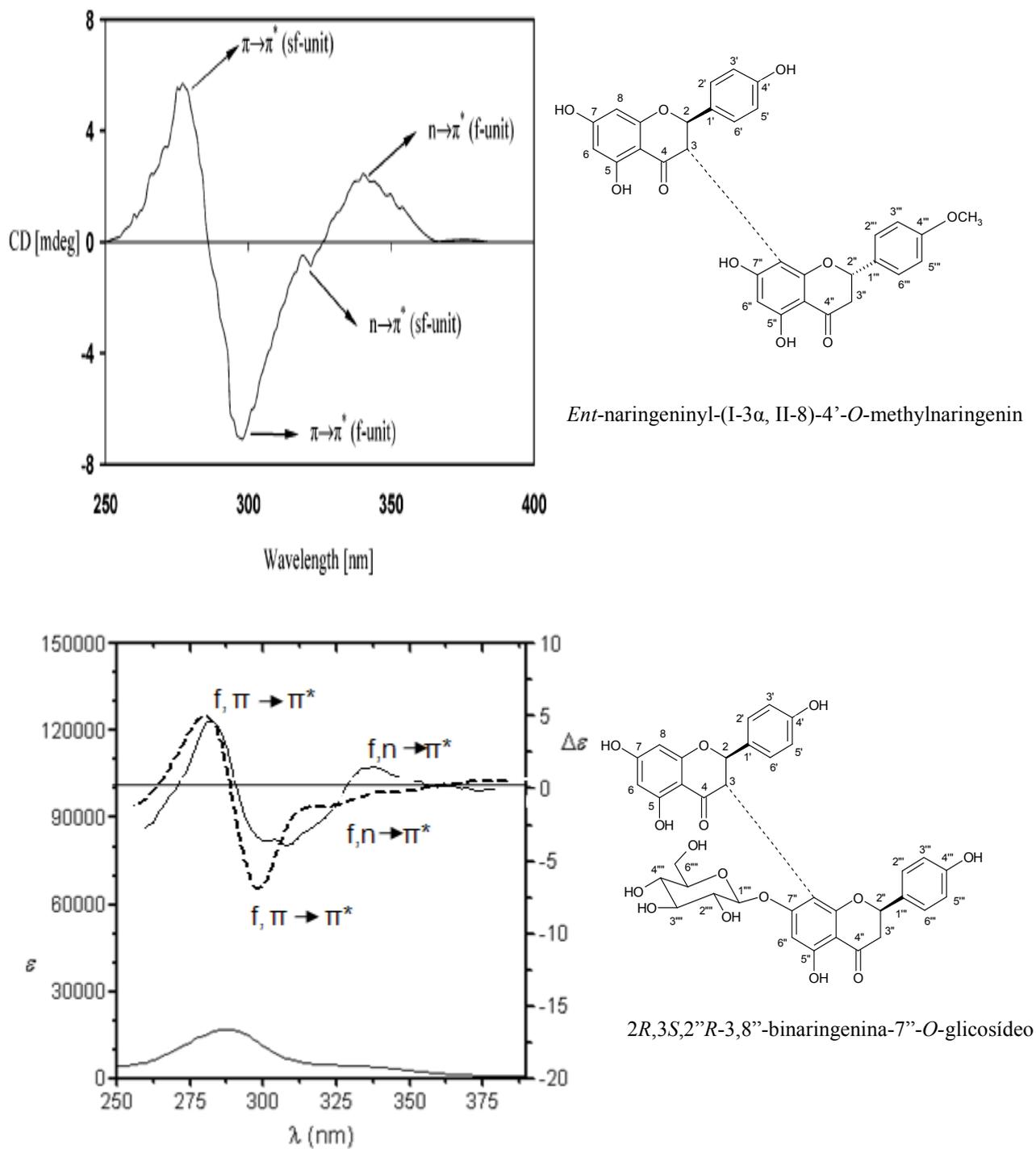
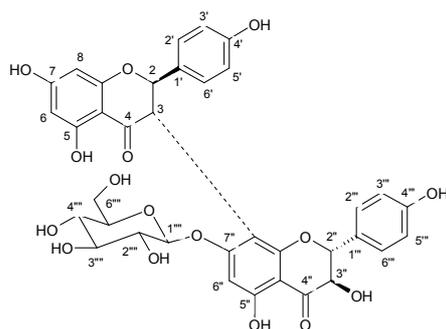


Figura 70. Espectro de Dicroísmo Circular (CD) em MeOH (—) e DMSO (...) e UV em MeOH (—) de *Ent-naringeninyl-(1-3 α , II-8)-4'-O-methylnaringenin* MBWAMBO *et al.* (2006) e FCAE5 (3,8''-binaringenina-7-O-glicosídeo). Abreviaturas: f= flavanonas

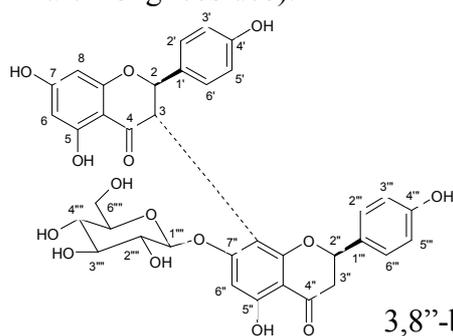
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (500 e 75 MHz, respectivamente) de FCAE4 (GB1-7''-O-glicosídeo).



GB1-7''-O-glicosídeo

C	δ_{C}	$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMQC-}^1J_{\text{CH}}$		$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC-}^nJ_{\text{CH}}$	
		δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
4	196.92	-	H-3	H-2	
5	163.60	-	H-6		
7	168.91	-	H-6, H-8		
9	163.20	-	H-8		
10	101.10	-		H-6, H-8	
1'	127.01	-		H-3'; 5'	
4'	157.64	-	H-3'; 5'	H-2'; 6'	
1''	127.45	-	H-2''	H-3''', 5'''	
4''	198.21	-	H-3''	H-2''	
5''	161.81	-	H-6		
7''	162.79	-	H-6''	H-1''', H-3	
8''	102.68	-	H-3	H-6''	
9''	158.62	-		H-3	
10''	101.57	-		H-6''	
4'''	157.50	-	H-3''', 5'''	H-2''', 6''	
CH					
2	82.07	5.45 (d, $J=12$)		H-4	
3	46.70	5.06 (d, $J=12$)	H-8'', H-4	H-7'', H-9''	
6	95.93	5.89 (d, $J=2$)		H-8, H-10	
8	94.81	5.75 (d, $J=2$)	H-7, H-9	H-6, H-10	
2',6'	129.76	7.23 (d, $J=8.5$)		H-2, H-4'	
3',5'	114.80	6.60 (d, $J=8.5$)	H-4'	H-1'	
2''	82.75	5.03 (d, $J=11$)	H-1''	H-4''	
3''	72.43	4.3 (d, $J=11$ e 6)	H-4''		
6''	96.02	6.22 (s)	H-7''	H-8'', H-10''	
2''',6'''	128.32	7.20 (d, $J=8.5$)		H-4'''	
3''',5'''	114.95	6.70 (d, $J=8.5$)	H-4'''	H-1'''	
1''''	99.95	4.73 (d, $J=7.5$)	H-7''		
2''''	73.00				
3''''	77.14				
4''''	69.57				
5''''	76.11				
6'''' α	60.55	3.7 (dd, $J=10.5$ e 5)			
β		3.44 (m)			

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (500 e 75 MHz, respectivamente) de FCAE5 (3,8''-binaringenina-7''-*O*-glicosídeo).



C	δ_{C}	δ_{H} (multi)
4	196,97	-
5	163,48	-
7	166,47	-
9	163,12	-
10	101,21	-
1'	128,09	-
4'	157,87	-
1''	127,13	-
4''	197,58	-
5''	162,02	-
7''	162,77	-
8''	103,31	-
9''	160,12	-
10''	101,31	-
4''	157,65	-
CH		
2	81,36	5,55 (d, $J=12$)
3	46,60	5,09 (d, $J=12$)
6	95,93	5,91 (d, $J=2$)
8	94,87	5,80 (d, $J=2$)
2',6'	130,0	7,25 (d, $J= 8,5$)
3',5'	114,93	6,60 (d, $J= 8,5$)
2''	78,44	5,48 (dd, $J=12,5$ e 3)
6''	78,44	6,19 (s)
2''',6'''	128,53	7,19 (d, $J= 9,0$)
3''',5'''	115,15	6,68 (d, $J= 8,5$)
1''''	99,90	4,72 (d, $J= 7,0$)
2''''	73,02	
3''''	77,13	
4''''	69,58	3,14 (m)
5''''	76,17	
6'''' α	60,53	3,66 (dd, $J= 10,5$ e 5)
β		3,44 (m)
CH₂		
3'' α	42,12	3,05 (dd, $J= 17,5$ e 13)
β		2,75 (dd, $J= 17,5$ e 3)

4.2. Testes antioxidantes

4.2.1. Determinação do teor de fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de métodos, entretanto, o que utiliza o reagente de Follin-Ciocalteu é o mais empregado (ABDILLE *et al.*, 2005). O reagente de Follin-Ciocalteu, que contém ânions heteropolifosforato-molibdato, reage com compostos fenólicos em meio básico e, com a retirada de um próton fenólico, há a formação de um ânion fenolato, que é capaz de reduzir o reagente, em um complexo molibdênio-tungstênio de coloração azul, por um provável mecanismo de transferência de elétrons (HUANG *et al.*, 2005; PRIOR *et al.*, 2005; ROGINSKY & LISSI, 2005).

O teor de fenólicos totais do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O dos frutos verdes de *C. paralicola* com o emprego da metodologia de Follin-Ciocalteu estão representados na Figura 71, p. 97. A fração AcOEt (135,43±3,19 mg EAG/g) mostrou o maior teor de fenólicos totais, seguida do extrato EtOH (132,05±1,25 mg EAG/g), da fração MeOH:H₂O (94,84±3,29 mg EAG/g) e da fração hexânica (42,86±3,19 mg EAG/g).

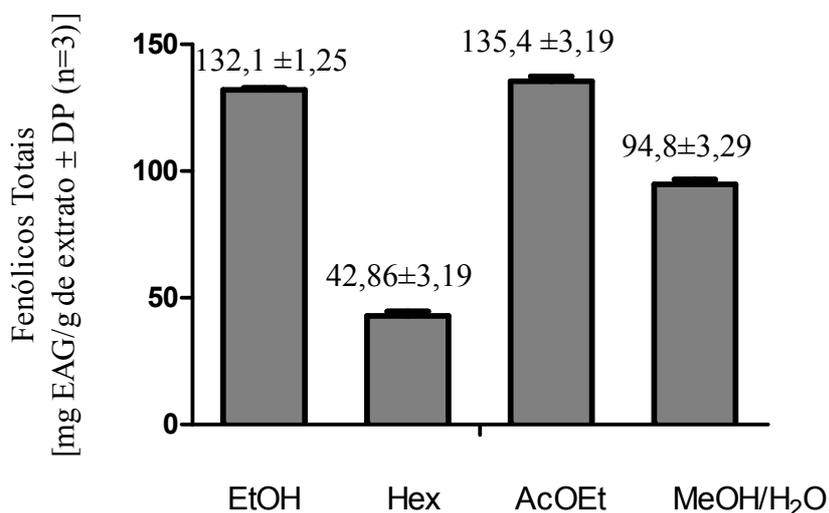


Figura 71. Teor de Fenólicos Totais (FT) do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MEOH:H₂O (100 µg/mL) dos frutos verdes de *C. paralicola*

Levando-se em consideração a análise estatística dos dados pelo teste de Tukey verificou-se que todas as amostras testadas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação ao teor de fenólicos totais.

Uma investigação fitoquímica preliminar por CCDA empregando reagentes específicos para compostos fenólicos tais como, NP e cloreto férrico, revelaram que o extrato EtOH e as frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O, são ricos em compostos desta natureza. A presença de compostos fenólicos também foi observada pela análise dos espectros de UV de algumas amostras obtidos por HPLC-DAD. O teor de fenólicos encontrado nas amostras analisadas é considerado promissor em comparação aos descritos na literatura para outras espécies da família Clusiaceae, conforme descrito na Tabela 8, p. 98.

Tabela 8. Teor de fenólicos totais de extratos e frações de espécies da família Clusiaceae.

Extrato e/ou frações	Espécie vegetal	Teor de fenólicos mg EAG/g de extrato
Hexânico	<i>Calophyllum cf. brasiliense cambess</i>	59±5,5
Acetato de Etila	<i>Calophyllum cf. brasiliense cambess</i>	198±5,8
Metanólico	<i>Calophyllum cf. brasiliense cambess</i>	249±15,4
Hexânico	<i>Calophyllum inophyllum</i> L.	35±2,6
Acetato de Etila	<i>Calophyllum inophyllum</i> L.	175±5,9
Metanólico	<i>Calophyllum inophyllum</i> L.	266±12,8
Acetato de Etila	<i>Clusia paralicola</i>	135,4 ±3,19

Fonte: MESA-VANEGAS *et al.*, 2010.

Clusia paralicola, alvo do presente estudo, revelou-se uma promissora fonte de compostos fenólicos, daí a necessidade de realizar mais testes com o intuito de avaliar seu potencial antioxidante.

4.2.2. Atividade sequestradora do radical livre DPPH

O DPPH é um cromóforo estável que apresenta um pico de absorção em 520 nm em meio etanólico e sua solução apresenta coloração violeta intensa (ARNAO, 2000;

ALVES *et al.*, 2010). Por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, o DPPH[•] é reduzido formando DPPH-H (hidrazina), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (HUANG *et al.*, 2005). O fator determinante nesta reação é a acessibilidade estérica, neste caso, moléculas pequenas que têm melhor acesso ao sítio do radical podem apresentar uma maior atividade aparente quando comparadas a moléculas maiores (ALVES *et al.*, 2010). Este método é considerado fácil, preciso e reprodutível na avaliação da atividade antioxidante de suco de frutos, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonóides e terpenóides (ALVES *et al.*, 2010).

O extrato EtOH e as frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O dos frutos verdes de *C. paralicola* apresentaram atividade seqüestradora de radical livre com CE₅₀ variando de 10,80±0,064 a 17,39±0,062 µg mL⁻¹, considerando-se que os extratos são considerados ativos quando apresentam valores de CE₅₀ < 500 µg/mL (CAMPOS *et al.*, 2003), podemos afirmar que todas as amostras analisadas apresentaram promissor potencial antioxidante. A fração AcOEt apresentou a melhor atividade seqüestradora de radical livre (10,80±0,064), seguida do extrato EtOH (12,67±0,075) e das frações MeOH/H₂O (13,93±0,24) e hexânica (17,39±0,075). Em relação à fração AcOEt, pode-se atribuir parte desta atividade a *epicatequina* (DAVID *et al.*, 2002) e aos biflavonóides (60,22±1,61) isolados desta fração.

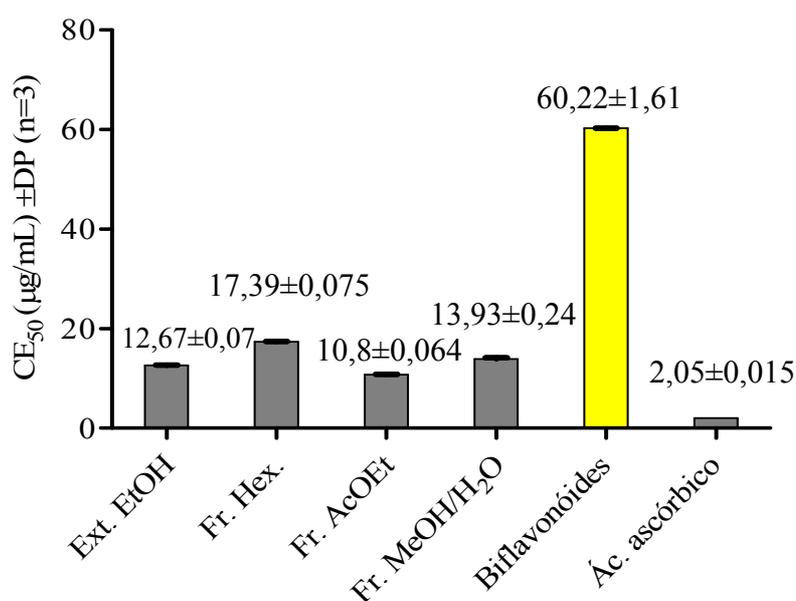


Figura 72. Atividade seqüestradora do radical DPPH do extrato EtOH, das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O e dos biflavonóides dos frutos verdes de *C. paralicola*

Levando-se em consideração a análise estatística dos dados da atividade antioxidante em todas as concentrações testadas, aplicando-se ANOVA e o teste de Tukey, verificou-se que somente o extrato EtOH não apresentou diferença significativa ($P < 0.05$) em comparação as frações AcOEt e MeOH/H₂O no potencial como fonte de substâncias seqüestradoras de radicais livres, as demais frações apresentaram diferenças significativas entre si.

O coeficiente de correlação de Pearson foi igual a $r = 0,969$ entre o teor de fenólicos totais e a CE₅₀ do extrato e frações dos frutos verdes de *C. paralicola*. Na análise de regressão foi observado que houve aumento linear na capacidade de seqüestrar o radical DPPH em função do teor de fenólicos. Esta análise sugere que a atividade seqüestradora radicalar deve-se em grande parte ao teor de fenólicos. Porém, deve-se considerar que além da presença de outros fitoquímicos, a concentração e a reatividade do componente ativo têm influência na capacidade antioxidante, assim a capacidade antioxidante de um extrato não pode ser explicada apenas com base no teor de fenólicos, a caracterização do composto (s) ativo (s) se faz necessária (HEINONEN *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2010).

Os biflavonóides isolados dos frutos de *C. paralicola* demonstraram atividade seqüestradora frente ao radical DPPH menos significativa do que a respectiva fração de origem, porém promissora em comparação a outros flavonóides. O baixo desempenho antioxidante das flavanonas naringenina livre e heterosídica, que constituem as duas unidades flavanoídicas de FCAE5, foi verificado por EDENHAR & GRUNHAGE (2003). Estes autores relacionaram a estrutura química destes flavonóides com o efeito antioxidante observado, que estaria associado à ausência da hidroxila livre no carbono 3 (anel C); da insaturação entre o carbono 2 e 3 (anel C); do padrão e número de hidroxilas nos anéis A, B e C e da presença de açúcares.

Metabólitos pertencentes à classe das benzofenonas isopreniladas apresentaram atividade antioxidante (ITO *et al.*, 2003; PAGANO *et al.*, 2008), incluindo clusianona, previamente isolada das resinas florais de *C. paralicola* (PORTO *et al.*, 2000). Desta forma, pode ser que parte da atividade antioxidante observada seja atribuída à presença de benzofenonas isopreniladas na constituição química dos frutos desta espécie.

Relatos sobre a atividade anti-radicalar de espécies do gênero *Clusia* não foram encontrados na literatura, porém algumas espécies da família Clusiaceae mostraram atividade seqüestradora frente ao radical DPPH como *Platonia insignis* (LIMA *et al.*, 2007) e algumas espécies do gênero *Calophyllum* (MESA-VANEGAS *et al.*, 2010).

4.2.3. Atividade seqüestradora frente ao cátion radical ABTS⁺

O extrato EtOH e as frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O dos frutos verdes de *C. paralicola* apresentaram atividade seqüestradora de radical livre com CE₅₀ variando de 6,19±0,31 a 18,56±0,13 µg mL⁻¹. A fração AcOEt apresentou a melhor atividade seqüestradora de radical livre (6,19±0,31), seguida do extrato EtOH (7,43±0,41), da fração MeOH/H₂O (13,92±0,22), e da fração hexânica (18,56±0,13). Parte da atividade apresentada pela fração AcOEt pode ser atribuída aos biflavonóides (26,74±3,29) isolados desta fração. Os valores de CE₅₀ do extrato, frações, biflavonóides e controle estão representados na Figura 73, p. 101.

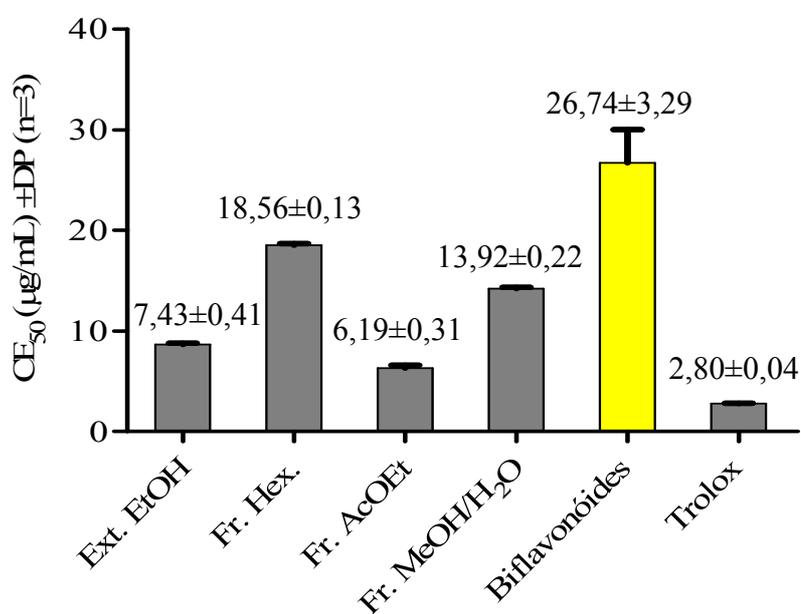


Figura 73. Atividade seqüestradora do cátion radical ABTS⁺ do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt, MeOH/H₂O e biflavonóides dos frutos verdes de *C. paralicola*

Levando-se em consideração a análise estatística dos dados de atividade antioxidante em algumas das concentrações testadas, aplicando-se ANOVA e teste de Tukey, verificou-se que com exceção do extrato EtOH e da fração AcOEt dos frutos verdes de *C. paralicola*, as demais amostras apresentaram diferenças significativas (P<0,05) no potencial antiradicalar frente ao ABTS⁺.

O coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,98$ entre o teor de fenólicos totais e os valores de CE_{50} indica que parte da atividade sequestradora apresentada pelo extrato e frações frente ao cátion radical $ABTS^+$ pode ser atribuída ao conteúdo de fenólicos presentes nestas amostras. A correlação entre os dois testes antirradicalares (DPPH e $ABTS^+$) também foi analisada, o coeficiente de correlação $r = 0,958$ indica uma boa correlação entre os dois testes (Figura 74, p. 102), a diferença observada pode estar relacionada à maior sensibilidade do cátion radical $ABTS^+$, que apesar de ser uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de compostos redutores e de ser aplicável a sistemas lipofílicos e hidrofílicos, mostra uma baixa seletividade na reação com compostos doadores de hidrogênio (ROGINSKI & LISSI, 2005; JUSTO *et al.*, 2008).

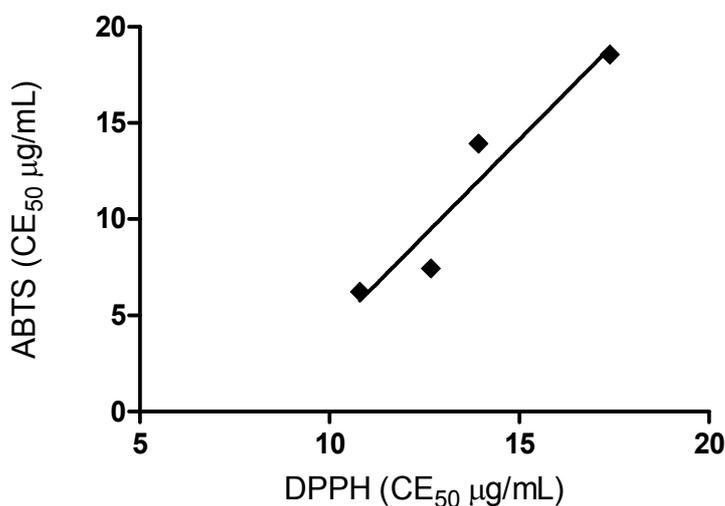


Figura 74. Correlação de Pearson ($r = 0,958$; $p=0,042$) entre os valores de CE_{50} dos testes radicalares de $ABTS^+$ e DPPH dos frutos verdes de *C. paralicola*

4.2.4. Atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico

A avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais pelo ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoléico baseia-se na descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra contendo antioxidantes individuais, ou extratos naturais contribui para retardar a queda de absorvância do β -caroteno (SOKMEN *et al.*, 2004).

Em sistemas multifases, a eficiência do antioxidante é afetada pelas propriedades de solubilidade, que determinam a distribuição dos compostos nas diferentes fases, incluindo a localização e orientação. O fenômeno “paradoxo antioxidante” estabelece que o início da oxidação de lipídeos esteja localizada na interface do sistema. Dessa forma, a oxidação do óleo puro, ocorre na interface ar/óleo, onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto a oxidação de emulsões está localizada na interface água/óleo onde os antioxidantes lipofílicos estão localizados (PORTER, 1993; HUANG, 1996; ALVES *et al.*, 2010). Esta metodologia é amplamente utilizada permitindo a determinação do poder antioxidante de compostos termossensíveis, e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (SILVA, 1999; ALVES *et al.*, 2010).

O extrato EtOH, as frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O e os biflavonóides dos frutos verdes de *C. paralicola* apresentaram atividade de inibição em 60 minutos variando de 82,38±2,27 a 53,20±2,69%. Todas as amostras avaliadas apresentaram promissora atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico quando comparadas ao respectivo controle positivo Trolox (16 µg/mL) (60 min= 77,40±1,84%) (Figuras 75 a 79, p. 103 a 105).

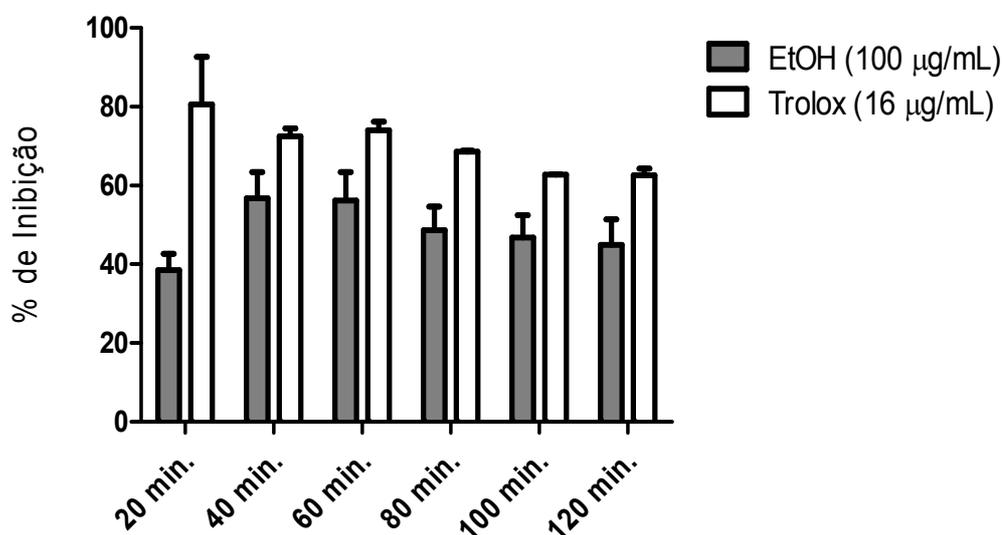


Figura 75. Atividade antioxidante (sistema β-caroteno/ácido linoléico) do extrato EtOH (100 µg mL⁻¹) dos frutos verdes de *C. paralicola*

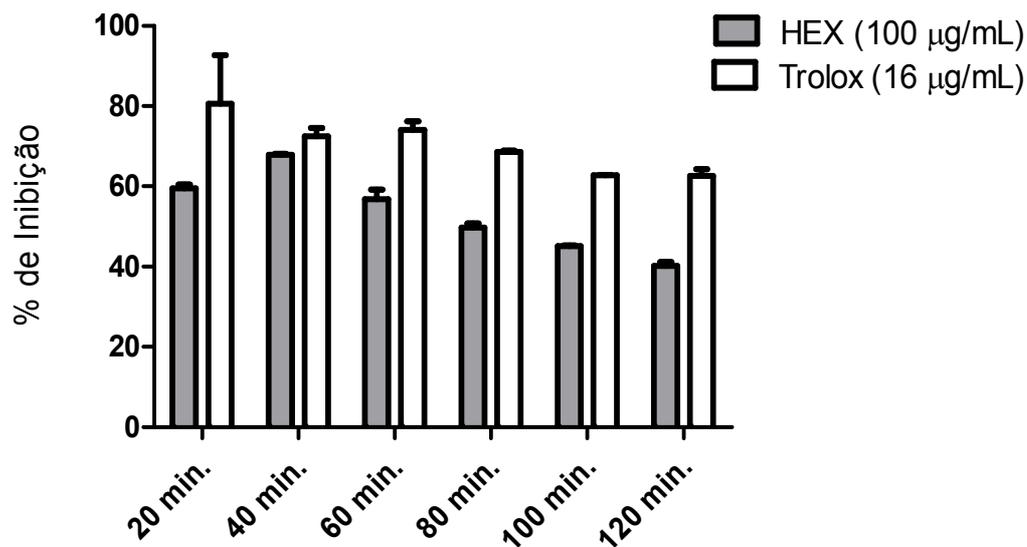


Figura 76. Atividade antioxidante (sistema β -caroteno/ácido linoléico) da fração hexânica ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos frutos verdes de *C. paralicola*

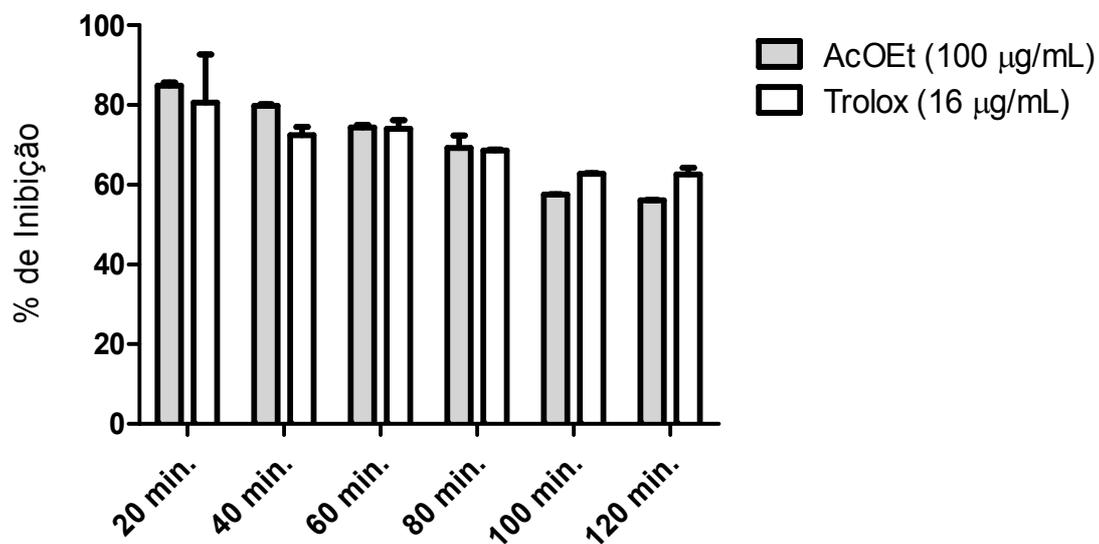


Figura 77. Atividade antioxidante (sistema β -caroteno/ácido linoléico) da fração AcOEt ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos frutos verdes de *C. paralicola*

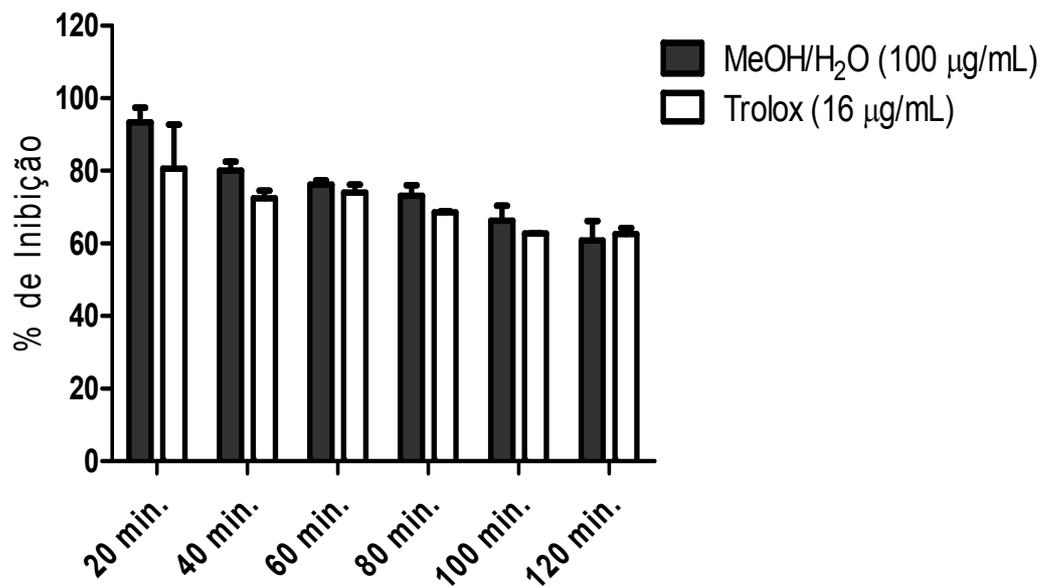


Figura 78. Atividade antioxidante (sistema β-caroteno/ácido linoléico) da fração MeOH/H₂O (100 µg mL⁻¹) dos frutos verdes de *C. parvicola*

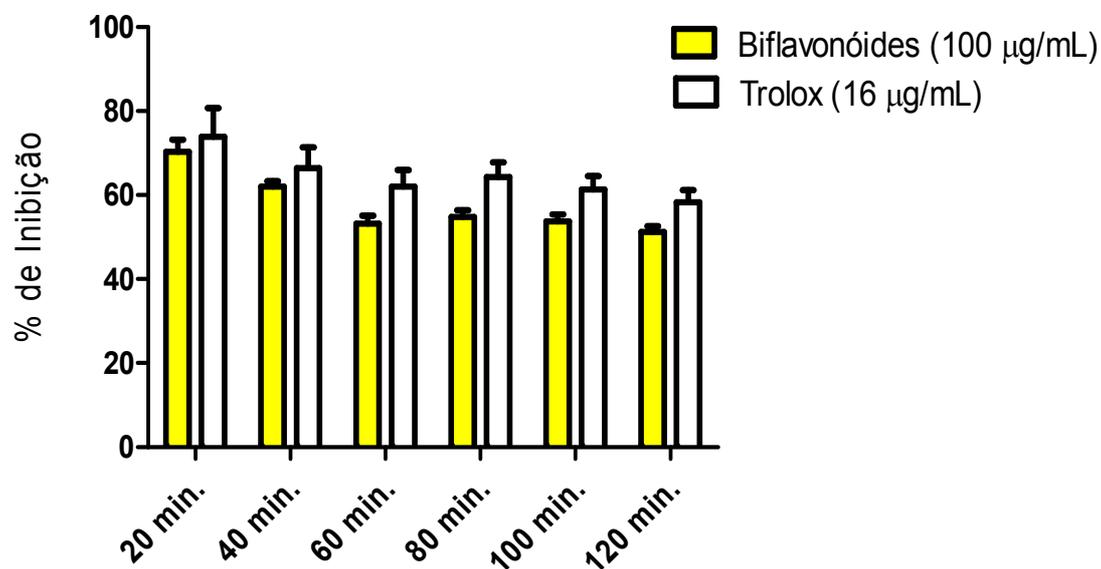


Figura 79. Atividade antioxidante (sistema β-caroteno/ácido linoléico) dos biflavonóides (100 µg mL⁻¹) isolados dos frutos verdes de *C. parvicola*

As frações MeOH/H₂O (60 min= 82,38±2,27%) e AcOEt (60 min= 70,64±3,2%) apresentaram as melhores atividade de inibição da degradação do sistema em todos os tempos analisados, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre si (ANOVA e teste de Tukey). Em seguida, temos a fração hexânica (60 min= 68,32±9,79%) e o extrato EtOH (60 min= 65,64±3,80%) com atividades antioxidantes similares, e os biflavonóides (60 min= 53,20±2,69%). Alguns autores sugerem que a utilização do meio emulsionado interfere nos valores de absorbância justificando a baixa reprodutibilidade desta metodologia (ALVES *et al.*, 2010).

Em relação ao potencial antioxidante da fração AcOEt, podemos atribuir parte da atividade de inibição observada a *epicatequina* (DAVID *et al.*, 2002) e aos biflavonóides isolados desta fração. A promissora atividade antioxidante apresentada pela fração hexânica pode ser atribuída em parte, à presença de tocotrienóis e tocoferóis (DA CAMARA, 2001; TEXEIRA *et al.*, 2006) nesta fração, compostos de natureza lipofílica e “análogos” estruturalmente a vitamina E, um excelente antioxidante.

Relatos na literatura a respeito da atividade antiradicalar (DPPH[•] e ABTS^{•+}) e antioxidante com o sistema β-caroteno/ácido linoléico sobre espécies do gênero *Clusia* não foram encontrados. Desta forma, o presente estudo foi de extrema importância na contribuição ao conhecimento do potencial antioxidante da espécie *Clusia paralicola*.

5. CONCLUSÕES

- O estudo químico dos frutos verdes de *C. paralicola* resultou no isolamento e identificação de dois biflavonóides (2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*- GB1-7-*O*-glicosídeo e 2*R*, 3*S*, 2''*R*-3,8''-binaringenina-7-*O*-glicosídeo), uma catequina (*epicatequina*), dois esteróides (β -sitosterol e estigmasterol), um fenilpropanóide (1,3,5-trimetoxi-2-propenilbenzeno) e um triterpeno pentacíclico (β -amirina), sendo seis destas substâncias relatadas pela primeira vez nesta espécie.
- O isolamento destas substâncias contribuiu para o estudo quimiotaxonômico da família Clusiaceae e esta parcialmente de acordo com o perfil químico esperado de plantas do gênero *Clusia*. Este é o primeiro trabalho descrevendo o estudo químico dos frutos de *C. paralicola*, além de ser o primeiro relato sobre a determinação estrutural completa e da configuração absoluta dos biflavonóides (-)-(2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*)- GB1-7-*O*-glicosídeo e (-)-(2*R*, 3*S*, 2''*R*)-3,8''-binaringenina-7-*O*-glicosídeo.
- Quando submetidas aos testes antioxidantes, as amostras do extrato e frações dos frutos verdes de *C. paralicola* mostraram promissora atividade nos três ensaios DPPH, ABTS⁺ e sistema β -caroteno/ácido linoléico, sendo as amostras mais ativas aquelas com o maior teor de fenólicos. A mistura de biflavonóides também revelou um promissor potencial antioxidante frente aos ensaios antiradicalares e no sistema β -caroteno/ácido linoléico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDILLE, M. D. H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, p. 891-896, 2005.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989, 564 p.

ALCOFORADO-FILHO, F. G.; SAMPAIO, E. V. DE S. B.; RODAL, M. J. N. Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifolia espinhosa arbórea em Caruaru, Pernambuco. **Acta Botânica Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 287-303, 2003.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, P. J.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ARMBRUSTER, W. S. The Role of Resin in Angiosperm Pollination: Ecological and Chemical Considerations. **American Journal of Botany**, v. 71, n. 80, p. 1149-1160, 1984.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P.; Tea and herbal infusions: their antioxidant. Activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

AWAH, F. M.; UZOEGWU, P. N.; OYUGI, J. O.; RUTHEFORD, J.; IFEONU, P.; YAO, X-J.; FOWKE, K. R.; EZE, M. O. Free radical scavenging activity and immunomodulatory effect of *Stachytarpheta angustifolia* leaf extract. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1409-1416, 2010.

BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica**. São Paulo: Edel, 1986, 466 p.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEERHUES, L.; LIU, B. Review: Biosynthesis of biphenyls and benzophenones – Evolution of benzoic acid specific type III polyketide synthases in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1719-1727, 2009.

BENAVENT-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUNO, A.; DELRIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food chemistry -Review-** v. 72, p. 145-171, 2001.

CAMPANA, R. C.; MOURÃO, K. S. M.; MARZINEK, J. Morfoanatomia e ontogênese dos frutos e sementes de *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 437-444, 2010.

CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; DA CUNHA, A. P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.

CARDONA, M. L.; FERNÁNDEZ, I.; PEDRO, J. R.; SERRANO, A. Xanthonas from *Hypericum refluxum*. **Phytochemistry**, v. 29, n.9, p. 3003-3006, 1990.

CARMO, R. M.; FRANCESCHINELLI, E. V. Polinização e biologia floral de *Clusia arrudae* Planchon & Triana (Clusiaceae) na serra da calçada, município de Brumadinho, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n.3, p. 505-513, 2002.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E, P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5^o Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

CERRINI, S.; LAMBA, D.; DELLE MONACHE, F.; PINHEIRO, R. M. Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1.0^{3,7}]-Decane-7-hydroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1023-1028, 1993.

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 9, p. 3963-3986, 2006.

CHEN, F-C.; LIN, Y-M.; HUNG, J-G. A new biflavanone glucoside from *Garcinia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 3, p. 818-820, 1975.

CHOI, J-Y; SEO, C-S.; ZHENG, M-S.; LEE, C-S.; SON, J-K. Topoisomerase I and II inhibitory constituents from the bark of *Tilia amurensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 11, p. 1413-1418, 2008.

CHRISTIAN, O. E.; HENRY, G. E.; JACOBS, H.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. Prenylated benzophenone derivatives from *Clusia hevetiodes* Var. *Stenocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n.1, p. 21-23, 2001.

COMPAGNONE, R. S.; SUAREZ, A. C.; LEITAO, S. G.; MONACHE, F. D. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 6-10, 2008.

CORTEZ, D. A. G.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation of xanthonas and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea* by centrifugal partition chromatography. **Chromatographia**, v. 50, n. 1-2, p. 7-10, 1999.

CRUZ, F. G.; TEXEIRA, J. S. R. Polyprenylated Benzophenones with a Tricyclo [4.3.1.1^{3,8}]Undecane Skeleton from *Clusia obdeltifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 4., p. 504-508, 2004.

CUESTA-RUBIO, O.; CUELLAR, A. C.; ROJAS, N.; CASTRO, H. V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. A polyisoprenilated benzophenone from cuban própolis. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 1013-1015, 1999.

DA CAMARA, C. A. G. **Clusia – Cultura de Tecidos e Importância do Seu Látex na Sobrevivência das Espécies**. 2001, 233 f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

DAVID, J. P.; DOS SANTOS, E. O.; MIRANDA, M. S.; BARREIROS, A. L. B. S.; DOS SANTOS, I. D.; DAVID, J. M. Atividade antioxidante da *epicatequina*-(2 β →7, 4 β →8)-*epicatequina* isolada de *Dioclea lasiophylla*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 5-6, 2002.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CAVALCANTI, J. F. An unexpected dihydrophenanthrene from *Clusia paralicola*. **Tetraedron Letters**, v. 28, n. 5, p. 563-566, 1987.

DE OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO A. M.; BITTRICH V.; VENCATO I.; MARSAIOLI A. J. Floral resins of *Clusia* spp.: chemical composition and biological function. **Tetraedron Letters**, v. 37, p. 6427-6430, 1996 .

DE OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A. L. M.; BITTRICH, V.; MARSAIOLI, A. J. Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1073-1079, 1999.

DE PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. DE A.; PILÓ-VELOSO, D.; DEMUNER, A. J.; HOWARTH, O. Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus* Swart (Bombacaceae). **Eclética Química**, v. 23, p. 1-7, 1998.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. New York: John Wiley, 2º ed., 2001, 507 p.

DIAZ-CARBALLO, D.; SEEBER, S.; STRUMBERG, D.; HILGER, R. A. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 12, p. 622-623, 2003.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advanced Genetics**, v. 28, p. 165-234, 1990.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

EDENHARDER, R.; GRÜNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA 102. **Mutation Research**, v. 540, p.1-18, 2003.

ENGLER, A. Guttiferae et Quinaceae. In: Von Martins, C. F. P. (Ed.). **Flora brasiliensis**. Munchen, Frid. Fleisher, 1888, v. 12, n.1, p. 381-486.

FERRARI, J.; TERREAUX, C.; KURTÁN, T.; SZIKSZAI-KISS, A.; ANTUS, S.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line LC/CD analysis of 3-8"-linked biflavonoids from *Gnidia involucrata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86, p. 2768-2779, 2003.

GAFFIELD, W. Circular dichroism, optical rotator dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. Determination of aglycone chirality in flavanone glycosides. **Tetrahedron**, v. 26, p. 4093-4108, 1970.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; MATAMOROS, O. M. Acción vaso-periférica Del extracto acuoso de las hojas de *Clusia coclensis* (Clusiaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 3, p. 575-578, 1998.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoids composition of *Citrus* juices. **Molecules**, v. 12, p. 1641-1673, 2007.

GOMIS, D. B.; PALOMINO, N. F.; ALONSO, J. J. M. Capillary liquid chromatographic determination of neutral phenolic compounds in Apple juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 426, p. 111-117, 2001.

GONZALEZ, J. G.; CURLLAR, V.; BETANCOURT, A.; PINZON, M. I. A benzophenone from the fruits of *Clusia ellipticifolia*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 9, p. 2088-2090, 1983.

GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; DE LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; DE CARVALHO, M. G.; FILHO, R. B. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofilonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.

GROSSMAN, B. R.; JACOBS, B. On the structures of pluketiones B, D and E and their relationships to the other polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. **Tetrahedron**, v. 41, p. 5165-5169, 2000.

GUIMARÃES, A. G.; DOS SANTOS, M. M.; BISPO, R. M.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. S.; MORAES, V. R. S.; FERREIRA, A. G. Triterpenos pentacíclicos de *Clusia sellowiana* (Clusiaceae). In: **31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia – SP, 2008.

GULCIN, I.; OKTAY, M.; KURECCI, E.; KUFREVIOLU, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, p. 371-382, 2003.

GULCIN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, n.3, p. 393-400, 2004.

GUSTAFSON, K. R.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G.; FULLER, R. W.; MEKEE, T. C.; CARDELINA, J. H.; MEMAHON, J. B.; GRAGG, G. M.; BOYD, M. R. HIV inhibitory natural products. 8. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 10093-10102, 1992.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. **Biochemical and Pharmacology**, n. 10, v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HAMED, W.; BRAJEUL, S.; MAHUTEAU-BETZERT, F.; THOISON, O.; MONS, S.; DELPECH, B.; VAN HUNG, N.; SÉVENET, T.; MARAZANO, C. Obongifolins A-D, polyprenylated benzoyl-phloroglucinol derivatives from *Garcinia oblongifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 774-777, 2006.

HAN, Q. B.; LEE, S. F.; QIAO, C. F.; HE, Z. D.; SONG, J. Z.; SUN, H. D.; XU, H. X. Complete NMR assignments of the antibacterial GB1 from *Garcinia kola*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 8, p. 1034-1036, 2005.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal of Natural Products**, n. 59, p. 205-215, 1996.

HEINONEN, M.; LEHTONEN, P. J.; HOPIA, A. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 25-31, 1998.

HENRY, C. E.; JACOBS, H.; CARRINGTON, C. M. S.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Plukenetione A an unusual adamantyl ketone from *Clusia plukenetti* (Guttiferae). **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 8663-8666, 1999.

HU, L. H.; SIM, K. Y. Cytotoxic polyprenylated benzoyl phoroglucinol derivatives with an unusual adamantyl skeleton from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). **Organic Letters**, v. 1, n.6, p. 879-882, 1999.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, S. W.; HODIA, A.; SCHWARZ, K.; FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of α -tocopherol and Trolox in different lipid substrates: bulk vs. oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 444-452, 1996.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M. C.; LOZADA, L.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 Inhibition by Extracts of Clusiaceae

Species from Mexico. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 916-920, 2004.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 735-741, 2010.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MIYAMOTO, Y.; ONODA, S.; RAO, K. S.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FUTUKAWA, H. Polyphenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potencial cancer chemopreventive activities. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 206-209, 2003.

JACKSON, B.; LOCKSLEY, H. D.; SCHEINMANN, F. Extractives from Guttiferae. Part XXII. The isolation and structure of four novel biflavanones from the heartwoods of *Garcinia buchananii* Baker and *G. eugeniifolia* Wall. **Journal of Chemical Society (C)**, p. 3791-3804, 1971.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 1983, p. 319-337.

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M.; BARRETO, G. P. DE M.; MERCADANTE, A. Z.; VIEIRA E SILVA, P. DE T. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.

KAWANISHI, S.; MURATA, M.; TAKAHASHI, A.; SAITO, I. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 822-832, 2002.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Biochemical Pharmacology of Biflavonoids: Implications for Anti-inflammatory Action. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n.3, p. 265-273, 2008.

KLIPPEL, K. F.; HILTL, D. M.; SCHIPP, B. A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for treatment of benign prostatic hyperplasia. German BPH-Phyto Study group. **British Journal of Urology International**, v. 80, n. 3, p. 427-432, 1997.

KALODZIEJCZYK, J.; MASULLO, M.; OLAS, B. Effects of garcinol and guttiferone K isolated from *Garcinia cambogia* on oxidative/nitrative modifications in blood platelets and plasma. **Platelets**, v. 20, n. 7, p. 487-492, 2009.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, xantonas e cromonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2º Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2000, p. 451-469.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research -Review-**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LEAL, K. Z.; YONEDA, J. D.; LINDGREN, E. B.; PINHEIRO, C. B.; CORRÊA, A. L.; FRANÇA, H. S. Conformational analysis of phloroglucinols from *Hypericum brasiliense* by using X-ray diffraction and molecular modeling. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 837-841, 2010.

LENTA, B. N.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; WENIGER, B.; DEVKOTA, K. P.; NGROUPAYO, J.; KAISER, M.; NAZ, Q.; CHOUDHARY, M. I.; TSAMO, E.; SEWALD, N. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548-1557, 2007.

LI, X.-C.; JOSHI, A. S.; TAN, B.; ELSOHLY, H. N.; WALKER, L. A.; ZJAWIONY, J. K.; FERREIRA, D. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3,8'')-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 8709-8717, 2002.

LIU, J.; WANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, C.; LU, S.; LIU, J. The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. **Food Chemistry**, v. 126, p. 261-269, 2011.

LIMA, A.C.A. **Contribuição ao conhecimento químico da família Guttiferae. Constituintes químicos das raízes, caule e cascas de *Tovomita brevistaminea* Engl.** 2000. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL.

LIMA, M. M. DE O.; VIEIRA, L. F.; COSTA JUNIOR, J. S. Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). In: **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, João Pessoa -PB- 2007.

LOBÔ, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MULLER, A. H.; ARRUDA, G. M. S.; SANTOS, A. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosea). **Química Nova**, v.31, n. 3, p. 493-497, 2008.

LOKVAM, J.; BRADDOCK, J. F.; REICHARDT, P. B.; CLAUSEN, T. P. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Phytochemistry**, v. 55, p. 29-34, 2000.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag, p. 35-279, 1970.

MACHADO, S. M. F. **Contribuições à química das recompensas florais de *Clusia e Tovomitopsis* (Guttiferae)**. 2002, 233 f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford: Clarendon Press, 1987, 374 p.

MARIN, R. M.; ALAECÓN, A. B.; CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. Polyprenylated benzophenones derivatives from *Clusia minor* fruits. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 762-765, 2008.

MBWAMBO, Z. H.; KAPINGU, M. C.; MOSHI, M. J.; MACHUMI, F.; APERS, S.; COS P.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Antiparasitic Activity of Some Xanthenes and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia liWingstonei*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 369-372, 2006.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphyla*. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 185-188, 1999.

MESA-VANEGAS, A. M.; GAVIRIA, C. A.; CARDONA, F.; SAÉZ-VEGA, J. A.; TRUJILLO, S. B.; ROJANO, B. A. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 15, n. 2, p. 13-26, 2010.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry -Review-** v. 72, p. 145-171, 2001.

MULLER, F. L.; LUSTGARTEN, M. S.; JANG, Y.; RICHARDSON, A.; REMMEN, H. V. Trends in oxidative aging theories. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 477-503, 2007.

MURCIA, M. A.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMÉNES, A. M.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives, influence of irradiation procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1872-1881, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A -Review-**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NGOUELA, S.; LENTA, B. N.; NOUNGOUE, D. T.; NGOUPAYO, J.; BOYOM, F. F.; TSAMO, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; CONNOLLY, J. D. Antiplasmodial and antioxidant activities of constituents of the seeds whells of *Shymphonia globulifera* Linnf. **Phytochemistry**, v. 67, p. 302-306, 2006.

OKUNJI, C. O.; WARE, T. A.; HICKS, R. P.; IWU, M. M.; SKANCHY, D. J. Capillary electrophoresis determination of biflavanones from *Garcinia kola* in three traditional African medical formulations. **Planta Medica**, v. 68, p. 440-444, 2002.

PAGANO, B.; PAVONE, M.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L.; CUESTA-RUBIO, O.; MATTIA, C. A.; BARONE, V. Structural and conformational investigation of nemorosone: a combined X-ray and quantum mechanical study. **Chemical Physics Letters**, v. 462, p. 158-163, 2008.

PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; CHICA, M. B.; MAHMOOD, N.; PAGANO, B.; PAVONE, M.; BARONE, V.; RASTRELLI, L. Estructural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, v. 61, p. 8206- 8211, 2005.

PITTER, H. **Manual de las plantas usales de Venezuela y su suplemento**. Caracas: Fundación Eugenio Menzoza, 1970, 211 p.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT- Food Science and Technology**, v. 40, p. 1-11, 2007.

PORTER, W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, p. 93-122, 1993.

PORTO, A. L. M.; MACHADO, S. M. F.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. E.; MARSAIOLI, A. J. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. **Phytochemistry**, v. 55, p. 755-768, 2000.

PÓVOA FILHO, H. Antioxidantes. In: PÓVOA, H. **Radicais Livres: Em Patologia Humana**. Rio de Janeiro: Imago, 1995, p. 211-246.

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

PROTIVA, P.; HORKINS, M. E.; BAGGETT, S.; YANG, H.; LIPKIN, M.; HOLT, P. R.; KENNELLY, E. J.; BERNARD, W. I.; Growth inhibition of colon cells by polyisoprenylated benzophenones is associated with induction of the endoplasmic reticulum response. **Internacional Journal of Cancer**, v. 123, n. 3, p. 687-694, 2008.

RE, R.; PELLEGRINI, N; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

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

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n.2, p. 235-254, 2005.

ROUBIK, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. New York: Cambridge University Press, 1989.

SALAMA, A. M. Aislamiento de friedelina y friedelinol de la corteza de *Clusia ellipticifolia*. **Revista Colombiana de Ciencias Químicas e Farmacéuticas**, v. 15, p. 99, 1986.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2º Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2000, p. 451-469.

SEEBER, S.; HILGER, R. A.; DIAZ-CARBALLO, D. Clusianone isomers and use thereof for the treatment of tumors and viral diseases. **PCT Int. Appl.**, p. 64, CODEN: PIXXD2 WO 2003043966 A2 20030530, 2003a.

SEEBER, S.; HILGER, R. A.; DIAZ-CARBALLO, D. Substituted bicyclo[3.3.1]nonane-2,4,9-triones as pharmaceutically active substances for the treatment of cancer and viral diseases. **Ger. Offen.**, p. 46, CODEN: GWXXBX DE 10157033 A1 20030528, 2003b.

SEO, EUN-K; HUANG, L.; WALL, M. E.; WANI, M. C.; NAVARRO, H.; MUKHERJEE, R.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D. New biphenyl compounds with DNA strand-scission activity from *Clusia paralicola*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 11, p. 1484-1487, 1999.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, T. M. S. **Estudo químico de espécies de *Solanum***. 2002, 194 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; BARBOSA, J. M.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 507-511, 2006.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOKMEN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, A.; DAFERERA, D.; TEPE, B.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; SAHIN, F. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v. 15, p. 627-634, 2004.

SOUSA, C. M. DE M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-Jr., G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.;

ARAÚJO, P. B. DE M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STEVENS, P. F. Clusiaceae – Guttiferae. In: **The families and genera of vascular plants**. Biomedical and Life Sciences, Springer Berlin Heidelberg, v. 25, n. 3; p. 505-513, 2002.

TEXEIRA, J. S. R.; MOREIRA, L. DE M.; GUEDES, M. L. DA S., CRUZ, F. G. A new biphenyl from *Clusia melchiorri* and a new tocotrienol from *C. obdeltifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 4, p. 812-815, 2006.

ZUANAZZI, J. A. DE S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2º Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2000, p. 489-516.

WANG, S.; HUANG, K. Determination of flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 273-279, 2004.