

**Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos
do Extrato dos Frutos da Aroeira
(*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

NATALIA RIBEIRO BERNARDES

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2010**

**Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos
do Extrato dos Frutos da Aroeira
(*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

NATALIA RIBEIRO BERNARDES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Barros de Oliveira

Co-Orientadora: Prof. Dr. Michelle Frazão Muzitano

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2010

**Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos
do Extrato dos Frutos da Aroeira
(*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

NATALIA RIBEIRO BERNARDES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Barros de Oliveira
Co-Orientadora: Prof. Dr. Michelle Frazão Muzitano

Aprovada em 02 de Fevereiro de 2010

Comissão examinadora:

Prof. Zenildo Buarque de Moraes Filho (D.S., Química de Produtos Naturais)
UNIGRANRIO - RJ

Prof. Milton Masahiko Kanashiro (D.S., Biociências e Biotecnologia) UENF

Prof. Karla Silva Ferreira (D.S., Ciência e Tecnologia de Alimentos) UENF

Prof. Daniela Barros de Oliveira (Orientadora) (D.S., Química de Produtos Naturais) UENF

Aos meus pais José Francisco e Catarina, aos meus irmãos João Paulo e Francesca e ao meu noivo Raphael.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro.

Agradeço à UENF, pela oportunidade de aqui desenvolver este trabalho.

Agradeço aos Professores Zenildo Buarque de Moraes Filho, Milton Masahiko Kanashiro e Karla Silva Ferreira por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.

Agradeço a Camila de Oliveira Mansur pelas análises realizadas no RMN, nos laboratórios do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN) e ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Dept. de Bioquímica - UFRJ).

Agradeço a Professora Daniela Barros de Oliveira, por ter aceitado me orientar, por todo ensinamento, carinho, paciência, dedicação e por sempre acreditar que eu sou capaz, e me lembrar quando eu não acreditava. Você é muito especial.

Agradeço a Professora Michelle Frazão Muzitano, que me orientou em toda parte biológica, por toda ajuda, paciência, ensinamento, carinho e dedicação. Você foi muito importante na minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço a Deus por me ajudar a completar mais essa etapa da minha vida, que esteve presente do meu lado sempre.

Aos meus pais José Francisco e Catarina, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo, acreditando, incentivando, essa etapa da minha vida é dedicada a vocês.

Aos meus irmãos João Paulo e Francesca, por acreditarem e torcerem sempre por mim. Obrigado mesmo! Mesmo distantes vocês estarão sempre no meu coração e sem a força de vocês eu não teria conseguido.

Ao meu noivo Raphael, por tudo o que você fez e faz por mim. Sempre me ajudou, me incentivou você já faz parte até do LTA. Sempre do meu lado, em todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou ruins. Te amo!

Aos meus amigos da parte química Shallini, Fernanda, Clara, Lorena e Cristiano, obrigado pela ajuda, sempre disponíveis nas horas em que precisei. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês.

Agradeço aos meus amigos da parte biológica, Isabela, Marlon, Thatiana e Maíra, obrigada por cada ensinamento, paciência, companherismo e amizade, com certeza vocês me ajudaram muito.

Agradeço aos amigos do LTA, Sílvia, sempre muito amiga e carinhosa, Andréia, João, Juliana, Fernanda, Silvana, Marcela, Luciana Coutinho, Valdinéia, Juliana, Vânea, muito obrigada pelos momentos de descontração, vocês são muito especiais.

As meninas lá de casa, Renata, Thays, Priscilla e Jéssica, vocês são as irmãs que eu pude escolher, obrigada por cada momento que dividimos, vocês estarão sempre no meu coração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIações.....	xviii
RESUMO.....	xx
ABSTRACT.....	xxii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS.....	3
3- REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	4
3.1 – Alimentos funcionais.....	4
3.2 - Formação dos radicais livres (RL) X Antioxidantes.....	6
3.3 – Imunofarmacologia.....	8
3.3.1 – Síntese de NO.....	9
3.4– Flavonóides.....	11
3.4.1 – Biossíntese.....	11
3.4.2 – Propriedades Químicas.....	13
3.5 – Escolha do material vegetal.....	16

3.5.1 – Descrição Botânica.....	16
3.6 - Principais constituintes químicos da família Anacardiaceae.....	17
3.6.1 - Gêneros mais representativos da família Anacardiaceae.....	18
3.7 – Propriedades medicinais.....	30
3.7.1 – Propriedades medicinais a partir dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	30
3.7.2 – Propriedades medicinais a partir das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	30
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. – Coleta de material vegetal.....	32
4.2 – Metodologia Geral.....	32
4.2.1- Parte Química: Técnicas Gerais.....	33
4.3 - Preparo do extrato metanólico.....	36
4.4- Fracionamento do extrato, isolamento e identificação da substância.....	37
4.5 - Atividade Antioxidante.....	40
4.6 - Análise e dosagem de taninos e fenóis totais do fruto e cascas de aroeira.....	41
4.6.1 - Método para Dosagem de Taninos Gálicos.....	39
4.6.2 - Método para Dosagem de Taninos Condensados.....	39
4.6.3 – Método para Dosagem de Fenóis Totais.....	39
4.7 - Parte biológica.....	43
4.7.1 - Testes farmacológicos.....	43
4.7.2 - Inibição da produção de NO.....	43
4.7.3 - Citotoxicidade celular.....	43
4.7.4 – Doador de óxido nítrico.....	44
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45

5.1 – Extrato metanólico.....	45
5.1.1 – Quantificação dos flavonóides por CLAE no extrato.....	54
5.1.2 – Fracionamento do extrato metanólico.....	54
5.1.3 – Substância isolada.....	61
5.2 - Elucidação estrutural da substância ST-1.....	65
5.2.1 – Técnicas monodimensionais.....	65
5.2.1.1 – RMN ¹ H.....	66
5.2.1.2 – RMN ¹³ C.....	70
5.2.2 - Técnicas bidimensionais.....	74
5.2.2.1 - COSY ¹ H - ¹ H.....	74
5.2.2.2 - HMQC.....	74
5.2.2.3 – HMBC.....	75
5.3 - Proposta Estrutural.....	76
5.4 - Atividade Antioxidante.....	77
5.5 - Análise e dosagem de taninos e fenóis totais do fruto e cascas de aroeira.....	83
5.6 - Atividades Imunofarmacológicas.....	87
5.6.1 - Atividade do extrato metanólico na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 264.7.....	87
5.6.2 - Atividade do conjunto A3 na inibição da produção de NO por macrófagos.....	90
5.6.3 - Mecanismo de ação do extrato e conjunto A3 na inibição da produção de NO por macrófagos.....	92
5.6.4 - Atividade da substância ST-1 na inibição da produção de NO por macrófagos.....	94
6 – RESUMO E CONCLUSÕES.....	96
6.1 - Avaliação do perfil químico do extrato metanólico.....	96

6.2 - Avaliação da atividade antioxidante.....	97
6.3 - Avaliação do teor de taninos e fenóis totais nas cascas e frutos de aroeira.....	97
6.4 - Avaliação da atividade Imunofarmacológica.....	98
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos.....	05
Figura 2 – Biossíntese geral dos flavonóides, ilustrando as etapas da formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos flavonóides são formados.....	12
Figura 3 – Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.....	13
Figura 4 – Algumas subclasses de flavonóides.....	14
Figura 5 – Os frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	17
Figura 6 – Estrutura do química do ácido anacárdico.....	17
Figura 7 – Estrutura química das substâncias isoladas de <i>Schinus leucifolius</i> . (A) quercetina e (B) ácido gálico.....	20
Figura 8 – Algumas estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Schinus molle</i> . (A) quercetina, (B) isoquercitrina 6"-O-p-hidroxibenzoato, (C) 2"-O- α -L-ramnopiranosil-hisperina 6"-O-galato, (D) α -amirina, (E) ácido 3-epiisomasticadienólico e (F) 13 α ,14 β ,17 α ,20S,24Z-3-oxalanosta-8,24-dien-26-metil-ester.....	21
Figura 9 – Estrutura química das substâncias isoladas de <i>Schinus polygamus</i> . (A) β - Sitosterol e (B) ácido chiquímico.....	22
Figura 10 – Estrutura molecular do ácido masticadienólico e do álcool schinol.....	22

Figura 11 – Estrutura química dos constituintes caracterizados a partir dos frutos da aroeira.....	23
Figura 12 – Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	24
Figura 13 – Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	25
Figura 14 – Estrutura química do ácido gálico isolado das folhas de aroeira.....	25
Figura 15 - O esqueleto das três agliconas de maior destaque na família Anacardiaceae.....	26
Figura 16 - Representação esquemática dos flavonóides presentes na família Anacardiaceae, no gênero <i>Schinus</i> e na espécie <i>Schinus terebinthifolius</i>	28
Figura 17 - Gráfico da área do pico X massa (em µg) injetada de rutina obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 6.....	35
Figura 18 - Cromatograma do extrato metanólico realizado por CCD. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.....	44
Figura 19 - Cromatograma 1, perfil químico da quercetina avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 332 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.....	46
Figura 20 - Cromatograma 2, perfil químico da rutina avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.....	47

Figura 21 - Esquema do flavonóide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.....	48
Figura 22 - Espectros de ultravioleta dos flavonóides quercetina (A) e rutina (B)....	49
Figura 23 - Cromatograma 3, perfil químico do extrato metanólico avaliado por CLAE. Seta 1: Pico majoritário do extrato metanólico; Seta 2: Pico com tempo de retenção característico para a rutina; Seta 3: Pico com tempo de retenção para a quercetina.....	50
Figura 24 - Espectros de Ultravioleta dos picos de tempo de retenção (TR) igual a 26,30 min, correspondente ao pico 1 (Verde); 27,01 min, correspondente ao pico 2 (Azul) e 29.01 min, correspondente ao pico 3 (Rosa).....	51
Figura 25 - Cromatograma 4, perfil químico da co-cromatografia do extrato metanólico, rutina e quercetina avaliado por CLAE.....	52
Figura 26 - Cromatograma da primeira coluna do extrato metanólico realizada por CCD, mostrando as manchas características nos três últimos grupos, que foram reunidas formando o A3. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.....	54
Figura 27 - Cromatograma 5, perfil químico do conjunto A1 avaliado por CLAE. Seta 1: Pico majoritário do extrato metanólico.....	56
Figura 28 - Cromatograma 6, perfil químico do conjunto A2 avaliado por CLAE.....	57
Figura 29 - Cromatograma 7, perfil químico do conjunto A3 avaliado por CLAE.....	58
Figura 30 - Cromatograma dos conjuntos B1 e B2 realizado em CCD, mostrando 2 manchas majoritárias. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.....	60
Figura 31 - Cromatograma do conjunto C2 realizada por CCD. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.....	61
Figura 32 - Cromatograma 8, perfil químico do conjunto C2, avaliado por CLAE.....	62
Figura 33 - Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 31.17 min, correspondente a amostra isolada C2.....	63
Figura 34 - Espectro de RMN ¹ H de ST-1 (400 MHz).....	67

Figura 35 - Espectro de RMN ^1H de ST-1 (400 MHz), com a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos.....	68
Figura 36 - Estrutura da aglicona apigenina (ST-1) comparada com os dados da literatura (Owen, et al., 2003).....	68
Figura 37 - Espectro de RMN ^{13}C de ST-1 (400 MHz).....	71
Figura 38 - Sinais de ^{13}C da aglicona apigenina (ST-1) comparados com os dados da literatura (Yoshikawa et al., 2000).....	71
Figura 39 - Espectro de RMN 2D- COSY para ST-1.....	73
Figura 40 - Espectro de RMN-2D HMQC para ST-1.....	74
Figura 41 - Espectro de RMN-2D HMBC para ST-1.....	75
Figura 42 - Estrutura de ST-1 (Apigenina 5,7,4' -trihidroxiflavona).....	76
Figura 43 - Mecanismo mostrando um composto aromático aceitando um elétron não emparelhado.....	77
Figura 44 - Atividade antioxidante do extrato metanólico, os conjuntos, ST-1 e os padrões de referência quercetina, rutina, apigenina, ácido ascórbico e BHT (n=3).	80
Figura 45 - Estrutura química da apigenina, mostrando o grupamento OH nos carbonos 5, 7 e 4'	82
Figura 46 - Estrutura química dos taninos ácido gálico e elágico.....	83
Figura 47 - Estrutura química da procianidina, um exemplo de tanino condensado.	83
Figura 48 - Efeito do extrato das cascas dos frutos da aroeira na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 267.4 (n=3). (**P<0,001).....	87
Figura 49 - Inibição da produção de NO por macrófagos em diferentes tempos....	88
Figura 50 - Percentual de liberação de LDH em macrófagos RAW 267.4 no extrato dos frutos da aroeira (n=3).....	88
Figura 51 - Efeito do conjunto A3 na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 267.4 (n=3) (**P<0,001).....	89

Figura 52 - Percentual de liberação de LDH em macrófagos RAW 267.4 no conjunto A3 (n=3).....	90
Figura 53 - Avaliação tempo-dependente da produção de NO por macrófagos RAW 267.4 (n=3). (**P<0,001).....	91
Figura 54 - Sequestro de NO doado pelo SNP.....	92
Figura 55 - Efeito da substância ST-1 na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 267.4 (n=3). (**P<0,001).....	93
Figura 56 - Percentual de liberação de LDH em macrófagos RAW 267.4 na substância ST-1 dos frutos da aroeira (n=3).....	94

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Ocorrência dos flavonóides na família Anacardiaceae por gênero botânico.....	27
Tabela 2: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE.....	34
Tabela 3: Dados de massa (em µg) injetada de rutina e as respectivas áreas obtidas.....	34
Tabela 4: Sistema de solventes utilizado na cromatografia em coluna aberta.....	37
Tabela 5: Tempos de retenção e as áreas dos flavonóides quercetina e rutina.....	48
Tabela 6: Quantificação dos flavonóides presentes no extrato metanólico das cascas dos frutos de aroeira.....	53
Tabela 7: Quantificação dos flavonóides presentes nos conjuntos A2 e A3.....	59
Tabela 8: Tempo de retenção e área obtidos por CLAE do extrato metanólico e dos grupos A3 e C2.....	63
Tabela 9: Sinais listados de ^1H e ^{13}C da substância ST-1.....	64
Tabela 10: Comparação dos sinais de ^1H da amostra ST-1 e os sinais da apigenina observados na literatura.....	66
Tabela 11: Comparação dos sinais de ^{13}C de ST-1 e os sinais da apigenina observados na literatura.....	70

Tabela 12: Comparação dos sinais de ST-1 e os sinais da apigenina da literatura (Owen, et al., 2003; Yoshikawa et al., 2000).....	72
Tabela 13: Atividade antioxidante do extrato metanólico, frações e dos padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina e 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT).....	78
Tabela 14: Dados obtidos nas análises de taninos condensados e taninos hidrolisáveis dos frutos e cascas de aroeira.....	84
Tabela 15: Dados obtidos dos teores de fenóis totais dos frutos e cascas das de aroeira.....	85

LISTA DE ABREVIações

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
NO	Óxido Nítrico
SNP	Nitroprussiato de Sódio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RL	Radicais Livres
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
NOS	Óxido Nítrico Sintase
<i>i</i> NOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
<i>c</i> NOS	Óxido Nítrico Sintase constitutiva
RP-2	Fase inversa com dois átomos de carbono
AA	Atividade Antioxidante
EIM	Ensaio Imunofarmacológico
AT	Análise de Taninos

FT	Fenóis Totais
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
RF	Fatores de Referência
TR	Tempo de Retenção
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetil sufóxido deuterado
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
HMQC	Heteronuclear MultipleQuantum Coherence
HMBC	Heteronuclear MultipleBond Coherence
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhanced Polarization Transfer

RESUMO

BERNARDES, N.R. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2010; Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos do Extrato dos Frutos da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi); Professora Orientadora: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.; Co-Orientadora: Michelle Frazão Muzitano, D.Sc.; Banca Avaliadora: Zenildo Buarque de Moraes Filho, D.Sc.; Milton Masahiko Kanashiro, D.Sc.; Karla Silva Ferreira, D.Sc.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, em conjunto com o Laboratório de Biologia do Reconhecer do Centro de Biociências e Biotecnologia, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil químico das cascas dos frutos de aroeira, *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), a avaliação da atividade antioxidante, e a capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, o que em tese pode justificar seu uso popular como anti-inflamatório e um possível alimento funcional. Para a obtenção do extrato bruto, as cascas dos frutos de aroeira foram separadas das sementes e submetidas à extração exaustiva (maceração estática) com metanol. Os fracionamentos cromatográficos foram realizados com o intuito de se obter uma substância purificada. O conhecimento do perfil químico do extrato nos

conduziu a quantificação de rutina e quercetina (baixos teores) e, a outros três flavonóides com picos nos tempos de retenção entre 25 a 30 minutos foram detectados. A partir da purificação do extrato, obteve-se uma substância isolada (ST-1), esta foi enviada ao RMN para sua elucidação estrutural, que a partir de dados espectroscópicos a apigenina foi identificada. O extrato, conjuntos, ST-1 e padrões químicos foram avaliados quanto sua atividade antioxidante, onde em uma escala de capacidade de sequestro de radicais livres, a seqüência seria: Extrato metanólico > A3 > A2 > ST-1. A partir de análises de taninos e fenóis totais das cascas e dos frutos de aroeira, não foram detectados taninos hidrolisáveis, e os teores de taninos condensados e fenóis totais apresentam baixas concentrações, ou seja, a capacidade antioxidante do extrato e conjuntos da aroeira não estão relacionados a esses fatores somente. O extrato, ST-1 e o conjunto A3 que apresentou melhor atividade antioxidante foram submetidos a análise imunofarmacológica, este apresentou capacidade inibitória de produção de NO ($0,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$, para a concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, e na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$ a quantidade de NO produzida foi $2,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$). A substância ST-1 apresentou inibição da produção de NO até mesmo na concentração de $0,8 \mu\text{g/mL}$. Com relação ao mecanismo de ação, se pode observar que tanto o extrato, quanto o conjunto A3 sequestram de forma significativa o NO formado ($5,7 \pm 5,1 \mu\text{M}$; $0,0 \pm 4,7 \mu\text{M}$, respectivamente). Após os macrófagos terem sido estimulados pela presença do LPS por 12 horas, se pode notar que o efeito inibitório da produção de NO foi verificado no extrato e no conjunto ($10,0 \pm 4,4 \mu\text{M}$; $0,0 \pm 2,0 \mu\text{M}$ respectivamente). Com estes resultados, ainda não é possível definir qual o mecanismo de ação do extrato e do conjunto, mas pode-se afirmar que as amostras da aroeira não atuam unicamente através da inibição da expressão da *iNOS*, podendo estar envolvidos também na inibição da sua atividade, e também no sequestro do NO formado, possuindo um alto potencial como agente anti-inflamatório. Sendo assim, este trabalho permitiu conhecer quimicamente as cascas dos frutos da aroeira até então nunca estudadas e avaliar sua atividade antioxidante e imunofarmacológica, contribuindo para a compreensão científica do seu uso popular como anti-inflamatório.

Abstract

Bernardes, N.R. MSc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February 2010; Study of Chemical Composition and the Effects of Immunopharmacology Fruit Extract Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi); Teacher Advisor: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.; Co-Advisor: Michelle Frazão Muzitano, D.Sc. Banking Appraiser: Zenildo Buarque de Moraes Filho, D.Sc.; Masahiko Milton Kanashiro, D.Sc.; Karla Silva Ferreira, D.Sc.

This work was conducted at the Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias in conjunction with the Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. The objectives of this study were to evaluate the chemical profile of the fruit's bark of the tree *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), to verify the antioxidant activity and the ability to inhibit production of nitric oxide (NO) by macrophages, which in theory could justify its use popular as a possible anti-inflammatory and functional food. To obtain the crude extract, the peels of the fruits of *Schinus* were separated from seeds and subjected to exhaustive extraction with methanol. The chromatographic separation was performed in order to obtain a purified substance. The study of the chemical profile of the extract resulted in the identification of rutin and quercetin (low amounts), and other three flavonoids with peaks of retention times between 25 and 30 minutes.

After purification of the extract, we obtained a pure compound (ST-1), this was sent to NMR structural elucidation, which from spectroscopic data apigenin was identified. The extract, fractions, ST-1 and chemical standards were evaluated for their antioxidant activity, which on a scale of sequestration capacity of free radicals, the sequence would be: methanol extract > A3 > A2 > ST-1. From analysis of total phenols and tannins from the fruits' barks of *Schinus* were not detected hydrolysable tannins, and total tannins and phenols were detected at low concentrations, then, the antioxidant extract of pepper tree and sets are not related to these factors only. The extract, ST-1 and the fraction that showed the greatest antioxidant activity were analyzed Immunopharmacologically, it showed inhibitory effect on NO production ($0.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$ for the concentration of $500 \mu\text{g/mL}$, and the concentration of $20 \mu\text{g/mL}$ the amount of NO produced was $2.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$). The substance ST-1 showed inhibition of NO production even at a concentration of $0.8 \mu\text{g/mL}$. Regarding the mechanism of action, we can see that both the extract, and the fraction A3 kidnap a significant NO amount ($5.7 \pm 5.1 \mu\text{M}$, $0.0 \pm 4.7 \mu\text{M}$, respectively). After the macrophages stimulation by LPS for 12 hours, it can be seen that the inhibitory effect of NO production was observed in the extract and the fraction ($10.0 \pm 4.4 \mu\text{M}$, $0.0 \pm 2.0 \mu\text{M}$ respectively). With these results, it is not possible to define the mechanism of action of the *Schinus* samples but it could be concluded that it is not only due to the inhibition of the *NOS* expression, other mechanisms like inhibition of *iNOS* activity, and also sequester of the NO released could be involved. The present study afforded new information about the chemical profile of *S. terebinthifolius* fruits and about their anti-oxidant and immunopharmacological profile, contributing to the understanding of the medicinal popular usage as anti-inflammatory.

1. INTRODUÇÃO

A utilização dos vegetais como fonte de alimentos e produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade e, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química atualmente, boa parte das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal (Balunas e Kinghorn, 2005; Newman et al., 2003).

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira, é uma espécie nativa da flora brasileira e faz parte da diversidade da região de Campos dos Goytacazes (Carvalho, et al., 2006). Seus frutos são utilizados como condimento e suas cascas, folhas e frutos possuem propriedades medicinais como adstringente, antidiarréica, anti-inflamatória, depurativa, diurética, febrífuga e antioxidante (Ceruks, et al., 2007; Degáspari, et al., 2005).

Muitas patologias além da aterosclerose, de problemas pulmonares, processos inflamatórios e outras doenças degenerativas como o câncer, podem ser agravadas pela formação de radicais livres e ainda promoverem lesões teciduais, como as cardiopatias, por originarem a oxidação (Halliwell, 2009; Shami e Moreira, 2004). Essas espécies químicas podem ser geradas por fatores intrínsecos e extrínsecos. Como exemplos de fatores intrínsecos podem ser citados a taxa respiratória durante a ativação de glóbulos brancos como neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, entre outros. E como fatores extrínsecos, a formação a partir do oxigênio e seus derivados, dos radicais alcoxi e peróxido, do ozônio, de metais de transição (Shami e Moreira, 2004).

Os principais radicais livres observados são superóxido ($O_2^{\bullet-}$), a hidroxila (OH^{\bullet}), o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}). Destes, o radical hidroxila é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares e o peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado uma potente espécie reativa de oxigênio, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (Anderson, 2000).

Assim, é comum a utilização de antioxidantes que podem ser exógenos ou endógenos. Os antioxidantes exógenos são capazes de neutralizar radicais livres. As substâncias fenólicas e dentre elas principalmente os ácidos fenólicos e os flavonóides (moléculas polares), ou ainda as substâncias apolares como os carotenóides, são exemplos de substâncias antioxidantes (Bertoldi, 2006; Temple, 2000). No caso dos agentes endógenos, citam-se as enzimas superóxido-dismutase, glutatona-peroxidase e catalases (Shami e Moreira, 2004).

A busca de novos agentes antioxidantes a partir de fontes vegetais utilizadas na alimentação humana e na medicina popular contra inflamações e infecções pode levar a moléculas naturais com alto potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo*. Estas substâncias poderiam justificar o uso popular de tais espécies vegetais como anti-inflamatório (Fang e Liu, 2002).

Existem diversos trabalhos para avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas de vegetais. No entanto, as pesquisas realizadas a partir de *Schinus terebinthifolius* Raddi se concentram em nível de análise das folhas e da seiva (tronco) (Web of Science e Science Direct, 1980 a 2009).

Relacionadas aos frutos da aroeira (parte comestível), poucas as pesquisas são observadas (Web of Science e Science Direct, 1980 a 2009). Dessa forma, o enfoque principal deste estudo está baseado na avaliação da atividade antioxidante, e na capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos a partir do extrato das cascas dos frutos, o que em tese pode justificar seu uso popular como anti-inflamatório e um possível alimento funcional.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é ampliar o conhecimento químico e biológico a cerca das cascas dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, para a utilização do mesmo como alimento funcional.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil químico do extrato metanólico das cascas dos frutos da aroeira por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar o teor de quercetina e rutina no extrato metanólico por CLAE;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e frações a partir das cascas dos frutos;
- Determinar os teores de taninos e fenóis totais do extrato.
- Isolar e Identificar o pigmento responsável pela atividade biológica dos frutos através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória, através da capacidade do extrato e das frações em inibir a produção de NO;
- Avaliar a capacidade de sequestro de NO a partir do doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimentos Funcionais

O termo “alimento funcional” foi utilizado pela primeira vez no Japão, em 1985, onde indústrias passaram a fortificar alimentos com ingredientes específicos, diferenciando-os com relação aos benefícios oferecidos à saúde, quando comparados aos alimentos nas formas tradicionais. A ausência de uma legislação que padronizasse mundialmente o termo fez com que surgissem várias denominações, como nutracêuticos, e alimentos medicinais (Moraes, 2007).

Assim, os alimentos funcionais são definidos como alimentos que possuem qualquer substância ou componente que proporcione benefícios para a saúde, inclusive a prevenção e o tratamento de doenças. Os exemplos de alimentos funcionais citados pelo International Food Information Council Foundation (IFIC), órgão que trabalha com questões de comunicação envolvendo consumidores e nutrição nos Estados Unidos são: frutas, hortaliças, grãos, alimentos fortificados e também alguns suplementos alimentares (IFIC, 2006).

Sendo assim, as frutas e as hortaliças vêm sendo estimuladas desde a década de 80 para consumo na população mundial (Singh et al., 2003), por apresentarem substâncias que estão relacionadas aos efeitos metabólicos ou fisiológicos no organismo humano, além de estarem vinculadas à atividade

antioxidante (seqüestro dos radicais livres), como as substâncias fenólicas (Wach et al., 2007).

A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade e, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química atualmente, boa parte das drogas prescrita no mundo é de origem vegetal (Figura 1). Embora exista um grande potencial na biodiversidade brasileira, são poucos os grupos trabalhando na área de caracterização de pigmentos, que fazem parte do metabolismo das plantas, a partir de frutos no nosso país.

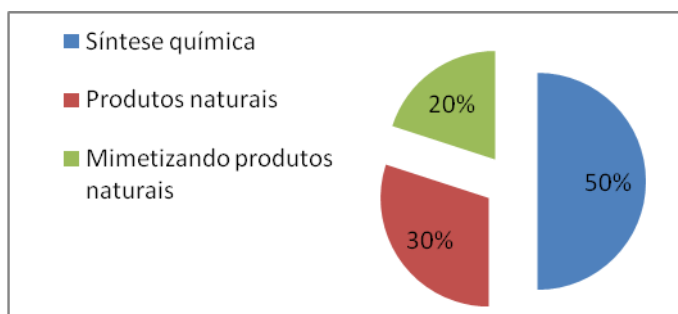


Figura 1: A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos. (Campos, 2008)

O metabolismo das plantas é dividido em metabolismo primário e secundário, mas, na realidade, não existe uma divisão exata entre os dois tipos. Admite-se, porém, que os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos, que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. E as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, são produtos do metabolismo secundário (Campos, 2008).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Entretanto, já foram reconhecidas várias funções atribuídas a essa classe de metabólitos (Campos, 2008). Atualmente, dentre os metabólitos secundários mais estudados na pesquisa científica estão os flavonóides, que constituem grupos de pigmentos vegetais com ampla distribuição na natureza, e relacionadas a uma gama variada de atividades biológicas e dentre elas, se destaca a atividade antioxidante e anti-inflamatória (Campos, 2008).

3.2 - Formação dos radicais livres (RL) X Antioxidantes

Os radicais livres (RL) são moléculas orgânicas e inorgânicas, que possuem átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (Schneider e Oliveira, 2004; Young e Woodside, 2001). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas.

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com várias doenças, incluindo doenças degenerativas, tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares. Os danos no DNA também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (Marion, et al.; 2009; Shami e Moreira, 2004).

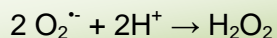
A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. Elas podem ser geradas por fontes endógenas, que se originam de processos biológicos que ocorrem no organismo como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases ou fontes exógenas como tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (Soares, 2002).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas *in vivo*, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, são altamente reativas e potencialmente prejudiciais. Estes são continuamente produzidos no corpo humano, pois são essenciais para o custo energético, desintoxicação, sinalização química, e função imunológica (Ali, et al., 2008; Schneider e Oliveira, 2004). Devido ao excesso de produção de espécies reativas, induzida pela exposição a substâncias oxidantes externas ou uma falha nos mecanismos de defesa, o dano para as estruturas de células, DNA, lipídios e proteínas pode aumentar o risco de mais de trinta diferentes doenças (Ali, et al., 2008). Nos processos biológicos há formação de uma variedade de radicais livres (Soares, 2002; Erenel et al., 1993), mas para essa dissertação serão utilizados radicais do oxigênio como o íon superóxido (O_2^-) e do nitrogênio como o óxido nítrico (NO) (será discutida no item 3.3).

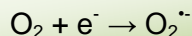
O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado pela reação entre moléculas de substâncias que participam da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e no retículo endoplasmático com o oxigênio, em decorrência do metabolismo aeróbico. As células fagocitárias produzem superóxido como parte do mecanismo de defesa imunológica para eliminar microorganismos patogênicos; nas doenças inflamatórias crônicas esta produção torna-se excessiva, provocando lesões nos tecidos (Mariod, 2009; Degáspari, 2004; Scheneider e Oliveira, 2004).

Se o O_2 é parcialmente reduzido pela recepção de dois elétrons, o produto é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reação 1); se receber apenas um elétron, o produto será o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Reação 2).

Reação 1:



Reação 2:



O H_2O_2 e o $O_2^{\cdot-}$ são extremamente tóxicos e sua toxicidade se deve, em grande parte, à conversão em radical hidroxila (OH^{\cdot}). Radicais livres como OH^{\cdot} causam quebra e modificações nas bases de DNA levando a alterações na expressão genética, mutação e apoptose celular, alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica produzida nas paredes do endotélio vascular contribui para a aterosclerose, risco de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (Halliwell, 2009; Degáspari, 2004; Scheneider e Oliveira, 2004).

Para tanto é comum o uso de substâncias antioxidantes que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos (Ali, et al., 2008; Vicentino e Menezes, 2007).

Estes podem ser naturais ou artificiais, o primeiro grupo encontram-se principalmente em plantas na forma de compostos fenólicos (flavonóides, ácidos e álcoois, estilbenos, tocoferóis, tocotrienóis), ácido ascórbico e carotenóides. Para o grupo dos antioxidante artificiais podem ser citados butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) (Mariod, et al.; 2009; Ali, et al.; 2008; Fang e Liu, 2002).

3.3 Imunofarmacologia

As fontes vegetais produzem um vasto número de substâncias que possuem várias atividades biológicas, incluindo propriedades imunomoduladoras e atividade antioxidante (Carlos, et al., 2005; Lelpo et al., 2000).

De acordo com Murakami e Ohigashi (2007), os macrófagos são as primeiras células a participar da resposta imunológica e podem ser ativados por uma variedade de estímulos. Sua principal função inclui a fagocitose de partículas estranhas, a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO).

O radical livre óxido nítrico (NO) é um gás formado na atmosfera durante tempestade com raios. É também formado numa reação catalisada por enzimas entre o oxigênio molecular e L-arginina em mamíferos, assim como em espécies mais primitivas (Rang, et al., 2001). É uma molécula utilizada no reino animal como um sinalizador nos sistemas cardiovascular e nervoso, desempenha um papel de defesa do hospedeiro, ou um agente tóxico entre as células (Coleman, 2001; Rang, et al., 2001).

O NO também tem um importante papel no sistema imunológico. Ele está envolvido na patogénia e controle de doenças infecciosas, tumores, processos auto-imunes e doenças degenerativas crônicas (Bogdan, 2001).

Além disso, essa molécula também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. Assim, está demonstrada sua ação antibacteriana, antiviral e antiparasitária (Coleman, 2001).

3.3.1- Síntese de NO

A síntese do NO é intermediada por um grupo de enzimas chamadas de óxido nítrico sintases (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. Óxido nítrico sintase (NOS) é uma enzima que catalisa a conversão de L-arginina em L-citrulina com formação estequiométrica de óxido nítrico (NO), um radical gasoso (Chae et al.; 2009; Murakami e Ohigashi 2007).

Tais sintases catalisam a oxidação de uma molécula de L-arginina pelo oxigênio molecular obtendo como produto final L-citrulina e uma molécula de NO (Vieira, 2007; Guzik, et al., 2003). Nesta reação a L-arginina é transformada em um intermediário, a NG-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH) e Ca^{2+} sendo necessário mais NADPH e (O_2) para a formação de L-citrulina e NO (Vieira, 2007).

A NOS é uma proteína dimérica e o monômero de suas isoformas possui massa molecular que varia de 135 a 164 kDa (Cerqueira e Yoshida, 2002; Rang, et al., 2001). NOS está classificado em subfamílias de acordo com a localização da expressão no corpo e forma de expressão, ou seja, constitutiva ou induzida (Murakami e Ohigashi 2007).

NOS constitutiva (cNOS) é detectada no tecido neuronal (nNOS) e vasculares, e nas células endoteliais (eNOS), enquanto NOS induzida (*iNOS*) é expressa em uma variedade de tipos de células incluindo macrófagos, células da microglia, queratinócitos, hepatócitos, astrócitos e do endotélio vascular e células epiteliais, em circunstâncias normais e condições patológicas. Com estímulos pró-inflamatórios e infecciosos, a proteína *iNOS* é altamente induzida a produzir NO em um intervalo micromolar, ao passo que a geração de NO a partir de enzimas nNOS e eNOS é constante e dentro do intervalo nanomolar (Murakami e Ohigashi 2007).

As duas cNOS são classificadas como cálcio-dependentes, pois necessitam de Ca^{2+} para sua ativação, ou seja, é necessária determinada concentração de Ca^{2+} intracelular para existir a atividade enzimática, caso ocorra queda no nível de Ca^{2+} as enzimas tornam-se inativas. Já a *iNOS* é classificada como cálcio-

independente, pois sua ativação não é regulada pela presença de Ca^{2+} (Viera, 2007; Guix et al., 2005; Rang, et al., 2001).

Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio (Dusse et al., 2003). Na célula-alvo, o NO combina-se com grupos metais de enzimas responsáveis pela síntese de DNA e pelo ciclo respiratório, levando à morte celular (Vieira, 2007).

O NO é uma molécula efetora bactericida do sistema imune inato podendo inibir a síntese do DNA da bactéria através da inibição da ribonucleotídeo redutase bacteriana (Vieira, 2007). O NO produzido pela *iNOS* também tem importante função na inibição da replicação de uma variedade de vírus (Herpesvírus, Picornavírus e Coronavírus) sendo as proteases virais o alvo do NO.

A produção de NO aumenta durante a inflamação e exerce efeitos pró-inflamatórios e regulatórios. Resultados experimentais mostram que compostos capazes de inibir a produção de NO, por inibir a expressão ou a atividade da *iNOS*, possuem alto potencial como agentes anti-inflamatórios (Hamalainen et al., 2007).

iNOS é altamente expressa em macrófagos ativados com LPS (Lipopolissacarídeo) ou citocinas e desempenha um papel no desenvolvimento e manutenção da inflamação e dor. Assim, a produção de NO pela *iNOS* pode refletir o grau de inflamação e fornecer um padrão para avaliar o efeito das drogas sobre a resposta no processo inflamatório (Chae, et al., 2009; Murakami e Ohigashi 2007).

Alguns estudos relacionados à atividade inibidora de NO por produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias têm sido relatados na literatura, como é o caso do estudo da flavona wagonina e quercetina e sua capacidade de inibir a produção de NO e a expressão da enzima *iNOS* (Huang et al., 2007; Garcia-Mediavilla et al.; 2006).

3.4 – Flavonóides

Os flavonóides despertam interesse de uma gama de estudiosos por sua química, ocorrência, distribuição natural e funções biológicas (Harborne e Mabry, 1982).

Dentro do subgrupo de flavonóis e flavonas, o flavonol quercetina é o composto mais frequente em alimentos. Também se destacam a miricetina e o kaempferol, e entre as flavonas encontram-se a apigenina e a luteolina. O chá verde (*Camellia sinensis*) e a cebola são as principais fontes alimentares de flavonóis e flavonas. A quercetina é o flavonóide mais abundante presente nas cebolas, enquanto que o chá contém notáveis concentrações de ambos os flavonóides quercetina e kaempferol (Lolito e Frei, 2006; Moon, et al., 2006; Ross e Kasum, 2003).

Os flavonóides são pigmentos vegetais e foram identificados pela primeira vez em 1930, pelo Dr. Szent György, a partir da casca do limão, onde foi extraída a citrina, uma substância que possuía certa capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Este trabalho foi publicado em 1936 por Ruzsnyak e Szent-Gyorgyi (Ross e Kasum, 2003).

3.4.1- Biossíntese

Os flavonóides, junto com os isoprenóides e alcalóides, compreendem as três maiores classes de metabólitos secundários, são únicos nos vegetais e são parte essencial na adaptação à vida num ambiente adverso e inconstante (Ribani, 2006; Winkel-Shirley, 2001). Na maioria das espécies de plantas, o excesso de luz e alta radiação UV desencadeiam um aumento na síntese e acúmulo de compostos não fotossintéticos relacionados a via dos fenil propanóides contendo o esqueleto C6-C3 (fenil propano), derivados do ácido cinâmico, sintetizado a partir do ácido chiquímico (Ribani, 2006).

O esqueleto carbônico dos flavonóides resulta de rotas biossintéticas mistas (Figura 2): a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido mevalônico (Harborne, 1994). A chalcona sintase é a enzima que cataliza a formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos os flavonóides são formados, pela condensação de três moléculas de malonil-CoA com uma molécula de 4-coumaroil-CoA, (C6-C3). O substrato éster da CoA do ácido cinâmico vem da fenilalanina. A fenilalanina amônio liase canaliza o esqueleto C6-C3 da fenilalanina via o ácido *trans*-cinâmico pelo metabolismo de fenilpropanóides. A introdução da função hidróxi na posição 4 do ácido *trans*-cinâmico é catalizada pela cinamato 4-hidroxilase, fornecendo o 4-coumarato. O ácido hidróxi-cinâmico é ativado para futuras reações, pela formação de um éster da CoA (4-coumaroil-CoA), substrato preferido pela chalcona sintase. O segundo substrato da chalcona sintase, o malonil-CoA, é sintetizado a partir da acetil-CoA e CO₂. Através de subseqüentes hidroxilações e reduções, os vegetais sintetizam as diferentes classes dos flavonóides (Ribani, 2006; Forkmann e Martens, 2001).

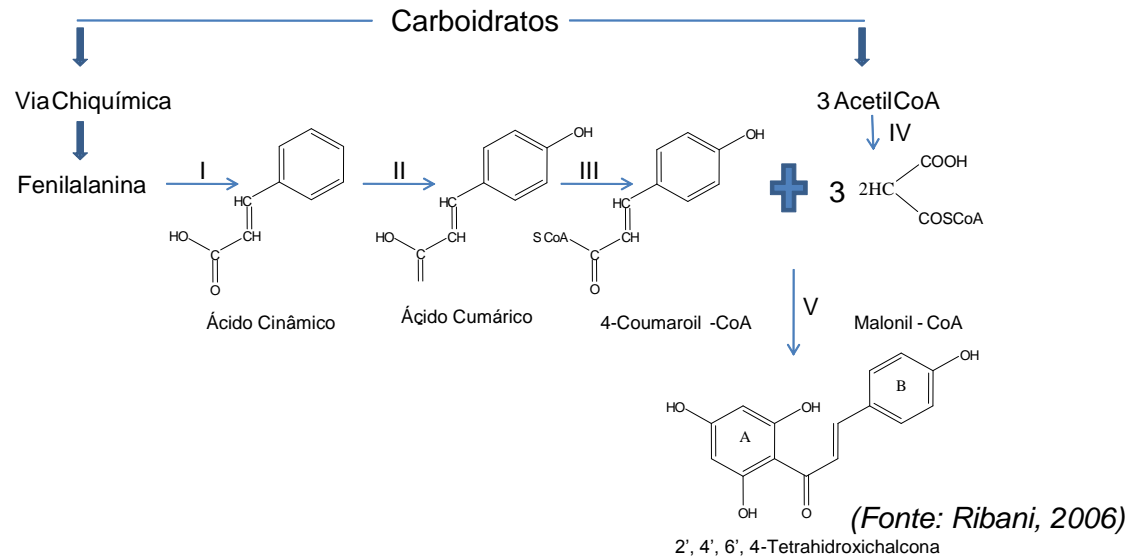


Figura 2: Biossíntese geral dos flavonóides, ilustrando as etapas da formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos os flavonóides são formados. As enzimas são: I-Fenil amônia liase; II-Cinamato 4-hidroxilase; III-4-coumarato:CoA ligase; IV- Acetil-CoA carboxilase; V-Chalcona sintase.

3.4.2 Propriedades Químicas:

Os flavonóides são ácidos fracos e, como são compostos polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações destes solventes com água. Podem sofrer degradação em meio alcalino na presença de oxigênio. Apresentam intensa absorção no UV, aproximadamente em 350 nm devido à presença de ligações duplas conjugadas com os anéis aromáticos (Harborne, 1994).

Podem-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais, entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental arranjados na configuração C6- C3- C6 (Figura 3). Os flavonóides consistem de dois anéis benzênicos (A e B), que são conectados por um anel de três carbonos contendo oxigênio (anel C). O anel C pode ter forma cíclica piranóica (núcleo flavonóide básico) ou ainda conter um grupo carbonila na posição 4 (Otaki, et al., 2009; Pozzi, 2007; Ribani, 2006). A figura 3 mostra a estrutura dos flavonóides e sua numeração para distinguir a posição dos carbonos ao redor da molécula.

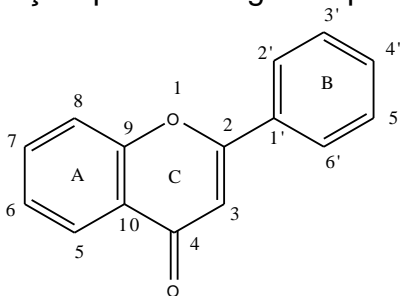
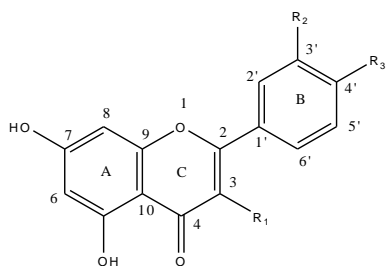


Figura 3: Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.

A variação estrutural no anel C subdivide os flavonóides em seis principais sub-classes como ilustrado na figura 4: flavonóis (p.ex., quercetina, kaempferol, miricetina), contendo uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do anel C; flavonas (p.ex., luteolina, apigenina), contendo apenas carbonila na posição 4; flavanóis (p.ex. catequina) contendo apenas a hidroxila no C-3, porém sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3; flavanonas contendo apenas a carbonila no C-4, também sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3; antocianidinas (p.ex., cianidina, pelargonidina) apenas contendo a hidroxila no C-3; isoflavonas (p.ex., genisteína,

daidzeína) em que o anel B está localizado na posição C-3 do anel C (Otaki, et al., 2009; Ribani, 2006; Ross e Kasum, 2002; Harborne, 1994). Mais de 5000 subclasses dos flavonóides foram identificadas em 1990 (Ross e Kasum, 2002).

1a e b)



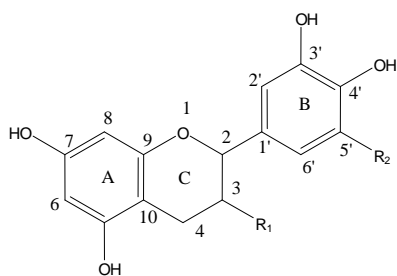
1-a Flavonóis

	R ₁	R ₂	R ₃
Quercetina	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	H	OH

1-b Flavonas

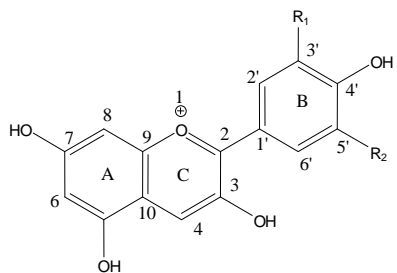
	R ₁	R ₂	R ₃
Luteolina	H	OH	OH
Apigenina	H	H	OH

2)



2) Flavanóis

	R ₁	R ₂
Catequina	OH	H



3) Antocianidina

	R ₁	R ₂
Cianidina	OH	H
Malvidina	OCH ₃	HCH ₃

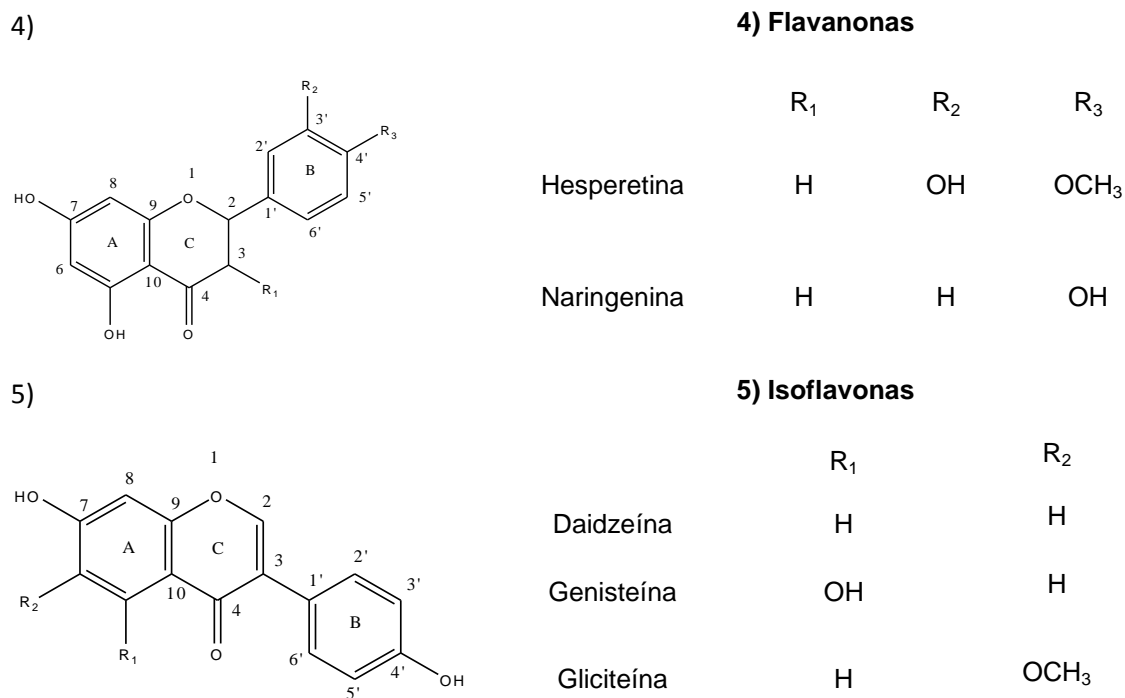


Figura 4 - Algumas subclasses de flavonóides.

A estrutura e a função dos flavonóides variam de acordo com sua substituição, como a glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outros (Harborne, 1994).

São encontrados em plantas principalmente na forma conjugada, como glicosídios, pelo menos 8 monossacarídeos diferentes ou combinações desses (di ou trissacarídeos) podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilas da aglicona, resultando no grande número de flavonóides conhecidos (Ross e Kasum, 2002; Harborne, 1994).

De acordo com Campos (2008), diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, dentre as quais podemos citar, proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta (UV) e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, controle da ação de hormônios vegetais, inibidores de enzimas. Os efeitos bioquímicos e

farmacológicos dos flavonóides são muito vastos, dentre eles destacam-se ações como sequestro de radicais livres (antioxidantes), anti-inflamatórias, anti-hepatóxica, antialérgica, antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana, fungistática, antiviróticos, entre outros (Huang, et al., 2007, Muzitano, et al., 2006).

3.5- Escolha do material vegetal

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira, é uma espécie nativa da flora brasileira e faz parte da diversidade da região de Campos dos Goytacazes (Carvalho, et al., 2006). Seus frutos são utilizados como condimentos na culinária, e popularmente é empregada como anti-inflamatória e antifebriífera, porém são poucos os trabalhos acerca deste fruto na literatura. Por esta razão, essa fonte vegetal foi escolhida para um estudo da composição, quanto aos compostos fenólicos atrelados a atividade biológica.

3.5.1- Descrição Botânica

Anacardiaceae é uma família botânica representada por 70 gêneros e cerca de 700 espécies. No Brasil ocorrem cerca de 15 gêneros e cerca de 70 espécies. Possuem distribuição tropical e subtropical (Souza e Lorenzi, 2005).

Schinus terebinthifolius Raddi é largamente distribuída por todo território brasileiro, de Alagoas até Rio Grande do Sul e pode ser encontrada na Europa, onde a cultivam como espécie ornamental (Corrêa, 1984). É conhecida por diversos nomes populares, como aroeira-mansa, aroeira-vermelha, araguaraíba, brazilian pepper, christmas berry, florida holly, false pepper, entre outros.

A aroeira é uma árvore de médio porte. Atinge a altura de 5 a 10 metros. Suas folhas são verde-escuras, compostas, oblongas a elípticas e com nervura proeminentes na parte de cima do limbo.

Os frutos (Figura 5) são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos. A casca é vermelha, seca e envolve a única semente, que é

única, marrom escura e mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (Degáspari, et al., 2004)



Figura 5: Os frutos de *Schinus terebinthifolius*.

Este fruto insere-se entre as muitas especiarias existentes e que são utilizadas para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária mundial. O seu sabor suave e levemente picante, como sua bonita aparência, de uso decorativo, permite o seu emprego podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moídos. No entanto, a aroeira é especialmente apropriada para a confecção de molhos que acompanham as carnes brancas, de aves e peixes, por não abafar o seu gosto sutil, e também salames, chocolate e massas (Degáspari, et al., 2004).

3.6 Principais constituintes químicos da família Anacardiaceae

A família anacardiaceae é quimicamente caracterizada pela presença de compostos fenólicos incluindo flavonóides (Di Stasi e Hiruna-Lima, 2002; Schimidt et al., 1998); sendo o ácido anacárdico ($C_{22}H_{32}O_3$) (Figura 6), normalmente presente nos frutos, o que torna a presença dessa substância uma característica marcante das espécies dessa família (Di Stasi e Hiruna-Lima, 2002).

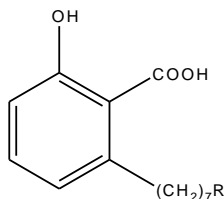


Figura 6: Estrutura química do ácido anacárdico.

(Fonte: Di Stasi & Hiruna-Lima, 2002)

3.6.1 Gêneros mais representativos da família Anacardiaceae

Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Rhus* (*Toxicodendron*), *Mangifera*, *Schinus*, *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea* (Correia, et al., 2006). Cerca de 25% dos gêneros dessa família são populares por possuírem espécies reconhecidas como tóxicas e causadoras de dermatite de contato severa. De modo geral, as espécies venenosas desta família estão restritas aos gêneros *Anacardium*, *Rhus* e *Semecarpus* (Correia, et al., 2006).

Nesta revisão bibliográfica, as substâncias fenólicas receberam destaque, de acordo com o perfil do trabalho, com ênfase nos flavonóides, que foram isolados a partir dos gêneros mais pesquisados no Brasil na família Anacardiaceae.

Para o maior gênero da família anacardiaceae, *Rhus*, destacam-se os biflavonóides hinokiflavona, amentoflavona, agathisflavona, robustaflavona, rhusflavanona, succedaneafavanona e rhusflavona (Correia, et al., 2006). Todos com atividade biológica importante, como inibição da enzima transcriptase reversa (HIV-1-RT), que atua na replicação do vírus HIV. Outras atividades são antimalárica (Ahamed, et al., 2001), antiviral (Zembower, et al., 1998) e citotóxica (Lin, et al., 1989).

De acordo com Correia e colaboradores (2006), para o gênero *Mangifera* destacam-se os flavonóides catequina e epi-catequina, além de ácido hidróxi-benzóico, galatos de alquila, ésteres do ácido benzóico, todos com comprovada atividade antioxidante.

Para o gênero *Anacardium*, onde seu representante mais conhecido é o cajú, destacam-se os ácidos anacárdicos, juntamente com os alquilresorcinóis. Entre as atividades biológicas citam-se a atividade antitumoral, antiacne, antibacteriana, moluscocida e antifúngica (Correia, et al.; 2006). Dos flavonóides isolados a partir deste gênero, destacam-se a quercetina, mirecetina e o Kaempferol.

Os diidroflavonóis 4',7-di-O-methildihidroquercetina, 4',7-di-O-methildihidrokaempferol, 3',5-diidroxi-4',7-dimethoxidihidroflavonol foram isolados a partir do gênero *Lannea* (Islam e Tahara, 2000).

De acordo com Kawashty e colaboradores (2000) para o gênero *Pistacia* destacam-se os flavonóides cianidina-3-galactosídeo, diidroquercetina, taxifolina, distilina, fisetina e naringenina, kaempferol-3-glucosídeo, quercetina-3-glucosídeo, quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-rutinosídeo, quercetina-7-galactosídeo, apigenina-6,8-di-C-glicosídeo, miricetina-3-glicosídeo, miricetina-3-galactosídeo e miricetina-3-rutinosídeo.

A partir do gênero *Tapirira* foram isolados terpenos, ferulatos e derivados de alquil e os flavonóides kaempferol 3- α -raminosídeo, kaempferol 3- α -arabinofuranosídeo e quercetina 3- α -raminosídeo também conhecida como quercetrina.

Para gênero *Semecarpus*, os flavonóides 3,4,2,4-tetrahidroxichalcona e 7,3,4-triidroxiflavona apresentam efeitos anti-inflamatórios *in vivo* (Selvam, et al., 2004).

De acordo com Njoku e Akumefula (2007) para o gênero *Spondias*, destacam-se os altos teores de alcalóides, flavonóides, taninos e saponinas. Os estudos acerca deste gênero se concentram principalmente em nível de caule, onde é produzida uma goma clara muito solúvel em água que é rico em polissacarídeos (Njoku e Akumefula, 2007).

A partir do gênero *Lithraea*, as substâncias isoladas foram os catecóis 3-Pentadecenil, 3-heptadecdienil, 3-heptadecenil e 3-pentadecil, bem como os resorcinóis (Z,Z)-5-(trideca-4,7-dienil), (Z)-5-(trideca-4-enil), (Z,Z,Z)-5-(trideca-4,7,10-trienil) e (Z,Z,E)-5-(trideca-4,7,10-trienil) (Araújo, et al., 2006).

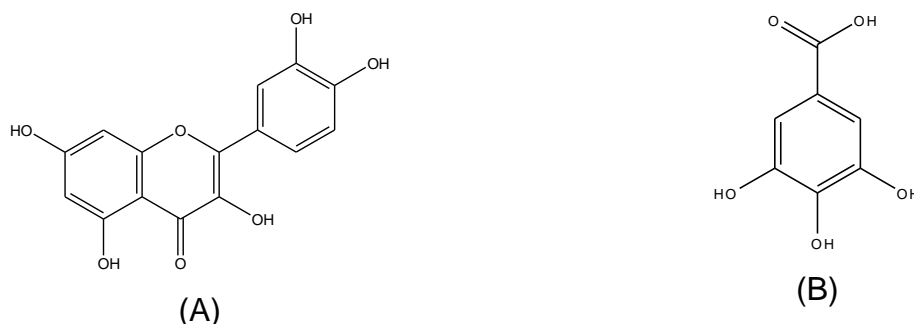
Para o gênero *Melanorrhoea*, os flavonóides e as substâncias fenólicas ainda não foram isolados (Science direct, 1980 a 2009).

Relacionada ao gênero *Schinus*, que compreende cerca de 40 espécies, dentre elas, se encontra a espécie *Schinus terebinthifolius*, escolhida para compor essa dissertação de mestrado, alguns flavonóides foram identificados.

Quanto a espécie *Schinus leucifolius* estudos indicaram a presença do flavonóide (Figura 7) quercetina e do ácido gálico (Viana, et al., 1995).

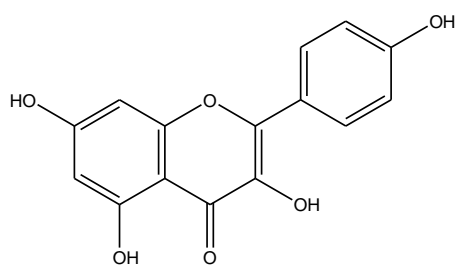
Estudos relacionados à constituição química da espécie *Schinus molle* L. permitiram isolar os flavonóides quercetina, isoquercitrina 6"-O-p-hidroxibenzoato e 2"-O- α -L-ramnopiranosil-hisperina 6"-O-galato, o esteróide α -amirina, o ácido 3-epiisomasticadienólico e um éster 13 α ,14 β ,17 α ,20S,24Z-3-oxalanosta-8,24-dien-26-metil-éster (Figura 8) (Marzouk et al., 2006; Viana et al., 1995).

Para a espécie *Schinus polygamus* foram extraídos o β - sitosterol, o ácido chiquímico e a quercetina, e esta última que justifica as atividades anti-inflamatórias, analgésica e antimicrobiana para a espécie (Figura 9) (Erazo, et al., 2006).

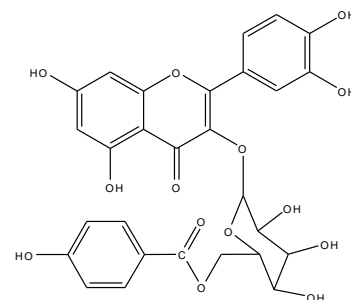


(Fonte: Viana, et al., 1995)

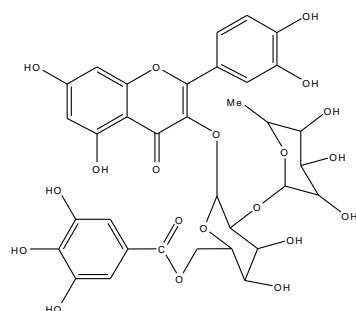
Figura 7: Estrutura química das substâncias isoladas de *Schinus leucifolius*. (A) quercetina e (B) ácido gálico.



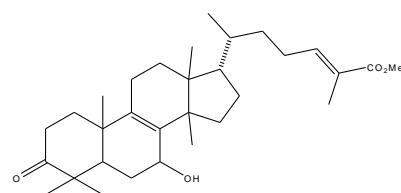
(A)



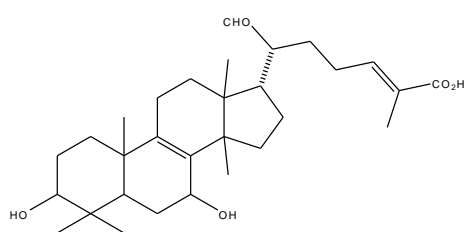
(B)



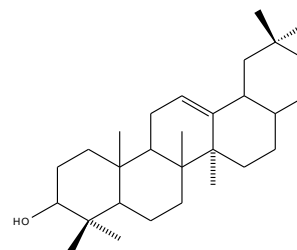
(C)



(D)



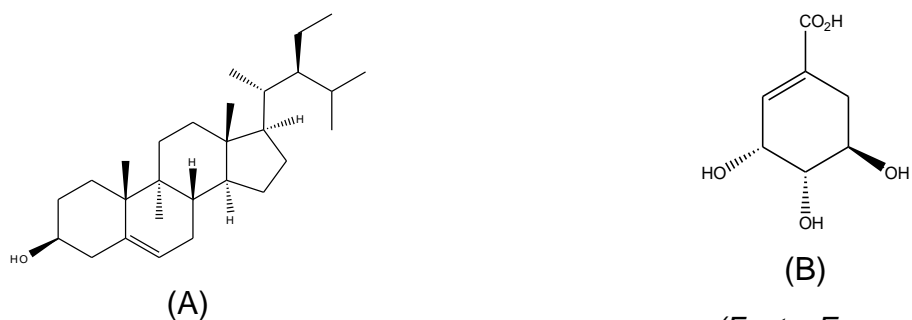
(E)



(F)

(Fonte: Marzouk, et al., 2006)

Figura 8: Algumas estruturas químicas das substâncias isoladas de *Schinus molle*. (A) quercetina, (B) isoquercitrina 6''-O-*p*-hidroxibenzoato, (C) 2''-O- α -L-ramnopiranosil-hesperina 6''-O-galato, (D) α -amirina, (E) ácido 3-epiisomasticadienónico e (F) 13 α ,14 β ,17 α ,20S,24Z-3-oxalanosta-8,24-dien-26-metil-ester.



(Fonte: Erazo, et al.; 2006)

Figura 9: Estrutura química das substâncias isoladas de *Schinus polygamus*. (A) β -Sitosterol e (B) ácido chiquímico

Estudos químicos e biológicos efetuados a partir de espécies do gênero *Schinus* descrevem a ocorrência de terpenóides, ácidos graxos e flavonóides em *S. terebinthifolius*.

Para uma melhor organização para esta espécie, serão apresentadas as substâncias isoladas a partir dos frutos de *Schinus terebinthifolius*, seguido das pesquisas a partir das folhas da fonte vegetal.

Dentre os terpenóides, dois triterpenos isolados do extrato de acetato de etila dos frutos de *S. terebinthifolius* foram caracterizados como inibidores específicos da fosfolipase A_2 (Jain, et al., 1995). Onde 1 representa o ácido masticadienóico e 2 representa o álcool schinol, sua estrutura molecular está esquematizado na figura 10.

1 R = α -OH, H; 2 R = (=O)

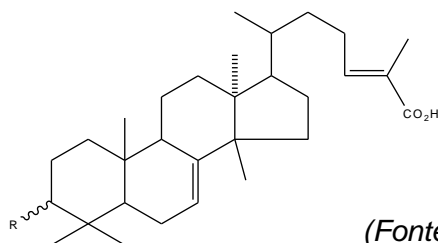


Figura 10: Estrutura molecular do ácido masticadienóico e do álcool schinol.

De acordo com o trabalho de Degáspari e colaboradores (2005), os frutos da aroeira-vermelha apresentam baixo teor de compostos fenólicos, quando comparados a outros vegetais.

O extrato alcoólico apresentou concentração significativa da flavona apigenina, além de ácido elágico. Já na amostra obtida a partir do extrato aquoso, foi avaliada baixa concentração da flavanona naringina (figura 11) (Degáspari, et al.; 2005).

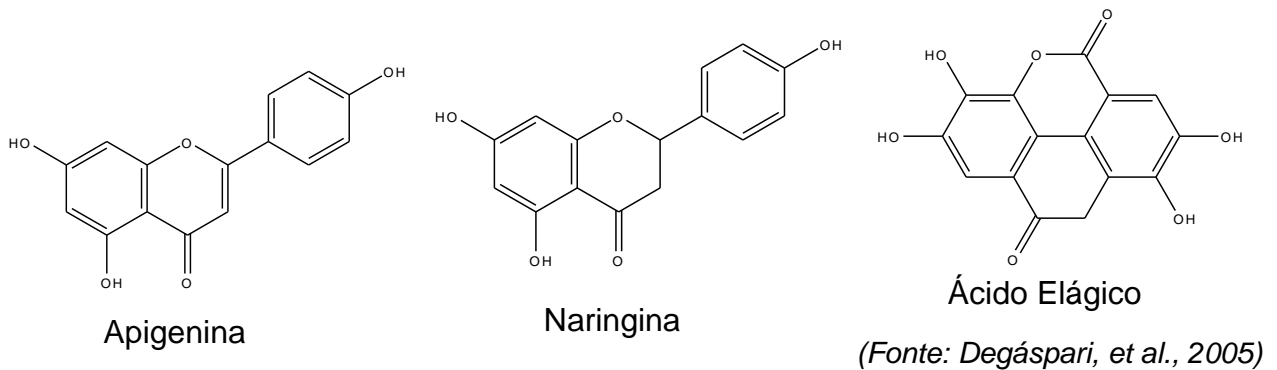
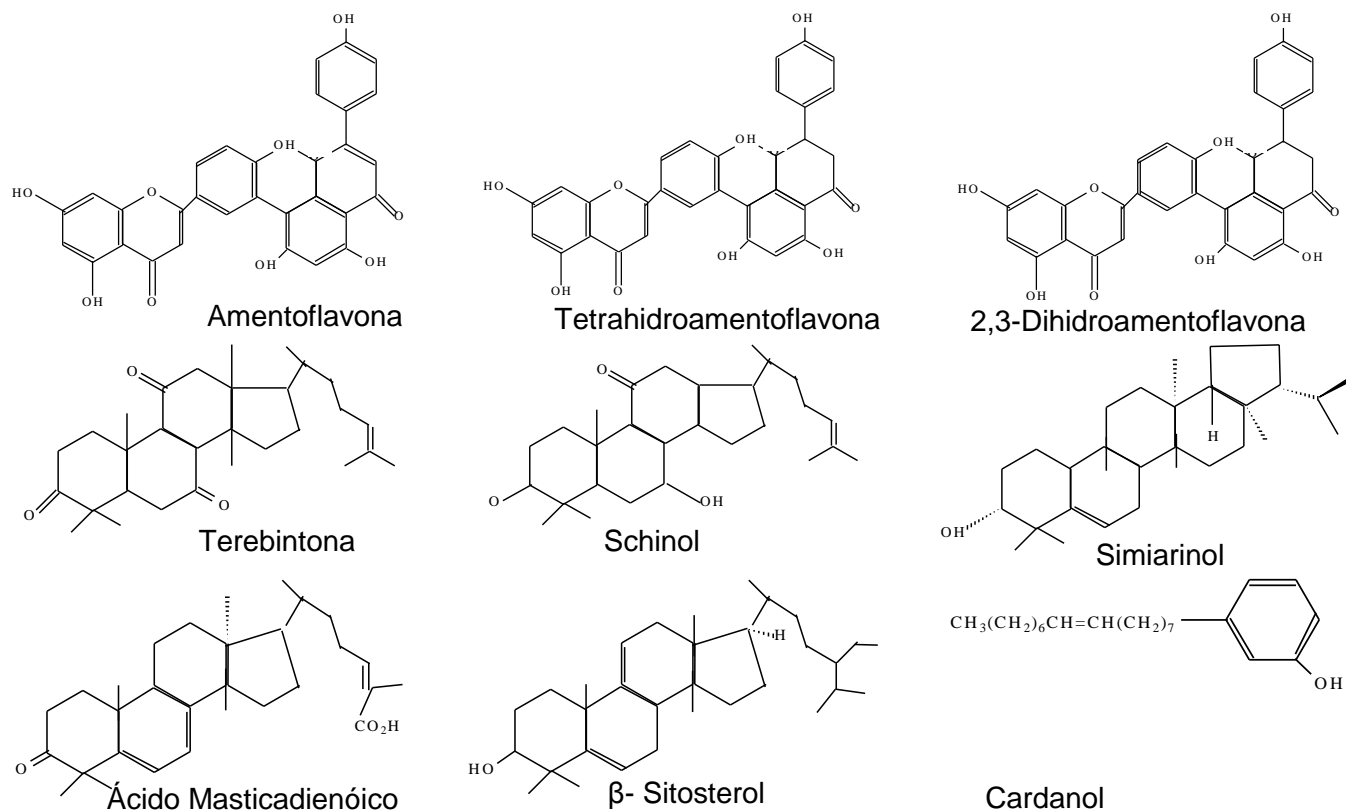


Figura 11: Estrutura química dos constituintes caracterizados a partir dos frutos da aroeira.

No trabalho de Barbosa e colaboradores (2007), foram analisados os óleos voláteis dos frutos e das folhas de *Schinus terebinthifolius*. Entre as amostras de óleos presentes nas folhas frescas, folhas frescas em floração e nos frutos verdes se observa a predominância dos mesmos constituintes químicos, destacando-se os compostos β -pineno (10,21%), α -terpineol (5,35%), β -elemeno (5,92%), (E)-cariofileno (13,61%), germacreno-D (37,55%), biciclogermacreno (20,82%), Epi- α -murolool (9,89%), δ -cadineno (15,48%) e α -cadinol (20,60%), a maioria sesquiterpenos.

A amostra de óleo presente nos frutos maduros e na amostra de óleo comercial, destacam-se os compostos α -pineno (18,82%), β -pineno (5,02%), α -felandreno (23,55%), δ -3-careno (29,22%), β -felandreno (18,08%) e germacreno-D (11,89%), a maioria monoterpenos.

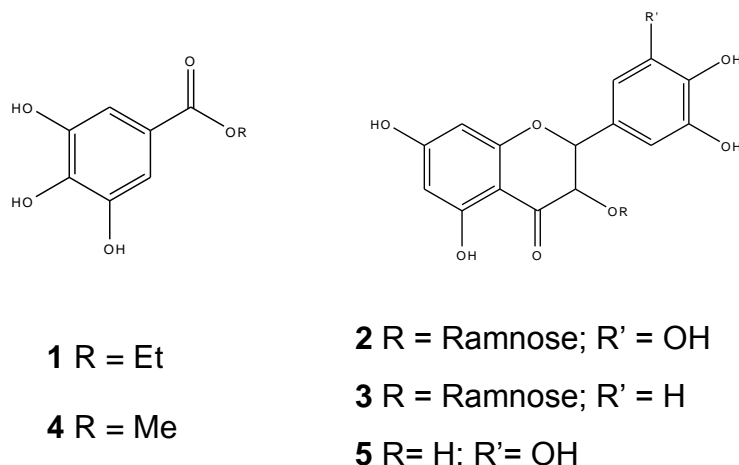
A partir das folhas de *S. terebinthifolius*, Viana, et al., (1995) relataram a detecção dos flavonóides amentoflavona, tetrahydroamentoflavona, 2,3-dihydroamentoflavona, dos esteróides schinol, simiarinol e β -sitosterol, além do ácido masticadienóico e do álcool de cadeia longa cardanol (Figura 12).



(Fonte: Viana, et al., 1995)

Figura 12: Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

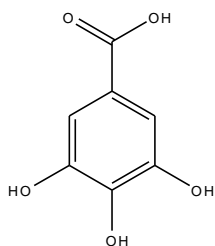
No trabalho de Ceruks e colaboradores (2007), a partir das folhas de *Schinus terebinthifolius*, foram isolados a partir da fração em acetato de etila, oriunda do extrato em etanol, o galato de etila (1), miricetrina (2), quercitrina (3), galato de metila (4) e miricetina (5), como mostra a figura 13.



(Fonte: Ceruks, et al., 2007)

Figura 13: Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

No trabalho de Santos (2009), foi isolado a partir das folhas de aroeira o ácido gálico (Figura 14) com potencial alelopático.



(Fonte: Santos, 2009)

Figura 14: Estrutura química do ácido gálico isolado das folhas de aroeira.

Portanto, nesta revisão bibliográfica foram verificadas a ocorrência de 36 flavonóides isolados a partir da família Anacardiaceae, e outras substâncias com diversas atividades biológicas.

A tabela 1 destaca os flavonóides isolados a partir da família Anacardiaceae, ressaltando que o flavonóide quercetina foi isolado em cinco dos onze gêneros mais

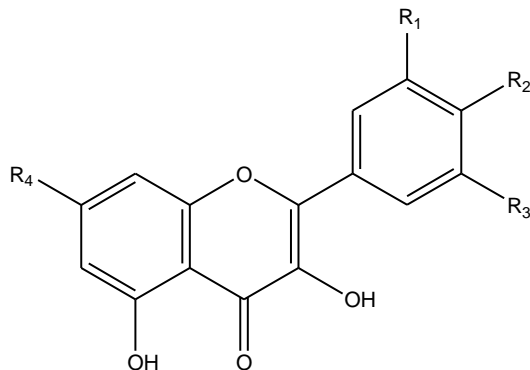
representativos desta família no Brasil, seguido pelo flavonol kaempferol, cujo esqueleto da aglicona se encontra a partir de quatro dos onze gêneros (Figura 15).

O flavonóide mirecetina, se destaca em três gêneros da família Anacardiaceae, este fato corrobora com O`Prey e colaboradores (2003) que relatam que entre os flavonóides da dieta humana, a quercetina representa cerca de 60% do consumo total dos flavonóides, o kaempferol, a apigenina, a luteolina e os derivados de miricetina compreendem apenas os outros 40 %.

Todos os demais flavonóides identificados contribuem com apenas uma ou duas citações em cada gênero.

Os gêneros *Lithaea*, e *Melanorrhoea* não foram encontrados essa classe de substâncias. Para o gênero *Spondias*, foi detectado apenas um único registro sobre altos teores de flavonóides.

O gênero *Pistacia* é aquele que apresenta o maior número de contribuições sobre a ocorrência dos flavonóides (15), seguido de *Schinus* com 11 citações para essa classe de substâncias.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Quercetina	OH	OH	H	OH
Kaempferol	H	OH	H	OH
Mirecetina	OH	OH	OH	OH

Figura 15: O esqueleto das três agliconas de maior destaque na família Anacardiaceae.

Tabela 1: Ocorrência dos flavonóides na família Anacardiaceae por gênero botânico

<i>Rhus</i>	<i>Mangifera</i>	<i>Anacardium</i>	<i>Lanea</i>	<i>Pistacia</i>	<i>Tapirira</i>	<i>Semecarpus</i>	<i>Schinus</i>
Hinokiflavona	Catequina	Quercetina	4',7-di-O-methildihidroquercetina	cianidina-3-galactosídeo	kaempferol 3- α -raminosídeo	3,4,2,4-tetrahidroxichalcona	Quercetina
Amentoflavona	Epi-catequina	Mirecetina	4',7-di-O-methildihidrokaempferol	Dihidroquercetina	kaempferol 3- α -arabinofuranosídeo	7,3,4-triidroxiflavona	isoquercitrina 6"-O-p-hidroxibenzoato
Agathisflavona		Kaempferol	4',7-di-O-methildihidrokaempferol	Taxifolina	Quercetrina		2"-O- α -L-ramnopiranosil-hisperina 6"-O-galato
Robustaflavona				Distilina			apigenina
Rhusflavanona				Fisetina			naringina
Succedanea				Naringenina			amentoflavona
Rhusflavona				kaempferol-3-glucosídeo			tetrahydroamentoflavona
				quercetina-3-glucosídeo			2,3-dihidroamentoflavona
				quercetina-3-galactosídeo			miricetrina
				quercetina-3-rutinosídeo			quercitrina
				quercetina-7-galactosídeo			mirecetina
				apigenina-6,8-di-C-glicosídeo			
				miricetina-3-glicosídeo			
				miricetina-3-galactosídeo			
				miricetina-3-rutiínoídeo			

Para este trabalho de dissertação de mestrado, que versa sob a espécie *Schinus terebinthifolius*, foram encontrados nove relatos sobre o isolamento dos flavonóides a partir das folhas, sendo que dois destes possuem esqueleto compatível com a quercetina. Com relação aos frutos, apenas dois flavonóides foram identificados (naringina e apigenina) (Degáspari, et al., 2005), o que faz desta parte da planta alvo de pesquisas.

A figura 16 exemplifica o quão representativo são os flavonóides nesta família, gênero e espécie. Mostrando que os flavonóides presentes nos frutos de *Schinus terebinthifolius* correspondem a apenas 3% de todas as pesquisas com este enfoque para a família Anacardiaceae, refletindo a importância deste estudo para os frutos de aroeira ainda tão pouco explorados sob o ponto de vista químico e biológico.

Vale a pena ressaltar que a quercetina é o flavonóide mais abundante nesta família, uma vez que foram isolados e identificados oito esqueletos compatíveis com esta aglicona a partir dos gêneros *Anacardium*, *Pistacia* e *Schinus*.

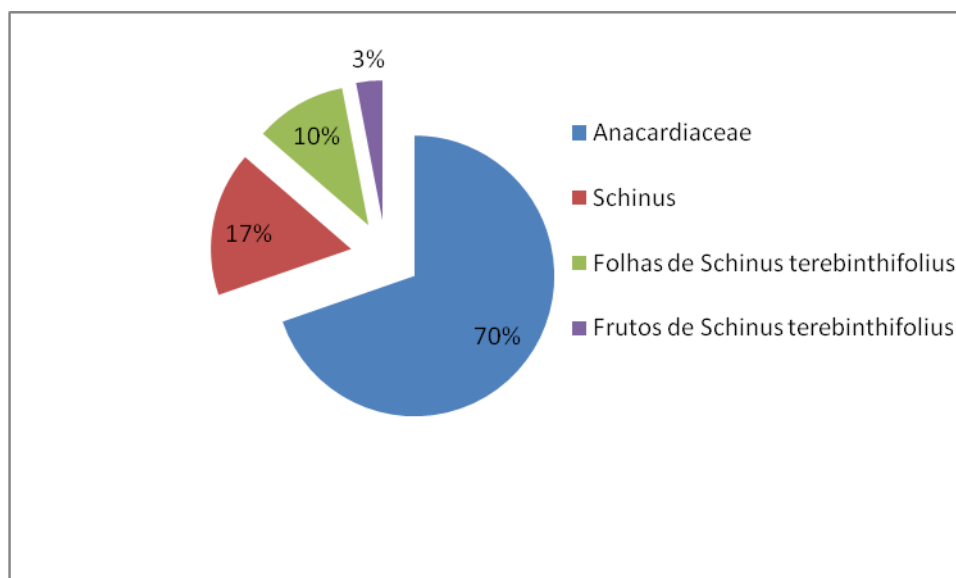


Figura 16: Representação esquemática dos flavonóides presentes na família Anacardiaceae, no gênero *Schinus* e na espécie *Schinus terebinthifolius*.

3.7 Propriedades medicinais

3.7.1 Propriedades medicinais dos frutos de *Schinus terebinthifolius*

Aos frutos desta espécie vegetal, atribui-se propriedade diurética (Corrêa, 1984), entretanto, a maior aplicabilidade se encontra na culinária, sob a forma desidratada dos frutos que são conhecidos como pimenta rosa.

Em 1999 foi lançada no Brasil uma preparação farmacêutica em gel contendo extrato de aroeira. Utilizado no tratamento da vaginose bacteriana apresentou taxa de cura de 84% para o grupo dos tratados com o gel, contra 47,8% para o grupo do placebo (Amorim e Santos, 2003).

Com relação à sua ação antimicrobiana, observou-se que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e do *Bacillus cereus* ATCC 11778. O extrato aquoso não apresentou efeito inibitório aos microrganismos testados (Degáspari, et al., 2005).

3.7.2 Propriedades medicinais das folhas de *Schinus terebinthifolius*

As folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi apresentam propriedades adstringente, antidiarréica, anti-inflamatória, depurativa, diurética e febrífuga (Ceruks, et al.; 2007).

De acordo com Martínez, et al., (1996), o extrato etanólico das folhas da aroeira apresentaram a melhor atividade antibacteriana entre as 12 espécies de plantas avaliadas. As cepas testadas foram de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* e *Candida albicans*.

Em um estudo realizado por Braga, e colaboradores (2007), foi considerado que entre os 24 extratos metanólicos utilizados contra *Leishmania amazonensis*, o extrato preparado a partir das folhas de *Schinus* se apresentou como potente inibidor do crescimento do microorganismo.

No trabalho de Cavalher-Machado e colaboradores (2008), o estudo a partir da fração em acetato de etila das folhas de aroeira, mostraram

propriedade antialérgica, inibindo a liberação de histamina durante a degranulação dos mastócitos, diminuindo a formação de edema e influxo de eosinófilos.

Além destas atividades, estudos na literatura mostram o potencial antioxidante observado para o extrato metanólico das folhas da aroeira quando comparados com o radical livre DPPH, onde o valor do IC₅₀ para o extrato a partir das folhas é de 8.8 µg/mL de amostra para reduzir completamente esta espécie radicalar (Ceruks, et al., 2007).

Vale a pena ressaltar, que todos os trabalhos publicados (Web of Science e Science Direct, 1980 a 2009) a partir dos frutos e folhas de aroeira se concentram em nível dos extratos, sendo esse trabalho pioneiro no que se refere ao isolamento e caracterização de uma substância presente nas cascas dos frutos de aroeira com atividade biológica.

4- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relacionados a parte química foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), com a colaboração do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR), do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) para toda a parte imunofarmacológica e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

4.1 Coleta de material vegetal

Foram coletados os frutos de aroeira no distrito de Farol de São Tomé, localizado no município de Campos dos Goytacazes - RJ (Latitude = 21° 44' Sul; = 41° 18' Oeste = altitude 12 m do nível do mar). Os períodos de frutificação são nos meses de março e abril. A exsicata foi depositada no herbário da UENF sob o código H 5073.

4.2- Metodologia Geral

Para facilitar o entendimento deste trabalho de dissertação de mestrado, este item foi dividido em dois subitens, um para a parte química e o outro para a parte biológica.

4.2.1- Parte química: Técnicas gerais

Foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ em Alumínio, espessura 0,2 mm da MERCK (20X20 cm), e cortadas na medida de 4 cm de comprimento e as aplicações das amostras feitas a aproximadamente 0,7 cm acima da borda do inferior da placa e cerca de 0,5 cm de distância das bordas laterais, para a realização da Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para a separação de flavonóides, a fase móvel preparada foi acetato de etila:hexano (75:25) (Mabry, et al.,1970).

Após o desenvolvimento da cromatografia, é necessário o uso de reveladores químicos ou físicos (Sabudak et al., 2005). Neste caso as placas com sílica estavam pré-impregnadas com material fluorescente, portanto, reveladas com lâmpada de UV nos comprimentos de onda de 254 e 332 nm (método físico). Como revelador químico utilizou-se a solução ácida sulfato cérico, que para o seu preparo é necessário ácido sulfúrico concentrado e água. Após o preparo deste revelador, ele é borrifado na placa cromatográfica e depois de aquecido, as manchas que apresentaram coloração amarela são características para os flavonóides e assim, de interesse (Sabudak et al., 2005). Para realçar a tonalidade das cores das CCDs, foi utilizado o programa de edição de imagens Nero photo snap, versão 1.6.1.0, 2007.

Após a avaliação por CCD, o extrato foi fracionado por cromatografia em coluna para purificação e as frações oriundas acompanhadas por CCD seguindo o protocolo acima. As sílicas para a montagem das colunas para a cromatografia utilizadas neste trabalho foram:

1- Sílica de fase inversa RP-2. Esta denominação se deve ao fato de sua fase estacionária ser não-polar, geralmente um hidrocarboneto, e a fase móvel é relativamente polar, como água, ao contrário do sistema cromatográfico que utiliza a fase normal, onde a fase estacionária é altamente polar, como água, suportadas em partículas de sílica, e a fase móvel é relativamente não-polar, como hexano (Skoog, et al., 2002).

2- Sílica para a cromatografia de exclusão por tamanho. Este empacotamento consiste de partículas pequenas (~ 10 µm) de sílica ou de

polímero contendo uma rede de poros uniformes nos quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. Moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase estacionária são excluídas e essencialmente não sofrem retenção. Essas espécies são as primeiras a serem eluídas. Moléculas com diâmetro menores que dos poros podem penetrar através do emaranhado de poros e ficar retidos por tempos maiores, e estas são as últimas a serem eluídas. A sílica utilizada foi Sephadex LH-20 (Skoog, et al., 2002).

Outras técnicas cromatográficas foram empregadas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que é uma técnica que apresenta alta sensibilidade, resposta rápida aos solutos dependendo do detector utilizado, resposta independente da fase móvel, informação qualitativa do pico desejado entre outros fatores (Baggio e Bragagnolo, 2004). Esta técnica foi empregada a fim de se avaliar e estabelecer o perfil químico do extrato.

As análises por CLAE neste estudo foram realizadas no aparelho:

1. Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 332 nm (detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A) e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 μ L.

A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). O sistema de solvente foi água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) e acetonitrila, a eluição foi gradiente, conforme ilustrado na tabela 2, usando fluxo de 1 ml/min. O extrato metanólico foi preparado na concentração de 6 mg/ml (p/v), e as frações foram preparadas nas concentrações de 1 mg/mL.

Tabela 2: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE

Tempo (min)	Concentração de A Água Acidificada (pH 3,5)	Acetonitrila
0	100	0
5	75	15
10	80	20
15	70	30
20	60	40
25	59	41
30	58	42
40	50	50
45	100	0

Para a quantificação dos flavonóides nos extratos foi realizada uma curva padrão (área do pico X massa em μg) utilizando-se uma amostra pura de rutina, (Tabela 3; Figura: 17). Os flavonóides foram quantificados em termos de rutina, já os valores de quantificação do flavonóide isolado foram corrigidos utilizando um fator de correção de peso molecular (fator de correção = PM flavonóide / PM rutina). Desta forma, o resultado foi expresso em relação ao flavonóide específico.

Tabela 3: Dados de massa (em μg) injetada de rutina e as respectivas áreas obtidas.

Massa de rutina injetada (em μg)	Área correspondente ao pico
10	32051066
5	19095573
2,5	10851943
1,25	5514665

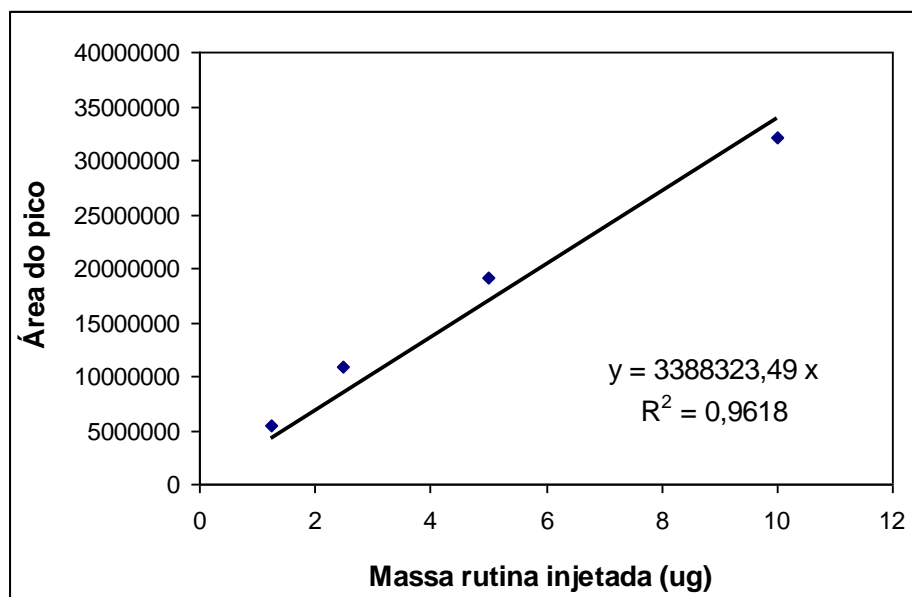


Figura 17: Gráfico da área do pico X massa (em µg) injetada de rutina obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 6.

Para a identificação e caracterização do pigmento isolado foi necessários a utilização de métodos espectroscópicos como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , que é uma técnica espectroscópica importantíssima para a elucidação estrutural da molécula. O RMN fornece um mapa do esqueleto de carbono-hidrogênio de uma molécula orgânica. A amostra foi solubilizada em DMSO deuterado.

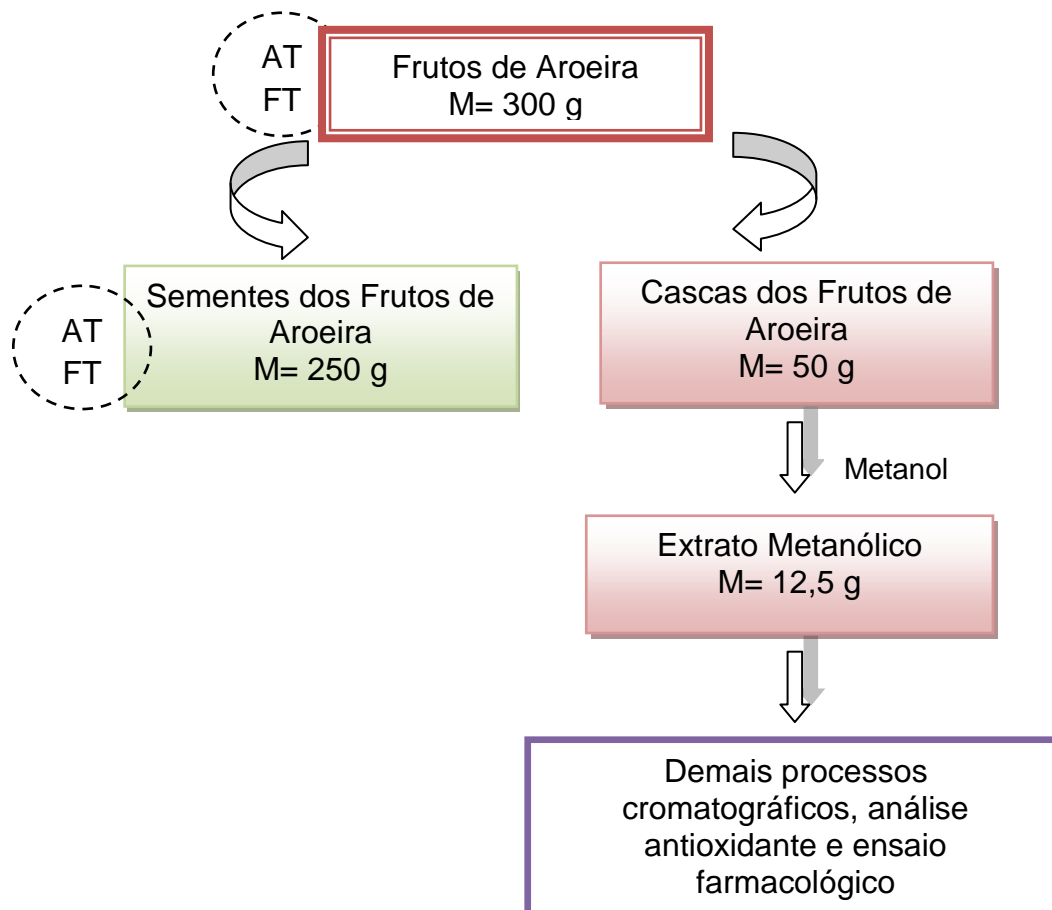
O equipamento utilizado foi:

- Varian 400 MHz, do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN)
- Bruker 400 MHz do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Departamento de Bioquímica - UFRJ).

4.3- Preparo do extrato metanólico

Os frutos foram limpos, e separados as cascas, da semente. As cascas foram submetidas a extração exaustiva, por maceração estática com metanol (esquema 1), esse extrato foi evaporado a 35°C em banho-maria ao abrigo da luz (Oliveira, 2005).

Vale a pena ressaltar a dificuldade de extração a partir das cascas dos frutos de aroeira, pois se pode verificar que o rendimento, partindo de 300 g de frutos até o extrato metanólico, foi de apenas 4,2 % (Esquema 1).



AT: Análise de taninos

FT: Análise de fenóis totais

Esquema 1: Obtenção do extrato metanólico das cascas dos frutos de aroeira.

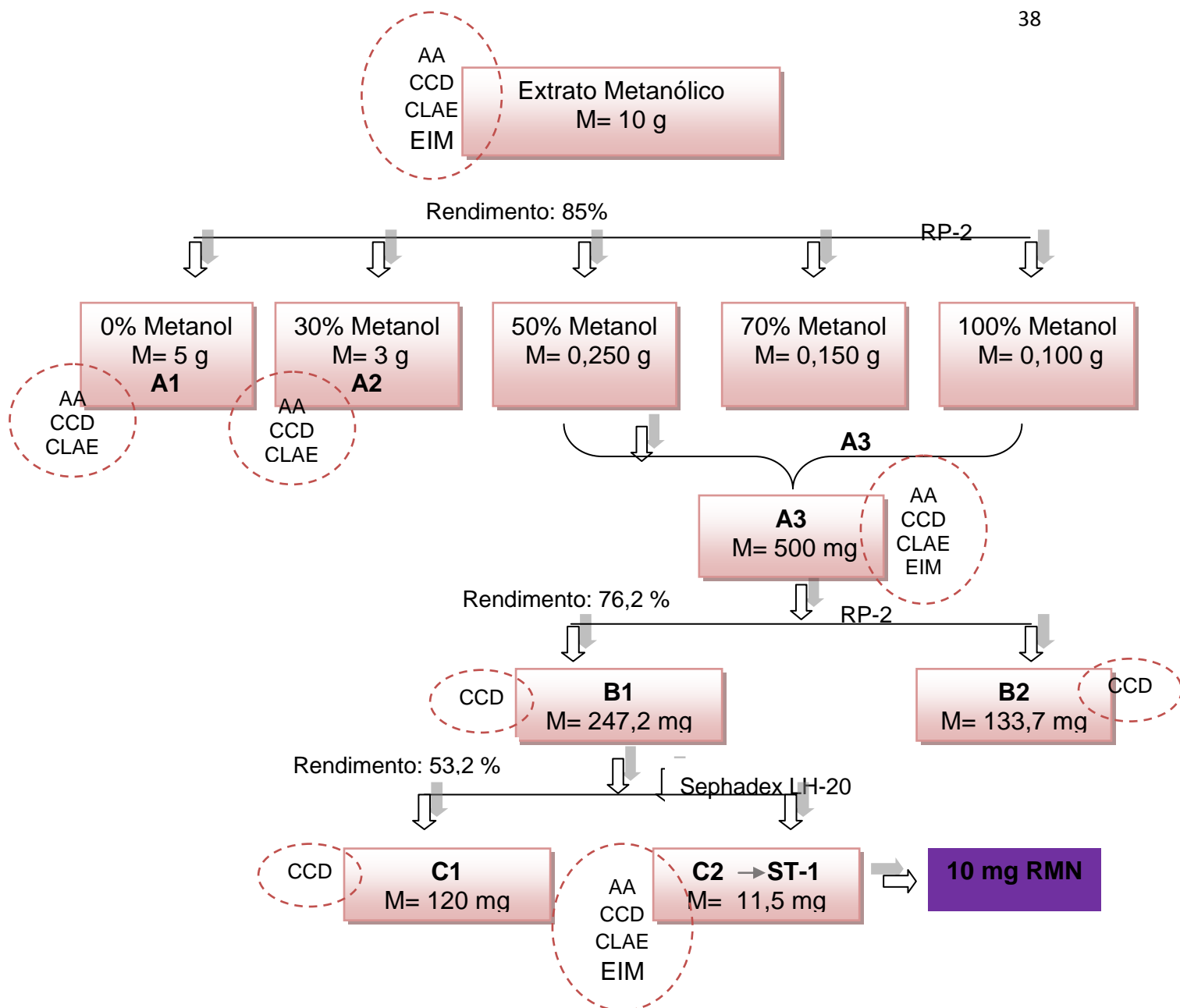
4.4- Fracionamento do extrato, isolamento e identificação da substância

Após o preparo do extrato, foram realizadas técnicas cromatográficas como exemplificados no item 4.2. O esquema 2 ilustra as sílicas para a montagem das colunas para as cromatografias utilizadas, bem como as frações

resultantes e seus rendimentos. A tabela 4 ilustra a fase móvel empregada nas colunas cromatográficas. Este processo de fracionamento foi guiado pelas placas em CCD, onde as frações eluídas da cromatografia em coluna aberta, foram agrupadas em conjuntos de acordo com as manchas características para os flavonóides e além deste, também foi levado em consideração a atividade antioxidante.

Tabela 4: Sistema de solventes utilizado na cromatografia em coluna aberta

Concentração de A Água	Metanol
100	0
70	30
50	50
30	70
0	100



AA: Atividade Antioxidante

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EIM: Ensaio Imunofarmacológicos

Esquema 2: Fracionamento e purificação do extrato metanólico.

4.5- Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).

Este método se baseia no seqüestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) pelos antioxidantes, que produz uma diminuição de absorção em 515 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, a forma reduzida do radical gerado é acompanhada de perda de cor (Ali, et al.; 2009).

Essa técnica consiste em adicionar 1ml do extrato em concentrações que variam de 0,1 - 1000 µg/ml. A este foi adicionado 1 ml de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM), a reação foi processada em 1h à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH foi verificada em 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis. O espectrofotômetro utilizado foi o UV-VIS Shimadzu Mini 1240. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade seqüestradora de radicais livres de cada extrato foi expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT), quercetina, rutina e ácido ascórbico. Posteriormente, foi calculado o percentual seqüestrador (PS%) de radicais livres (Tait et al., 1996; Koleva et al., 2002). A capacidade de seqüestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}})/A_{\text{DPPH}}) * 100$$

Onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução (Roesler, et al., 2007).

4.6- Análise e dosagem de taninos e fenóis totais do fruto e cascas de aroeira

4.6.1- Método para Dosagem de Taninos Gálicos

O fruto e as cascas dos frutos de aroeira (500 mg) foram maceradas com 4 X 5 ml de solução de acetona/ água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 ml. Uma alíquota de 1 ml do extrato foi hidrolisado com 5 ml ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1M e aquecido em banho-maria a 95°C por 24 horas, após o resfriamento, a solução foi avolumada para 10 ml com água. Parte desta solução (10 ml) reagiu com solução de rodanina e com hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M. As amostras foram avaliadas em triplicata, e as amostras positivas desenvolveram coloração vermelha-rósea. As absorvâncias das amostras foram lidas a 520 nm após 5-10 minutos (Moreira, 2000).

4.6.2- Método para Dosagem de Taninos Condensados

O fruto e as cascas dos frutos de aroeira (500 mg) foram maceradas com 4 X 5 ml de solução de acetona/ água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 ml. Em seguida, para 1 ml do extrato foram adicionados 4 ml de solução de butanol (BuOH) em ácido clorídrico (HCl) 5%. O conjunto foi aquecido em banho-maria a 95°C por 2 horas. As amostras positivas desenvolveram coloração vermelha ou violácea e as absorvâncias das amostras foram lidas a 540 nm após 5-10 minutos (Moreira, 2000).

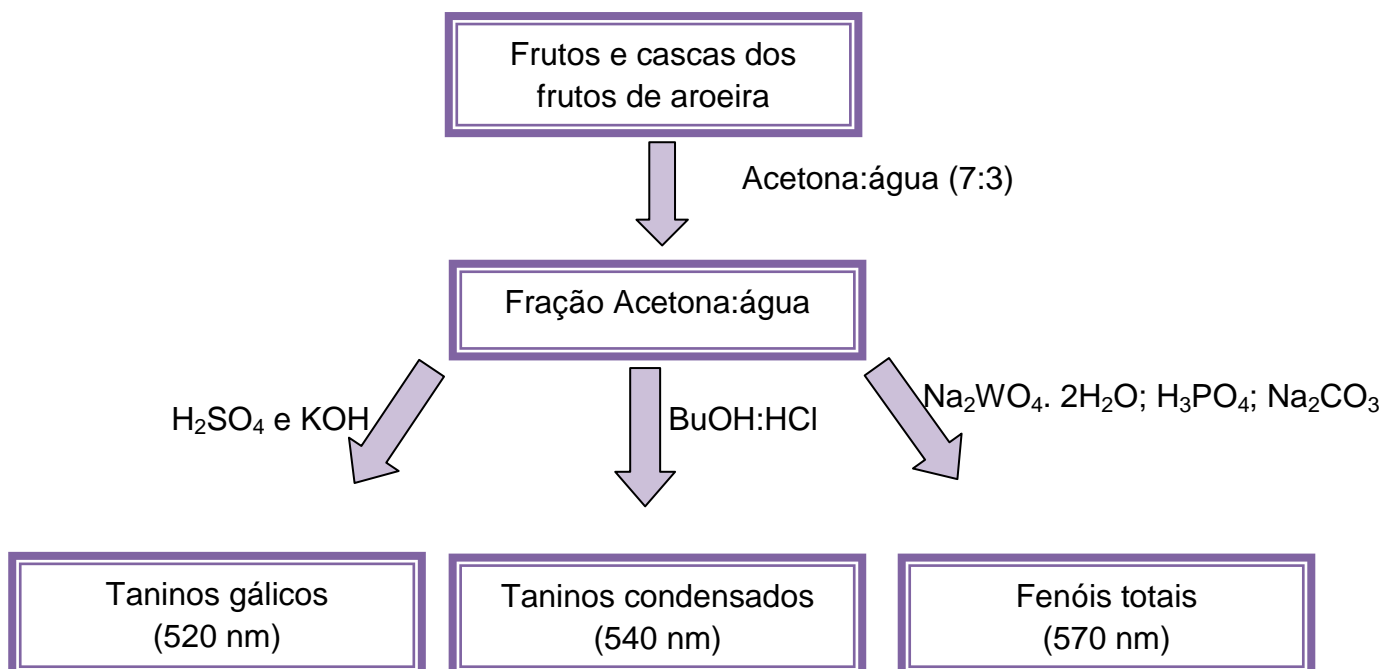
4.6.3- Método para Dosagem de Fenóis Totais

O fruto e as cascas dos frutos de aroeira (500 mg) foram maceradas com 4 X 5 ml de solução de acetona/ água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 ml. Em seguida, o reagente

de Folin-Denis foi adicionado a 0,5 ml dos extratos das amostras e 3 ml de água destilada, e posteriormente avolumado para 10 ml . Posteriormente 1 ml da solução de carbonato de cálcio saturada foi adicionado, e as amostras positivas desenvolveram coloração azul intensa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760 nm (Moreira, 2000).

Para todas as amostras o espectrofotômetro utilizado foi da marca UV-VIS Shimadzu Mini 1240 e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O esquema 3 ilustra a metodologia para a dosagem de taninos e fenóis totais do fruto e cascas da aroeira.



Esquema 3: Fluxograma para a dosagem de taninos e fenóis totais dos frutos e cascas dos frutos da aroeira.

4.7- Parte biológica

4.7.1- Testes farmacológicos

A cultura celular de macrófagos murinos é a linhagem RAW 264.7, cultivadas em garrafas de plástico em meio DEMEN F-12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina em estufa de CO₂ a 5 % a 37°C. O extrato e as frações secas foram ressuspensos em DMSO na concentração de 10 mg/mL.

4.7.2- Inibição da produção de NO

Para realização dos experimentos de inibição da liberação de NO, os macrófagos foram cultivados em placa de 96 poços na presença de 5×10^6 células e com o extrato e as frações em 3 diferentes concentrações 500, 100 e 20 µg/mL em meio com macrófagos estimulados com LPS (1 µg/mL) em triplicatas. Após 48h de incubação a quantidade de NO produzida foi determinada pelo teste colorimétrico de Griess. Como controle negativo foi utilizado macrófagos não tratados e como controle positivo macrófagos estimulados com LPS.

4.7.3- Citotoxicidade celular

Para verificar a citotoxicidade dos frutos da aroeira, foi realizado o teste de liberação da enzima citoplasmática Lactato Desidrogenase (LDH) utilizando o Kit comercial Dolles de quantificação de lactato desidrogenase. Como controle negativo foram utilizados macrófagos lisados com Triton.

4.7.4- Atividade seqüestradora de óxido nítrico

Para o ensaio com o doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (SNP) preparou-se uma solução estoque a 100 mM desta em PBS, pH 7,2. A Solução de SNP (5 µl) foi adicionado a 95 µL de meio de cultura contendo os extratos e rutina como padrão. As soluções foram incubadas a 25°C por 2,5 h. Após este período, foi realizado o teste colorimétrico de Griess, como mencionado anteriormente para determinar a concentração de nitrito no meio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Extrato metanólico

Inicialmente o perfil cromatográfico do extrato metanólico (Figura 18), foi submetido à Cromatografia em Camada Delgada.

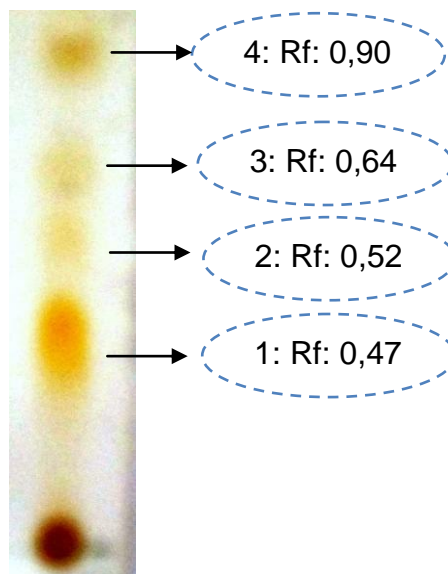


Figura 18: Cromatograma do extrato metanólico realizado por CCD. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.

Verifica-se na figura 18 que o sistema de solventes utilizado mostrou-se satisfatório, pois houve separação de algumas manchas, assim se pode verificar que a concentração de substâncias fenólicas é elevada, uma vez que

é possível notar quatro manchas majoritárias características para tais substâncias, como descrito no item 4.2.1 (página 33).

Essas manchas apresentam como fatores de referência (R_f), os valores de 0,47; 0,52; 0,64 e 0,90 que sob revelação em luz UV (332 nm) apresentam coloração azul. Nota-se nesta figura (18) que a mancha 1 é a mais polar, quando comparada com as demais manchas, e esta se apresenta com coloração amarela mais intensa em luz visível. Devido as características observadas (manchas largas, intensa e com arraste), nos sugere ser uma mistura de substâncias que correspondem aos compostos fenólicos (Sabudak et al., 2005).

Para o sistema de solventes (fase móvel) utilizado, e como suporte físico, a sílica gel para CCD (fase estacionária), as manchas características para os compostos fenólicos que apresentaram o perfil mencionado acima se pode dizer que das quatro manchas majoritárias, aquela que apresenta R_f 0,90 é a mais apolar, enquanto as manchas com R_f 0,52 e 0,64 apresentam características intermediárias quanto a polaridade.

Com o intuito de conhecer o perfil químico deste extrato, este foi submetido a outra técnica cromatográfica, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para conhecer as substâncias presentes. Essa técnica desempenha um papel central na separação de misturas complexas, como por exemplo, os flavonóides e as substâncias fenólicas. Estudos quanto ao tempo de retenção (T_r) em diferentes suportes e eluentes têm sido aperfeiçoados e tabelados, a fim de se obter condições ótimas de análise (Oliveira, 2005).

Na análise do extrato metanólico, foram utilizados dois padrões de substâncias fenólicas, com o objetivo de direcionar as análises por CLAE, uma vez que esses representam moléculas comumente presentes em frutas (O'Prey, et al., 2003) e encontradas com frequência na família Anacardiaceae (Correia, et al., 2006; Marzouk, et al., 2006; Islam e Tahara, 2000; Kawashty et al., 2000; Viana, 1995).

- Quercetina: Trata-se de um flavonol, penta-hidroxilado nas posições 3, 5, 7, 3' e 4', este é o flavonóide de maior ocorrência na família Anacardiaceae (Figura 19, cromatograma 1);
- Rutina: Trata-se de um flavonóide que possui esqueleto da quercetina, com duas unidades de açúcares (glicose interna e ramnose externa) ligados na posição 3 do flavonóide (Figura 20, cromatograma 2).

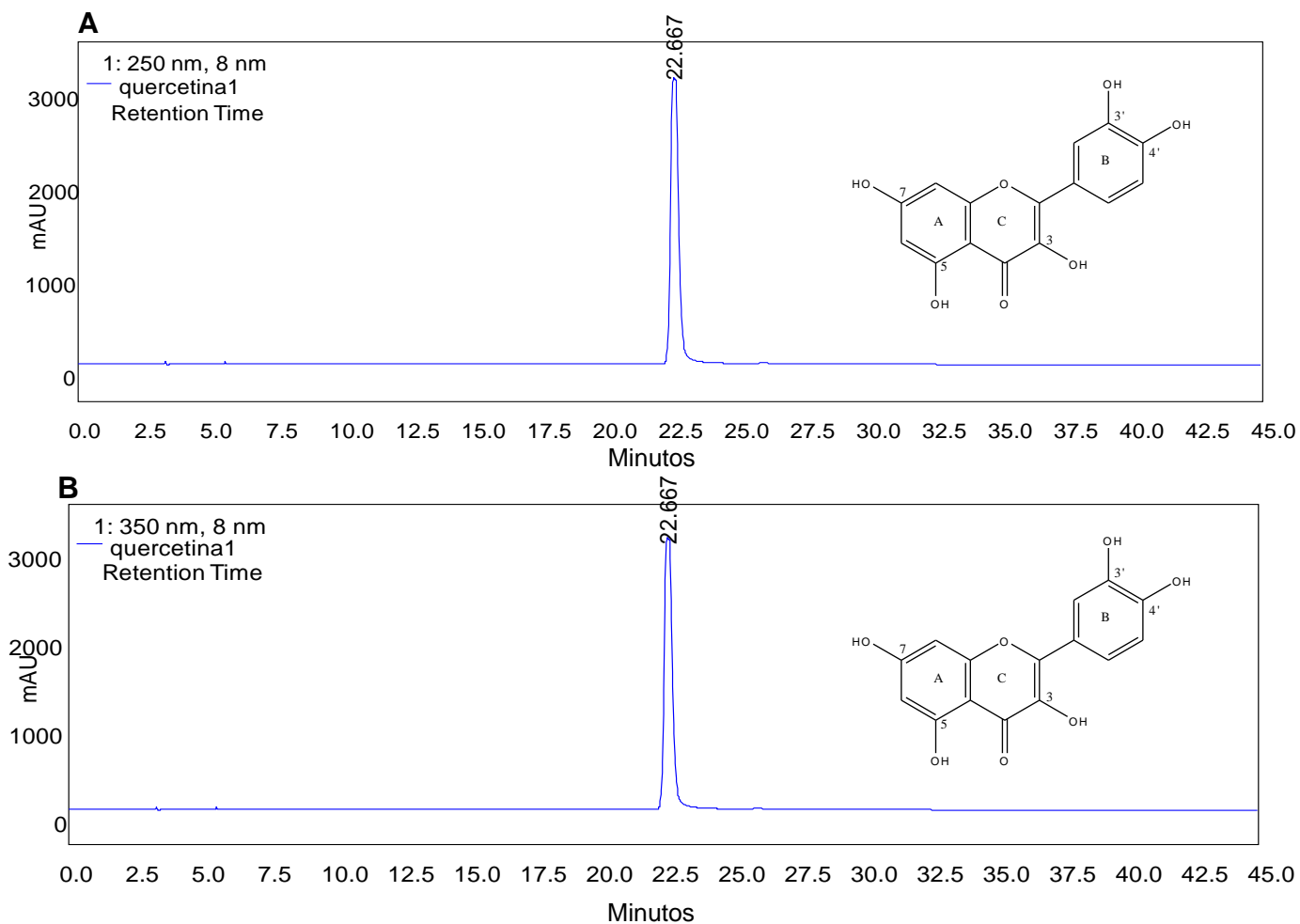


Figura 19: Cromatograma 1, perfil químico da quercetina avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

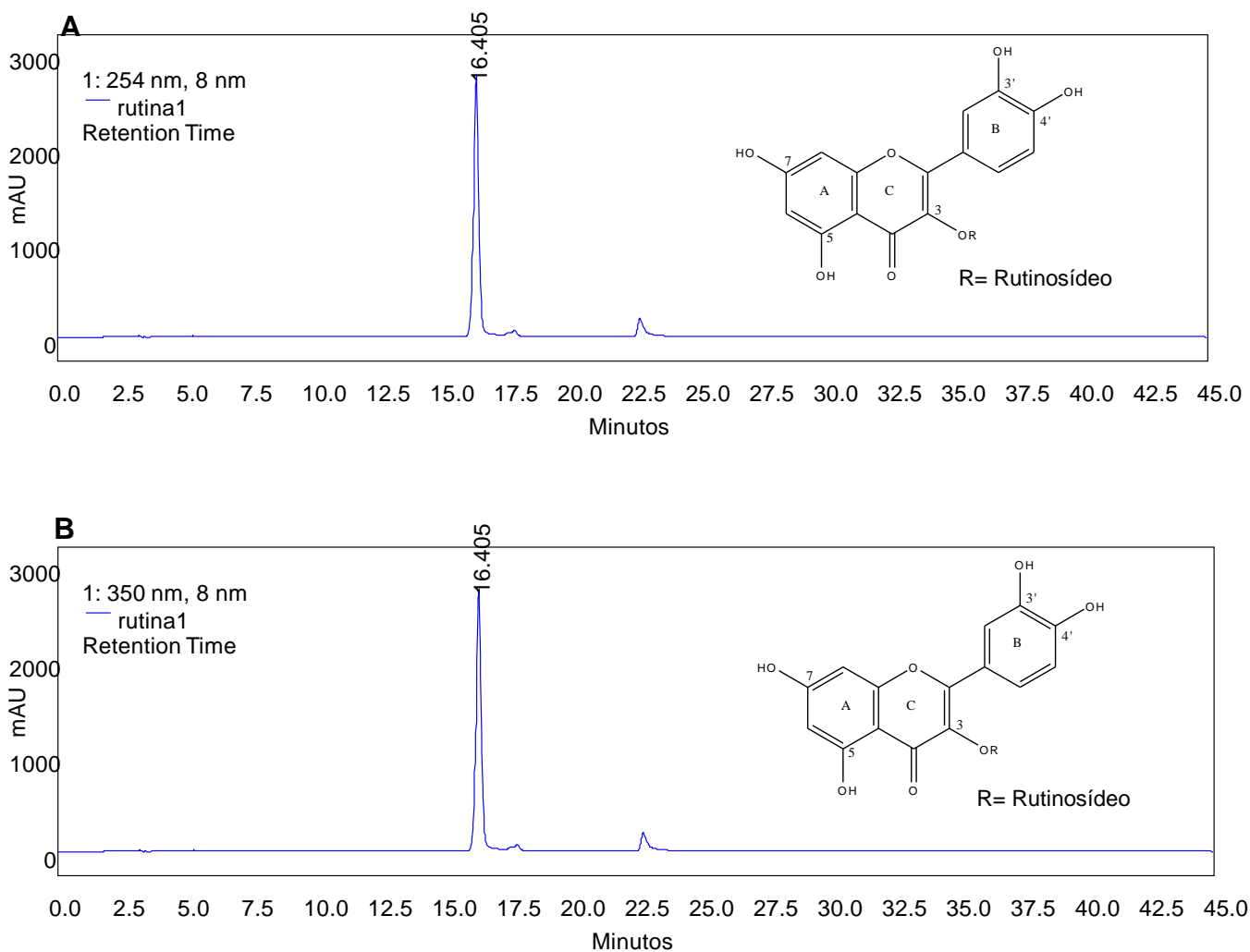


Figura 20: Cromatograma 2, perfil químico da rutina avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL

De acordo com as Figuras 19 e 20 (Cromatogramas 1 e 2), se pode notar que ambas as substâncias absorvem nos comprimentos de onda de 254 e 350 nm, e para os sistema de solventes utilizados, os picos para ambos os flavonóides foram tabelados em 22,667 minutos para quercetina e 16,405 minutos para a rutina.

A tabela 5 mostra os tempos de retenção e as áreas correspondentes aos flavonóides quercetina e rutina, ressaltando que a quercetina possui um percentual de área de 96,8 %, e que a rutina representa 84,3 % utilizados como padrões neste trabalho de dissertação de mestrado. Este resultado avalia o quão puros são os flavonóides em questão, além de estabelecer o tempo de retenção nas condições de análise mencionadas.

Tabela 5: Tempos de retenção e as áreas dos padrões dos flavonóides quercetina e rutina

Quercetina			Rutina		
Tempo (min)	Área (%)	Área	Tempo (min)	Área (%)	Área
22.667	96,8	58934692	16.405	84,3	33483575

As análises realizadas com os flavonóides solubilizados em metanol mostraram que estas substâncias produzem duas bandas de absorção característica no espectro de UV na região de 240-400 nm, o que corrobora com os picos observados no CLAE. Essas bandas (Figura 21) são conhecidas como banda I (300-380 nm), e está associada à absorção do sistema cinamoil do anel B, e banda II (240-280 nm), ocasionada pela absorção do sistema benzoil do anel A (Alonso-Salces et al., 2004).

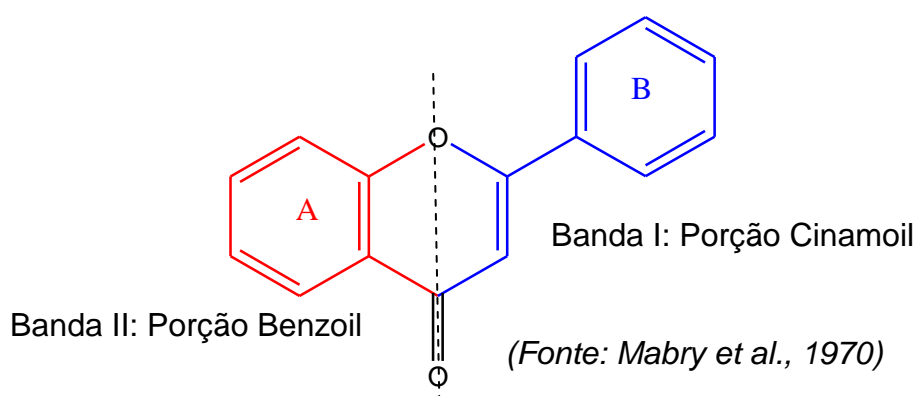


Figura 21: Esquema do flavonóide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.

Com base nesta informação a figura 22 representa o espectro de ultravioleta dos flavonóides quercetina (A) e rutina (B), destacando as bandas características dos picos em 350nm, que corresponde a banda I do anel B e a banda próximo a 240 nm que representa a banda II do anel A. O que para ambos os flavonóides corrobora com os picos observados em 254 e 350 nm na análise por CLAE (Figuras 19 e 20 respectivamente).

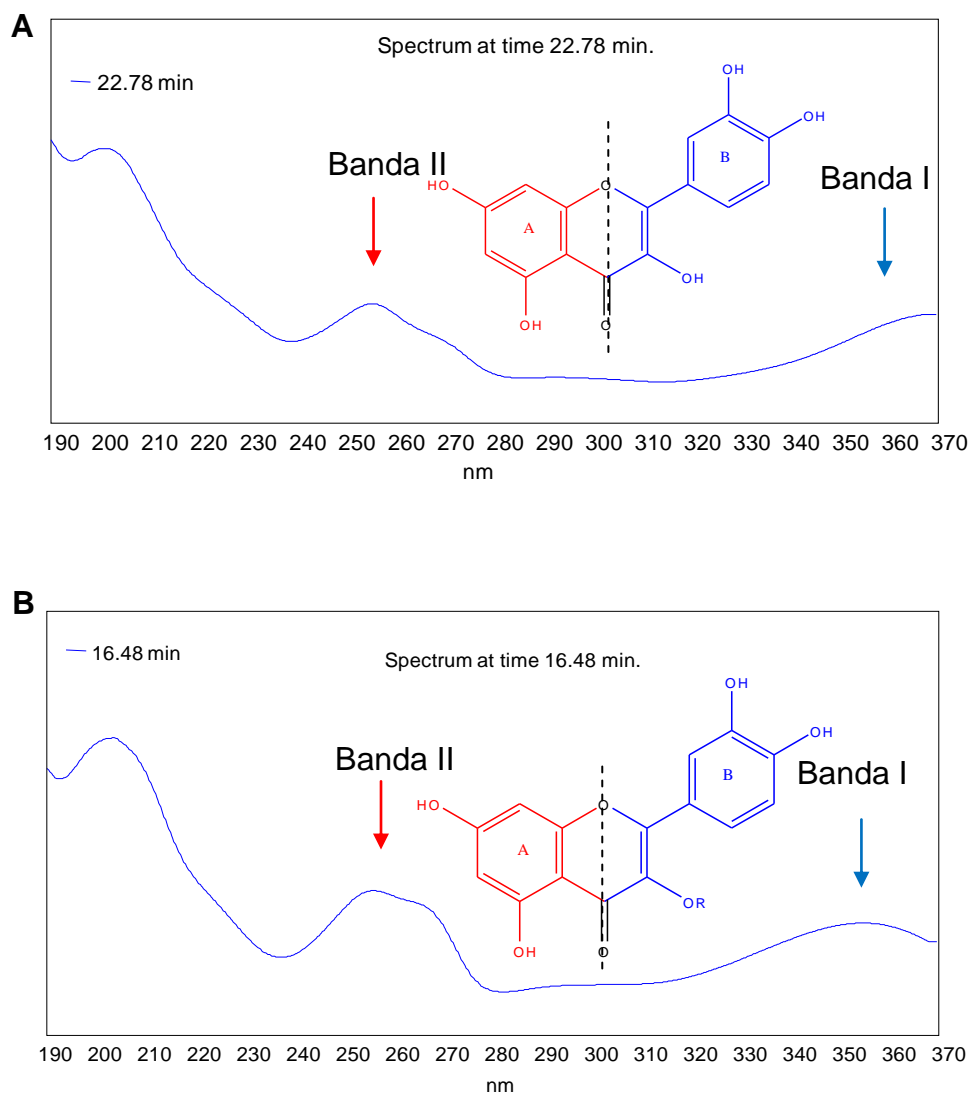


Figura 22: Espectros de ultravioleta dos flavonóides quercetina (A) e rutina (B).

Após verificar os tempos de retenção dos flavonóides quercetina e rutina, o extrato metanólico foi submetido a análise por CLAE para o conhecimento acerca do seu perfil químico. A figura 23 mostra o cromatograma do extrato metanólico.

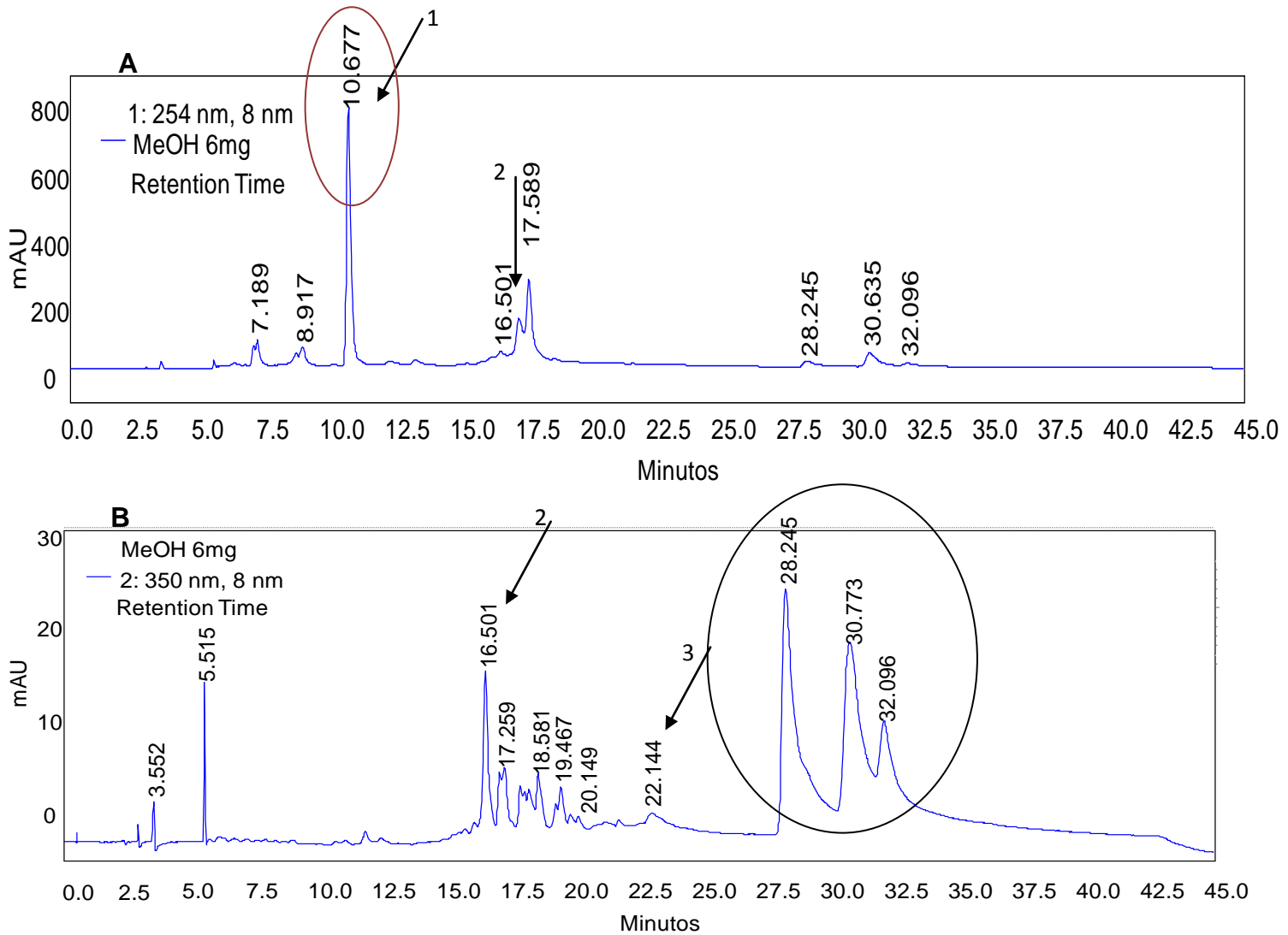


Figura 23: Cromatograma 3, perfil químico do extrato metanólico avaliado por CLAE. Seta 1: Pico majoritário do extrato metanólico; Seta 2: Pico com tempo de retenção característico para a rutina; Seta 3: Pico com tempo de retenção para a quercetina.

Depois de realizada a CLAE com o extrato metanólico, pode-se observar um pico majoritário no tempo de retenção em 10,667 minutos (seta 1)

(circulado em vermelho) no comprimento de onda de 254 nm, com área de 9.632.224, o mesmo pico não se observa no comprimento de onda de 350 nm.

É de fácil percepção que os picos com tempo de 28,245 e 30,773 minutos se apresentam majoritários no comprimento de onda de 350 nm, e que o pico com tempo de 32,096 minutos é o minoritário entre os três.

Os espectros de UV para estes picos (Figura 24) revelam as bandas em aproximadamente 240 e 350 nm, o que em tese confirmam a presença de flavonóides com características para as bandas I e II.

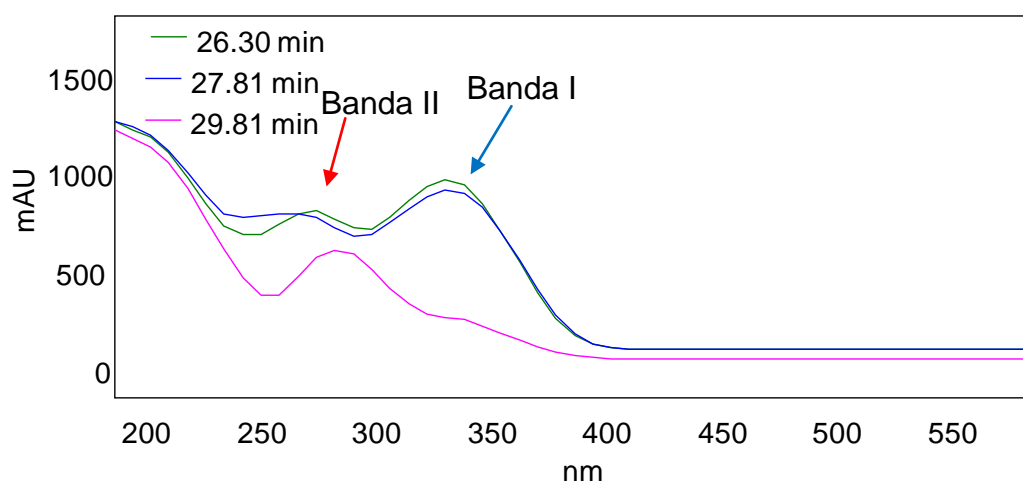


Figura 24: Espectros de Ultravioleta dos picos de tempo de retenção (TR) igual a 26,30 min, correspondente ao pico 1 (Verde); 27,01 min, correspondente ao pico 2 (Azul) e 29.01 min, correspondente ao pico 3 (Rosa).

Outro pico em 16,501 minutos, (seta 2) em ambos os comprimentos de onda de 254 e 350 nm, apesar de menos intenso, é característico do flavonóide glicosilado rutina, como se pode comprovar na figura 20 (Cromatograma 2) e tabela 4.

Com relação ao flavonóide quercetina, o pico que caracteriza essa substância no extrato, é pouco representativo (22,144 minutos) (seta 3), no comprimento de onda de 350 nm, este mesmo pico não foi observado para o comprimento de onda de 254 nm, devido a sua baixa concentração no extrato metanólico.

Logo, a fim de confirmar a presença dos flavonóides quercetina e rutina no extrato metanólico, foi realizada uma co-cromatografia dos padrões unidos ao extrato, a fim de verificar os tempos de retenção e o perfil cromatográfico da amostra unida aos padrões (Figura 25).

De acordo com a co-cromatografia dos padrões com o extrato metanólico, se pode notar que no extrato há a presença dos picos compatíveis com os tempos de retenção da rutina e da quercetina.

Quando injetados juntos os padrões e os extratos, se observa um pequeno deslocamento dos tempos de retenção da amostra, isso ocorre porque há possivelmente uma interação das substâncias presentes na amostra (extrato) e dos padrões (quercetina e rutina). Além das interferências relacionadas ao próprio equipamento, como a rede elétrica, por exemplo, entre outros.

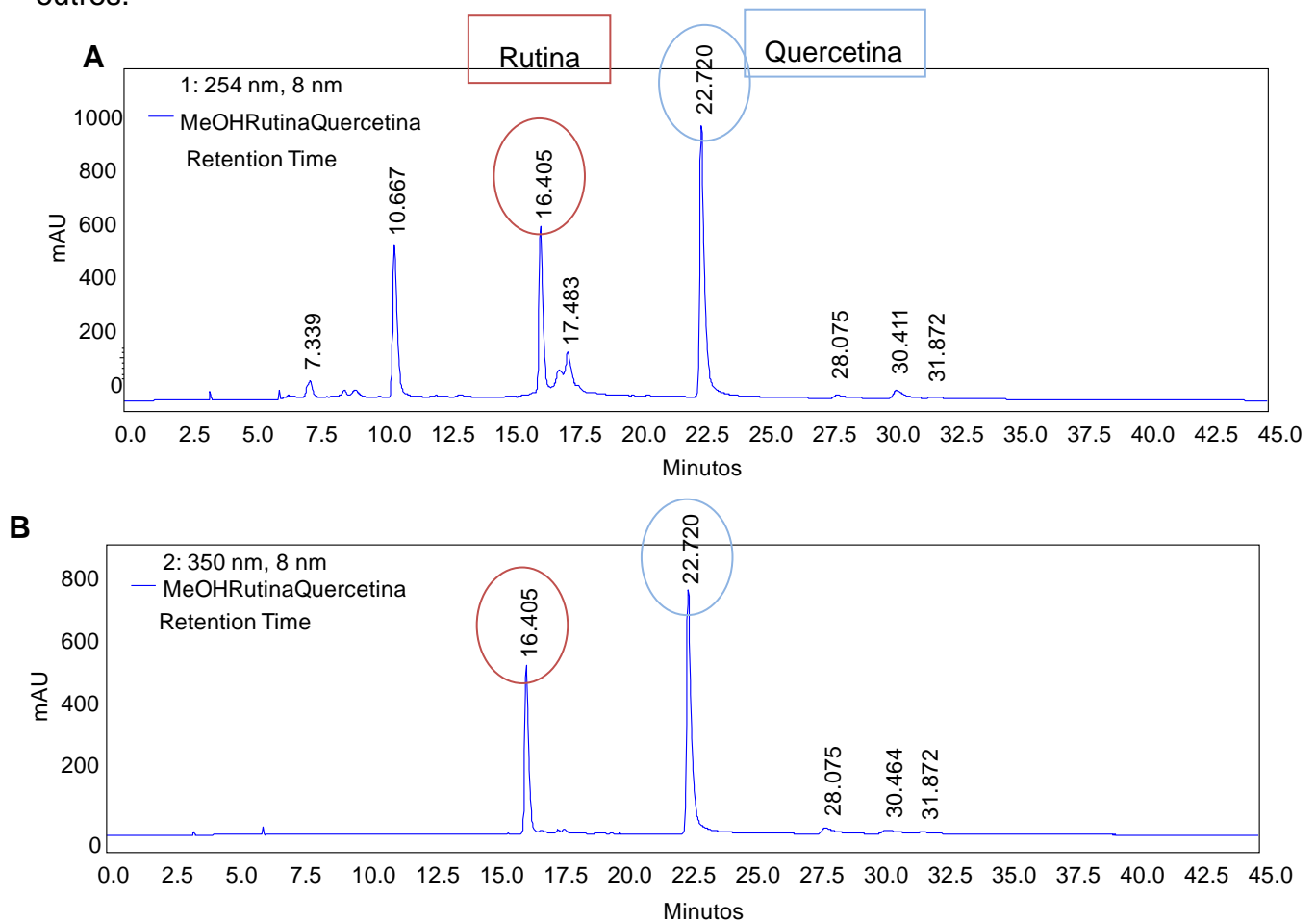


Figura 25: Cromatograma 4, perfil químico da co-cromatografia do extrato metanólico, rutina e quercetina avaliado por CLAE.

5.1.1 Quantificação dos flavonóides por CLAE no extrato

Tendo em vista a existência dos picos correspondentes aos flavonóides rutina e quercetina no extrato metanólico nas cascas dos frutos de aroeira, além daqueles outros três com tempo de retenção entre 26 e 30 minutos (Figura 23), optou-se por avaliar o quão representativo são essas substâncias no extrato, a partir da rutina que parece ser majoritária em relação a quercetina.

Desta forma, a partir da curva padrão de rutina elaborada (descrita no item 4.2.1, Página 35) foi possível quantificar esses três flavonóides presentes no extrato, os resultados obtidos estão mostrados na tabela 6.

Tabela 6: Quantificação dos flavonóides presentes no extrato metanólico das cascas dos frutos de aroeira

Flavonóides	Tr (min)	Extrato MeOH (% p/p)	Extrato MeOH (% Área)
Pico 1	26,30	0,35	22,63
Pico 2	27,81	0,30	19,46
Pico 3	29,81	0,24	15,83

A partir da quantificação dos flavonóides, observou-se que o pico 1, é o flavonóide majoritário dos três, e que o pico 3 é o minoritário.

Assim, com o objetivo de separar essas substâncias de interesse (flavonóides), o extrato metanólico foi fracionado conforme indicado no esquema 2, página 37.

5.1.2 –Fracionamento do extrato metanólico

Após o primeiro fracionamento do extrato (Esquema 1, item 4.2.1, página 37) em coluna cromatográfica aberta em fase inversa RP-2, se obteve

cinco conjuntos em que as frações foram unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado por CCD. A figura 26 mostra a CCD destes grupos.

- Conjunto A1: As frações eluídas da coluna com 100 % de água;
- Conjunto A2: As frações eluídas com 70 % água e 30 % metanol;
- Conjunto A3: As frações eluídas com 50 % água e 50 % metanol;
- Conjunto A4: As frações eluídas com 30 % água e 70 % metanol;
- Conjunto A5: As frações eluídas com 100 % metanol;

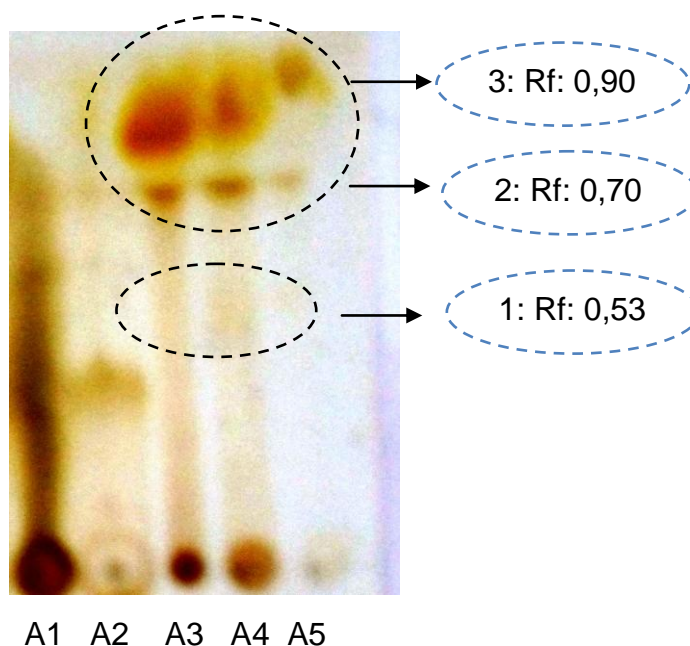


Figura 26: Cromatograma da primeira coluna do extrato metanólico realizada por CCD, mostrando as manchas características nos três últimos grupos, que foram reunidas formando o A3. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.

De acordo com a CCD (Figura 26) realizada logo após o primeiro fracionamento (RP-2), notou-se que as manchas amarelas de interesse se concentravam nos três últimos conjuntos (A3, A4 e A5), logo estes foram reunidos, devido a similaridade e cujo Rf são 0,53; 0,70 e 0,90. O conjunto A5, apesar de sua aparente purificação, foi reunido com os demais por apresentar pouca massa.

Pode-se notar que a mancha com R_f 0,90 é a mais apolar para o sistema de solventes utilizado, e suporte. A mancha cujo R_f é 0,53 é a mais polar, e a mancha de R_f 0,70 com características de polaridade intermediária.

Vale a pena ressaltar, que o fracionamento nos conduziu a separação de substâncias com R_f muito semelhantes, ao observado no extrato para as manchas majoritárias (Figura 18). Desta forma, esses conjuntos foram renomeados, e codificados como:

- A1 as frações eluídas com 100 % de água;
- A2 as frações eluídas com 70 % de água e 30 % de metanol;
- A3 corresponde a reunião dos conjuntos A3, A4 e A5 (frações eluídas com 50%, 70% e 100 % de metanol).

Com o intuito de verificar se o processo de fracionamento foi eficiente, ou seja, se as manchas das substâncias de interesse foram separadas, foi realizado o CLAE para os conjuntos A1 (Figura 27), A2 (Figura 28) e A3 (Figura 29).

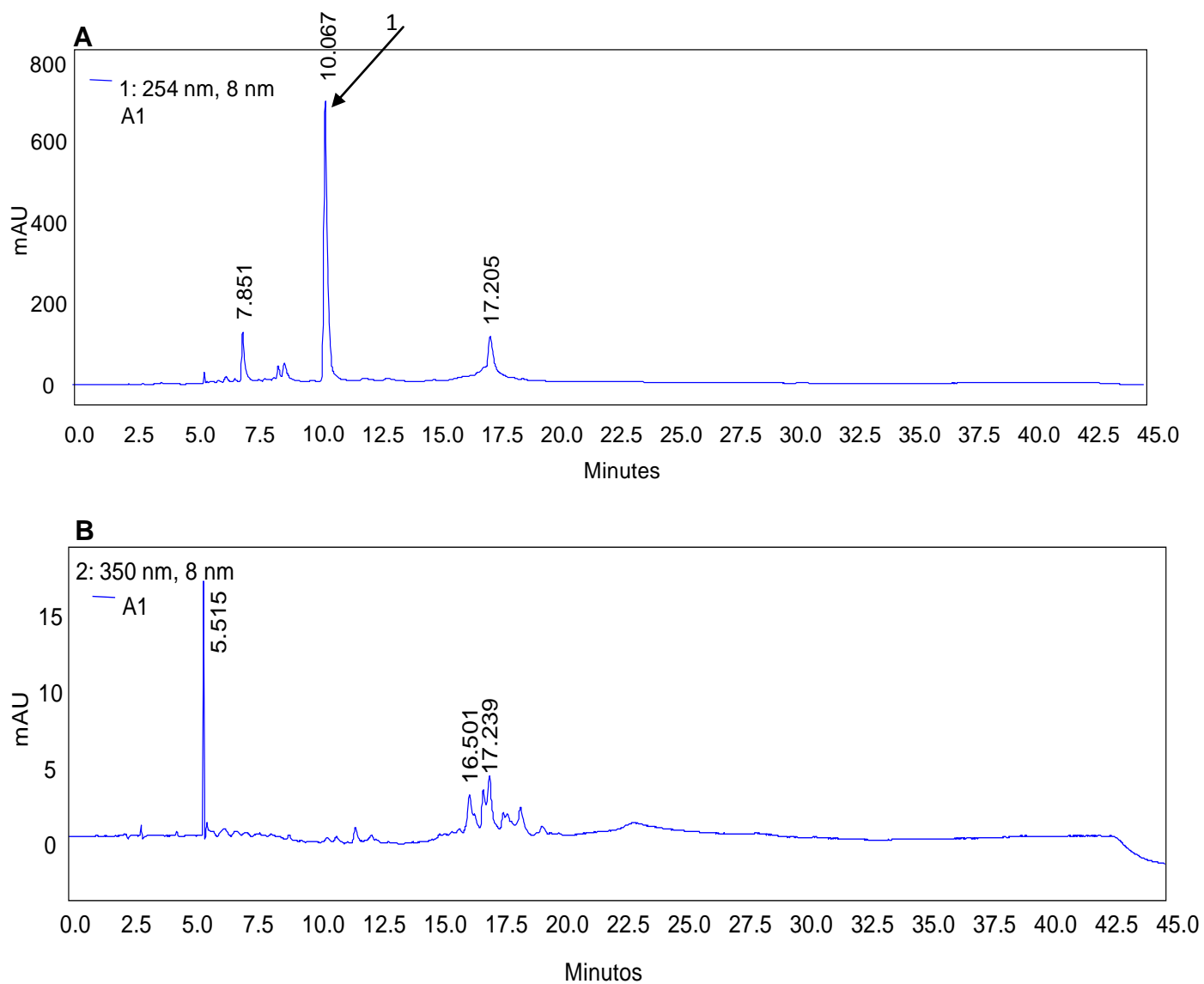


Figura 27: Cromatograma 5, perfil químico do conjunto A1 avaliado por CLAE.

Seta 1: Pico majoritário do extrato metanólico.

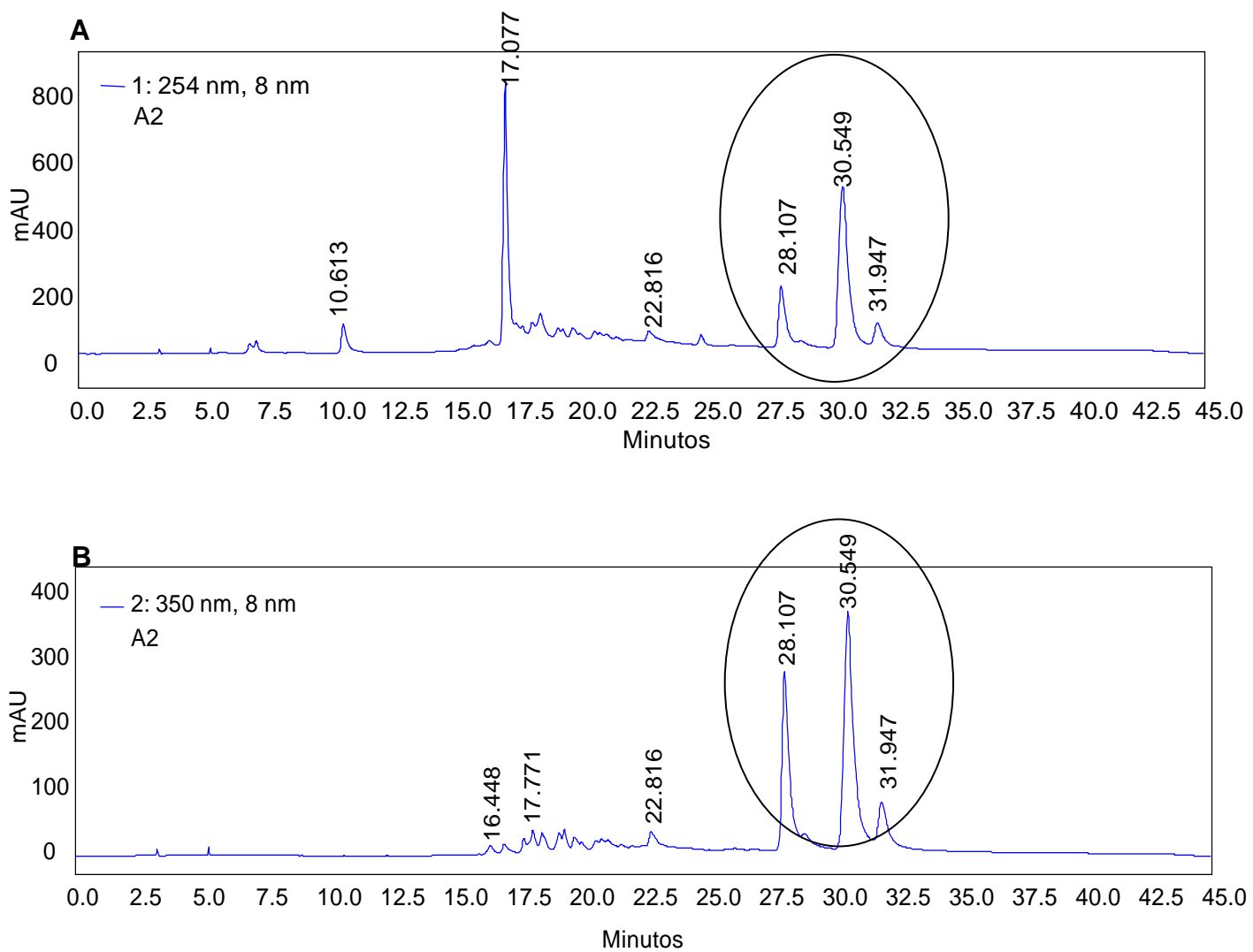


Figura 28: Cromatograma 6, perfil químico do conjunto A2 avaliado por CLAE.

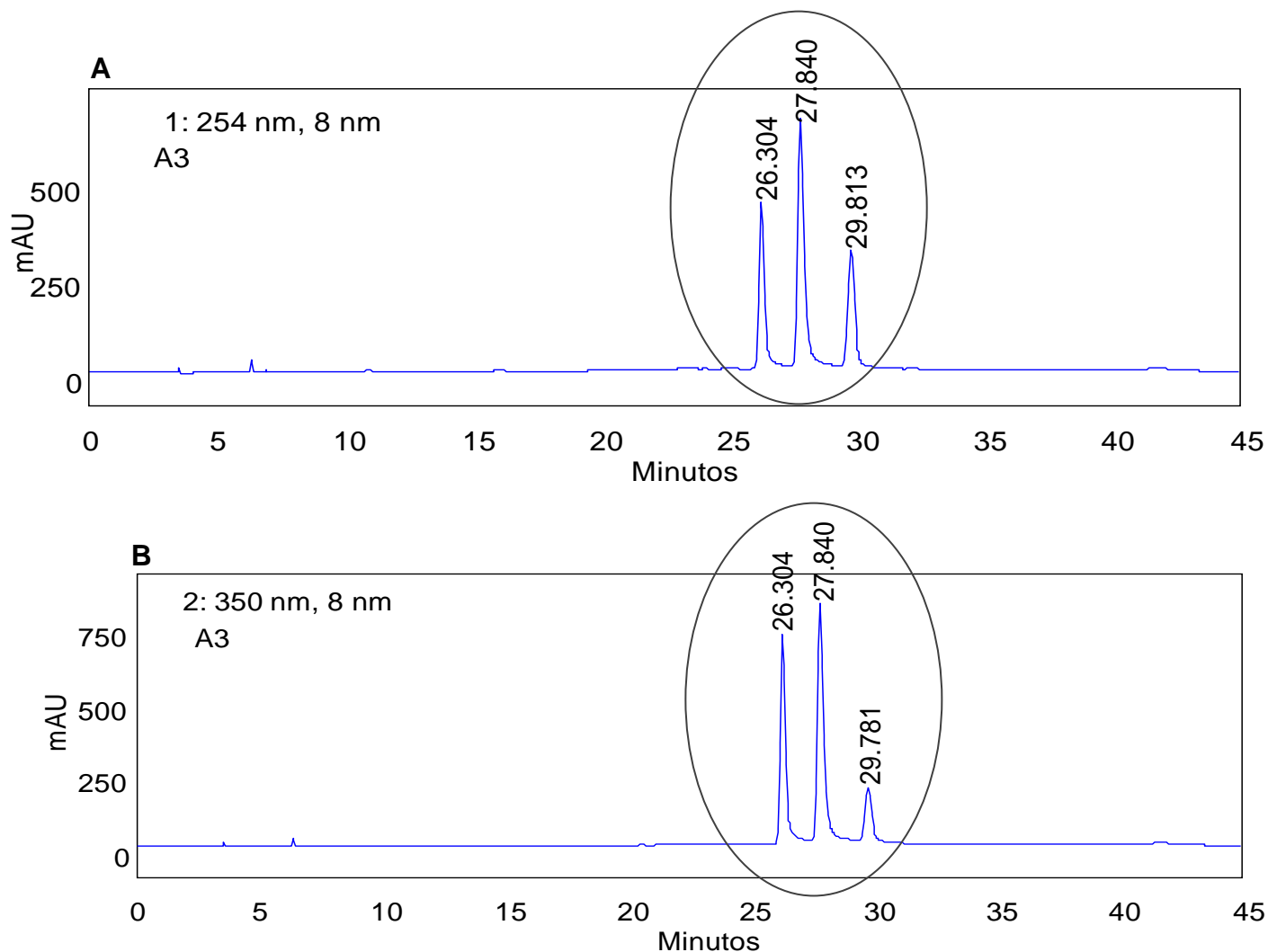


Figura 29: Cromatograma 7, perfil químico do conjunto A3 avaliado por CLAE.

Quando se compara os três conjuntos resultantes do primeiro fracionamento se pode notar que o conjunto A1 (Figura 27) possui características muito polares, (100% de água), e por CLAE, após 17 minutos, o eluente na coluna cromatográfica está tornado de 70 % de água e 30% de acetonitrila (item 4.2.1, página 34, Tabela 2). Todavia é neste conjunto que se encontra o pico majoritário do extrato metanólico, com tempo de retenção em 10,067 minutos (seta 1).

Com relação ao conjunto A2 (Figura 28), se observa a presença de um pico bem pronunciado com tempo de retenção de 17,077 minutos (seta 2), e a presença de picos que correspondem a flavonóides com características para

bandas I e II no ultravioleta (Figura 24), nos tempos de retenção de 28,107; 30,549 e 31.947 minutos, porém minoritários.

É possível notar que o conjunto A3 apresentou a melhor separação para essas substâncias, sendo possível observar apenas os picos com tempos de retenção de 26,304; 27,840 e 29,781 minutos, com concentrações bastante elevadas.

É correto afirmar que os conjuntos A2 (Figura 28) e A3 (Figura 29) possuem um perfil cromatográfico muito semelhante entre 28 e 32 minutos. Todavia, é o conjunto A3 que está mais purificado, sendo este escolhido para uma posterior purificação.

A curva padrão de rotina (descrita no item 4.1.1, Página 34) foi utilizada para comprovar que a partir do fracionamento do extrato metanólico se conseguiu concentrar os flavonóides no conjunto A3. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 7.

Tabela 7: Quantificação dos flavonóides presentes nos conjuntos A2 e A3

Flavonóides	Tr (min)	Conjunto A2	Conjunto A2	Conjunto A3	Conjunto A3
		(% p/p)	Área (%)	(% p/p)	Área (%)
Pico 1	26,30	1,8	16,9	3,6	39,5
Pico 2	27,81	3,2	30,0	6,5	45,2
Pico 3	29,81	1,3	12,1	2,6	14,0

Como se pode observar na tabela 6, o pico 2 corresponde ao flavonóide majoritário entre os três, e o pico 3 é o flavonóide minoritário. O pico 3, que é o minoritário corresponde a 40 % em relação ao pico majoritário, e o pico 1, corresponde a 55,4 %, para o conjunto A3. Todavia a mesma proporção é verificada para o conjunto A2, porém todas essas três substâncias estão cerca de 50 % menos concentradas neste conjunto.

Assim, com o objetivo de isolar os flavonóides, o conjunto A3, por possuir as substâncias em maior concentração, foi fracionado conforme indicado no esquema 2, página 37.

5.1.3 –Substância isolada

O conjunto A3 foi submetido a uma purificação em coluna cromatográfica aberta de fase inversa RP-2, o que originou duas frações (B1 e B2), o cromatograma em CCD destas duas frações está ilustrado a seguir (Figura 30).

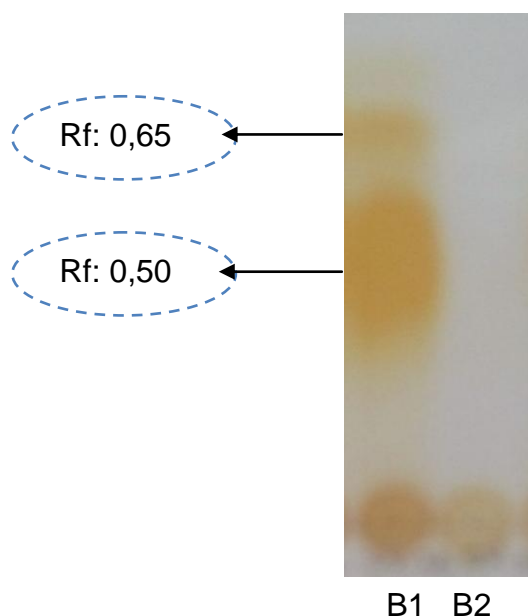


Figura 30: Cromatograma dos conjuntos B1 e B2 realizado em CCD, mostrando 2 manchas majoritárias. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.

O conjunto B1 possui manchas características para as substâncias fenólicas (Rf: 0,50 e 0,65). De acordo com o sistema de solvente utilizado e o suporte, a mancha com Rf 0,65 é a menos polar, e a mancha 0,50 é a mais polar.

O conjunto B2, apresentou coloração escura na origem, com Rf igual a 0, ou seja a fase móvel utilizada não foi capaz de separar estes compostos, que provavelmente são muito polares.

Desta forma, B1, por sua simplicidade e manchas características para fenólicos, foi escolhida para purificação e, assim submetida a um fracionamento, porém desta vez, o suporte para a coluna aberta foi Gel de Sephadex LH-20. Foram obtidos dois conjuntos (C1 e C2) das quais C2 mostrou-se purificada (uma única mancha) por CCD (Figura 31), cujo Rf foi 0,47. O conjunto C1 apresentou duas manchas com Rf de 0,51, de característica mais polar, e outra mancha com Rf de 0,63 de característica menos polar.

De acordo com a CCD, mostrada na figura 31, a mancha característica do flavonóide é muito pronunciada, e possui Rf de 0,47. Esta mancha quando submetida a revelação sob luz UV (332 nm) apresenta coloração azul, característica de substâncias fenólicas e, neste caso de flavonóide.

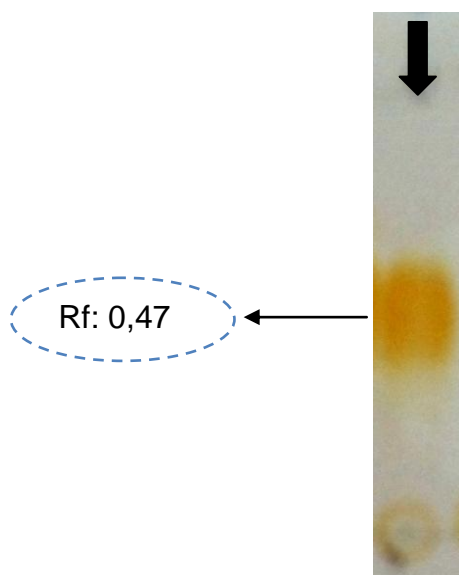


Figura 31: Cromatograma do gupo C2 realizada por CCD. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.

De acordo com a CLAE (Figura 32), esta substância se mostrou isolada, com um único pico com tempo de retenção em torno de 31 minutos.

Vale a pena ressaltar que a substância isolada (Figura 32 – Tr 31,168 minutos), é o pico minoritário em relação aos três picos observados no conjunto A3 (Figura 29), mostrando que o fracionamento em coluna aberta com suporte em Gel de Sephadex LH-20 foi satisfatório ao isolar uma substância minoritária.

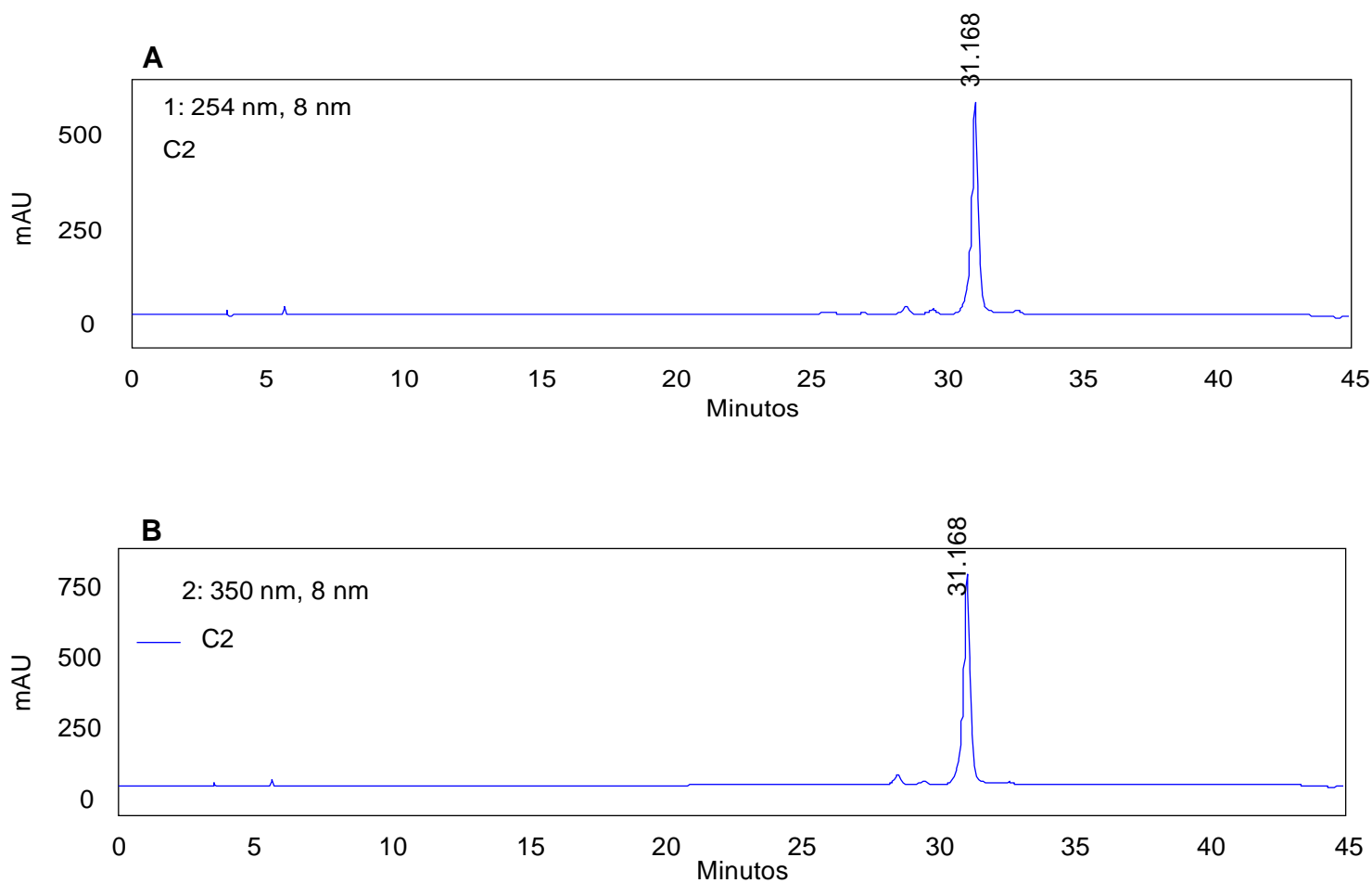


Figura 32: Cromatograma 8, perfil químico do conjunto C2, avaliado por CLAE.

O espectro de UV para este pico (Figura 33) revela uma banda em aproximadamente 250 e outra em 340 nm, o que em tese confirmam a presença de flavonóide com características para as bandas I e II, sistemas cinamoil e benzoil, respectivamente.

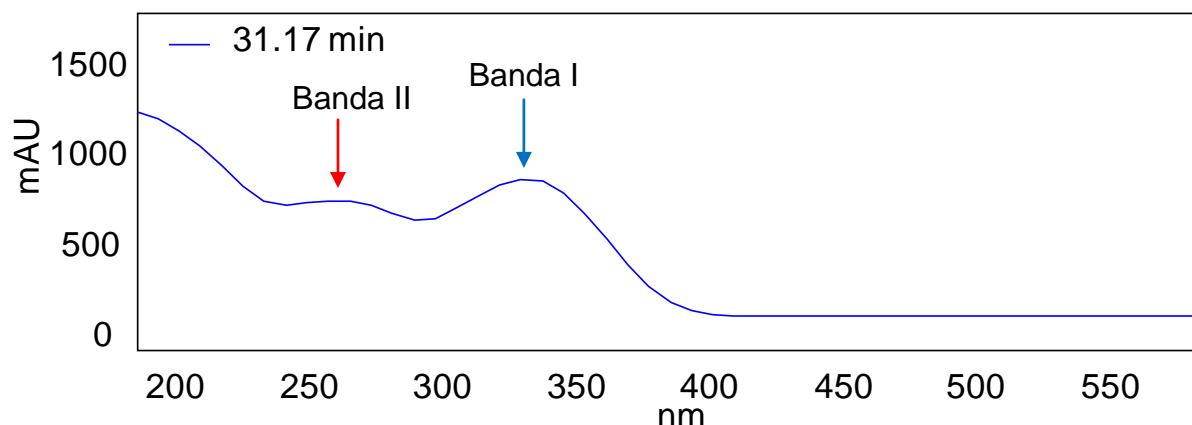


Figura 33: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 31.17 min, correspondente a amostra isolada C2.

Nos cromatogramas mostrados para o extrato bruto e frações, observou-se que a purificação dos extratos, no sentido de isolar os flavonóides, foi eficiente, pois se obteve uma substância isolada (C2), que passou a ser codificada como ST-1.

Desta forma, a tabela 8 mostra um resumo do tempo de retenção e da área dos cromatogramas realizados por CLAE para o extrato e conjunto A3 e a substância ST-1, destacando a purificação dos flavonóides, com conseqüente aumento de suas áreas (concentração) e o isolamento do pico minoritário.

Tabela 8: Tempo de retenção e área obtidos por CLAE do extrato metanólico e dos grupos A3 e C2.

Extrato Metanólico			Conjunto A3			ST-1		
Tempo (min)	Área	Área (%)	Tempo (min)	Área	Área (%)	Tempo (min)	Área	Área (%)
27.296	1.310.316	22,6	26.304	12.334.776	39,5			
28.992	1.180.622	19,4	27.840	21.863.582	45,2			
31.115	1.050.827	15,8	29.781	8.825.438	14,0	31.168	23.909.763	78,3

5.2 Elucidação estrutural da substância ST-1

5.2.1 Técnicas monodimensionais

Após a purificação do conjunto A3, o que nos conduziu a substância ST-1, que foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , e os dados estão listados na tabela 9:

Tabela 9: Sinais listados de ^1H e ^{13}C da substância ST-1

RMN ^1H (DMSO- d_6) PPM	RMN ^{13}C (DMSO- d_6) ppm
H-3 (5,90; s),	C-2 (167,4)
H-6 (6,06; d; J= 1,3 Hz)	C-3 (102,7)
H-8, (6,18; d; J= 1,3 Hz)	C-4 (181,7)
H-3', 5' (6,53; d; J= 8,7 Hz)	C-5 (161,7)
H-2', 6' (7,69; d; J= 8,5 Hz)	C-6 (99,7)
	C-7 (162,9)
	C-8 (94,7)
	C-9 (157,9)
	C-10 (108,0)
	C-1' (122,0)
	C-2', 6' (128,4)
	C-3', 5' (115,9)
	C-4' (161,2)

5.2.1.1 RMN ^1H

Inicialmente, foi analisado o espectro de RMN ^1H do flavonóide ST-1 obtido em DMSO- d_6 (400 MHz) (Figura 34).

Em 5,90 ppm está situado um singlete, o qual indica a presença de um hidrogênio na posição 3 da aglicona, indicando que esta substância é uma flavona (Mabry, et al., 1970).

Na região do espectro correspondente aos núcleos aromáticos (6,00 - 8,00 ppm), pode-se observar a presença de quatro sinais, sendo dois correspondentes a região do anel A (6,06 e 6,18 ppm; núcleo mais protegido) e dois para a região do anel B (6,53 e 7,69 ppm; núcleo mais desprotegido) (Mabry, et al., 1970).

Os sinais para os hidrogênios em 6,53 correspondem aos sinais de H-3' e H5', bem como o sinal em 7,69 se encontra os H-2' e H-6'.

A figura 35 mostra a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos, no qual se pode observar dois dupletos na região do anel A, sendo um em 6,06 ppm (H-6) e outro em 6,18 ppm (H-8), ambos com constante de acoplamento (j) de 1,3 Hz, indicando uma relação *meta* entre esses dois hidrogênios. Deduz-se com esses dados que o anel A apresenta-se como um núcleo 5,7-di-hidroxilado.

Ao analisar a região do anel B, observa-se um duplete em 6,53 ppm ($j = 8,70$ Hz) (H-3', 5'), indicando a presença do acoplamento na posição em *orto* deste hidrogênio (valor elevado para j), e um duplete em 7,69 ppm ($j = 8,50$ Hz) também com acoplamento em *orto*. Deduz-se com esses dados que o anel B apresenta um núcleo 4'-hidroxilado.

Os sinais de ^1H encontrados nos remetem a estrutura da apigenina, e para confirmar esta estrutura tais sinais foram comparados com os dados da apigenina na literatura (Tabela 10) (Owen, et al., 2003; Agrawall, 1989).

Tabela 10: Comparação dos sinais de ^1H da amostra ST-1 e os sinais da apigenina observados na literatura

δ_{H} ST-1 (DMSO- d_6)	δ_{H} Literatura (DMSO- d_6) (Owen, et al., 2003)
H-3 (5,90; s), H-6 (6,06; d; J= 1,3 Hz) H-8, (6,18; d; J= 1,3 Hz) H-3', 5' (6,53; d; J= 8,7 Hz) H-2', 6' (7,69; d; J= 8,5 Hz)	H-3 (6,64; s), H-6 (6,21; d) H-8, (6,47; d) H-3', 5' (6,94; d) H-2', 6' (7,87; d)

Dessa forma, com os sinais de ^1H obtidos por este espectro e comparando com os dados da literatura, se pode deduzir que a estrutura da aglicona é a apigenina (Figura 36). Outros sinais observados no espectro de RMN de ^1H indicam a presença de uma segunda substância, porém não foi possível determinar sua estrutura em mistura.

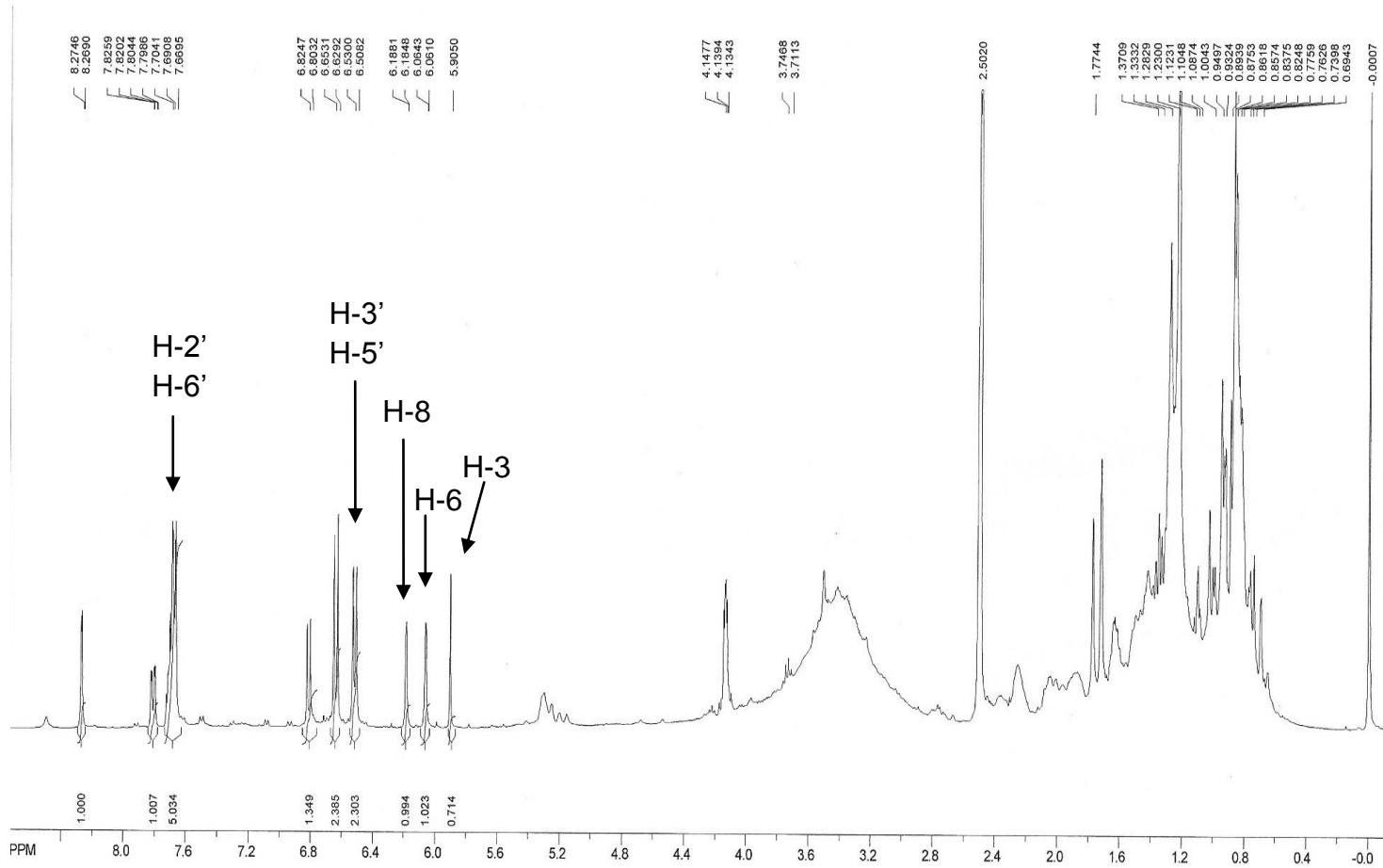


Figura 34: Espectro de RMN ^1H de ST-1 (400 MHz).

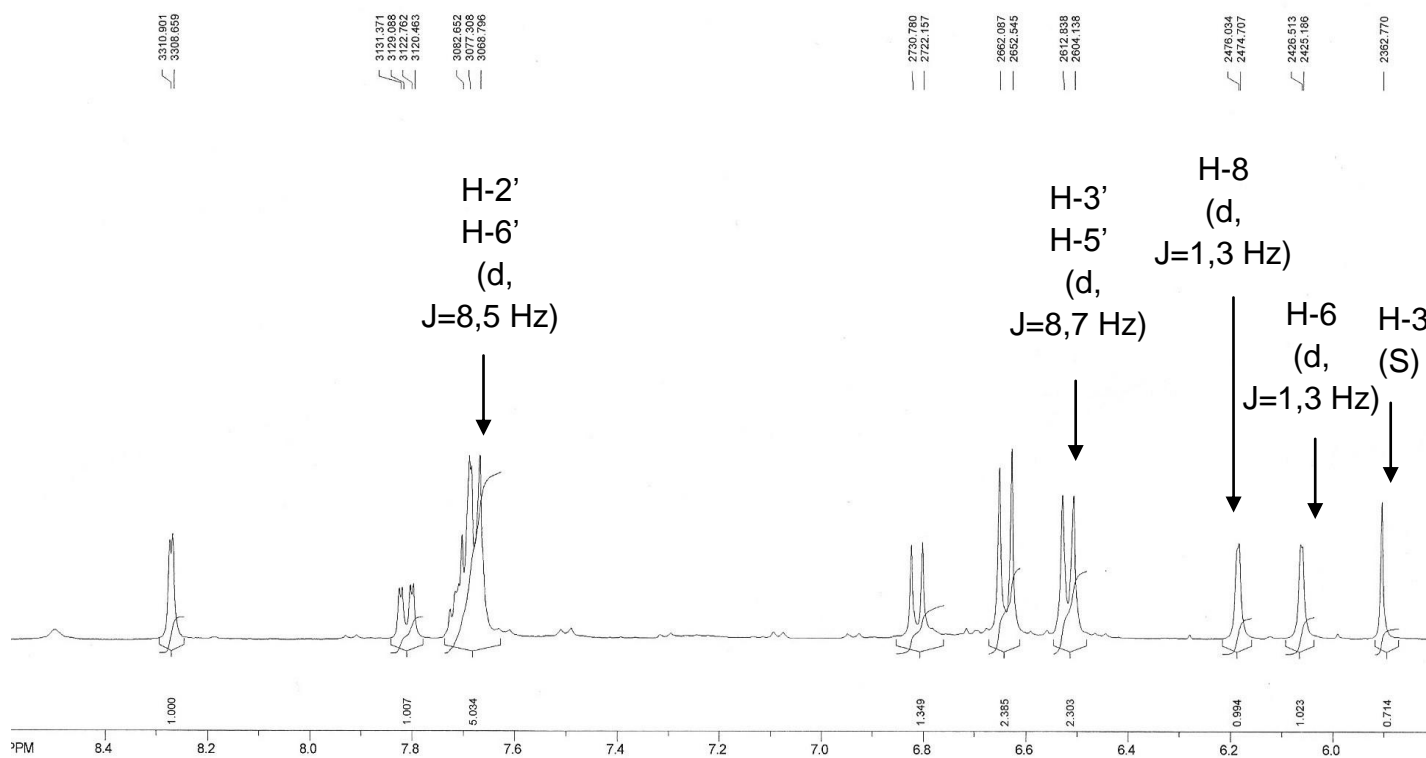
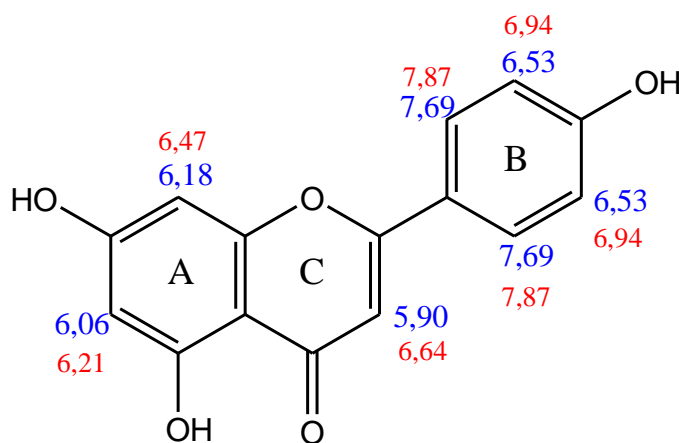


Figura 35: Espectro de RMN ^1H de **ST-1** (400 MHz), com a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos



ST-1

Literatura

Figura 36: Estrutura da aglicona apigenina (ST-1) comparada com os dados da literatura (Owen, et al., 2003).

5.2.1.2 RMN ^{13}C

O espectro de RMN de ^{13}C forneceu 11 sinais (Figura 37), porém estes se referem a 13 carbonos, conforme tabela 8, uma vez que o sinal em 115,9 corresponde aos carbonos C-3' e C-5', e o sinal em 128,4 corresponde aos carbonos C-2' e C-6'.

Observa-se para o anel C da aglicona um sinal mais desprotegido do espectro, em 181,7 ppm, o que confirma a presença de uma carbonila cetônica em C-4 α - β insaturada (Yoshikawa et al., 2000).

O segundo sinal mais desprotegido do espectro está listado para outro carbono do anel C (167,4 ppm), que corresponde ao C-2, e de acordo com Mabry e colaboradores (1970), quando o sinal de C-2 está em torno de 165 ppm, e o sinal de C-3 em torno de 103 ppm, estes são característicos para as flavonas.

O sinal listado em 162,9 foi assinalado para o C-7 que está em região desprotegida, devido sua ligação com a hidroxila. O sinal em 161,7 ppm corresponde ao C-5, que está hidroxilado (Figura 37). O carbono 6 está ligado a um hidrogênio e seu sinal está em 99,7 ppm.

Em 161,2 ppm encontra-se o carbono 4' do anel B ligado a hidroxila, o carbono 8 está ligado a um hidrogênio e aparece na região de 94,7 ppm. O sinal para o C-10, por sua vez, está situado em 108,0 ppm. Já os sinais de 157,9 e 122,0 ppm foram atribuídos aos carbonos C-9 e C1' respectivamente.

A tabela 11 correlaciona os sinais de ^{13}C do espectro obtido da amostra ST-1 com os sinais da apigenina encontrados na literatura (Owen, et al., 2003; Agrawall, 1989).

Com os dados de ^{13}C e foi possível corroborar a proposta da aglicona apigenina (Figura 38).

Tabela 11: Comparação dos sinais de ^{13}C de ST-1 e os sinais da apigenina observados na literatura.

	δ_{C} (DMSO- d_6)	δ_{C} (DMSO- d_6)
	ST-1	Literatura (Yoshikawa et al., 2000)
Apigenina		
2	167,4	164,2
3	102,7	103,1
4	181,7	182,0
5	161,7	161,5
6	99,7	99,1
7	162,9	163,9
8	94,7	94,4
9	157,9	157,7
10	108,0	104,1
1'	122,0	121,6
2'	128,4	128,6
3'	115,9	116,3
4'	161,2	161,2
5'	115,9	116,3
6'	128,4	128,6

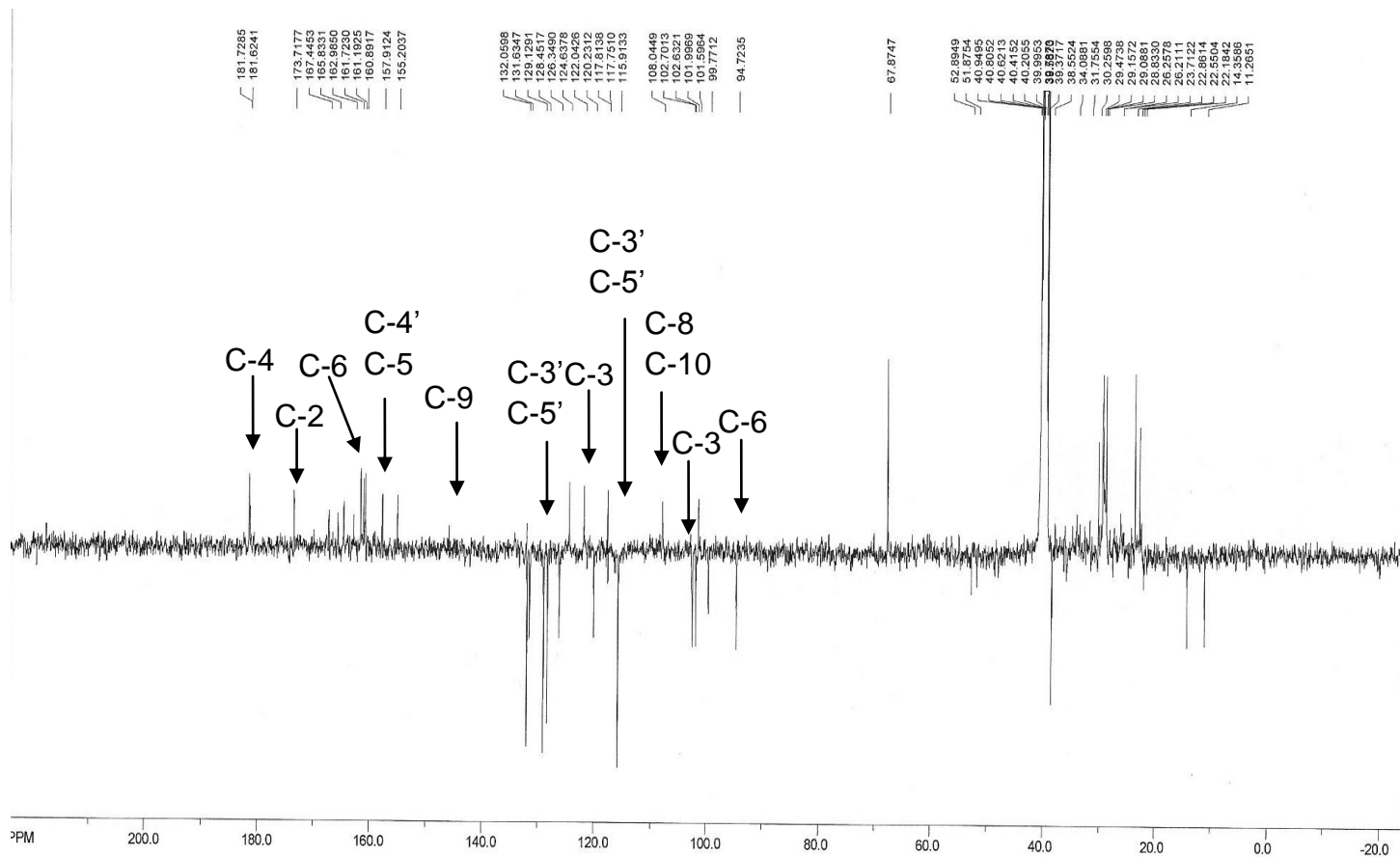
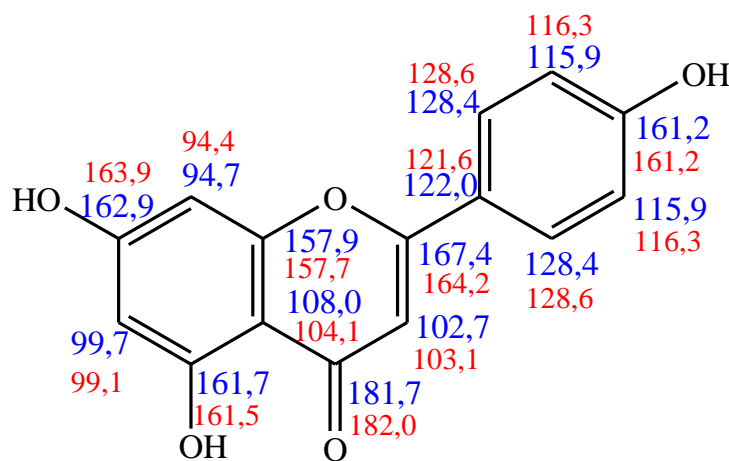


Figura 37: Espectro de RMN DEPT ^{13}C de **ST-1** (400 MHz).



ST-1

Literatura

Figura 38: Sinais de ^{13}C da aglicona apigenina (ST-1) comparados com os dados da literatura (Yoshikawa et al., 2000).

A tabela 12 mostra um resumo dos sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C verificados para ST-1 e comparados com os dados da literatura (Owen, et al., 2003; Agrawal, 1989).

Tabela 12: Comparação dos sinais de ST-1 e os sinais da apigenina da literatura (Owen, et al., 2003; Yoshikawa et al., 2000).

	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
	ST-1	Literatura	ST-1	Literatura
	(DMSO- d_6)	(DMSO- d_6)	(DMSO- d_6)	(DMSO- d_6)
Apigenina				
2	167,4	164,2	---	---
3	102,7	103,1	5,9	6,64
4	181,7	182,0	---	---
5	161,7	161,5	---	---
6	99,7	99,1	6,06	6,21
7	162,9	163,9	---	---
8	94,7	94,4	6,18	6,47
9	157,9	157,7	---	---
10	108,0	104,1	---	---
1'	122,0	121,6	---	---
2'	128,4	128,6	7,69	7,87
3'	115,9	116,3	6,53	6,94
4'	161,2	161,2	---	---
5'	115,9	116,3	6,53	6,94
6'	128,4	128,6	7,69	7,87

5.2.2 Técnicas bidimensionais

5.2.2.1 COSY ^1H - ^1H

A partir da análise do COSY foi possível identificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos H-3' e H-5' (vermelho) com H-2' e H-6' (azul), mostrando a sua correlação. A figura 39 mostra o espectro de COSY, com essas correlações.

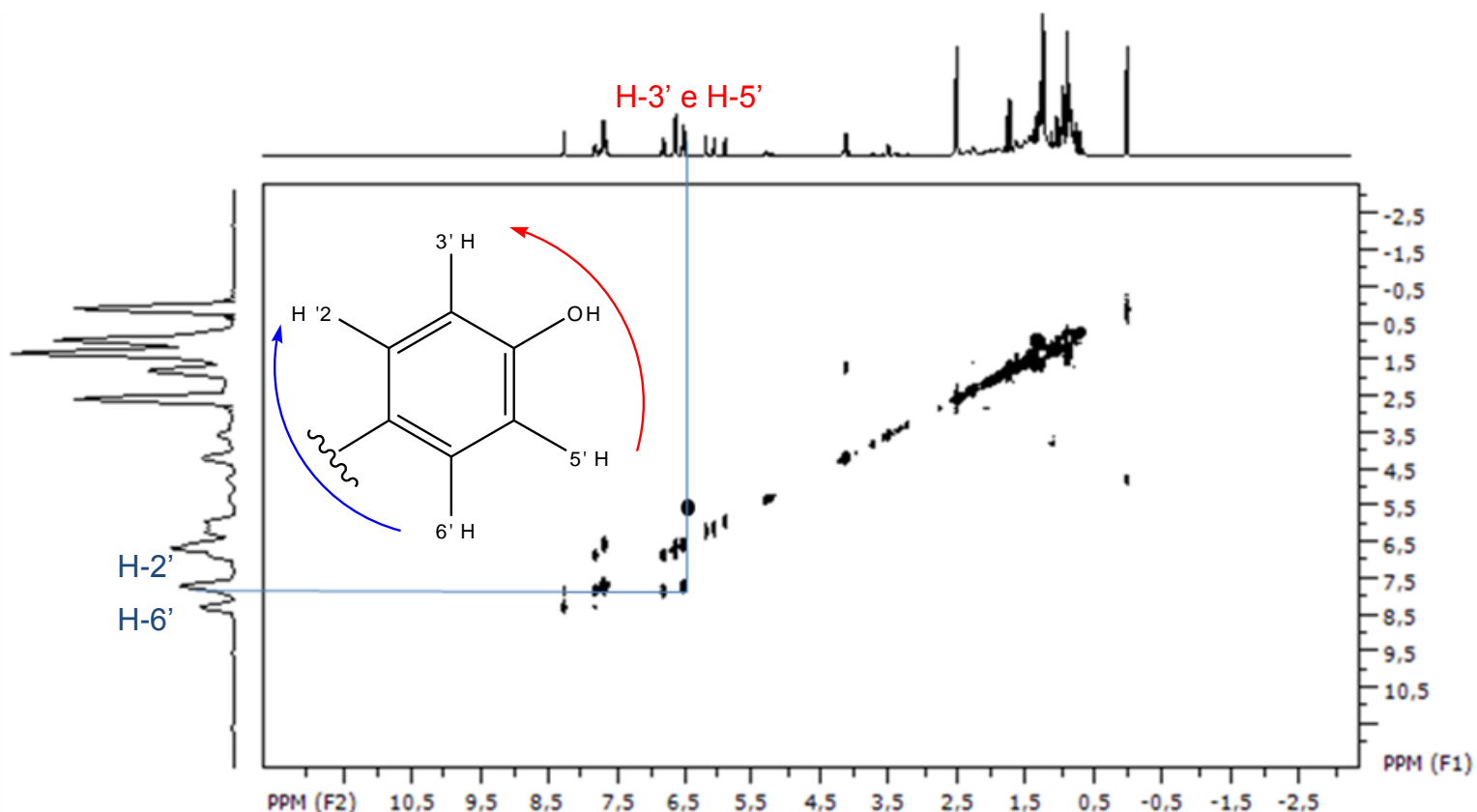


Figura 39: Espectro de RMN 2D- COSY para ST-1.

5.2.2.2 HMQC

A partir dos dados do espectro de HMQC (Figura 40) foi possível estabelecer a correlação direta entre os núcleos de ^1H com os núcleos de ^{13}C a eles diretamente ligados. Dessa forma, através da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar os valores dos deslocamentos químicos (δ) dos carbonos da aglicona que possuíam um hidrogênio a eles ligado.

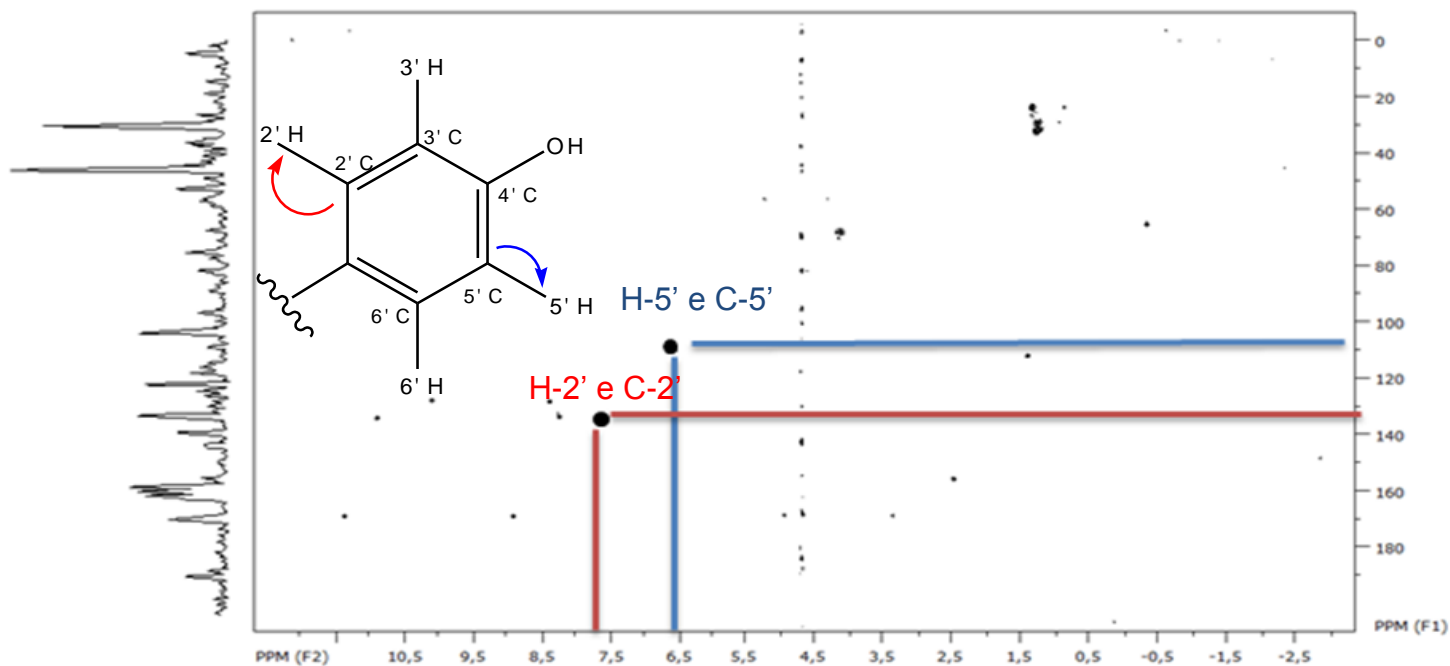


Figura 40: Espectro de RMN-2D HMQC para ST-1.

5.2.2.3 HMBC

Através da análise das correlações a longa distância ^1H - ^{13}C (Figura 41) foi possível detectar a correlação entre os núcleos de ^1H e os núcleos de ^{13}C , a duas ou mais ligações de distância. A partir da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar a correlação entre os sinais de H-6' e H-2' com C-4' e os sinais de C-2' com H-5'.

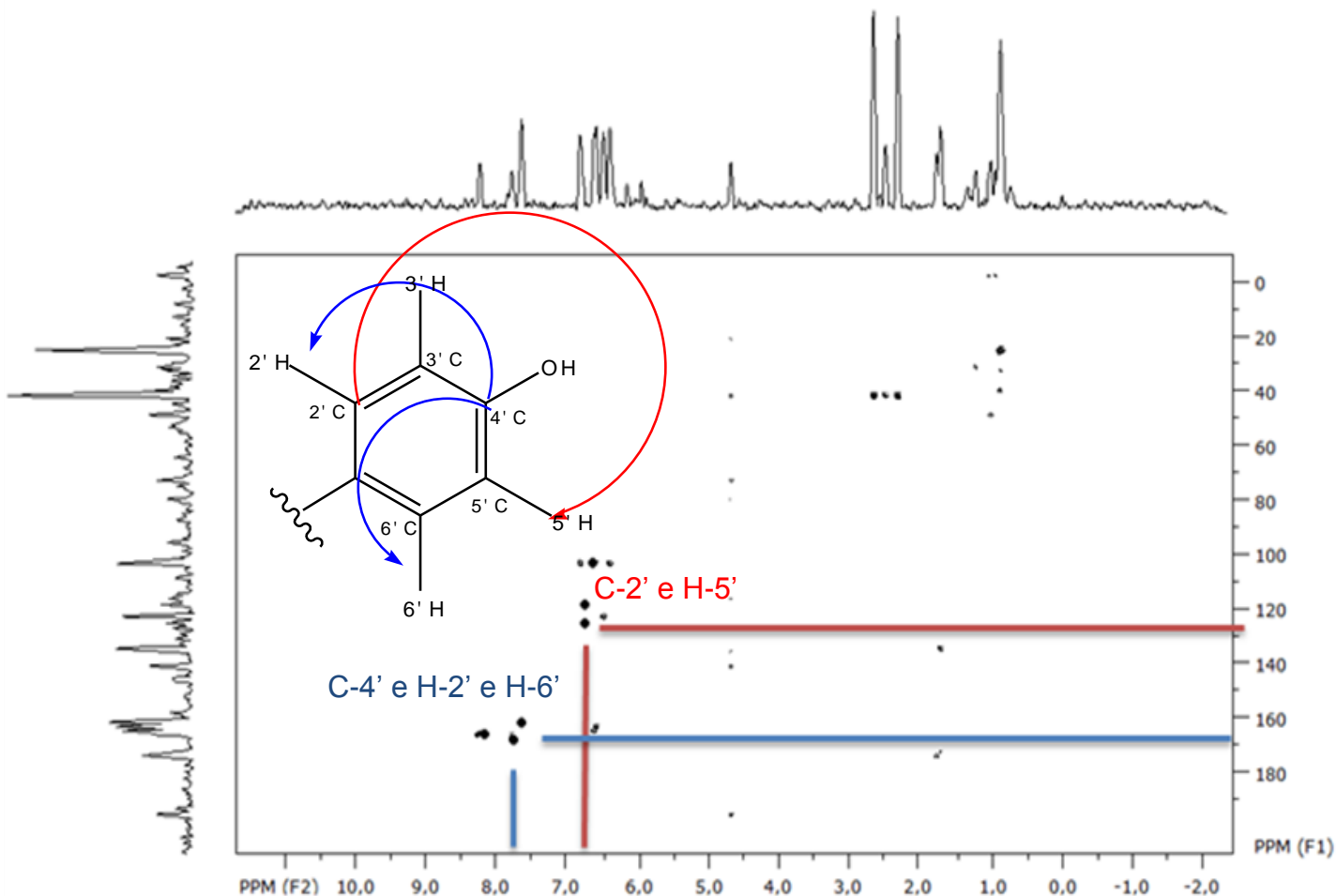


Figura 41: Espectro de RMN-2D HMBC para ST-1.

5.3 Proposta Estrutural

A análise dos espectros mono e bidimensionais revelou a presença da aglicona apigenina (Figura 42). Os sinais de RMN de ^{13}C e ^1H estão listados na Tabela 11 e a comparação com dados da literatura (Owen, et al., 2003; Agrawal, 1989). Porém pode-se perceber que além desta flavona existe uma outra substância minoritária, pois em todos os espectros se pode notar a presença de outros sinais, todavia, essa molécula não pôde ter sua elucidação estrutural proposta ou confirmada.

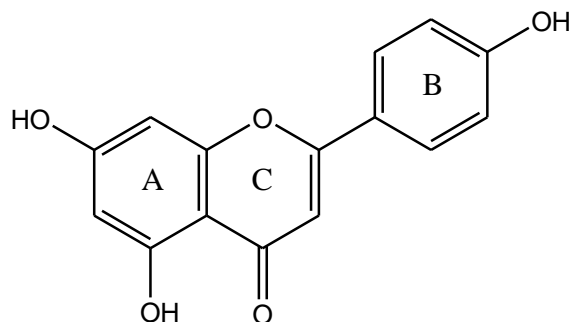


Figura 42: Estrutura de ST-1 (Apigenina 5,7,4' -trihidroxi-flavona).

Esta flavona foi identificada anteriormente nos frutos de aroeira (Degáspari, et al., 2004), porém este trabalho é pioneiro no que se refere ao isolamento e elucidação estrutural da substância.

5.4 Atividade Antioxidante

Atualmente, há um crescimento na procura por produtos naturais que fazem parte da dieta humana, devido aos possíveis efeitos negativos dos aditivos alimentares na saúde humana, e aliado a isto um aumento da preocupação dos consumidores com a alimentação ao longo dos anos. Diversos estudos (Lachman, et al., 2010; Zhang, et al., 2010) demonstram que um grande número de fontes vegetais biossintetizam fitoquímicos que possuem atividade antioxidante e podem ser utilizados como uma fonte natural de substâncias que podem seqüestrar os radicais livres (Lachman, et al., 2010).

Diversos trabalhos sugerem que dietas ricas em fitoquímicos podem reduzir a incidência de doenças do coração, bem como alguns tipos de câncer, e algumas desordens neurológicas (Arts e Hollman, 2005), devido a sua capacidade de seqüestrar os radicais livres produzidos no organismo. Tais radicais podem ocasionar a ruptura da membrana celular e DNA, causando mutações e outras doenças (Reynertson, et al., 2008).

Essas espécies reativas também são responsáveis pela ativação de inúmeros fatores de transcrição pró-inflamatórias, e a inflamação é o principal fator na promoção de doenças inflamatórias crônicas (Reynertson, et al., 2008).

Com este intuito, se verificou a capacidade do extrato metanólico e suas frações no seqüestro do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila).

A tabela 13 mostra os resultados do extrato metanólico, os conjuntos, ST-1 (apigenina isolada e caracterizada neste estudo) e os padrões de referência submetidos ao ensaio antioxidante em três concentrações distintas. Vale ressaltar que os testes foram realizados em triplicata e aqui estão apresentadas as médias aritméticas e o desvio padrão.

Os padrões utilizados neste trabalho foram os flavonóides quercetina, rutina, e apigenina, o ácido ascórbico e o padrão comercial de estrutura fenólica, BHT (Butil-hidroxi-tolueno).

Os flavonóides foram utilizados como padrões devido ao seu efeito protetor nos sistemas biológicos, que são atribuídos à sua capacidade de transferência de elétrons dos radicais livres, também ativam as enzimas antioxidantes e inibem as oxidases (Heim, 2002). De acordo com Ross e Kasum (2002), a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua estrutura, em especial com a facilidade com que um átomo de hidrogênio a partir de uma hidroxila do anel aromático pode ser doado para um radical livre. E a capacidade de um composto aromático em estabilizar um elétron não emparelhado (Figura 43).

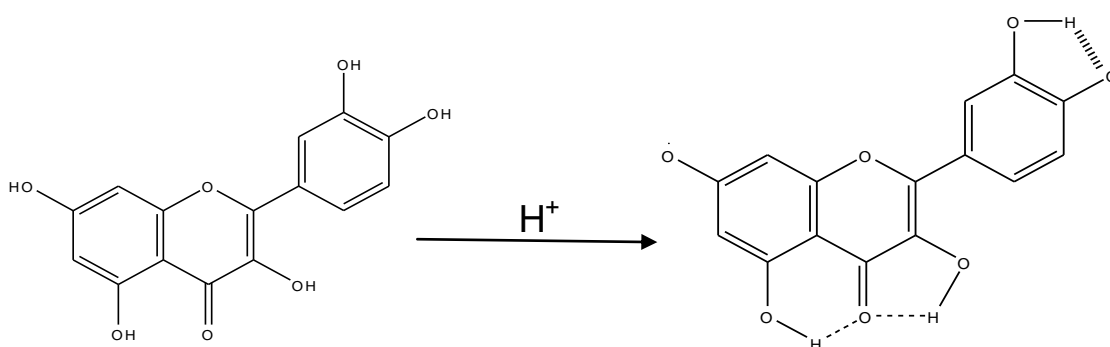


Figura 43: Mecanismo mostrando um composto aromático aceitando um elétron não emparelhado.

O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato e por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. O ascorbato desempenha inúmeros papéis metabólicos no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular Fe^{3+} e Cu^{2+}) presentes nos sítios ativos das enzimas, ou nas formas livres no organismo. Por ser um bom agente redutor o ascorbato pode ser oxidado pela maioria das espécies reativas de oxigênio que chegam ou são formadas nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (Barreiros, et al., 2006).

Tabela 13: Atividade antioxidante do extrato metanólico, frações e dos padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina e 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT)

Espécies vegetais	Concentrações		
	1000 $\mu\text{g/mL}$ (%)	100 $\mu\text{g/mL}$ (%)	10 $\mu\text{g/mL}$ (%)
Extrato Metanólico	95,6 \pm 0,96	92 \pm 0,20	87,6 \pm 2,38
Conjunto A1	92,7 \pm 4,3	85,6 \pm 0,3	80,0 \pm 2,5
Conjunto A2	90,9 \pm 1,8	84,9 \pm 2,2	22,9 \pm 0,9
Conjunto A3	93,6 \pm 0,9	89,8 \pm 0,9	80,0 \pm 1,2
ST-1	80 \pm 1,2	45,8 \pm 0,9	9,0 \pm 2,2
Quercetina	95,27 \pm 0,9	93,4 \pm 1,2	91,3 \pm 3,0
Rutina	88 \pm 0,9	86,4 \pm 1,1	0,84 \pm 0,9
Apigenina	60 \pm 1,5	41,3 \pm 2,7	9,5 \pm 1,0
Ácido ascórbico	95,6 \pm 1,1	93,3 \pm 2,7	92,7 \pm 1,5
BHT	100 \pm 0,9	52,1 \pm 2,2	43,6 \pm 1,5

*Média \pm Desvio Padrão (n=3).

Pode-se notar que o extrato metanólico e os conjuntos A1 e A3 possuem atividade seqüestradora de radicais livres nas três concentrações testadas (1000, 100 e 10 $\mu\text{g/ml}$). Sendo que até na menor concentração (10 $\mu\text{g/mL}$), estes apresentam atividade superior a 80%.

Quando comparados o extrato metanólico com os demais conjuntos, observa-se que o extrato apresenta atividade antioxidante superior, e em uma escala de capacidade de sequestro de radicais livres, a seqüência seria: Extrato metanólico > A3 > A1 > A2 > ST-1.

O extrato metanólico, quando comparados com a quercetina e o ácido ascórbico, somente na menor concentração (10 µg/mL) do extrato que se observa que este é inferior ao flavonóide e ao ácido, nas demais concentrações, o percentual de seqüestro é próximo aos valores encontrados para extrato e padrões.

O padrão comercial BHT apresenta atividade antioxidante na maior concentração (1000 µg/mL) superior aos demais extratos e padrões, porém quando comparados o extrato metanólico com o BHT, o extrato apresentou atividade antioxidante superior ao padrão nas concentrações de 100 e de 10 µg/mL, sendo inferior apenas na concentração de 1000 µg/mL. Fato este que também se observa para o conjunto A3, demonstrando o potencial antioxidante deste extrato e deste conjunto.

Quando o extrato metanólico é comparado com a rutina e apigenina, este apresenta um alto potencial antioxidante, pois todas as concentrações são superiores aos flavonóides, comprovando novamente esta atividade seqüestradora do extrato.

Quando se observa o potencial antioxidante do conjunto A2, este apresentou atividade antioxidante superior ao BHT somente na concentração de 100 µg/mL e semelhante ao padrão comercial na concentração de 1000 µg/mL.

Com relação ao flavonóide rutina, o conjunto A2 se mostrou superior na concentração de 1000 e 10 µg/mL apresentando na concentração de 100 µg/mL atividade semelhante ao padrão. Com relação aos demais padrões (quercetina e ácido ascórbico), este conjunto apresentou-se inferior em todas as concentrações testadas.

A substância ST-1 (apigenina) apresentou capacidade seqüestradora de radicais livres na maior concentração (1000 µg/mL), resultando em 80 % de seqüestro. Para as demais concentrações, esta substância apresentou atividade antioxidante inferior aos padrões testados, com exceção da rutina, que apresentou tal atividade na menor concentração inferior a 1 %.

A figura 44 mostra o potencial antioxidante do extrato metanólico e as frações, bem como dos padrões fenólicos.

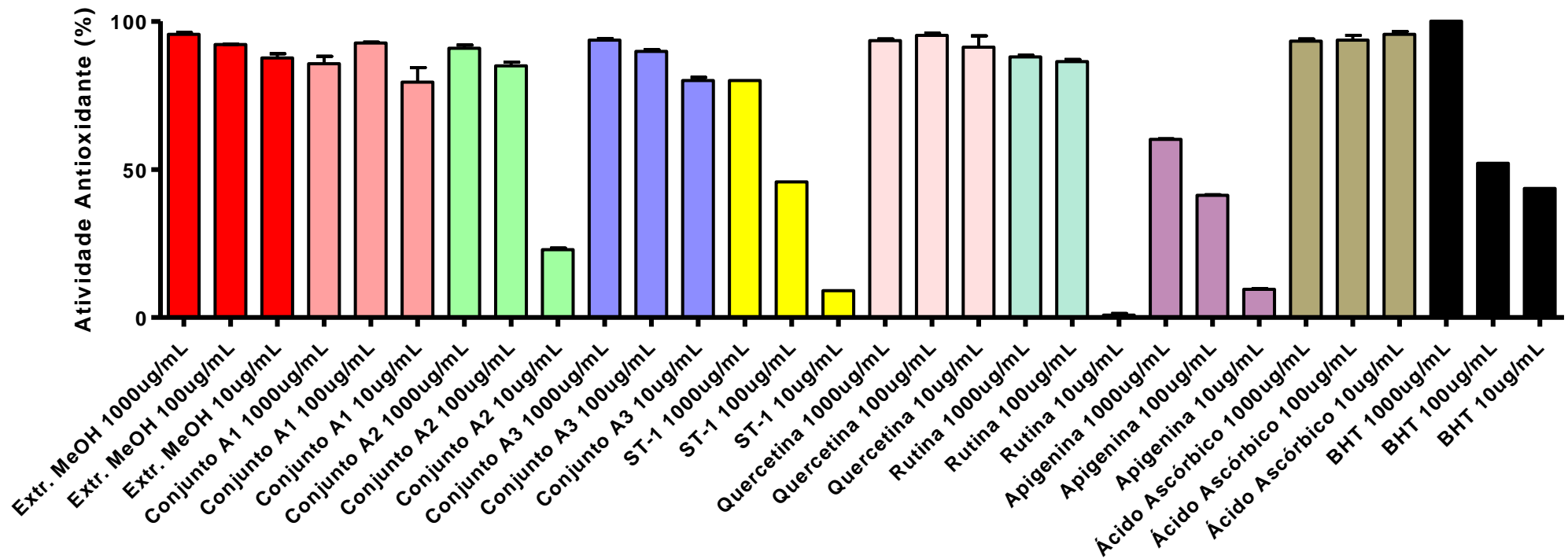


Figura 44: Atividade antioxidante do extrato metanólico, os conjuntos, ST-1 e os padrões de referência quercetina, rutina, apigenina, ácido ascórbico e BHT (n=3).

Quando se compara a substância ST-1 e apigenina, se pode notar a semelhança dos resultados obtidos, porém a maior concentração (1000 µg/mL) do ST-1 se apresentou superior a apigenina, este fato pode ter ocorrido devido a substância ST-1 estar em mistura com outra substância minoritária. As demais concentrações mostraram-se com valores de percentual de seqüestro de radicais livres semelhantes.

O padrão comercial BHT pode ter apresentado atividade seqüestradora de radicais livres apenas na maior concentração (1000 µg/mL), devido sua pouca polaridade e este é um antioxidante efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes (Ramalho e Jorge, 2006).

Com relação a vitamina C, esta apresenta uma potente capacidade antioxidante, visto que suas moléculas, que são polares e estão localizados em compartimentos aquoso, sofrem oxidação antes que outras moléculas se oxidem, impedindo e protegendo essas outras moléculas da oxidação (Costa e Rosa, 2006).

Dados de literatura (Wojdyło, et al., 2007; Skerget, et al., 2005; Galati, et al., 2002; Chen, et al., 1996) relatam que a apigenina apresenta pouca capacidade antioxidante, fato que pode ser explicado pela estrutura do flavonóide.

De acordo com Ross e Kasum (2002) a propriedade antioxidante dos flavonóides está relacionada com sua estrutura, e os flavonóides que se apresentam hidroxilados, principalmente os grupos 3-OH, 5-OH, 7-OH, 4'-OH e 3'-OH são os que apresentam maior propriedade antioxidante. Outro aspecto que intensifica a atividade antioxidante que está relacionada aos flavonóides é a presença de dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 (Harborne e Williams, 2000).

A apigenina (ST-1) (Figura 45), apresenta a dupla ligação entre os carbonos C-3 e C-4, e a hidroxila no carbono 5, 7 e 4', porém esta aglicona não apresenta o grupo OH nos demais carbonos, fato este que pode explicar a

capacidade antioxidante menor quando comparada á literatura (Harborne e Williams, 2000; Rice-Evans, et al., 1996).

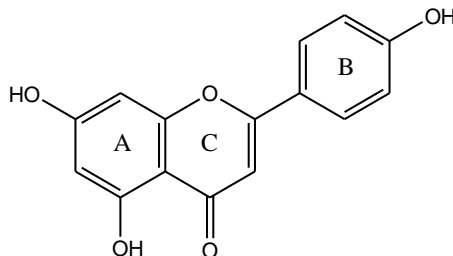


Figura 45: Estrutura química da apigenina, mostrando o grupamento OH nos carbonos 5, 7 e 4'.

Tendo em vista que a atividade antioxidante está relacionada principalmente aos flavonóides e além destes, aos ácidos fenólicos e aos taninos, estes últimos também foram avaliados. Assim, foram quantificados os teores de taninos gálicos, taninos condensados e fenóis totais.

5.5- Análise e dosagem de taninos e fenóis totais do fruto e cascas dos frutos de aroeira

Os taninos são compostos secundários, presentes na maioria das plantas, que podem variar de concentração nos tecidos vegetais, dependendo da idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta (Monteiro, et al., 2005).

Os taninos são classificados em dois grupos principais, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham molécula poli-hidroxifenóis ou seus derivados (Degáspari, et al., 2005).

Os pertencentes ao primeiro grupo são denominados taninos hidrolisáveis, que incluem os galitaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico (Figura 46). Este grupo de taninos podem ser detectados em elevadas concentrações principalmente em madeiras, cascas de árvores, folhas e galhos (Mueller-Harvey, 2001).

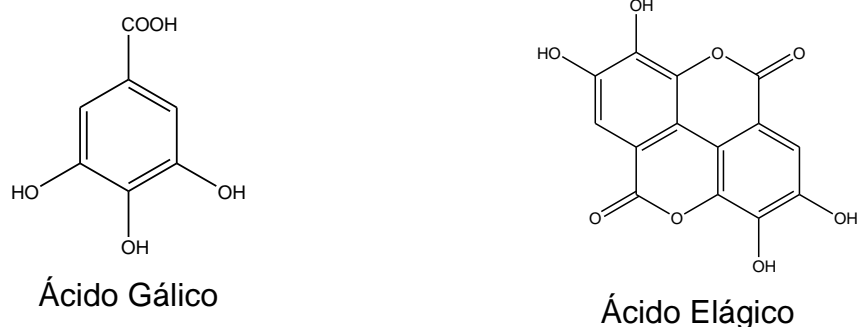


Figura 46: Estrutura química dos taninos ácido gálico e elágico

O outro tipo de taninos é denominado de taninos condensados e são encontrados em maior quantidade e de maior importância em alimentos (Degáspari, 2005).

Compreendem um grupo de polihidroxi-flavan-3-ol, e apresentam uma estrutura semelhante aos flavonóides, com coloração variando do vermelho ao marrom (Scholfield, et al., 2001).

De acordo com Degáspari (2005), a presença de pequenas quantidades de taninos em frutos confere-lhes características sensoriais desejáveis, ditas como "o corpo da fruta". No entanto, quantidades maiores conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes. A sensação de adstringência é gerada devido à propriedade que os taninos apresentam de precipitar proteínas. Quando em contato com as proteínas da saliva formam um complexo insolúvel que popularmente se caracteriza pela sensação adstringente (Figura 47).

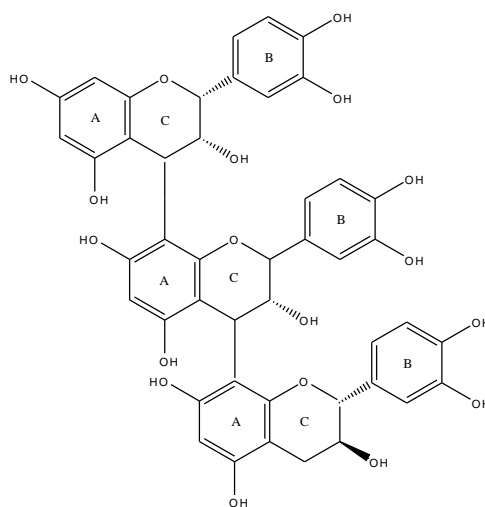


Figura 47: Estrutura química da procianidina, um exemplo de tanino condensado

Neste trabalho foram analisados os teores de taninos condensados e hidrolisáveis dos frutos e semente das cascas dos frutos de aroeira. A tabela 14 ilustra esses resultados.

Tabela 14: Dados obtidos nas análises de taninos condensados e taninos hidrolisáveis dos frutos e cascas de aroeira

Amostras	Taninos condensados (%)	Taninos hidrolisáveis (%)
Fruto de aroeira	2,7	—
Casca do fruto de aroeira	2,54	—

De acordo com esses resultados é possível observar que os teores de taninos se concentram nas cascas dos frutos de aroeira, visto que ambos os resultados apresentam valores semelhantes.

Observa-se que não foram detectados os teores de taninos hidrolisáveis nos frutos e cascas de aroeira. Porém para a família Anacardiaceae esses taninos são encontrados principalmente nas copas das árvores de espécies do gênero *Rhus* (Battestin, 2004).

De acordo com Aganga e Mosase (2001), os teores de taninos condensados das sementes variam entre 2 a 5%, entre as diferentes espécies. Todavia, os teores de taninos condensados detectados nas sementes de *Rhus lanceae* (Anacardiaceae) foram em torno de 5,07% de taninos condensados, e quando comparados com as sementes de *Schinus terebinthifolius*, estes se apresentam inferiores (Aganga e Mosase, 2001).

Com relação aos teores de fenóis totais nos frutos e cascas de aroeira a tabela 15 mostra os resultados.

Tabela 15: Dados obtidos dos teores de fenóis totais dos frutos e cascas de aroeira

Amostras	Fenóis totais ($\mu\text{g/mL}$)
Fruto de aroeira	125,4
Casca do fruto de aroeira	122

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que os teores de fenóis totais se concentram nas cascas dos frutos de aroeira, assim como os teores de taninos.

Observa-se baixa concentração de fenóis totais nos frutos e cascas de aroeira. Um fator responsável por essa baixa concentração pode ser a metodologia de extração, que é um fator limitante para a observação do conteúdo fenólico das plantas (Agostini-Costa et al., 2003).

Este resultado corrobora com trabalhos (Oliveira, 2005; Zielinski e Kozlowka, 2000) que demonstram que não há nenhuma correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico de extratos de diferentes plantas. Esse mesmo fato foi relatado por Kahkonen et al. (1999) e Maillard e Berset (1995). Isso indica que podem existir outras substâncias, além das fenólicas que podem estar agindo como seqüestradoras de radicais livres.

De acordo com Moure e colaboradores (2001), os polifenóis poliméricos são antioxidantes mais potentes do que os fenólicos monoméricos. Isto significa que os taninos condensados e gálicos (hidrolisáveis) possuem maior habilidade antioxidante.

É possível também que a atividade antioxidante observada no extrato metanólico e os conjuntos mais ativos possam estar relacionados com inúmeras substâncias, além das fenólicas presentes nos extratos.

5.6- Atividades Imunofarmacológicas

5.6.1- Atividade do extrato metanólico na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 264.7

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, encontrada no ar atmosférico em baixas concentrações, altamente tóxica por ser um radical livre, o que o torna um agente químico altamente reativo (Muzitano, 2006; Flora-Filho e Zilberstein, 2000). A produção fisiológica de NO é extremamente importante na defesa do organismo, porém uma superprodução deste e de seus metabólitos tem implicado no desenvolvimento de diversas patologias, como uma sepsia bacteriana, bem como uma inflamação crônica (Wadsworth e Koop, 2001).

Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares (Muzitano, 2006; Dusse et al., 2003).

Um mecanismo de ação proposto para o extrato de *Schinus terebinthifolius* baseia-se na sua capacidade em inibir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Os compostos capazes de inibir a produção de NO, pela supressão da expressão ou da atividade da *iNOS*, possuem alto potencial como agentes anti-inflamatórios (Hamalainen et al., 2007).

Inicialmente foi avaliada a capacidade do extrato metanólico em inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264-7 estimulados com LPS (1 µg/mL) em três diferentes concentrações, 500, 100 e 20 µg/mL (Figura 48).

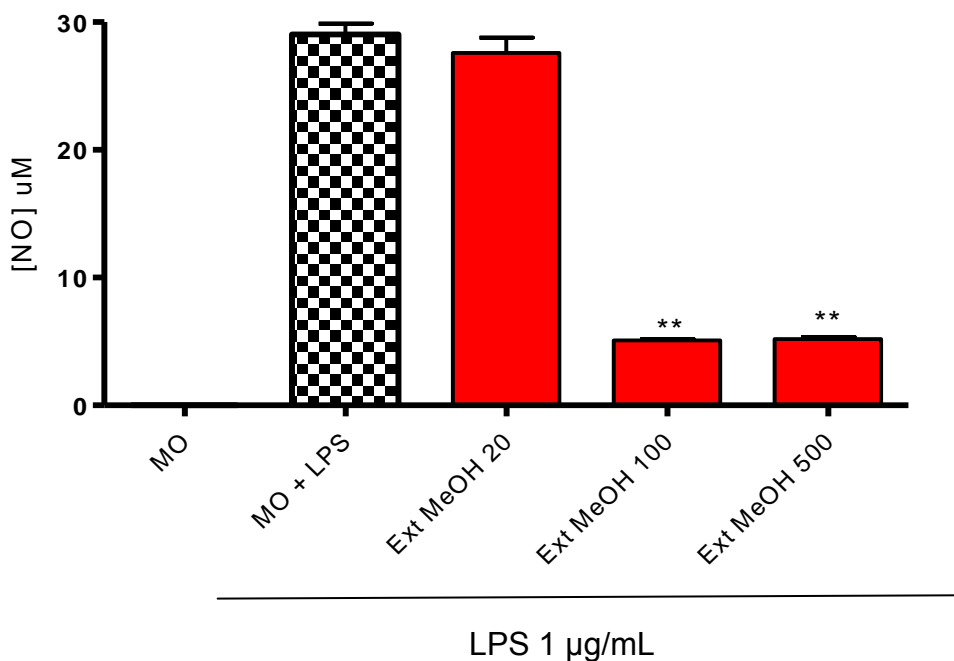


Figura 48: Efeito do extrato das cascas dos frutos da aroeira na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 267.4 (n=3). (**P<0,001).

Pode-se notar na Figura 48 que na maior concentração, a quantidade de NO produzida foi de $5,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$, e que mesmo na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ a quantidade de NO produzida foi de $5,0 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$. Estes dados comprovam capacidade do extrato em inibir o aumento dos níveis de NO na cultura de macrófagos estimulados.

Podem ser encontrados alguns relatos na literatura relativos a extratos e substâncias de origem vegetal capazes de inibir a produção de NO por macrófagos, como por exemplo, os flavonóides quercetina, rutina, wogonina, apigenina (Kim, et al., 2004) bem como algumas saponinas e esteróides (Tewtrakul e Itharat, 2007).

Com o intuito de verificar o tempo em que o extrato é capaz de inibir a produção de NO por macrófagos, foi realizado um experimento em diferentes tempos (12, 24, 36 e 48 h) (Figura 49).

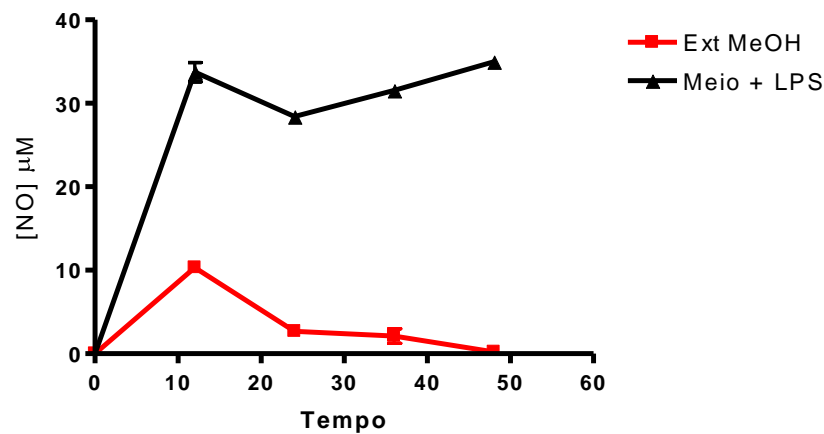


Figura 49: Inibição da produção de NO por macrófagos em diferentes tempos

Como é possível observar na figura 49, a partir de 12 horas é possível verificar a inibição da produção de NO e que no tempo de 48h todo o NO formado havia sido inibido.

. O extrato também foi avaliado quanto a sua citotoxicidade, de acordo com a liberação específica de LDH, explicado em Materiais e Métodos (item 4.7, página 42) e o resultado está mostrado na figura 50.

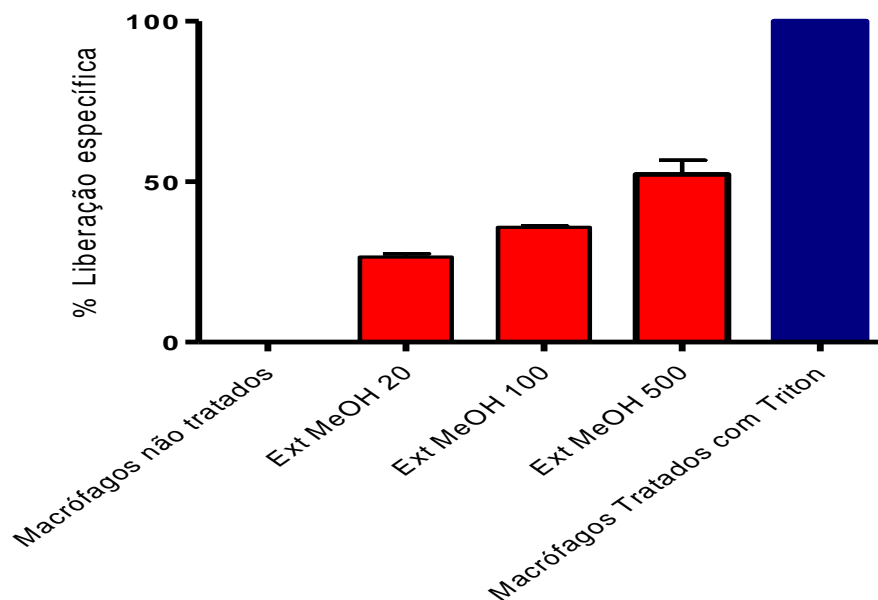


Figura 50: Percentual de liberação de LDH em macrófagos RAW 267.4 no extrato das cascas dos frutos da aroeira (n=3).

Observa-se com este resultado que o extrato metanólico na maior concentração apresenta em torno de 50 % de toxidez, sendo esta toxicidade dependente da concentração. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ onde a atividade na redução dos níveis de NO é ainda muito elevada (Figura 48) a citotoxidez é já bem reduzida (Figura 50).

5.6.2- Atividade do conjunto A3 na inibição da produção de NO por macrófagos

O conjunto A3 foi avaliado quanto a sua capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO). Este conjunto foi o único a ser escolhido dentro os demais, devido ao seu elevado potencial antioxidante e de pureza do conjunto observado por CLAE.

Observando a figura 51 pode-se notar o conjunto é capaz de inibir a produção de NO em macrófagos RAW 267-4 estimulados com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$).

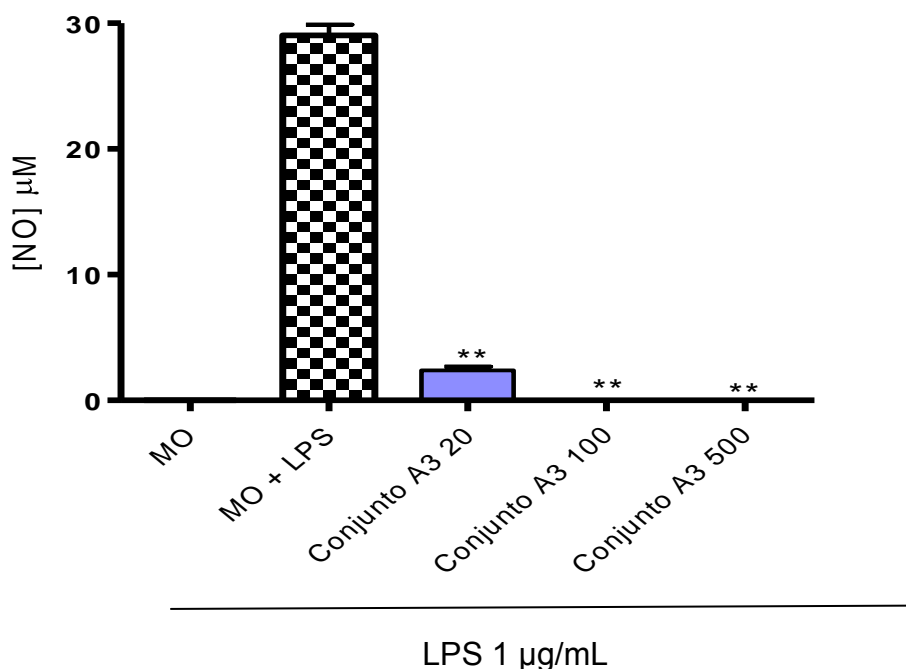


Figura 51: Efeito do conjunto A3 na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 267.4 (n=3). (**P<0,001).

O conjunto A3, assim como o extrato metanólico, foi avaliado em três diferentes concentrações, 500, 100 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Este conjunto apresentou a maior capacidade em inibir a produção de NO, quando comparado com o extrato, visto que nas três concentrações houve quase que completa inibição desta produção. Tanto a concentração de 500 e de 100 $\mu\text{g/mL}$, a quantidade de NO produzida foi de $0,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$, já a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ a quantidade de NO produzida foi $2,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$, ainda assim mostrando ativo em relação ao controle (30 μM), o que indica a capacidade inibitória da produção de NO deste conjunto, o que justificaria seu potencial anti-inflamatório.

Com relação a toxidez, se verificou a ação do conjunto na liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (Materiais e Métodos, item 4.7; página 42), e o resultado está mostrado na figura 52.

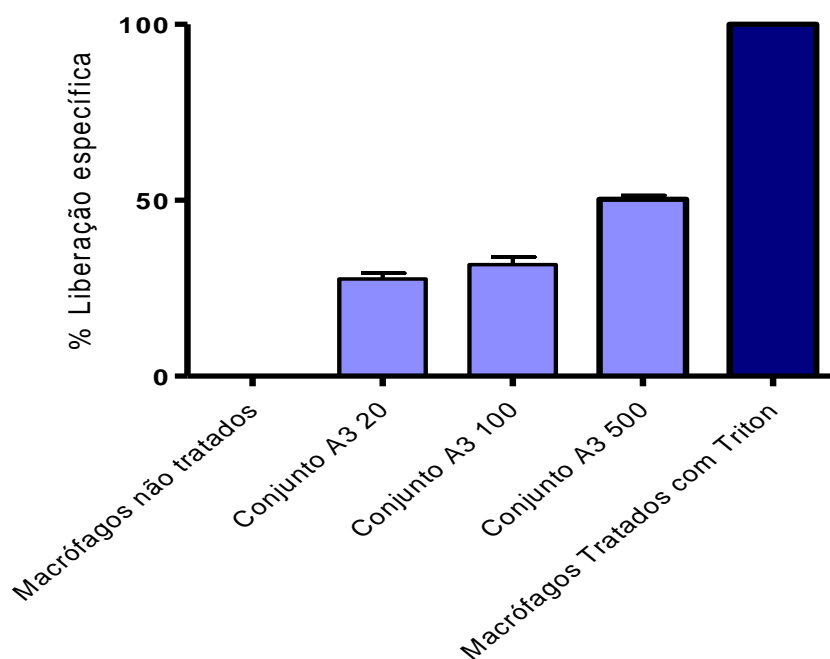


Figura 52: Percentual de liberação de LDH em macrófagos RAW 267.4 no conjunto A3 (n=3).

Observa-se com este resultado que o conjunto A3 é muito semelhante ao extrato metanólico, apresentando sua maior toxidez na maior concentração (500 $\mu\text{g/mL}$) em torno de 50 %, e menos tóxicos nas concentrações mais baixas.

5.6.3- Mecanismo de ação do extrato e conjunto A3 na inibição da produção de NO por macrófagos

Com o intuito de verificar qual o mecanismo responsável pela capacidade de inibir a produção de NO, foram realizados dois experimentos:

1) Inibição da atividade da enzima *iNOS*, realizando um experimento tempo-dependente.

2) Com o doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP);

Para o experimento tempo-dependente, inicialmente ocorre o estímulo com LPS (expressão da *iNOS*) e depois foram acrescentados o extrato e o conjunto A3 (Figura 53), com o objetivo de verificar se ocorreu a inibição da atividade da *iNOS*, visto que sua expressão já havia ocorrido.

O experimento com o doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP) foi utilizado com o objetivo de verificar se a inibição da produção de NO, se deu por intermédio do seqüestro do NO produzido (Figura 54).

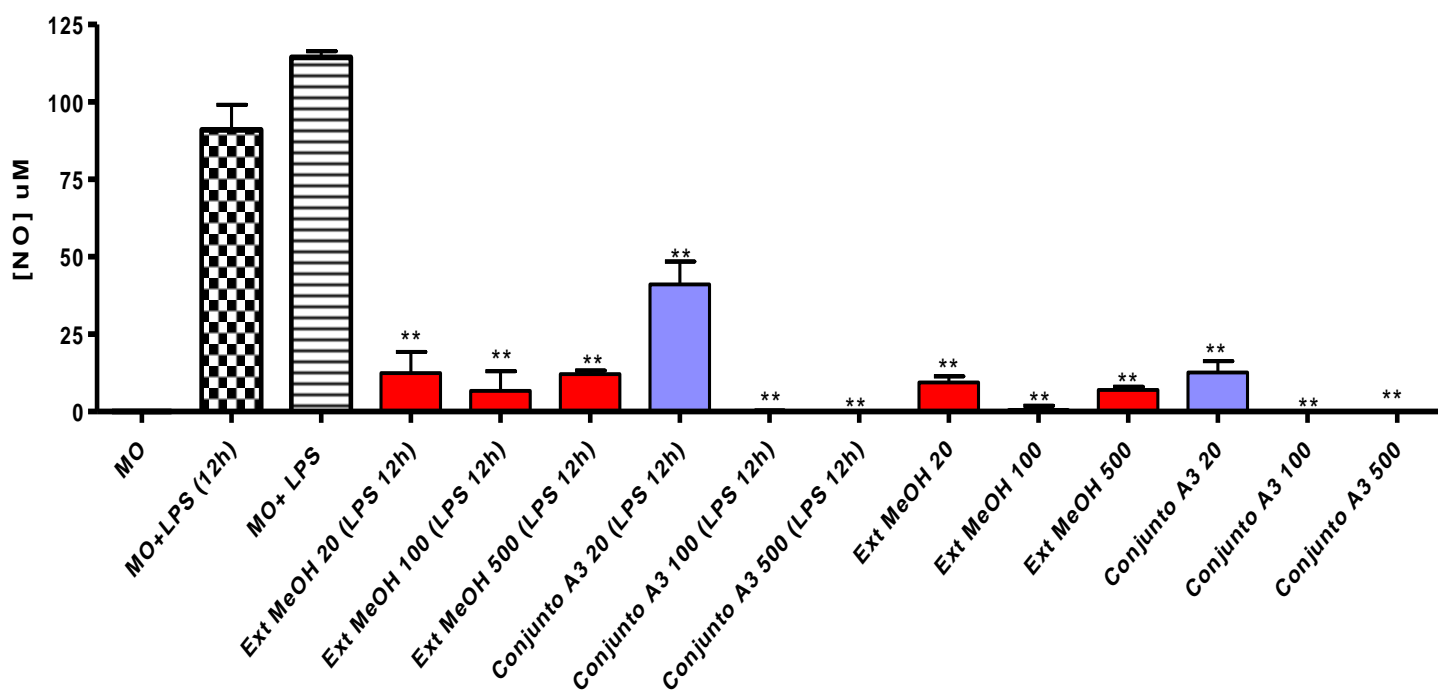


Figura 53: Avaliação tempo-dependente da produção de NO por macrófagos RAW 267.4 (n=3). (**P<0,001).

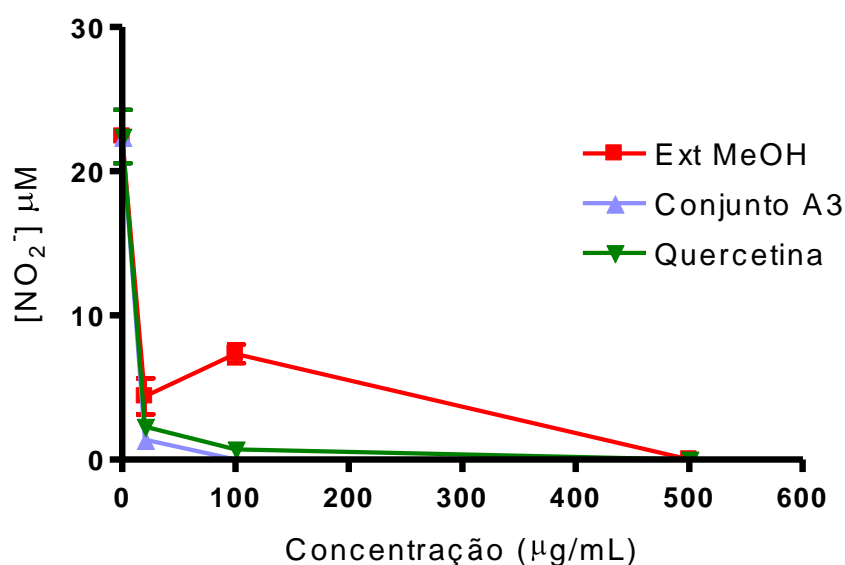


Figura 54: Sequestro de NO doado pelo SNP

De acordo com a Figura 53, se pode notar que o efeito inibitório da produção de NO foi verificado no extrato ($10,0 \pm 4,4 \mu\text{M}$) em todas as concentrações testadas. Com relação ao conjunto A3, a quantidade de NO produzida para as concentrações de 500 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foi em torno de $0,0 \pm 2,0 \mu\text{M}$, e na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ a quantidade foi de $34,0 \pm 4,2 \mu\text{M}$ após os macrófagos já terem sido estimulados pela presença do LPS 12 horas antes.

Foi possível observar na Figura 54 que o extrato sequestra de forma significativa o NO formado ($5,7 \pm 5,1 \mu\text{M}$), e que o conjunto A3 o sequestra completamente ($0,0 \pm 4,7 \mu\text{M}$) contribuindo para a redução do mesmo quando produzido pelos macrófagos em condições pró-inflamatórias.

Com estes resultados, ainda não é possível definir qual o mecanismo de ação do extrato e do conjunto, mas pode-se afirmar que as amostras da aroeira não atuam unicamente através da inibição da expressão da *iNOS*, podendo estar envolvidos também na inibição da sua atividade, e também no sequestro do NO formado, possuindo um alto potencial como agente anti-inflamatório.

5.6.4- Atividade da substância ST-1 na inibição da produção de NO por macrófagos

A substância ST-1 foi avaliada em cinco diferentes concentrações (100; 20; 4; 0,8 e 0,16 $\mu\text{g/mL}$). Sua capacidade em inibir a produção de NO está mostrada na figura 55.

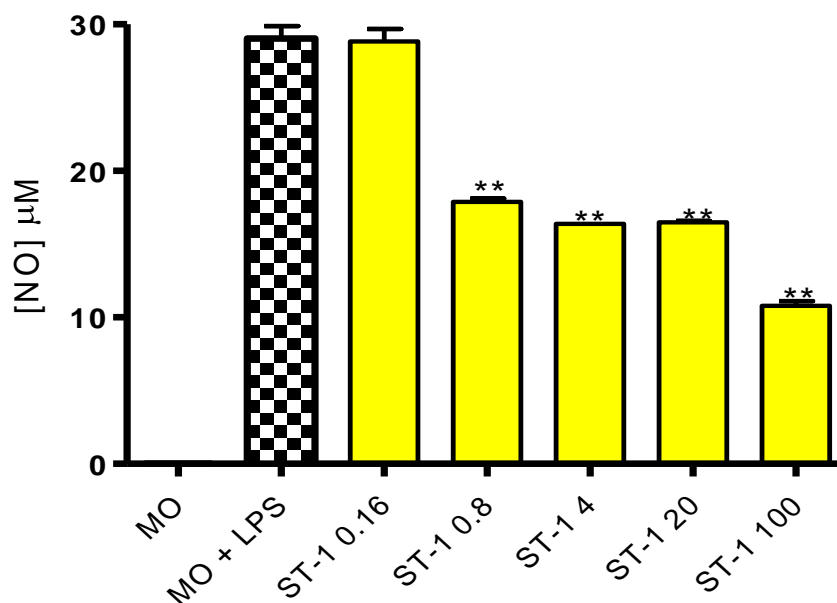


Figura 55: Efeito da substância ST-1 na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 267.4 (n=3). (**P<0,001).

Pode-se notar que a substância ST-1 (apigenina) mostrou-se com potencial anti-inflamatório. Esta foi avaliada em concentrações menores que o extrato e o conjunto devido a sua pureza, e até mesmo na concentração de 0,8 $\mu\text{g/mL}$, esta substância inibiu significativamente a produção de NO. Todos estes resultados demonstram que com a purificação do extrato, foi possível obter frações mais ativas na inibição da produção de NO.

Em relação a toxidez, esta substância mostrou um percentual de liberação específica menor que 10% (Figura 56), fato este que comprova a sua baixa citotoxicidade, este resultado demonstra que com a purificação do extrato e do conjunto A3 obteve uma amostra purificada, ativa e sem toxidez.

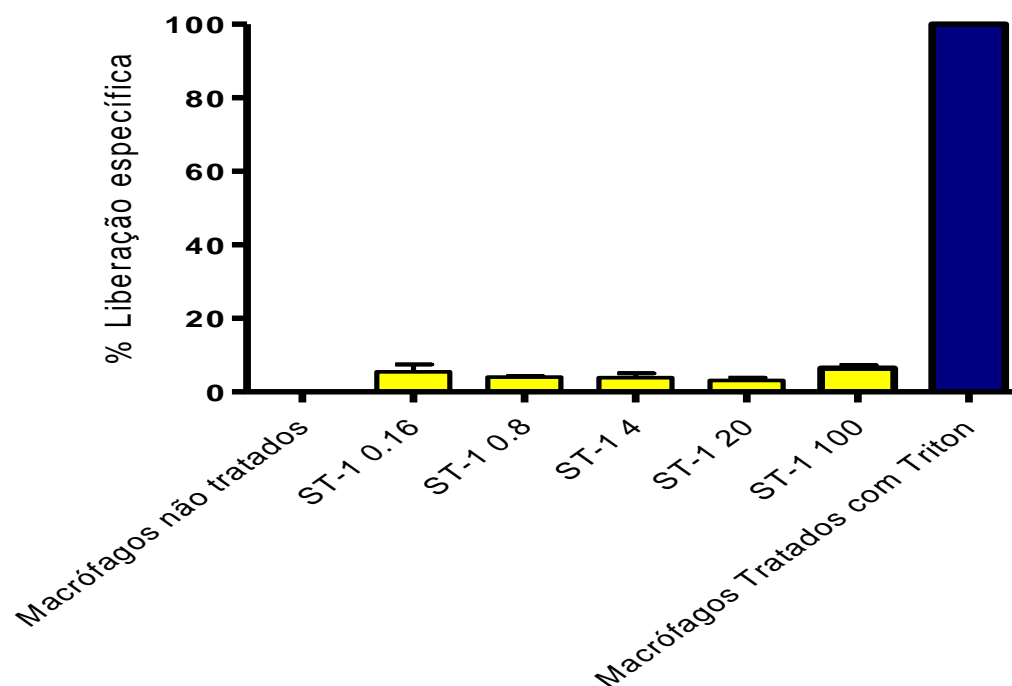


Figura 56: Percentual de liberação de LDH em macrófagos RAW 267.4 na substância ST-1 das cascas dos frutos da aroeira (n=3).

Apesar da baixa atividade antioxidante quando comparada a outros flavonóides, a apigenina é uma flavona amplamente distribuída no reino vegetal, que apresenta uma variedade de atividades farmacológicas, incluindo redução de dermatite atópica (Yano, et al., 2008), hipotensão (Loizzo, et al., 2007), anti-inflamatório, onde sua atividade é na inibição de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico e prostaglandina E_2 . As enzimas óxido nítrico sintase induzida (*iNOS*) e ciclooxigenase (*COX*) são significativamente inibidas, em modelo *in vitro*, utilizando duas diferentes linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7 e J774 A.1) induzidas por LPS (Raso, et al., 2001).

No trabalho de Rougee e colaboradores (2005) foi discutida a atividade da apigenina em eliminar citocinas pró-inflamatórias a baixas concentrações.

Outros autores relatam os efeitos antitumorais em diversas células com câncer, incluindo de próstata, cólon e de mama, além de apresentar baixa toxicidade (Raso, et al., 2001). Todos os resultados obtidos neste trabalho de

dissertação de mestrado corroboram com as atividades encontradas na literatura, mostrando o potencial antioxidante e anti-inflamatório desta substância e extrato. Outros experimentos serão realizados posteriormente para melhorar elucidação do mecanismo de ação dos extratos e frações das cascas dos frutos da aroeira.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho se avaliou o perfil químico das cascas dos frutos de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), a medida da quantificação da atividade antioxidante, e da capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, o que em tese pode justificar seu uso popular como anti-inflamatório e um possível alimento funcional. Para a obtenção do extrato bruto, as cascas dos frutos de aroeira foram separadas das sementes e submetidas a extração exaustiva com metanol. Os fracionamentos cromatográficos foram utilizados com o intuito de se obter uma substância purificada e para o conhecimento do perfil químico do extrato. Após a purificação da substância isolada, esta foi enviada ao RMN para sua elucidação estrutural. O extrato, conjuntos, substância isolada e padrões químicos foram avaliados quanto sua atividade antioxidante. Foram realizadas as análises de taninos e fenóis totais das cascas e dos frutos de aroeira. O extrato, a substância isolada e o conjunto que apresentou melhor atividade antioxidante foram submetidos a análise imunofarmacológica. As principais conclusões do estudo podem ser assim resumidas:

6.1- Avaliação do perfil químico do extrato metanólico

O extrato metanólico das cascas dos frutos de aroeira quando avaliados por CLAE, apresentou um pico majoritário no tempo de retenção em 10,667

minutos, e três picos com característica para flavonóides com tempos de 26,30; 27,81 e 29,81 minutos. Foram utilizados dois padrões de substâncias fenólicas nesta análise (quercetina e rutina), com o objetivo de direcionar as análises por CLAE, e foi observada a presença destes dois flavonóides no extrato, em concentrações minoritárias. Depois de realizadas técnicas cromatográficas de separação de substâncias, foram obtidos conjuntos dos quais, os três picos majoritários foram isolados, e destes a substância purificada (ST-1) foi enviada para RMN, e foi elucidada sua estrutura, e que de acordo com dados espectroscópicos foi identificada como a apigenina neste extrato.

6.2- Avaliação da atividade antioxidante

O extrato, conjuntos, ST-1 e padrões foram avaliados quanto sua atividade antioxidante, e em uma escala de capacidade de sequestro de radicais livres, a seqüência seria: Extrato metanólico > A3 > A1 > A2 > ST-1. O extrato metanólico e o conjunto A3 obtiveram uma capacidade antioxidante superior a 90 %. A substância isolada neste trabalho provavelmente apresentou a menor capacidade antioxidante, devido sua estrutura química, pois flavonóides que se apresentam hidroxilados, principalmente nas posições 3-OH, 5- OH, 7- OH, 4'-OH e 3'- OH são os que apresentam maior propriedade antioxidante. Outro aspecto que intensifica a atividade antioxidante que está relacionada aos flavonóides é a presença de dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 (Harborne e Williams, 2000), e a apigenina apresenta a dupla ligação entre os carbonos C-3 e C-4, e a hidroxila no carbono 5, 7 e 4', porém esta aglicona não apresenta o grupo OH nos demais carbonos.

6.3- Avaliação do teor de taninos e fenóis totais nas cascas e frutos de aroeira

Foi possível observar que os teores de taninos condensados se concentram nas cascas dos frutos de aroeira, visto que os resultados das cascas e dos frutos apresentaram valores semelhantes. Os teores de taninos

condensados das sementes variam entre 2 a 5%, entre as diferentes espécies, e para este estudo foram encontrados em torno de 2,7 % de taninos. Não foram detectados os teores de taninos hidrolisáveis nos frutos e nas cascas de aroeira.

Com relação ao teor de fenóis totais, estes se concentram nas cascas dos frutos de aroeira, e em baixa concentração. Este fato indica que não há nenhuma correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico dos frutos de aroeira.

6.4- Avaliação da atividade Imunofarmacológica

O extrato, conjunto A3 e ST-1 apresentaram atividade na inibição da produção de NO. No extrato metanólico, a quantidade de NO produzida foi em torno de $5,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Com relação ao conjunto A3, este mostrou maior capacidade de inibir a produção de NO, visto que nas três concentrações houve quase que completa inibição desta produção ($0,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$, e a concentração de $20 \mu\text{g/mL}$ a quantidade de NO produzida foi $2,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$). A substância ST-1 apresentou inibição da produção de NO até mesmo na concentração de $0,8 \mu\text{g/mL}$. Com relação a toxidez, o extrato e conjunto A3 apresentaram em torno de 50 % de toxicidade na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, sendo esta toxidez diminuída, nas menores concentrações e com a purificação do extrato. Com relação ao mecanismo de ação, e com o objetivo de verificar se o extrato seqüestra o NO, ou se atua em nível enzimático, se pode observar que tanto o extrato, quanto o conjunto A3 sequestram de forma significativa o NO formado ($5,7 \pm 5,1 \mu\text{M}$; $0,0 \pm 4,7 \mu\text{M}$, respectivamente). Após os macrófagos terem sido estimulados pela presença do LPS 12 horas antes, se pode notar que o efeito inibitório da produção de NO foi verificado no extrato e no conjunto ($10,0 \pm 4,4 \mu\text{M}$; $0,0 \pm 2,0 \mu\text{M}$ respectivamente). Com estes resultados, ainda não é possível definir qual o mecanismo de ação do extrato e do conjunto, pois podem inibir a atividade da *iNOS* e também sequestrar o NO formado, possuindo um alto potencial como agente anti-inflamatório.

7. RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGANGA, A. A., MOSASE, K. W. (2001) Tannin content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Zizyphus mucronata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal feed science and technology*. 91:107-113.

AGOSTINI-COSTA, T. S., LIMA, A., LIMA, M .V. (2003). Determinação de tanino em pedúnculo de caju : método da vanilina versus método do butanol ácido. *Química Nova*. 26: 763-765.

AGRAWAL, P. K. (1989) Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

AHAMED, M. S.; GALAL, A. M.; ROSS, S. A.; FERREIRA, D.; ELSOHLY, M. A.; IBRAHIM, A. R. S.; MOSSA, J. S.; EL-FERALY, F. S. (2001) A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. *Phytochemistry*, 58:599-602.

ALI, S. S., KASOJU, N., LUTHRA, A., SINGH, A., SHARANABASAVA, H., SAHU, A., BORA, U. (2008) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International* 41:1–15.

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; ABAD, B.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. (2004) Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:2938-2952

AMORIM, M. M. R., SANTOS, L. C. (2003) Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 25:95-102.

ANDERSON D. (2000) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*. 350:103-8.

ARAUJO, C. E. P. , BELA, R. T., BUENO, L. J. F., RODRIGUES, R. F. O., SHIMIZU, M. T. (2006) Anti-ulcerogenic activity of the aerial parts of *Lithraea molleoides*. *Fitoterapia*, 77:406–407.

ARTS, I. C.W., HOLLMAN, P. C. H. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81:317S-325S.

BAGGIO, S. R., BRAGAGNOLO, N. (2004) Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24:64-70.

BALUNAS, M. J., KINGHORN, A. D. (2005) Drug Discovery from Medicinal Plants. *Life Sciences*. 78:431-441.

BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., CLEMENTE, A. D. (2007) Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* RADDI. *Química Nova*. 30:1959-1965.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 29:113-126.

BATTESTIN, V., MATSUDA, L. K., MACEDO, G. A. (2004) Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alimentos e Nutrição*. 15:63-72.

BERTOLDI, M. C. (2006) Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Tese Mestrado - Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa 116 páginas.

BOGDAN, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*. 2:906-916.

BRAGA, F. G., BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L., MATOS, M. O., MOREIRA, F. O., SCIO, E., COIMBRA, E. S. (2007) Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 111:396–402.

CAMPOS, D. A. (2008) Efeito gastroprotetor da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona isolada de *Lonchocarpus araripensis* Bentham em camundongos e possíveis mecanismos. Tese de Mestrado – Fortaleza – CE, Universidade Federal do Ceará, 131 páginas.

CARLOS, I. Z., LOPES, F. C. M., BENZATTI, F. P., CARLI, C. B. A., MARQUES, M. F., JORDÃO-JUNIOR, C. M., RINALDO, D., CALVO, T. R., SANTOS, L. C., VILEGAS, W. (2005) Ação do extrato metanólico e etanólico

de Davilla elliptica St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 15:44-50.

CARVALHO, A. C., BRAGA, J. M. A. B., GOMES, J. M. L., SOUZA, J. S., NASCIMENTO, M. T. (2006) Comunidade Arbórea de Baixada Aluvial no Município de Campos dos Goytacazes, R. J. *Cerne*. 12:157-166.

CAVALHER-MACHADO, S. C., ROSAS, E. C., BRITO, F. A., HERINGE, A. P., OLIVEIRA, R. R., KAPLAN, M. A. C., FIGUEIREDO, M. R., HENRIQUES, M. G. M. O. (2008) The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*. 8:1552–1560.

CERQUEIRA, N. F., YOSHIDA, W. B. (2002) Óxido Nítrico. Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 17:417-423.

CERUKS, M., ROMOFF, P., FÁVERO O. F. G., ENRIQUE, J. G. (2007) Polar phenolic constituents from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova*. 30:597-599.

CHAE, H. S., KANG, O. H., LEE, Y. S., CHOI, J. G., OH, Y. C., JANG, H. J., KIM, M. S., KIM, J. H., JEONG, S., KWON, D. Y. (2009) Inhibition of LPS-Induced iNOS, COX-2 and Inflammatory mediator Expression by Paeonol through the MAPKs Inactivation in RAW 264.7 Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 37:181–194.

CHEN, Z. Y., CHAN, P. T., HO, K. Y., FUNG, K. P., WANG, J. (1996) Antioxiidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*. 79:157 163.

COLEMAN, J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*. 1:1397–1406.

CORRÊA, M. P. (1984) Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Imprensa Nacional* - Rio de Janeiro: v. 6, p.170-171.

CORREIA, S. J., DAVID, J. P., DAVID, J. M. (2006) Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Química Nova*, 29:1287-1300.

DEGÁSPARI, C. H. (2004) Propriedades Antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI). Tese de Doutorado – Curitiba – PR. Universidade Federal do Paraná. 104 páginas.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M. R. M. (2005) Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciências agrotécnica*. 29:617-622.

DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A. (2002) Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Unesp, 604p.

- DUSSE, L. M. S., VIEIRA, L. M., CARVALHO, M. G. (2003) Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 39:343-350.
- ERAZO, S., DELPORTE, C., NEGRETE, R. GARCÍA, R., ZALDÍVAR, M., ITURRA, G., CABALLERO, E., LÓPEZ, J., BACKHOUSE, N. (2006) Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 107:395–400.
- ERENEL, G., ERBAS, D., ARICIOGLU, A. (1993) Free radicals and antioxidant systems. *Materia Medica Polona*. 85:37-43.
- FANG, Y. N., LIU, G. T. (2002) Effect of isorhapontigenin on respiratory burst of rat neutrophils. *Phytomedicine*. 9:734-738.
- FLORA FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. (2000) Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 46:265-271.
- FORKMANN, G., MARTENS, S. (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*. 12 :155-160.
- GALATI, G., SABZEVARJ, O., WILSON, J. X., O'BRIEN, P. J. (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177 :91–104.
- GARCÍA-MEDIAVILLA, V., CRESPO, I., COLLADO, P. S., ESTELLER, A., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., TUÑÓN, M. J., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (2007) The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa B pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*. 557:221–229.
- GUIX, F. X., URIBESALGO, I., COMA, M., MUÑOZ, F. J. (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*. 76:126-152.
- GUZIK, T. J., KORBUT, R., ADAMEK-GUZIK, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 54:469-487.
- HALLIWELL, B. (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine* 46:531–542.
- HAMALAINEN, M., NIEMINEN, R., VUORELA, P., HEINONEN, M., MOILANEN, E. (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*. 1:1-10.

HARBORNE, J. B. (1994) Phenolics *In*: MANN, J., DAVIDSON, R. S., HOBBS, J. B., BANTHORPE, D. V. *Natural Products. Their chemistry and biological significance*. 1. ed. New York: Longman scientific & Technical, p. 361-388.

HARBORNE, J. B., MABRY, T. J. (1982) The flavonoids: advances in research. *Chapman and Hall*. New York.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55:481-504.

HEIM, K. E. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutrition Biochemistry*. 13:572-584.

HOUGEE, S., SANDERS, A., FABERA, J., GRAUSA, Y. M. F. (2005) Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 69:241-248.

<http://www.sciencedirect.com>. Em 14 de setembro de 2009, as 18:00

<http://www.webofscience.com>. Em 14 de setembro de 2009, as 17:30.

HUANG, G. C., CHOW, J. M., SHEN, S. C., YANG, L. Y., LIN, C. W., CHEN, Y. C. (2007) Wogonin but not Nor-wogonin inhibits lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression and NO production in macrophages. *International Immunopharmacology*. 7:1054-1063.

IELPO, M. T., BASILE, A., MIRANDA, R., MOSCATIELLO, V., NAPPO, C., SORBO, S., LAGHI, E., RICCIARDI, M. M., RICCIARDI, L., VUOTTO, M. L. (2000) Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 71:101-109.

INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL FOUNDATION – IFIC. (2006) Functional Foods. <<http://www.ific.org/nutrition/functional>>. Acesso em: 15 de julho de 2008. 14: 30 minutos.

ISLAM, M. T., TAHARA, S. (2000) Dihydroflavonols from *Lanea coromandelica*. *Phytochemistry*. 54:901-907.

JAIN, M. K., YU, B. Z., ROGERS, J. M., SMITH, A. E., BOGER, E. T. A., OSTRANDER, R. L., RHEINGOLD, A. L. (1995) Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase a 2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*. 39:537-547.

KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA, A. I., VOURELA, H. J., RAUHA, J. P., PIHLAJA, K., KUJALA, T. S., HEINONEN, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3954-3962.

- KAWASHTY, S.A., MOSHARRAFA, S.A.M., EL-GIBALI, M., SALEH, N.A.M. (2000) The flavonoids of four Pistacia species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28:915-917.
- KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. J. (2004) Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 96:229-245.
- KOLEVA, L. I., VAN BEEK, T .A., LINSSEN, J. P. H., De GROOT, A., EVSTATIEVA, L. N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 13:8-17.
- LACHMAN, J., ORSAK, M., HEJTMANKOVA, A., KOVAROVA, E. (2010) Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *Food Science and Technology*. 43:52–58.
- LIN, Y. M.; CHEM, F. C.; LEE, K. H. (1989) Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Medica*, 65, p. 120-125
- LOIZZO, M.R., TUNDIS, R., STATTI, G. A., MILJKOVICBRAKE, A., MENICHINI, F., HOUGHTON, P. J. (2007) Bioactive extracts from Senecio samnitum Huet. *Natural Products Research*. 20:265-269.
- LOLITO, S., FREI, B. (2006) Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine*. 41:1727–1746.
- MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS. M. B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Nova York: Springer-Verlag.
- MAILLARD, M. N., BERSET, C. (1995). Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43:1789-1793.
- MARIOD, B. A., IBRAHIM, R. M., ISMAIL, M., ISMAIL, N. (2009) Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry* 118:120–127.
- MARTINEZ, M. J., BETANCOURT, J., ALONSO-GONZFILEZ, N., JAUREGUI, A. (1996) Screening of some Cuban medicinal plants activity for antimicrobial. *Journal of Ethnopharmacology*. 52:171-174.
- MARZOUK, M. S. ., MOHARRAM, F. A., HAGGAG, E. G., IBRAHIM, M. T., BADARY, O. A. (2006). Antioxidant Flavonol Glycosides from Schinus Molle. *Phytotherapy Research*, 20:200–205.
- MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAUJO, E. L., AMORIM, E. L. C. (2005) Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*. 28:892-896.

MOON, Y. J., WANG, X., MORRIS, M. E. (2006) Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*. 20:187–210.

MORAES, V. H. F. (2007) Alegações sobre as propriedades funcionais do Licopeno: um estudo com consumidores do município de Campinas/SP. Tese de Mestrado – Campinas - SP, Universidade Estadual de Campinas, 118 páginas

MOREIRA, D. L. (2000) Métodos de análise e dosagem de taninos condensados, taninos gálicos e fenóis totais. Apostila *NPPN-UFRJ*.

MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J. M., SINEIRO, J. DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M. J., PARAJÓ, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72: 145-171.

MUELLER-HARVEY, I. (2001) Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed and Technology*. 91:3-20.

MURAKAMI, A., OHIGASHI, H. (2007) Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *International Journal of Cancer*. 121:2357–2363.

MUZITANO, M. F., CRUZ, E. A., ALMEIDA, A. P., SILVA, S. A. G., KAISER, C. R., GUETTE, C., ROSSI-BERGMANN, B., COSTA, S. S. (2006) Quercetrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta medica*. 72:81-83.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal Natural Products*. 66:1022-1037.

NJOKU, P. C., AKUMEFULA, M. I. (2007) Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias mombin* leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6:613-615.

O'PREY, J.; BROWN, J.; FEMING, J.; HARRISON, P.R. (2003) Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochemistry Pharmacology*, 66:2075-2088.

OLIVEIRA, D. B. (2005) Aspectos Químicos e Etnomedicinais de Plantas da Dieta de Cervídeos na Reserva Particular do Patrimônio Natural – SESC Pantanal. Tese de Doutorado – Rio de Janeiro- RJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 206 páginas.

OTAKI, N, KIMIRA, M., KATSUMATA, S., UEHARA, M., WATANABE, S., SUZUKI, K. (2009) Distribution and major sources of flavonoids intakes in the middle-aged Japanese women. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition*. 44: 231–238.

OWEN, R. W., HAUBNER, R., MIER, W., GLACOSAC, A., HULL, W. E., SPIEGELHALDER, B., BARTSCHA, H. (2003) Isolation, structure elucidation

and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*. 41:703–717.

POZZI, A. C. S. (2007) Desenvolvimento de métodos de análise Espectrofotométrica de flavonóides do “maracujá”. Dissertação de Mestrado – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo, 86 páginas.

RAMALHO, V. C., Jorge, N. (2006) Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29:755-760.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. (2001) Óxido Nítrico. *In: Farmacologia*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 156-163.

RASO, G. M. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. *Life Science*. 68:921–31.

REYNERTSON, K. A, WALLACE, A. M., ADACHI, S., GIL, R. R, YANG, H., BASILE, M. J, D'ARMIENTO, J., WEINSTEIN, I. B, KENNELLY, E. J (2008). Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal Natural Products*. 69:1228-30.

RIBANI, R. H. (2006) Compostos fenólicos em erva-mate e frutas. Tese de Doutorado –Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 158 páginas

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

ROESLER, R., MALTA, L. G., CARRASCO, L. C., HOLANDA, R. B., SOUZA, C. A. S., PASTORE, G. M. (2007) Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:53-60.

ROSA, N. M. B., ROSA, C. O. B. (2006) Alimentos Funcionais. 22 Ed. Viçosa. Pág. 202.

ROSS, J. A., KASUM, C. M. (2002) Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*. 22:19–34.

SABUDAK, T., DOKMECH, D., OZYGIT, F., ISIK, E., AYDOGDU, N. (2005) Antiinflammatory and Antioxidant Activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* Extracts. *Asian Journal of Chemistry*, 20:1491-1496.

SANTOS, L. M. (2009) Avaliação dos constituintes químicos polares e da atividade alelopática de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado. Campos dos Goytacazes- RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 90 páginas.

SCHIMIDT, J., PORZEL, A., ADAM, G. (1998) 3(20-Dihydroxy-3(-25-Epoxy)lupane, A Triterpene From *Rhus Typhina*. *Phytochemistry*. 49:2049-2051.

SCHNEIDER, C. D., OLIVEIRA, A. R. (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 10:308-313.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, A.N.; PELL, A.N. (2001) Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 92:21-40.

SELVAM, C., SANJAY, M., JACHAK, K., BHUTANI, K. (2004) Cyclooxygenase inhibitory flavonoids from the stem bark of *Semecarpus anacardium* Linn. *Phytotherapy Research*. 18:582–584.

SHAMI, N. J. I., MOREIRA, E. A. M. (2004) Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*. 17:227-236.

SINGH, R. B., DUBNOV, G., NIAZ, M. A., GHOSH, S., SINGH, R., RASTOGI, S. S., MANOR, O., PELLA, D., BERRY, E.M. (2003) Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): a randomized single-blind trial. *Lancet*. 360:455-1461.

SKERGET, M., KOTNIK, P., HADOLIN, M., RI, M., HRAZ, A. R., SIMONIC, M., KNEZA, M. (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89:191–198.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. (2002) Princípios da Análise Instrumental. 5 edição, Porto Alegre: Bookman

SOARES, S. E. (2002) Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*. 15:71-81.

SOUZA V. C.; LORENZI H. (2005) Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. *Plantarum*, Nova Odessa.

TAIT, A., GANZERLI, S., DI BELLA, M. (1996) Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-Benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1-methylethyl) phenols. *Tetrahedron*. 52:1287-12596.

TEMPLE, N. J. (2000) Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutricion Research*. 20:449-459.

TEWTRAKUL, S., ITHARAT, A. (2007) Nitric oxide inhibitory substances from the rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *Journal of ethnopharmacology*. 109:412-416.

VIANA, G. S. B., MATOS, F. J. A., BANDEIRA, M. S. N. (1995) Aroeira-do-Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) Estudo Botânico, Farmacogóstico, Químico e Farmacológico. *Universidade Federal do Ceará: Fortaleza*, 160p.

VICENTINO A. R. R, MENEZES F. S. (2007) Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos

tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17:384-387.

VIEIRA, P. M. (2007) A. Participação do óxido nítrico na Infecção experimental de cães pelo *Trypanosoma cruzi*. Defesa de Mestrado – Ouro Preto _ MG, Universidade Federal de Ouro Preto, 87 páginas.

WACH, A., PYRZYŃSKA, K., BIESAGA, M. (2007) Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry*. 100:699-704.

WADSWORTH, T. L., KOOP, D. R. (2001) Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chemico-Biological Interactions*. 137:43–58.

WILKEL-SHIRLEY, B. (2001) Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*. 126: 485–493.

WOJDYO, A., OSZMIAN, J., CZEMERYS, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 105:940–949.

YANO, S., UMEDA, D., YAMASHITA, S., YAMADAA, K., TACHIBANA, H. (2008) Dietary apigenin attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1-6.

YOSHIKAWA, M., SHIMADA, H., SHIMODA, H., MURAKAMI, N., YAMAHARA, J., MATSUDA, H. (2000) Bioactive constituents of Chinese natural medicines II. *Rhodiola Radix*. (1). Chemical structures and anti-allergic activity of rhodiocyanoside A and B from the underground part of *Rhodiola quadrifida* (PALL.) FISH. et MEY. (Crassulaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44:2086-2091.

YOUNG, I. S., WOODSIDE, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 54:176-186.

ZEMBOWER, D. E.; LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; CHEN, F.; KORBA, B. E. (1998) Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. *Antiviral Research*, 39:81-88.

ZHANG, Z., ZHANG, Q., WANG, J., SONG, H., ZHANG, H., NIU, X. (2010) Chemical modification and influence of function groups on the in vitro-antioxidant activities of porphyran from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydrate Polymers*. 79:290–295.

ZIELNSKI, H., KOZLOWSKA, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:2008-2016.