

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS  
CASCA E TRITERPENÓIDES OBTIDOS DE CARINIANA  
DOMESTICA (MART) MIERS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Vanessa Janovik**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

# **AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CASCAS E TRITERPENÓIDES OBTIDOS DE CARINIANA DOMESTICA (MART) MIERS**

**Por**

**Vanessa Janovik**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado de Pós Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e  
Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos da Universidade  
Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para  
obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Margareth Linde Athayde**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS  
CASCAS E TRITERPENÓIDES OBTIDOS DE CARINIANA  
DOMESTICA (MART) MIERS**

elaborada por  
**Vanessa Janovik**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Margareth Linde Athayde, Dr<sup>a</sup>**  
(Presidente, Orientador)

**Ionara Irion Dalcol, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

**Paula Rossini Augusti, Dr<sup>a</sup> (UNIPAMPA)**

Santa Maria, 31 de março de 2011

## AGRADECIMENTOS

Ao Poder Supremo que governa e atua para que tudo ocorra da melhor maneira, e que coloca tudo em seu devido lugar.

Aos meus pais Alexandre e Alexandra, que me proporcionaram condições de ter concluído mais esta etapa, que sempre me apoiaram, incentivaram e acreditaram, mesmo quando nem eu acreditava! Exemplos de vida e conduta que formam as minhas bases de vida, essa vitória é de vocês também.

Ao meu irmão Cristian pelo incentivo e principalmente, pelas brincadeiras.

Ao meu noivo Leandro, pelo amor incondicional. Pelo carinho, zelo, companheirismo e respeito com os quais me conduziu até aqui. Pelas leituras e buscas de artigos, por assistir minhas apresentações sem dormir (nem sempre), por me apoiar quando decidi cursar disciplinas na Química! Por todos os bons e maus momentos compartilhados, desde a graduação até aqui, e por todos que ainda virão, as minhas forças vêm do amor que nos une.

À Morgana, por ter feito parte de minha vida.

À minha orientadora, professora e amiga Margareth Linde Athayde, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa em determinado momento e depositado confiança e apoio. Agradeço ao conhecimento e amizade compartilhados ao longo de toda esta etapa.

Aos professores deste curso de Pós Graduação, à professora Ionara Irion Dalcol, que também acompanhou este trabalho, pelo conhecimento, amizade e atenção sempre dispensados. Aos professores Ademir Farias Morel e Nilo Zanatta, pelos conhecimentos adquiridos e atenção dispensada na realização de suas disciplinas.

A todos os colegas de laboratório, pelo convívio e amizade. À Aline A. Boligon, pela parceria nas publicações, nos experimentos e pelas longas conversas. Ao mestrando Thiago G. Schwanz pela realização das análises de espectrometria de massas. À doutoranda Romaiana Picada Pereira pela realização das análises no laboratório de Bioquímica Toxicológica.

Ao curso de pós graduação em Ciências Farmacêuticas, ao funcionário Paulo Ricardo pela amizade e atenção, e à CAPES pela bolsa concedida.

Aos funcionários do Departamento de Farmácia Industrial, em especial ao Renato Sangói. À Maria Angélica da Silveira Lima, do departamento de Química, pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

A Universidade Federal de Santa Maria, instituição que proporcionou minha formação profissional e pós graduação.

A todos citados aqui ou não citados, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CASCAS E TRITERPENÓIDES OBTIDOS DE CARINIANA DOMESTICA (MART) MIERS**

AUTORA: Vanessa Janovik  
ORIENTADORA: Margareth Linde Athayde  
Local e data da defesa: Santa Maria, 31 de março de 2011

A família Lecythidaceae consiste em cerca de 230 espécies, classificada em 10 gêneros. A espécie *Cariniana domestica* (Mart) Miers é uma das diversas espécies de Jequitibá, as árvores milenares mais antigas do Brasil. O presente estudo teve o objetivo de caracterizar quimicamente a espécie, visando contribuir para um maior conhecimento sobre a família Lecythidaceae. As cascas de *C. domestica* foram coletadas no município de Tangará da Serra-MS e o material foi catalogado sob o registro SMDB 11818 no departamento de Biologia da UFSM. O material vegetal foi seco, triturado e moído. O pó obtido foi submetido à maceração hidroalcoólica (7:3, v/v), seguindo-se de concentração em evaporador rotatório. A partição do extrato aquoso remanescente originou as frações F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, F-AcOEt e F-BuOH. Os procedimentos cromatográficos de isolamento levaram à obtenção do fitoesteróis ( $\beta$ -sitosterol + estigmasterol) e triterpenos pentacíclicos (lupeol +  $\beta$ -amirina), os quais foram identificados por métodos espectroscópicos (<sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN) e cromatográficos (CG/EM e CLAE). Adicionalmente, foi avaliada a capacidade antioxidante frente ao radical DPPH, bem como utilizando o método do TBARS. Foram ainda realizadas dosagens investigativas quanto ao teor de polifenóis totais e flavonóides e um perfil cromatográfico para identificação de alguns compostos fenólicos também foi traçado. Os ensaios com o radical DPPH revelaram elevada capacidade seqüestradora de radicais livres, sendo que os valores de IC<sub>50</sub> obtidos variaram de 6,5 ± 0,81 a 19,5 ± 1,32 µg/mL. No ensaio do TBARS, os valores de IC<sub>50</sub> obtidos variaram de 11,11 ± 0,85 a 44,5 ± 2,31. A determinação de polifenóis totais revelou um teor variável de 54,6 ± 0,33 a 309,3 ± 2,73 mg/g. As determinações de flavonóides totais e taninos condensados variaram de 12,0 ± 0,12 a 14,18 ± 0,1 mg/g e 131 ± 0,03 a 149,7 ± 0,22, respectivamente. A análise por CLAE revelou a presença dos ácidos gálico, caféico e clorogênico, além dos flavonóides rutina, quercetina e campferol. Na fração diclorometano foram identificados os carotenóides licopeno e  $\beta$ -caroteno. Os resultados obtidos demonstram que a espécie *C. domestica* apresenta propriedades antioxidantes e os compostos identificados pela primeira vez para esta espécie podem estar relacionados com seus usos populares.

Palavras-chave: *Cariniana domestica*, Lecythidaceae, triterpenos, CLAE, DPPH

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### CHEMICAL EVALUATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE BARKS AND TRITERPENOIDS OBTAINED FROM CARINIANA DOMESTICA (MART) MIERS

AUTHOR: Vanessa Janovik  
ADVISER: Margareth Linde Athayde  
PLACE AND DATE OF DEFENSE: Santa Maria, March 31<sup>th</sup>, 2011

The Lecythidaceae family consists of about 230 species, classified in some 10 genera. The species *Cariniana domestica* (Mart) Miers is one of several Jequitibá species, the oldest and millenary trees from Brazil. The present work developed studies with the aim of characterize the species when concerning to chemical aspects, in order to contribute to the knowledge improvement about Lecythidaceae family. The barks of *C. domestica* were collected in Tangará da Serra-MS. Exsiccate was archived as voucher specimen in the herbarium of Department of Biology at UFSM (SMDB 11818). Plant material was dried, crushed and powdered. The powder was submitted to hidroalcoholic maceration (7:3, v/v) and concentrated under reduced pressure. The remained aqueous extract was partitioned to obtain the fractions F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, F-AcOEt e F-BuOH. Chromatographic procedures led to the isolation of phytosterols ( $\beta$ -sitosterol + stigmasterol) and pentacyclic triterpenes (lupeol +  $\beta$ -amyrin), which were identified by means of spectroscopic (<sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR) and chromatographic (GC/MS and HPLC) methods. Additionally, the antioxidant capacity was evaluated by measuring its scavenging ability on DPPH and also using TBARS assay. Contents of total polyphenolic and flavonoid were measured as well as a chromatographic profile searching for phenolic substances was determined. From F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DPPH assay revealed high scavenging ability with IC<sub>50</sub> values that ranged from 6.5  $\pm$  0.81 to 19.5  $\pm$  1.32  $\mu$ g/mL. IC<sub>50</sub> values obtained with TBARS assay ranged from 11.11  $\pm$  0.85 to 44.5  $\pm$  2.31  $\mu$ g/mL. Polyphenolic contents varied from 54.6  $\pm$  0.33 to 309.3  $\pm$  2.73 mg/g. Total flavonoid and condensed tannin contents varied from 12.0  $\pm$  0.12 to 14.18  $\pm$  0.1 and 131  $\pm$  0.03 to 149.7  $\pm$  0.22, respectively. HPLC analysis revealed the presence of gallic, caffeic and chlorogenic acids, as well as the flavonoids rutin, quercetin and kaempferol. The carotenoids lycopene and  $\beta$ -carotene were identified in dichloromethane fraction. The results revealed that the species *C. domestica* achieves antioxidant properties and the compounds identified for the first time for this species can be related to its popular uses.

Key-words: *Cariniana domestica*, Lecythidaceae, triterpenes, HPLC, DPPH

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais causas e conseqüências da ação dos radicais livres.....	22
FIGURA 2 - Principais classes de fitoquímicos que apresentam atividade antioxidante.....	24
FIGURA 3 - Foto ilustrativa de uma espécie de jequitibá ( <i>Cariniana</i> spp.).....	26
FIGURA 4 - Compostos isolados de <i>Cariniana rubra</i> por Lima <i>et al.</i> (2002). Compostos <b>1</b> (ácido 28-b -glucopiranosil-23- <i>O</i> -acetil arjunólico); <b>2</b> (ácido 3- <i>O</i> -b -glucopiranosil arjunólico); <b>3</b> (ácido 28- <i>O</i> -[ $\alpha$ -Rhamnopiranosil-(1,2)-b-glucopiranosil]-23- <i>O</i> -acetil arjunólico).....	29
FIGURA5- Reação do DPPH com um composto fenólico.....	72
FIGURA 6 - Compostos fenólicos identificados por CLAE nas cascas e folhas de <i>C. domestica</i> . 1 = ácido gálico; 2 = ácido caféico; 3 = ácido clorogênico; 4 = quercetina; 5 = rutina; 6 = campferol.....	77
FIGURA 7 - Esquema ilustrativo do processo de isolamento das misturas de $\beta$ -sitosterol + estigmasterol e lupeol + $\beta$ -amirina.....	78
<b>PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2</b>	
FIGURE 1 - Chemical structures of lupeol ( <b>1</b> ), $\beta$ -amyrin ( <b>2</b> ), $\beta$ -sitosterol ( <b>3</b> ) and stigmasterol ( <b>4</b> ).....	38
FIGURE S2 - Representative chromatogram of dichloromethane fraction ( <b>A</b> ); LC-UV chromatogram of the isolated lupeol and $\beta$ -amyrin ( <b>B</b> ). Peaks are identified as: <b>1</b> – lupeol and <b>2</b> – $\beta$ -amyrin.....	46



FIGURE S3 - Representative chromatogram of dichloromethane fraction (**A**); LC-UV chromatogram of the isolated  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol (**B**). Peaks are identified as: **3** –  $\beta$ -sitosterol and **4** – stigmasterol..... 47

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.3**

FIGURE 1 - Antioxidant activity of crude extract, dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions from the bark of *C. domestica*..... 57

FIGURE 2 - Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane and butanolic fractions from the bark of *C. domestica* on Fe (II) (10  $\mu$ M)-induced TBARS production in brain homogenates..... 60

FIGURE 3 - Effects of different concentrations of isolated compounds ( $\beta$ -sitosterol + stigmasterol and lupeol +  $\beta$ -amyrin) from the barks of *C. domestica* on Fe (II) (10  $\mu$ M)-induced TBARS production in brain homogenates..... 60

FIGURE 4 - Chromatogram of dichloromethane fraction. Peak 1 (RT = 7.5, lycopene) and Peak 2 (RT = 12.4,  $\beta$ -carotene)..... 61

FIGURE 5 - HPLC/DAD chromatograms obtained for polyphenols screening. A = ethyl acetate, 254 nm; B = ethyl acetate, 327 nm; C = ethyl acetate, 365 nm; D = dichloromethane, 254 nm; E = dichloromethane, 365 nm; F = crude extract, 254 nm; G = crude extract, 365 nm; H = *n*-butanol, 365 nm. Peaks: 1 = gallic acid; 2 = caffeic acid; 3; chlorogenic acid; 4 = rutin; 5 = quercetin; 6 = kaempferol..... 64

## LISTA DE TABELAS

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.1

TABELA 1 – Doseamento de polifenóis totais, flavonóides e taninos condensados no extrato bruto e frações das cascas de *Cariniana domestica*..... 33

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2

TABLE S1 – Percentage of lupeol and  $\beta$ -amyrin in mixture **1+2**; percentage of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in mixture **3+4**; percentage and quantification of the four compounds in dichloromethane fraction..... 47

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.3

TABLE 1 – Total phenolic content and antioxidant activity ( $IC_{50}$ /DPPH) for crude extract and fractions of *C. domestica*..... 57

TABLE 2 – HPLC/DAD of identified and quantified polyphenols in crude extract and fraction of *C. domestica*..... 62

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1</b> – Espectro de $^{13}\text{C}$ - RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura lupeol + $\beta$ -amirina.....	91
<b>ANEXO 2</b> – Espectro de $^1\text{H}$ - RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura lupeol + $\beta$ -amirina.....	92
<b>ANEXO 3</b> – Espectro de $^{13}\text{C}$ - RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura estigmasterol + $\beta$ -sitosterol.....	93
<b>ANEXO 4</b> – Espectro de $^1\text{H}$ - RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura estigmasterol + $\beta$ -sitosterol.....	94
<b>ANEXO 5</b> – Certificado de apresentação de trabalho científico no XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana.....	95
<b>ANEXO 6</b> – Certificado de apresentação de trabalho científico no XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana.....	96
<b>ANEXO 7</b> – Certificado de apresentação de trabalho científico no XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana.....	97
<b>ANEXO 8</b> – Certificado de apresentação de trabalho científico no 15º Farmapolis.....	98

**ANEXO 9** – Certificado de apresentação de trabalho científico no 15º Farmapolis..... 99

**ANEXO 10** – Manuscrito submetido ao periódico: Revista Brasileira de Farmacognosia..... 100

**ANEXO 11** – Manuscrito submetido ao periódico: Journal of Ethnopharmacology .....101

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs – absorvância

AcOEt – acetato de etila

*n*-BuOH – butanol

CCD – cromatografia em camada delgada

CG/MS – cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – diclorometano

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EB – extrato bruto

EtOH – etanol

EROs – espécies reativas de oxigênio

F-AcOEt – fração acetato de etila

F-BuOH – fração butanólica

F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – fração diclorometano

MeOH – metanol

min. – minuto

mg/g – miligramas por grama

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

tR – tempo de retenção

UV – ultravioleta

μL - microlitros

μg/mL – microgramas por mililitro

<sup>1</sup>H – RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

<sup>13</sup>C – RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	18
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<b>3.1 A importância do conhecimento em plantas medicinais</b> .....	19
<b>3.2 Produtos naturais</b> .....	20
<b>3.3 Atividade antioxidante</b> .....	21
<b>3.4 Descrição da planta</b> .....	25
3.4.1 Descrição da família Lecythydaceae.....	25
3.4.2 Descrição da espécie <i>Cariniana domestica</i> (Mart) Miers.....	25
<b>3.5 Estudos químicos e farmacológicos descritos para o gênero <i>Cariniana</i></b> .....	26
<b>4 RESULTADOS</b> .....	31
<b>4.1 Publicação científica na Revista Saúde</b> .....	32
<b>4.2 Artigo aceito para publicação no periódico Natural Product Research...</b>	35
<b>4.3 Manuscrito submetido ao periódico Journal of Ethnopharmacology</b> .....	48
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	70
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	81
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	82
<b>8 ANEXOS</b> .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. (MACIEL *et al.*, 2002).

A evolução da arte de curar possui numerosas etapas, porém, torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve por muito tempo associada às práticas mágicas, místicas e ritualísticas. A preocupação com a cura de doenças, ao longo da história da humanidade, sempre se fez presente. Sabemos que os alquimistas, na tentativa de descobrir o "elixir da vida eterna", contribuíram, e muito, na evolução da arte de curar. Esta medicina tradicional permanece até os dias de hoje, com base em práticas mantidas há milhares de anos (PEREIRA *et al.*, 2004).

As plantas medicinais respondem por cerca de 25% do total das prescrições médicas em países industrializados. Nos países em desenvolvimento, a participação de plantas medicinais no arsenal terapêutico alcança 80%. Utilizadas como matéria-prima para a produção de extratos ou para o isolamento de substâncias naturais puras, representam uma área em franca expansão. Adquirem importância cada vez maior as substâncias naturais puras e os extratos purificados ou padronizados, que permitem uma caracterização analítica e preenchem adequadamente aos requisitos de qualidade, eficácia e segurança, exigidos de qualquer medicamento moderno, seja ele natural ou sintético (SHARAPIN, 2000).

Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor é avaliada sob os aspectos biológicos (CECHINEL FILHO, 1997).

A importância das plantas medicinais deve-se também por serem fontes naturais de fármacos e por proporcionarem chances de obter-se uma molécula protótipo, devido à diversidade de constituintes que apresentam. No entanto, inúmeras plantas utilizadas em preparações fitoterápicas precisam de um maior

controle de qualidade, uma vez que podem apresentar também substâncias tóxicas ou composição química muito variável (CALIXTO, 2000; NOLDIN *et al.*, 2002).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com freqüência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, a botânica, a farmacologia e a fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e finalmente, a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2002).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes, e seus extratos quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. Além disto, os compostos naturais podem ser modificados em sua forma estrutural original, possibilitando desta forma o planejamento racional de novas moléculas e obtenção de estruturas mais seguras e eficazes, além de poderem apresentar propriedades farmacológicas não esperadas (RATES, 2001).



A família Lecythidaceae é conhecida como a “família da castanha do Brasil” e possui pelo menos 287 espécies tipicamente tropicais. Os trabalhos relacionados com estudos químicos de espécies desta família conduziram a identificação de triterpenos pentacíclicos, saponinas, ácido elágico e alcalóides do tipo indolo [2,1-b]quinazolínicos. Foram descritos diversos compostos triterpênicos para espécies dos gêneros *Eschweilera* e *Gustavia* (SOUZA *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 1998). O gênero *Cariniana* engloba as diversas espécies de Jequitibá, as árvores milenares mais antigas do Brasil.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliação da constituição química da espécie *Cariniana domestica* (Mart) Miers.

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolamento de metabólitos secundários por métodos cromatográficos;
- Realizar a identificação dos compostos isolados utilizando métodos espectroscópicos (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e cromatográficos (CLAE e CG/EM);
- Quantificar os compostos isolados utilizando CLAE;
- Obter perfil cromatográfico do extrato bruto e das frações;
- Determinar a capacidade antioxidante pelo método do DPPH;
- Avaliar a inibição da peroxidação lipídica pelo método do TBARS;
- Realizar a dosagem de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Realizar a dosagem de flavonóides totais e taninos condensados.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A importância do conhecimento em plantas medicinais

O sistema público de saúde no Brasil não possui uma política de assistência farmacêutica capaz de suprir as necessidades medicamentosas da população, sobretudo nas regiões mais pobres, onde a população carente apresenta dificuldades para obter os medicamentos essenciais, bem como adoece muito mais (COSENDEY *et al.*, 2000). Com a descentralização do poder público, o município atinge a gestão plena, com autonomia para implantar programas de assistência à saúde, quando necessários. Estados e municípios brasileiros vêm realizando nas duas últimas décadas a implantação de Programas de Fitoterapia na atenção primária à saúde, com o intuito de suprir as carências medicamentosas de suas comunidades. (OGAVA *et al.*, 2003; MICHILIS, 2004).

A experiência mais antiga que influenciou a criação de programas de fitoterapia no Brasil foi o Programa Farmácias Vivas, criado pelo professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, há mais de vinte anos. É o primeiro programa de assistência social farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais desenvolvido no Brasil, tendo por objetivo produzir medicamentos fitoterápicos acessíveis à população carente (MATOS, 1998).

A vasta gama de informações sobre o uso de plantas como remédios em todos os lugares do mundo leva à necessidade do desenvolvimento de métodos que facilitem o dispendioso processo de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais. (ELISABETSKY, 1999).

Dessa forma, a fitoquímica torna-se importante no descobrimento de novos princípios ativos, tendo em vista que alguns compostos originados de plantas não podem ser ou nunca foram quimicamente sintetizados (FRANÇA, 1999). Um exemplo desses fármacos sintéticos são os hormônios e anticoncepcionais obtidos a partir de sapogeninas extraídas de matérias primas vegetais (MATOS, 1998).

Em nosso país, os estudos científicos envolvendo produtos naturais ativos, suas indicações e contra-indicações, podem proporcionar aos fitofármacos um maior nível de aceitação médica, respaldados pela comprovação de sua eficácia terapêutica em experimentos farmacológicos pré-clínicos e clínicos. Este fato é de

extrema importância, considerando-se que o Brasil se encontra atualmente nas primeiras posições no mercado mundial de fármacos, necessitando urgentemente que as indústrias de fitofármacos existentes se desenvolvam para competir inclusive a nível internacional (CECHINEL FILHO, 1997).

Assim, a química de produtos naturais tem por objetivo o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, principalmente no campo da fitoquímica, através do seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (SILVA *et al.*, 2006).

É neste contexto social que as plantas medicinais e os fitoterápicos adquirem importância como agentes terapêuticos e, por isso, devem ser prioritariamente analisados.

### **3.2 Produtos Naturais**

Os metabólitos secundários produzidos por plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo da morfina, quinina, cânfora, e cocaína. A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Desta forma, as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (MONTANARI, BOLZANI, 2001).

A procura por fármacos a partir de um “screening” com uma variedade de espécies vegetais para testes biológicos específicos é uma das formas racionais adotadas para a obtenção de fármacos de origem vegetal. A busca por estes futuros candidatos a fármacos difere dos meios sintéticos devido a diversidade molecular e pela funcionalidade biológica (NISBET, MOORE, 1997).

O isolamento das primeiras substâncias naturais puras do reino vegetal começou a ocorrer no século XVIII. Os séculos XVIII e XIX caracterizaram-se pelas técnicas de extração, principalmente de ácidos orgânicos e alcalóides. Nesta época

foram realizados importantes isolamentos de substâncias como a morfina, quinina e estricnina (PINTO *et al.*, 2002).

Os produtos naturais fornecem medicamentos úteis cuja produção na forma sintética é difícil e muitas vezes inviável economicamente. De fontes naturais também podem ser retirados compostos básicos que modificados se tornam mais eficazes e menos tóxicos (ROBBERS *et al.*, 1997).

Alguns exemplos de produtos naturais obtidos e modificados incluem a aspirina. A salicinina e a salicigenina isoladas de *Salix alba* e *Filipendula ulmaria* respectivamente, são derivadas do ácido salicílico, que apresenta propriedades analgésicas e antiinflamatórias conhecidas. Uma modificação estrutural simples como uma acetilação, foi capaz de fornecer o ácido acetilsalicílico, amplamente utilizado (HOSTTETMANN *et al.*, 2003).

Outro exemplo é a *Papaver soniferum*, a papoula, espécie da qual é extraído o ópio. Um dos constituintes majoritários do ópio é a morfina, um alcalóide com propriedades narcóticas e analgésicas. A partir da morfina foi sintetizada a diacetilmorfina, comercializada inicialmente como antitussígeno, sendo tão eficaz que foi denominada uma substância heróica, daí o nome heroína (HOSTTETMANN *et al.*, 2003).

Das cascas de *Cinchona spp.* foi isolada a quinina, um alcalóide utilizado durante muito tempo como antimalárico e que serviu como protótipo para descoberta de outros derivados antimalariais como a cloroquina e a mefloquina (BARREIRO, FRAGA, 2001).

Uma das classes mais abundantes de metabólitos secundários presente nas plantas são os triterpenos e fitoesteróis. O ácido betulínico, por exemplo, apresenta moderada atividade antitumoral e anti-HIV, sendo que um derivado denominado Berivimat apresentou intensa atividade anti-HIV e encontra-se em fases avançadas de testes clínicos (KUO *et al.*, 2009).

### **3.3 Atividade antioxidante**

Atualmente, numerosas pesquisas sugerem que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de muitas doenças incluindo desordens neurodegenerativas, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, atuando também

no processo de envelhecimento. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio que ocorre no balanço da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e radicais hidroxila, bem como na habilidade de sistemas biológicos enzimáticos e não enzimáticos protegerem o organismo contra tais danos. Como consequência do estresse oxidativo pode ocorrer oxidação de proteínas, lipídios e DNA, que podem levar à degeneração e até morte celular (Figura 1). Diferentes estratégias terapêuticas têm sido propostas para a prevenção e tratamento de doenças mediadas por EROs, com ênfase especial na terapia com antioxidantes (PAZ *et al.*, 2010; VALKO *et al.*, 2007; EMERIT *et al.*, 2004).

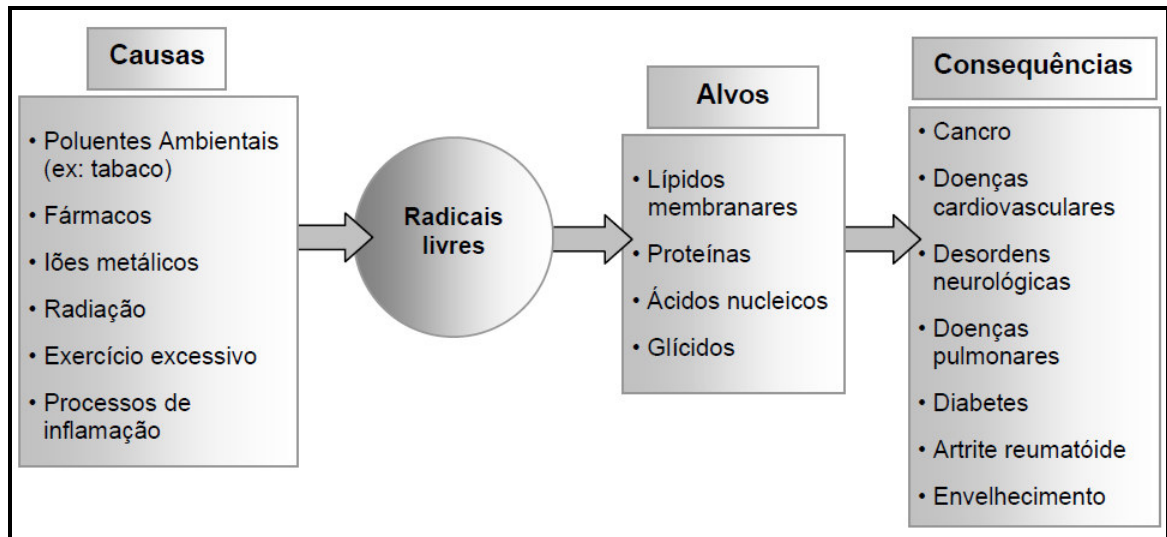


Figura 1 - Principais causas e consequências da ação dos radicais livres (reproduzido de Ferreira, Abreu, 2002)

Antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios e outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio (AL-MAMARY *et al.*, 2002; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005;). As substâncias com núcleo fenólico como os tocoferóis, os flavonóides e ácidos fenólicos apresentam destaque especial como antioxidantes por atuarem como eficientes captadores de EROs, além de reduzirem

e quelarem íons que catalisam a peroxidação lipídica (Al-MAMARY *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2007).

Alguns produtos naturais com atividade antioxidante podem ser úteis no auxílio do sistema protetor endógeno, podendo ser utilizados como nutracêuticos (KANTER, 1998). Nessa perspectiva, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protetores que ajudam o corpo humano na redução dos danos oxidativos.

Os fitoquímicos (Figura 2) são classificados como compostos bioativos provenientes de diferentes partes das plantas, tais como, sementes, frutos, folhas, raízes (RAMARATHNAM *et al.*, 1995) e estão relacionados com a redução do risco de ocorrência de diversas doenças crônicas. Sendo o estresse oxidativo induzido por radicais livres, responsável por várias dessas doenças crônicas, os fitoquímicos presentes nos vegetais assumem cada vez mais uma enorme importância. Já foram identificados mais de 5000 fitoquímicos, no entanto, uma grande percentagem destes compostos é ainda desconhecida, sendo importante a sua identificação para melhor compreender a sua contribuição para a saúde ao serem incluídos na nossa dieta (LIU, 2003).

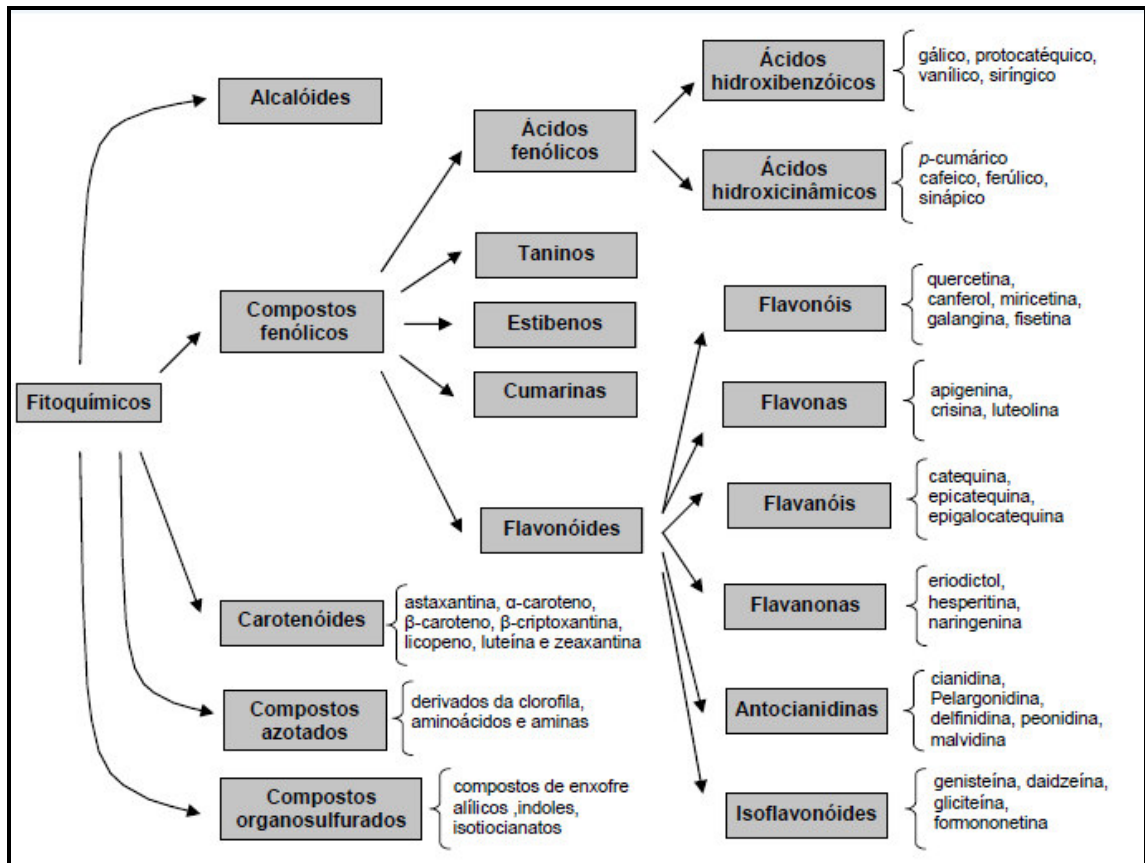


Figura 2 – Exemplos de algumas das principais classes de fitoquímicos (reproduzido de Ferreira, Abreu, 2002)

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOARES, 2002; SOUSA *et al.*, 2007).

Para além dos compostos fenólicos, também os carotenóides possuem atividade antioxidante importante para a saúde humana. Efetivamente, o papel fotoprotetor dos carotenóides está relacionado com a sua capacidade de bloquear e inativar EROs formadas na presença de luz e ar. Os carotenóides conseguem reagir com radicais livres e tornarem-se, eles próprios, radicais estáveis devido à deslocalização dos elétrons desemparelhados ao longo da sua cadeia. Por exemplo,



o  $\beta$ -caroteno reage com um radical peroxila formando um radical que interrompe a cadeia de propagação das espécies reativas de oxigênio (FERREIRA, ABREU, 2002; FANG *et al.*, 2002).

### 3.4 Descrição da planta

#### 3.4.1 Descrição da família Lecythidaceae

A família Lecythidaceae consiste em cerca de 230 espécies, classificada em 10 gêneros de plantas lenhosas originárias da América do Sul, sudeste da Ásia e África Ocidental, com maior diversidade na região neotropical. A maioria das espécies é formada por árvores ou arbustos (TSOU, MORI, 2007).

Segundo Souza e Lorenzi (2005), no Brasil há cerca de 100 espécies, a maioria nas florestas Amazônia e na Mata Atlântica do nordeste. Conhecida por ser a família da castanheira do Pará (*Bertholletia excelsa*), cujas sementes são apreciadas no mundo todo, a etimologia do nome desta família vem do grego *Lecythis*, que significa “urna” ou “vaso”, uma alusão à forma dos frutos;

#### 3.4.2 Descrição da espécie *Cariniana domestica* (Mart) Miers

A espécie *Cariniana domestica*, antigamente denominada *Couratari domestica*, pertence à família Lecythidaceae, sendo conhecida popularmente como “jequitibá roxo” (Figura 3). Apresenta-se como uma árvore alta e frondosa, possuindo folhas pecioladas, pergamentáceas, oblongas e glabras. As flores são dispostas em panículas terminais ou axilares. Possui fruto pixídio cilíndrico. É encontrada principalmente nos estados de Goiás e Mato Grosso, no Brasil. (PIO CORREA, 1969).



Figura 3 - Foto ilustrativa de uma espécie de jequitibá (*Cariniana* spp.).

Disponível em: < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Jequitiba.jpg> >

### **3.5 Estudos químicos e farmacológicos descritos para o gênero *Cariniana*.**

Quanto aos aspectos químicos e farmacológicos, as espécies *Cariniana* spp. são muito pouco estudadas. Na medicina popular, o Jequitibá é utilizado como adstringente. O chá das cascas é utilizado para curar hemorragias internas, leucorréia, angina e afecção das amídalas. Os taninos presentes nas cascas são empregados no curtimento de couros, e a casca também tem grande ação desinfetante (NETO, MORAIS, 2003). Alguns estudos relatam atividade antiinflamatória (SANTOS, 2000).

Atualmente, muito pouco é conhecido sobre a composição química da família Lecythidaceae. Alguns autores (CARVALHO *et al.*, 1998; SOUZA, *et al.*, 2001) relatam que já foram identificados triterpenos pentacíclicos, saponinas, ácido elágico e alcalóides do tipo indolo-[2,1-b]-quinazolínicos de espécies da família Lecythidaceae. Carvalho *et al.* (1998), identificou uma série de triterpenos na espécie *Eschweilera longipes* Miers, utilizada na indústria madeireira e como combustível doméstico. Entre os compostos identificados estão fridelina, fridelinol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, 3-O $\beta$ -cinamoil- $\alpha$ -amirina, 3-O $\beta$ -cinamoil- $\beta$ -amirina,  $\alpha$ -amirenona,  $\beta$ -amirenona, 3- $\alpha$ -hidroxi-lupeol, 3- $\alpha$ -hidroxi-taraxasterol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol,  $\alpha$ -

tocopherol e tocotrienol. Souza *et al.* (2001) realizou estudo químico de *Gustavia augusta* L., utilizada popularmente com anti-leishmaniose e antiinflamatória. Os autores também identificaram compostos triterpênicos como estigmasterol, espinasterol, espinasterona, D-friedoolean-14-en-3 $\beta$ -ol (taraxerol), D-friedoolean-14-en-3-ona (taraxerona) e D-friedoolean-14-en-3 $\alpha$ -ol (epitaraxerol), além de estigmasterol,  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, lupeol, 3- $\alpha$ -hidroxi-lupeol (epilupeol) e ácido betulínico.

Em estudos relacionados com a constituição química das espécies *Cariniana* spp., podemos citar um estudo desenvolvido por Lima *et al.* (2002) o qual levou ao isolamento e determinação de estrutura de saponinas presentes em *Cariniana rubra*, identificadas como monodesmosídeos e bidesmosídeos derivados do ácido arjunólico (Figura 4). Além das saponinas, os autores isolaram também os compostos estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -amirina e 3-O-b-D-glucosídeo de sitosterol. Segundo estes autores, triterpenos, saponinas e taninos são encontrados na família Lecythidaceae, contudo, pouco se sabe sobre a constituição química do gênero *Cariniana*.

Baurin *et al.* (2002) estudou algumas espécies de plantas em relação à inibição da tirosinase, enzima envolvida no processo de melanogênese. Neste estudo foram avaliadas 68 espécies de plantas quanto à inibição da tirosinase utilizando método espectrofotométrico. A espécie *Cariniana brasiliensis* foi avaliada e apresentou inibição de 90%, sendo a planta que apresentou a melhor inibição, ficando atrás apenas da espécie *Morus alba* (97% de inibição), utilizada como controle positivo e que apresenta ação despigmentante comprovada. A espécie *Cariniana brasiliensis* já havia sido descrita com possuidora de ação clareadora da pele por Shimomura *et al.* (1995), porém via inibição da hialuronidase.

Fenner *et al.* (2006), incluiu em seu estudo o uso de *Cariniana estrellensis* e *Cariniana legalis* como parte das plantas utilizadas no Brasil como antifúngicas. As cascas destas duas espécies são utilizadas popularmente no tratamento da leucorréia (FREISE, 1933).

Um estudo relacionado com ações biológicas foi realizado por Santos (2000), abordando uma triagem farmacológica de plantas medicinais usadas popularmente no Mato Grosso como antiinflamatórias. Este estudo incluiu a espécie *C. rubra*.

Em trabalho publicado recentemente, foi realizada avaliação da atividade antimicrobiana de espécies do cerrado do Mato Grosso, entre as quais, *Cariniana rubra*. Neste estudo, os extratos mais polares das cascas foram efetivos contra os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, apresentando MICs = 100-1000 µg/mL (SILVA JUNIOR *et al.*, 2009).

Em relação à espécie *C. domestica*, não foram encontrados trabalhos relacionados a estudos químicos ou farmacológicos até o presente momento.

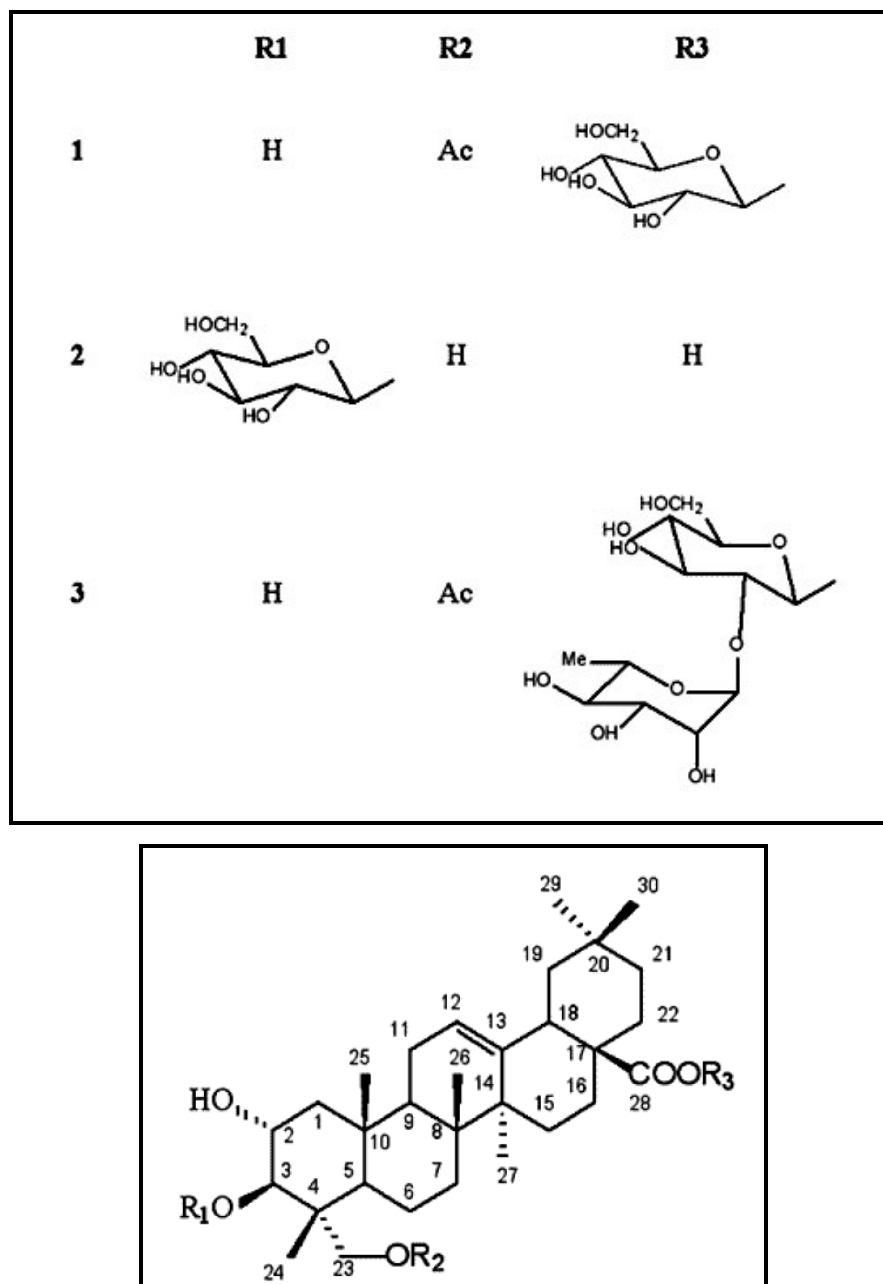


Figura 4 - Compostos isolados de *Cariniana rubra* por Lima *et al.* (2002). Compostos **1** (ácido 28-b-glucopiranosil-23-O-acetil arjunólico); **2** (ácido 3-O-b -glucopiranosil arjunólico); **3** (ácido 28-O-[ $\alpha$ -Rhamnopiranosil-(1,2)-b-glucopiranosil]-23-O-acetil arjunólico).

## 4. RESULTADOS

Esta dissertação apresenta os resultados obtidos na forma de artigos científicos, os quais estão formatados de acordo com as normas dos periódicos aos quais estão publicados, aceitos ou submetidos. Contempla um item de discussão geral no qual os principais dados são discutidos em conjunto, além dos anexos onde estão colocados os espectros de ressonância magnética dos compostos isolados e demais publicações científicas.

**4.1** JANOVIK, V., BOLIGON, A.A, FELTRIN, A.C., PEREIRA, D.F., FROHLICH, J.K., & ATHAYDE, M.L. (2009). Doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos no extrato bruto e frações de *Cariniana domestica* (Mart.) Miers. **Revista Saúde**, 2, 25-29.

Artigo publicado na **Revista Saúde**, em 2009.

**DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS, FLAVONÓIDES E TANINOS NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE  
CARINIANA DOMESTICA (MART.) MIERS**

*Determination of polyphenols, flavonoids and tannins in the crude extract and  
fractions of Cariniana domestica (Mart.) Miers*

Vanessa Janovik<sup>1</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>1</sup>, Andrieli Cassel Feltrin<sup>1</sup>, Danielle Fontana Pereira<sup>2</sup>,  
Janaina Kieling Frohlich<sup>3</sup> e Margareth Linde Athayde<sup>4</sup>

**RESUMO**

O presente trabalho teve como objetivo realizar a avaliação do teor de polifenóis, flavonóides e taninos no extrato bruto e frações das cascas de *Cariniana domestica* (Mart.) Miers, visando comparar com as suas atividades antioxidantes. Os valores encontrados para polifenóis variaram de  $54,6 \pm 0,333$  a  $309,3 \pm 2,733$  miligramas de ácido pirogálico por grama de planta seca. Os valores encontrados para flavonóides variaram de  $12 \pm 0,12$  a  $14,18 \pm 0,1$  miligramas de rutina por grama de planta seca. Por fim, os valores encontrados para taninos  $131 \pm 0,03$  a  $149,7 \pm 0,22$  miligramas de ácido pirogálico por grama de planta seca. Estas concentrações indicam que *Cariniana domestica* possui um alto teor de substâncias com capacidade sequestrante de radicais livres, podendo ser estudada de maneira mais aprofundada quanto a um possível uso como antioxidante.

Palavras-chave: *Cariniana*, polifenóis, flavonóides, taninos

**SUMMARY**

This study aimed to make an assessment of the content of polyphenols, flavonoids and tannins in the crude extract and fractions from the bark of *Cariniana domestica* (Mart.) Miers, so as to compare them with their antioxidant activities. The values found for polyphenols ranged from  $0.333$  to  $309.3 \pm 54.6 \pm 2.733$  milligrams of pyrogalllic acid per gram of dry plant. The values found for flavonoids ranged from  $12 \pm 0.12$  to  $14.18 \pm 0.1$  mg of rutin per gram of dry plant. Finally, the values found for tannins ranged from  $131 \pm 0.03$  to  $149.7 \pm 0.22$  milligrams of pyrogalllic acid per gram of dry plant. These findings indicate that *Cariniana domestica* has a high content of free radical scavengers and can be studied more thoroughly as a potential antioxidant agent.

Keywords: *Cariniana*, polyphenols, flavonoids, tannins

**INTRODUÇÃO**

A espécie *Cariniana domestica*, popularmente conhecida como jequitibá roxo, pertence à família Lecythidaceae, constituída de 25 gêneros e 400 espécies que se apresentam na forma de árvores de grande porte, com distribuição pantropical. Alguns constituintes com atividade farmacológica têm sido isolados de espécies desta família e, por isso, torna-se importante o desenvolvimento de estudos fitoquímicos e farmacológicos destas espécies<sup>1</sup>.

Antigamente chamada *Couratari domestica*, é uma árvore alta e frondosa, possuindo folhas pecioladas, pergamentáceas, oblongas, crenado-serreadas e glabras. As flores são dispostas em

panículas terminais ou axiliares e fruto pixídio cilíndrico. Produz madeira branca própria para caixotaria e pasta para papel. O líber é branco e espesso, empregado em cordoaria, podendo servir para curtume<sup>2</sup>.

O gênero *Cariniana* é pouco estudado. Alguns trabalhos relatam o isolamento de compostos triterpênicos e atividade antiinflamatória para *Cariniana rubra*<sup>3,4</sup>. Para a espécie *Cariniana brasiliensis*, foi relatada atividade inibitória da enzima tirosinase<sup>5</sup>. Em 2006, o uso de *Cariniana estrellensis* é incluído em estudo de plantas utilizadas no Brasil como antifúngicas<sup>6</sup>.

Trabalho realizado no Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) / RS.

<sup>1</sup>Aluna do curso de Pós - Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM.

<sup>2</sup>Aluna de Doutorado em Farmacologia – Universidade Federal de Santa Catarina

<sup>3</sup>Aluna do Curso de Graduação em Farmácia da UFSM

<sup>4</sup>Prof. Adjunta da Universidade Federal de Santa Maria

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, entre outros, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente serem utilizadas como agentes medicinais<sup>7</sup>.

De acordo com alguns autores, o oxigênio molecular e seus radicais são os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. O termo “espécies reativas de oxigênio” (ERO) inclui os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila (HO $\cdot$ ), o radical peroxila (ROO $\cdot$ ) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), os quais são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos<sup>8,9</sup>.

Estas espécies reativas de oxigênio podem causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, e estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, doenças auto-imunes, carcinogênese e mutagênese<sup>8-11</sup>.

As substâncias com núcleo fenólico, como tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos, apresentam destaque especial como antioxidantes, por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio<sup>10</sup>.

Os taninos são componentes polifenólicos encontrados nas plantas. Tais compostos são responsáveis pela adstringência das plantas<sup>12</sup>. Dividem-se em dois grupos: as proantocianidinas, que são os taninos condensados, responsáveis pelas características atribuídas a estas substâncias, como adstringência e precipitação de proteínas, e os taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados são polímeros de flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol, apresentando uma rica diversidade estrutural. O método da vanilina baseia-se na reação da vanilina com os taninos condensados, com a formação de complexos coloridos<sup>13</sup>.

Os flavonóides possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os diversos sistemas biológicos. As propriedades antioxidantes dos flavonóides podem ser benéficas à saúde, por prevenirem a oxidação de LDLs, por exemplo<sup>14</sup>. A maioria dos flavonóides possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C, e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha para o núcleo B<sup>15</sup>. O método utilizado para a quantificação de flavonóides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonóides, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de suas absorções.

Desta forma, é possível determinar a quantidade de flavonóides na amostra, evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente a dos ácidos fenólicos<sup>13</sup>.

O objetivo deste trabalho foi determinar o conteúdo de polifenóis totais, flavonóides e taninos condensados no extrato bruto e frações das cascas de *Cariniana domestica*, visando comparar com as atividades antioxidantes já avaliadas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e extração do material vegetal:

As cascas de *Cariniana domestica* foram coletadas no município de Tangará da Serra, no estado do Mato Grosso do Sul e trazidas para o Laboratório de Fitoquímica, onde foram devidamente armazenadas. O material testemunho está depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM, catalogado sob o número de registro SMDB 11818.

O material vegetal foi seco ao ar livre, moído e triturado. O extrato foi obtido através da maceração hidroalcoólica (EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3, v/v) do material que foi colocado em recipiente fechado e recoberto com o solvente; o macerado foi submetido a agitações manuais diárias, por um período de sete dias. Ao fim desse período, o conteúdo foi filtrado em algodão, seguindo-se a concentração em evaporador rotatório, a temperatura inferior a 40°C. Após a eliminação do etanol, o extrato bruto foi particionado através da extração seqüencial utilizando solventes de polaridade crescente: diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-BuOH).

Determinação de polifenóis:

A determinação de conteúdos fenólicos totais foi realizada pelo método do Folin-Ciocalteu<sup>16</sup> na concentração de 150 µg/mL para as frações e o extrato bruto. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 730 nm, em triplicata. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido pirogálico por grama de planta seca. A equação obtida para a curva padrão do ácido pirogálico foi  $y = 34.443x - 0.0942$  ( $r = 0.9994$ ).

Doseamento de flavonóides:

A determinação do teor de flavonóides foi realizado segundo o método descrito por Woisky e Salatino<sup>17</sup>. A 1 mL de uma solução da amostra (150 µg/mL) das frações e extrato bruto de *Cariniana domestica*, foram adicionados 0,5 mL de uma solução de AlCl<sub>3</sub> 2%. Após 15 minutos, as absorvâncias foram lidas em 420 nm. Os testes foram realizados em triplicata e para o cálculo do doseamento de flavonóides utilizou-se a curva padrão de rutina ( $Y = 20,394x - 0,2033$  ( $r = 0,9997$ )). Os teores de flavonóides foram determinados em miligrama de rutina por grama de planta seca.



Doseamento de taninos condensados:

A determinação do teor de taninos condensados foi realizada segundo método da vanilina modificado de Burns<sup>18</sup>. A 0,1 mL de amostra (25 mg/mL) foram adicionados 0,9 mL de metanol, 2,5 mL de solução A (HCl 8% em metanol) e 2,5 mL de solução B (vanilina 1% em metanol). A mistura foi aquecida a 60°C durante 10 minutos e a seguir, foi efetuada a leitura das absorvâncias em 730 nm. Os testes foram realizados em triplicata e para o cálculo do doseamento de taninos utilizou-se a curva padrão de ácido pirogálico ( $Y = 0,0423x + 0,1362$  ( $r=0,9924$ )). Os teores de taninos condensados foram determinados em miligrama de pirogalol por grama de planta seca.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A tabela 1 fornece os resultados obtidos para as três

determinações. Os resultados indicam que o conteúdo de polifenóis seguiu a ordem  $AcOEt > EB > n-BuOH > CH_2Cl_2$ . Estes valores eram esperados devido a ordem crescente de polaridade utilizada para o fracionamento do extrato aquoso. Tal relação de teor de polifenóis e polaridade está bem documentada<sup>19-21</sup>. Em relação a atividade antioxidante, os valores mais altos de polifenóis na fração AcOEt se relacionam com os resultados mais altos de inibição do radical DPPH. O fração n-BuOH, entretanto, apresentou teor de polifenóis um pouco abaixo do esperado, levando-se em conta sua alta polaridade. Isto pode ocorrer devido aos totais de conteúdo fenólico baseados em certos padrões, como ácido gálico, epicatequina, epigallocatequina, pirogalol, catequina e quercetina, dentre outros, poderem subestimar ou superestimar o valor total de conteúdo fenólico descrito para uma determinada espécie, levando a diferentes interpretações de resultados<sup>16</sup>.

Tabela 1 – Doseamento de polifenóis totais, flavonóides e taninos condensados no extrato bruto e nas frações das cascas de *Cariniana domestica*.

Fração	Polifenóis(mg/g)	Flavonóides (mg/g)	Taninos condensados (mg/g)
F-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	54,6 ± 0,333	12,0 ± 0,12	136,3 ± 0,05
F-AcOEt	309,3 ± 2,733	13,98 ± 0,09	131 ± 0,03
F-n-BuOH	132,2 ± 1,966	14,18 ± 0,1	149,7 ± 0,22
EB	268 ± 3,266	13,69 ± 0,05	138,2 ± 1,85

Para o teor de flavonóides, os resultados seguiram a ordem  $n-BuOH > AcOEt > EB > CH_2Cl_2$ , demonstrando maior presença destes compostos na fração mais polar das cascas de *Cariniana domestica*. O método de Woisky e Salatino<sup>17</sup> permite realizar um doseamento específico para flavonóides, sem interferência de outros compostos fenólicos. Neste caso, o teor de flavonóides está apropriadamente mais elevado na fração butanólica, de maior polaridade.

Para o teor de taninos condensados, a ordem de valores seguiu a ordem  $n-BuOH > EB > AcOEt > CH_2Cl_2$ , indicando a maior concentração deste grupo de compostos fenólicos na fração n-BuOH. Os valores de taninos mostraram-se bastante altos em geral para o extrato bruto e frações, já que estes compostos encontram-se sabidamente em altas concentrações nas cascas das plantas, atuando como substâncias de defesa contra agressores. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de moléstias tais como diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, queimaduras e problemas renais. A capacidade de precipitar proteínas é a base do seu mecanismo de ação desejado, como por exemplo, como anti-séptico, formando um complexo tanino-proteína ou polissacarídeo sobre tecidos

danificados, impedindo o desenvolvimento de microorganismos<sup>22</sup>.

A atividade antioxidante, de modo geral, se deve a presença de compostos fenólicos. Para alguns compostos fenólicos, como ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico e seus ésteres com esteróis e triterpenos, já tem sido relatada tal atividade. Essas evidências têm sugerido que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados em plantas e na dieta<sup>23, 24</sup>.

## CONCLUSÃO

Finalmente, cabe ressaltar que no presente estudo a espécie *Cariniana domestica* apresentou elevados teores de compostos fenólicos totais, flavonóides e taninos condensados, relacionando-se com suas atividades antioxidantes já estudadas. A elucidação das estruturas químicas dos principais compostos da espécie poderá ser direcionada a partir dos resultados deste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carvalho MG; Javier RV; Oliveira LF; Bezerra FB. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* MIERS, Química Nova, 1998; 21(6).
2. Pio Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Vol 4. Ministério da Agricultura, IBDF. Rio de Janeiro, 1969.
3. Lima E; Sousa Filho PT; Bastida J; Schmeda-Hirschmann G. Saponins from *Cariniana rubra* (Lecythidaceae). Bol. Soc. Chil. Quím. 2002; v. 47 n. 4.
4. Santos EN. Triagem farmacológica de plantas medicinais usadas popularmente em Mato Grosso como anti-inflamatórias e validação pré-clínica de *Cariniana rubra* Gardner ex Miers (Jequitibá-vermelho) como anti inflamatória. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, 2000.
5. Baurin N; Amoult E; Scior QT; Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. Journal of Ethnopharmacology, 2002; v. 82, p. 155 -158.
6. Fenner R; Heemann AB; Mentz LA; Rates SMK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2006; vol. 42, n. 3, jul./set.
7. Cechinel Filho V; Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos para otimização da atividade. Química Nova, 1997; v.21 n.1, p 99-105.
8. Gyanfi MA; Yonamine M; Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. Gen. Pharmacol. 1999; 32: 661-667.
9. Gülcin I; Oktay M; Kirecci E; Küfrevioğlu OI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. Food Chem. 2003; 83: 371-382.
10. Al-Mamary M; Al-Meerri A; Al-Habori M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. Nutr. Res. 2002; 22: 1041-1047.
11. Chanwitheesuk A; Teerawutgulrag A; Rakariyatham N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. Food Chem. 2005; 92: 491-497.
12. Pansera MR et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Farmacognosia, jan.-jun. 2003; V. 13, n. 1, p. 17-22.
13. Funari CS; Ferro OV. Análise de Própolis. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, jan.-mar. 2006; 26(1): 171-178.
14. Araújo PWB; Quintans Júnior JL; Vasconcelos HD; Almeida JGS. *Flavonóides e Hipertensão*. Revista Brasileira de Hipertensão 2005; 12(3): 188-189.
15. Zuanazzi JA; Montanha JA. Flavonóides in Simões CMO et al. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento .2004; Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC.
16. Chandra S; Meija EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. J. Agric Food Chemistry, 2004.
17. Woisky RG; Salatino A. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal Apicultural Research, 1998; 37 (2): 99-105.
18. Burns RE. Method for estimation of tannin in grain sorghum. Agronomy Journal, 1971; 63: 511-512.
19. Tung YT; Wu JH; Kuo YH; Chang, S. T. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. Bioresource Technology, 2007; 98(5): 1120-1123.
20. Schubert A; Pereira DF; Zanin FF; Alves SH; Beck RCR; Athayde ML. Comparison of antioxidant activities and total phenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Die Pharmazie, 2007.
21. Tukmen N; Sari F; Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chem, 2006; 99: 835-841.
22. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. Journal of Natural Products, 1999; v. 59, p.205-215.
23. Simões CMO. (Organizador) et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Revista e ampliada, Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004; p.13 -16.
24. Boligon AA, Magoga BR, Feltrin AC, Janovik V, Athayde ML. Potencial antioxidante in vitro, conteúdo de fenóis e flavonóides nos ramos de *Scutia buxifolia* Reissek. Revista Saúde. In press 2009.

Endereço para correspondência:  
 Vanessa Janovik  
 Rua João Goulart, 535, apto 404.  
 CEP: 97105-220, Santa Maria – RS – Brasil.  
 Fone: (55) 91656523.  
 E-mail: [angiewish@hotmail.com](mailto:angiewish@hotmail.com)

**4.2** JANOVIK, V., BOLIGON A.A., FROHLICH, J.K., SCHWANZ, T.G.S, POZZEBON, V. T., HARTZ, S.A., ATHAYDE, M.L. Isolation and chromatographic analysis of bioactive triterpenoids from the bark extract of *Cariniana domestica* (Mart) Miers.

Artigo aceito para publicação em 2011: **Natural Product Research**

## SHORT COMMUNICATION

### Isolation and chromatographic analysis of bioactive triterpenoids from the bark extract of *Cariniana domestica* (Mart) Miers

5 Vanessa Janovik<sup>a\*</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>, Janaína Kieling Frohlich<sup>a</sup>,  
Thiago Guilherme Schawnz<sup>b</sup>, Tarciele Venturini Pozzebon<sup>c</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>c</sup>  
and Margareth Linde Athayde<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;  
10 <sup>b</sup>Center for Analysis and Organic Research (NAPO), Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Build 15, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil; <sup>c</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Build 20, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

(Received 5 April 2010; final version received 14 September 2010)

15 The Lecythidaceae family is composed of 25 genera and 400 species that occur in the form of trees with a pantropical distribution. The genera *Cariniana* belongs to the family Lecythidaceae, and there are few reports considering these species. In this work, fractionation of the dichloromethane fraction obtained from the aqueous extract of the stem bark of *Cariniana domestica* (Mart) Miers, popularly known as Jequitibá-roxo, led to the isolation of two mixtures of triterpenoids: lupeol and  $\beta$ -amyrin and  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol. The structures of the isolated compounds were elucidated by spectroscopic (NMR) and chromatographic (GC-MS) techniques as well as literature data comparisons.  $\beta$ -Sitosterol, stigmasterol, lupeol and  $\beta$ -amyrin were quantified in dichloromethane fraction by high-performance liquid chromatography (HPLC/DAD). The dichloromethane fraction was also investigated for antioxidant and antifungal activities. The isolated compounds and their biological activities are reported for the first time for the species *C. domestica*.

**Keywords:** *Cariniana*; HPLC; NMR; triterpenes; antioxidant; antifungal

#### 30 1. Introduction

The subfamily Lecythidaceae of Lecythidaceae family (Brazil nut family), consisting of small to very large trees, and composed of 10 genera and 230 species, is a dominant group in neotropical forests and an important element of Central and South America biodiversity (Tsou & Mori, 2007). *Cariniana domestica* (Mart) Miers belongs to Lecythidaceae family and is popularly known as Jequitibá-roxo in Brazil. There are few reports in the literature concerning the chemical constituents and ethnopharmacological uses of *Cariniana* spp., although the bark infusion of these species is commonly used as anti-inflammatory and antimicrobial remedies.

---

\*Corresponding author. Email: v.janovik@hotmail.com

2 V. Janovik et al.

40 Studies related to the biological actions determined that the triterpenoid compounds are potentially active in the extract of *Cariniana rubra*, and a screening of medicinal plants popularly used in Mato Grosso as anti-inflammatory led to the pre-clinical validation of *C. rubra* as antiinflammatory (Santos, 2000).

45 The species *Cariniana brasiliensis* was described as skin-lightening cosmetic by the inhibition of hyaluronidase and it also showed anti-tyrosinase activity (Baurin, Arnoult, Scior, & Bernard, 2002), whilst the extract of *Cariniana estrellensis* was described as active against *Mycobacterium kansasii* (Ramos et al., 2008). Three triterpenoidal saponins were isolated from the stem bark of *C. rubra* Gardner & Miers, whereas some constituents have been isolated from other species of this family, including pentacyclic triterpenes, saponins, ellagic acid and indol-quinazoline alkaloids (Carvalho, Velandia, Oliveira, & Bezerra, 1998; Lima, Filho, & Batisda, 50 2002). To the best of our knowledge, there are no bibliographic sources concerning the isolation and identification of secondary metabolites and biological activities from *C. domestica* yet.

55 As a part of our ongoing phytochemical and pharmacological investigations of Brazilian plants (Boligon, Pereira, et al., 2009; Janovik et al., 2009; Zanon, Pereira, Boschetti, Santos, & Athayde, 2008), and considering the large number of triterpenoids evidenced in this plant by a preliminary screening by thin layer chromatography (data not shown), the aim of this work was to identify and quantify the major triterpenoid compounds from the dichloromethane fraction obtained from 60 the bark of the plant. Consequently, this work describes the structural elucidation by means of spectroscopic and chromatographic techniques (NMR and GC-MS) of two binary mixtures of triterpenoid compounds isolated from the dichloromethane fraction as well as their quantification by means of HPLC/DAD. Simultaneously, preliminary *in vitro* antioxidant and antifungal assays were performed with this 65 fraction.

## 2. Results and discussion

Successive column chromatographic procedures with dichloromethane fraction led to the isolation of two triterpenoid/steroids mixtures, correspondent to four 70 compounds (Figure 1), whose structures were identified based on <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra, GC-MS, and by comparison with the literature data (De-Eknankul & Potduang, 2003; Forgo & Kövér, 2004; González-Lavaut, Gonzáles, Alvarez, & Vélez-Castro, 2008; Morita, Shibuya, Kushiro, Masuda & Ebizuca, 2000; Zanon et al., 2008). The <sup>13</sup>C NMR spectra of subfraction 11-15 showed 60 carbon atoms, indicating a mixture of two substances (1+2). The spectra showed 75 characteristic resonances displayed at 18.4, 109.3, and 150.9 ppm, suggesting the presence of one isopropenyl group located in C-30, C-29 and C-20, respectively, and compatible with a pentacyclic triterpene of the lup-20(29)-ene-3-ol skeleton (Morita et al., 2000). The <sup>1</sup>H NMR spectra showed the characteristic signals of the isopropenyl group: two doublets at  $\delta$  4.61 and 4.49 ppm corresponding to the geminal olefinic protons H-29a and H-29b, and the methyl singlet at  $\delta$  1.60 ppm assigned to 80 CH<sub>3</sub>-30. We allocated this set of data to compound 1 and we observed that the spectra showed all the remaining signals which were comparable with those described to lupeol isolated by our group from the leaves of *Vernonia tweediana*

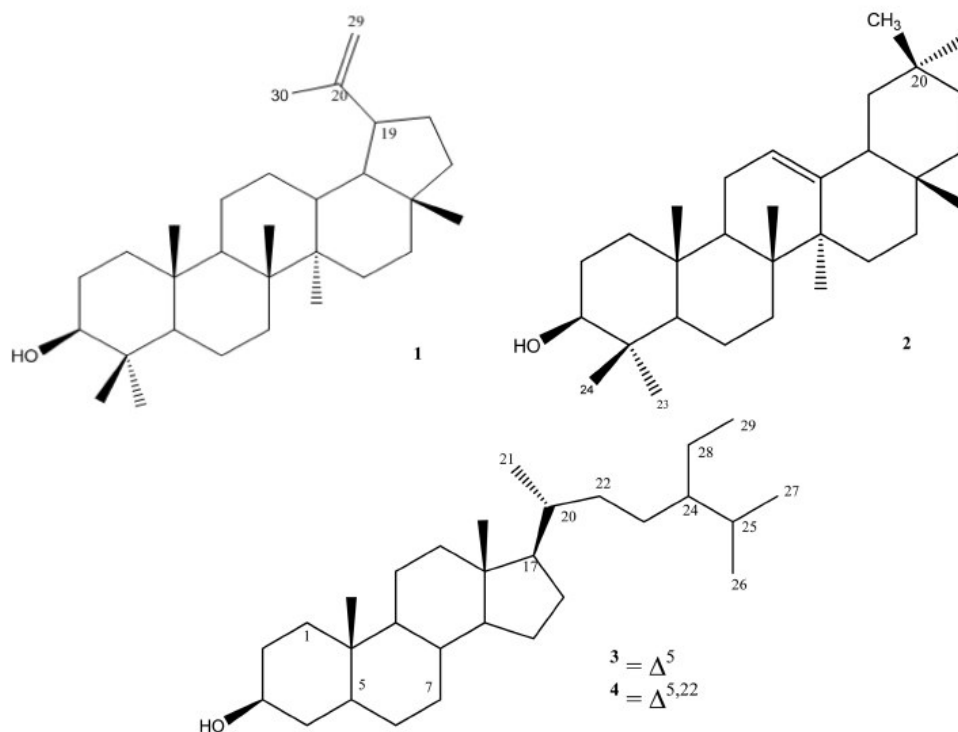


Figure 1. Chemical structures of lupeol (1),  $\beta$ -amyrin (2),  $\beta$ -sitosterol (3) and stigmasterol (4).

(Zanon et al., 2008). Therefore, compound 1 was confirmed as lupeol (Figure 1).  
 85  $^{13}\text{C}$ NMR assignments of compound 1: 38.8 (C-1), 25.1 (C-2), 79.0 (C-3), 38.7 (C-4),  
 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 34.3 (C-7), 40.8 (C-8), 50.4 (C-9), 37.1 (C-10), 20.9 (C-11), 27.4  
 (C-12), 38.0 (C-13), 42.8 (C-14), 27.4 (C-15), 35.6 (C-16), 43.0 (C-17), 48.3 (C-18),  
 47.9 (C-19), 150.8 (C-20), 29.8 (C-21), 40.0 (C-22), 27.9 (C-23), 16.1 (C-24), 15.9  
 (C-25), 15.3 (C-26), 14.5 (C-27), 18.9 (C-28), 109.3 (C-29), 18.4 (C-30).

90 The remaining  $\text{sp}^2$  signals in the spectra of 1+2 were located at  $\delta$  121.7 and  
 145.2 ppm, characteristic to the  $\beta$ -amyrin (oleanane type) nucleus with a double bond  
 located at the C-12 and C-13 positions (Zanon et al., 2008; González-Lavaut et al.,  
 2008). The  $^{13}\text{C}$  NMR assignments of compound 2 are: 38.7 (C-1), 26.9 (C-2), 79.0  
 (C-3), 38.8 (C-4), 55.2 (C-5), 18.4 (C-6), 31.0 (C-7), 41.7 (C-8), 47.6 (C-9), 36.9  
 95 (C-10), 23.7 (C-11), 121.7 (C-12), 145.2 (C-13), 41.7 (C-14), 28.1 (C-15), 26.1 (C-16),  
 32.6 (C-17), 47.2 (C-18), 46.8 (C-19), 31.0 (C-20), 34.7 (C-21), 37.1 (C-22), 28.4  
 (C-23), 15.4 (C-24), 15.5 (C-25), 16.8 (C-26), 25.9 (C-27), 27.2 (C-28), 33.3 (C-29),  
 23.5 (C-30). Characteristic  $^1\text{H}$  NMR signals were observed at  $\delta$  5.10 ppm for H-12  
 (1H, t,  $J=3.5$  Hz) and at  $\delta$  3.13 ppm (1H, dd,  $J=5.0$  and 11.0 Hz), attributed to the  
 100 proton at C-3. The set of data of 2 in the mixture was compatible with  $\beta$ -amyrin  
 (González-Lavaut et al., 2008) and its structure is shown in Figure 1.

The  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of subfraction 16-25 indicated 58 carbon atoms, consisting  
 in a mixture of two compounds (3 and 4). Four  $\text{sp}^2$  signals at  $\delta$  121.7, 129.3, 138.1  
 and 140.8 ppm indicate the presence of two double bonds. The signals at  $\delta$  121.7  
 105 and 140.8 ppm are characteristic of steroids with a double bond at C5 and C6

(De-Eknankul & Potduang, 2003; Forgo & Kövér, 2004) whereas the signals at  $\delta$  129.3 and 138.1 ppm are typical of triterpenes with a double bond between C-22 and C-23 (Forgo & Kövér, 2004; Zanon et al., 2008).  $\beta$ -Sitosterol (24 $\alpha$ -ethyl-cholestan-5-en-3- $\beta$ -ol) and stigmasterol (24 $\alpha$ -ethyl-cholestan-5,22-dien-3 $\beta$ -ol) have a double bound at the same position ( $\Delta^5$ ), therefore the signals at the NMR spectra will coincide and they are more intense when compared with the other two  $sp^2$  signals ( $\Delta^{22}$ ) that belong only to stigmasterol (De-Eknankul & Potduang, 2003). The large singlet signal at  $\delta$  5.23 ppm in the  $^1H$  NMR is characteristic of H-6 in both compounds and the double doublet at  $\delta$  5.05 and 4.95 ppm belongs to the other olefinic protons of stigmasterol. Therefore, the mixture of 3 + 4 was characterised as  $\beta$ -sitosterol (3) and stigmasterol (4), also shown in Figure 1.

The samples containing compounds 1 + 2 (sample 1) and 3 + 4 (sample 2) were submitted to GC-MS analysis. The chromatogram of sample 1 presented intense peaks at 25.88 and 26.72 min, corresponding to  $\beta$ -amyrin and lupeol, respectively. MS presented a signal at  $m/z$  426, corresponding to the molecular ion of lupeol. Other peaks come from the Retro-Diels-Alder-type fragmentation of ring C, and are typical of pentacyclic triterpenes. Most intense signals were observed at  $m/z$  218, 207, 189 and 109, which are characteristic of lupane fragmentation, confirming the identification of lupeol in the sample. For  $\beta$ -amyrin, the signal at  $m/z$  203 confirm the identity of the compound. Signals from the Retro-Diels-Alder-type fragmentation, typical of olean-12-ene and ursan-12-ene were observed at  $m/z$  218, 203 and 189. For sample 2, the GC-MS analysis presented peaks at 24.32 and 25.25 min, corresponding to stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol respectively. The most intense signals at MS were located at  $m/z$  207, 205 and 412 for stigmasterol and at  $m/z$  213, 303 and 414 for  $\beta$ -sitosterol (Martelanc, Vovk, & Simonovska, 2009; Zanon et al., 2008).

The crude fraction was submitted to GC-MS analysis as well. Besides the aforementioned four major compounds, numerous aliphatic long-chain fatty acids such as hexadecanoic acid, hexadecanoic acid methyl ester, oleic acid, linoleic acid ethyl ester and some compounds related to essential oils (heptatriacotonol and ethyl iso-allochololate) were identified. Betulin, a particularly important bioactive lupane-type triterpene (Lavoie & Stevanovic, 2007), lycopene and 9,19-cyclolanost-24-en-3-ol, acetate (3 $\beta$ ) were also present. All compounds were identified using the Adams MS database (Adams, 2001) and the NIST library of spectra. Additional literature data (Felföldi et al., 2009; Lavoie & Stevanovic, 2007; Ogunlesi, Okiei, & Osibote, 2010) was also consulted. Merely, the data of the three main compounds were shown: betulin,  $m/z$  442, 203, 189, 175; 9-19-cyclolanost-24-en-3-ol, acetate (3 $\beta$ ),  $m/z$  468, 414, 207, 189, 135, 93, 81, 69, 41 and lycopene,  $m/z$  536, 355, 159, 145, 119, 91, 69, 55, 41.

HPLC analysis was performed to quantify compounds 1–4 in mixtures and in the dichloromethane fraction. For quantification mixture 1 + 2, calibration curves were constructed with reference standard lupeol ( $Y = 11157x + 1178.7$  with  $r = 0.9992$ ) and  $\beta$ -amyrin ( $Y = 1651.1x + 3334.0$  with  $r = 0.9923$ ). Supplementary Figure 1(A) (online only) shows a representative chromatogram of the fraction, and Supplementary Figure S1(B) (online only) shows mixture 1 + 2, in which lupeol (RT = 4.7 min – peak 1) in and  $\beta$ -amyrin (RT = 6.1 min, peak 2) were quantified in 73.47% and 24.05%, respectively. In the crude fraction, lupeol was found to represent 28.2% from whole fraction and  $\beta$ -amyrin, 19.98%.

Several papers have been published on the detection and separation of triterpenoids mixtures by HPLC using acetonitrile: water or methanol; water and UV detection (Bologon, Janovick et al., 2009b; Martelanc et al., 2009). Due to their poor chromophores, the sterols could only be detected at low nanometers and the detection was influenced by the solvents used in the mobile phase. In this work, mixture 3+4 peaks were separated under the conditions described in the supplementary file. A calibration curve was constructed with reference standard  $\beta$ -sitosterol ( $Y=240846x+5410$  with  $r=0.9950$ ) and stigmasterol ( $Y=339108x+3750$  with  $r=0.9942$ ). Supplementary Figure S2(A) (online only) shows a representative chromatogram of the fraction and Supplementary Figure S2(B) (online only), the isolated compounds  $\beta$ -sitosterol (RT=7.6min, peak 3) and stigmasterol (RT=8.7 min, peak 4). Therefore, the quantities of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in the mixture were stated as 36.66% and 61.52%, respectively, and in the crude fraction, 5.85% and 12.52%. Data obtained from HPLC analysis is detailed in Supplementary Table S1 (online only).

Preliminary *in vitro* antioxidant and antifungal activities were investigated for dichloromethane fraction. In this work, this fraction exhibited good antioxidant activity ( $IC_{50}=16.4\pm0.06\mu\text{g mL}^{-1}$ ) when compared with the value obtained for ascorbic acid ( $IC_{50}=9.02\pm0.21\mu\text{g mL}^{-1}$ ), which lead us to think that the compounds isolated from this plant can exert antioxidant properties. As for antifungal activity, dichloromethane fraction presented MIC  $125\mu\text{g mL}^{-1}$  against *Saccharomyces cerevisiae*, being inactive against the other microorganisms tested.

In summary, lupeol,  $\beta$ -amyirin,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol were isolated for the first time from *C. domestica*. The four compounds were also quantified by HPLC.

#### Supplementary material

Experimental details related to this articlepaper can be found online, alongside Figures S1 and 2 and Table S1.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Maria Angélica da Silveira Lima (Chemistry Department of UFSM) for providing the NMR spectra, and Daniele Fontana Pereira for bringing the plant from Mato Grosso do Sul.

185

#### References

- Adams, R.P. (2001). *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, Q.T., & Bernard, P. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyroxidase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 155–158.
- 190 Bologon, A.A., Janovik, V., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Frohlich, J.K., & Athayde, M.L. (2009). Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das cascas do tronco de *Scutia buxifolia* Reissek. *Latin América Journal of Pharmacy*, 29, 450–453.



6 V. Janovik et al.

- 195 Boligon, A.A., Pereira, R.P., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Janovik, V., Rocha, J.B.T., & Athayde, M.L. (2009). Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, *100*, 6592–6598.
- Carvalho, M.G., Velandia, J., Oliveira, L.F., & Bezerra, F.B. (1998). Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Química Nova*, *21*, 740–742.
- 200 De-Eknankul, W., & Potduang, P. (2003). Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, *62*, 389–398.
- Felföldi, A., Gáva, B., Simándi, S.Z., Pländer, S., Szarka, Z., Szóke, É., & Kéry, A. (2009). Betulaceae and platanaceae plants as alternative sources of selected lupane-type triterpenes. Their composition profile and betulin content. *Acta Chromatographica*, *21*, 671–681.
- 205 Forgo, P., & Kövér, K. (2004). Gradient enhanced selective experiments in the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids*, *69*, 43–50.
- González-Lavaut, J.A., González, N.G., Alvarez, O.G., & Vélez-Castro, H. (2008). Una entidad química aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de  $\beta$ -amirina. *Latin America Journal of Pharmacy*, *27*, 85–88.
- 210 Janovik, V., Boligon, A.A., Feltrin, A.C., Pereira, D.F., Frohlich, J.K., & Athayde, M.L. (2010). Doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos no extrato bruto e frações de *Cariniana domestica* (Mart.) Miers. *Revista Saúde*, *2*, 25–29.
- Lavoie, M.J., & Stevanovic, T. (2007). Selective ultrasound-assisted extractions of lipophilic constituents from *Betula alleghaniensis* and *B. papyrifera* wood at low temperatures. *Phytochemical Analysis*, *18*, 291–299.
- 215 Lima, E., Filho, P.T.S., & Batisda, J. (2002). Saponins from *Cariniana rubra* (Lecythidaceae). *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, *47*, 441–447.
- Martelanc, M., Vovk, I., & Simonovska, B. (2009). Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1164*, 145–152.
- 220 Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K., & Ebizuka, Y. (2000). Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from *Pisum sativum*. New  $\alpha$ -amirin producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *European Journal of Biochemistry*, *267*, 3453–3460.
- 225 Ogunlesi, M., Okiei, W., & Osibote, E.A. (2010). Analysis of the essential oil from the leaves of *Sesamum radiatum*, a potential medication for male infertility factor, by gas chromatography – mass spectrometry. *African Journal of Biotechnology*, *9*, 1060–1067.
- 230 Ramos, D.F., Leitão, G.G., Costa, F.N., Abreu, L., Villareal, J.V., Leitão, S.G., Said, S.L., & Silva, E.A. (2008). Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *44*, 669–674.
- Santos, E.N. (2000). *Triagem farmacológica de plantas medicinais usadas popularmente em Mato Grosso como anti-inflamatórias e validação pré-clínica de Cariniana rubra Gardner ex Miers (Jequitibá-vermelho) como antiinflamatória* (Master's thesis). Federal University of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul.
- 235 Tsou, C.H., & Mori, S.A. (2007). Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: Information from combined *ndhF* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany*, *94*, 716–36.
- 240 Zanon, R.B., Pereira, D.F., Boschetti, T.K., Santos, M., & Athayde, M.L. (2008). Fitoconstituintes isolados da fração diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *18*, 226–229.

**Supplemental Material (disponível como material *on line* no periódico <http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713398545~db=all>)**

## **Experimental**

### ***Reagents, standards and apparatus***

All chemicals were of analytical grade.  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol,  $\beta$ -amyrin and 2,2-amphotericin B, fluconazole and 2,2-diphenyl,1-picrylhydrazyl (DPPH) were acquired from Sigma Chemical. Lupeol (95%) was acquired from Sigma Aldrich. Potato dextrose agar was acquired from Difco (Detroit, MI, USA). Silica Gel 60 for column chromatography, Silica Gel 60 F<sub>254</sub> coated plates, solvents for the extractions and analytical procedures were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol and acetonitrile were of HPLC grade. Deionised water was prepared by a Milli-Q water purification system. High performance liquid chromatography of the samples was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), prominence auto sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS-DAD (diode-detector) SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. NMR spectra were carried out on a Bruker AMX 400 spectrometer with TMS as an internal standard, using deuterated chloroform as solvent. Analyses in the Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) were performed on gas chromatograph Hewlett-Packard 6890 Series Plus + equipped with gun automatic split-splitless model HP 6890 Series GC Auto Sampler Controller and mass selective detector model HP 5973 MSD, using capillary chromatographic fused silica HP-5 MS (30 mx 0.32 mm internal diameter and thickness of the film 0.25  $\mu$ m) with 5% of phenyl and 95% of methylsiloxane. The carrier gas was helium (flow rate of 2 mLmin<sup>-1</sup>). Injector temperature was 250°C programming with a heating rate of 12°C min<sup>-1</sup> up to 280°C. Ionization potential was 70 eV. The absorbances for DPPH-assay were performed in a Shimadzu-UV-1201 (Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer.

### ***Plant collection and extraction***

The barks of *Cariniana domestica* were collected in Tangará da Serra - Mato Grosso do Sul, Brazil, in March of 2008. Exsiccate was archived as voucher specimen in the herbarium of Department of Pharmacology at UFSM (SMDB 11818).

The plant material was dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder was macerated with ethanol 70% (v/v). After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure. This procedure was repeated twice and the extracts were combined. The remained aqueous extract obtained was partitioned with solvents in increasing polarity: dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. At the end of all extractions procedures, each extract was evaporated under reduced pressure to obtain the dried fractions. In the present work, only dichloromethane fraction was investigated.

### ***Isolation and identification of triterpenes from the dichloromethane fraction***

The chromatographic profile of the dichloromethane fraction was first investigated by TLC. A quantity of 2  $\mu$ L of the fraction was spot in plate and eluted with dichloromethane : ethyl acetate : methanol (5 : 3 : 2) and then observed under UV light (254 and 366 nm) and sprayed with anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/100°C. Numerous substances with triterpenoid characteristics were visualized. This preliminary TCL screening prompts us to identify and quantify the major compounds in this fraction.

Therefore, 1.5 g of dried fraction was submitted to column chromatography on silica gel 60 using initially dichloromethane : hexane (50 : 50 v/v) as mobile phase and increasing the polarity by rising in 10% of dichloromethane until 100%. A new solvent system was used, starting with dichloromethane : ethyl acetate (90 : 10 v/v) and increasing in 10% of ethyl acetate until 100%. Finally the system started with ethyl acetate : methanol (90 : 10 v/v), increasing in 10% of methanol until 100%.

The procedure described above furnished ninety-three (93) fractions of  $\pm$  100 mL each, which were analyzed by TLC and pooled together on the basis of similarities in their chromatographic profile (solvent systems were dichloromethane : hexane (80 : 20, v/v) until fraction 38; dichloromethane : hexane : ethyl acetate (70 : 10 : 30, v/v/v) until fraction 71, and dichloromethane : ethyl acetate : methanol (60 : 20 : 20, v/v/v) until the last fractions.

Fraction 16-38 (0.07 g) was submitted to a flash column on silica gel 60 using initially dichloromethane : hexane (80 : 20, v/v), followed by pure dichloromethane and increasing the polarity by the use of 20% of ethyl acetate to obtain the last fractions. This procedure furnished 25 subfractions of  $\pm$  30 mL, which were analyzed by TLC and pooled together. Subfraction 11-15 (0.025 g) showed a very

concentrated violet spot on TLC analysis. Subfraction 16-25 (0.03 g) was crystallized with methanol, resulting in a white and inodorous solid compound which has a chromatographic behavior similar to  $\beta$ -sitosterol, as verified by comparison with standard by TLC. The samples were submitted to NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  analysis, as well as to GC-MS analysis.

### ***Liquid Chromatographic conditions***

The lupeol and  $\beta$ -amyryn analysis was carried out under isocratic conditions using a  $\text{C}_{18}$  column (4.6 mm x 250 mm), packed with 5  $\mu\text{m}$  diameter particles. The mobile phase was methanol and the flow rate,  $0.7 \text{ mLmin}^{-1}$  (Yan, Zhong, Wei, & Deng, 2008). Detections were done at 210 nm and the injection volume was 40  $\mu\text{L}$  for both compounds. The chromatographic analysis for  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol was performed at 210 nm, under isocratic conditions using a C-8 column (4.6 mm x 150 mm) packed with particles of 5  $\mu\text{m}$  diameter. The mobile phase was methanol : water (95 : 5, v/v) containing 1.0% acetic acid, according to Nair, Kanfer, & Hoogmartens (2006), with minor modifications. The flow rate and volume of injection were  $1.0 \text{ mLmin}^{-1}$  and 20  $\mu\text{L}$ , respectively. The mobile phases were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter and degassed in ultrasonic bath. Identification of  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol and  $\beta$ -amyryn was achieved by comparing retention times and UV/DAD spectra with those of standards. All chromatographic operations were performed at room temperature and in triplicate.

### ***Preparation of the standard solutions and samples for quantification***

Standard solutions of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol were prepared in mobile phase, at concentrations from 0.3 to  $2.4 \text{ mgmL}^{-1}$ , lupeol standard at concentrations from 0.75 to  $1.5 \text{ mgmL}^{-1}$ , and  $\beta$ -amyryn from 0.1 to  $0.3 \text{ mgmL}^{-1}$ . The dichloromethane fraction was dissolved in mobile phase for each analysis. Each concentration was injected three times and the calibration curve was obtained by linear regression.

### ***Radical-Scavenging Activity – DPPH Assay***

The antioxidant activity was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to a slightly modified method previously described (Choi et al., 2002). Six different ethanol dilutions of fraction at 250, 125,

62.5, 31.25, 15.62 and 7.81  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution. After 30 minutes, the readings were made at 518 nm. The DPPH quenching ability was expressed as  $\text{IC}_{50}$ . A solution of DPPH (1 mL; 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and ascorbic acid, in the same concentrations used for the fraction, provided the positive control. The test was performed in triplicate.

### ***Evaluation of antifungal activity***

The dichloromethane fraction was assessed for inhibition of the following microorganisms: *Candida albicans* ATCC 44373, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28952, *Aspergillus flavus* ATCC 2384, *Sporothrix schenckii* (clinical isolate), and *Fusarium proliferatum* (clinical isolate).

The minimal inhibit concentration (MIC) against the tested microorganisms was determined by the broth microdilution method M27-A2 (NCCLS 2002). The experiments were repeated twice and the results were determined as an average value. Seven different dilutions of fraction (2000, 1000, 625, 500, 250, 125 and 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were prepared in DMSO. Microorganisms were inoculated into potato dextrose agar and MIC was determinate. The MIC endpoint was considered as the lowest concentration of the fraction inhibiting the total growth of microorganisms and detected by lack of visual turbidity (matching the negative growth control). Standard antibiotics fluconazole and amphotericin B were used to control the sensitivity of the tested microorganisms.

### **References**

- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., & Kim, S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163, 1161-1168.
- Nair, V.D.P., Kanfer, I., & Hoogmartens, J. (2006). Determination of stigmasterol, beta- sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using

high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis*, 41, 731– 737.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard, document M27-A2 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: document M7-A5, Wayne, PA.

Yan, Z.J, Zhong, Z.L., Wei, S.L., & Deng G.H. (2008) Determination of stigmasterol,  $\beta$ - sitosterol and lupeol in *Phyllanthus urinaria* L by HPLC. *Chemical Research and Application*. Doi:CNKI:SUN:HXYJ.0.2008 10-019.

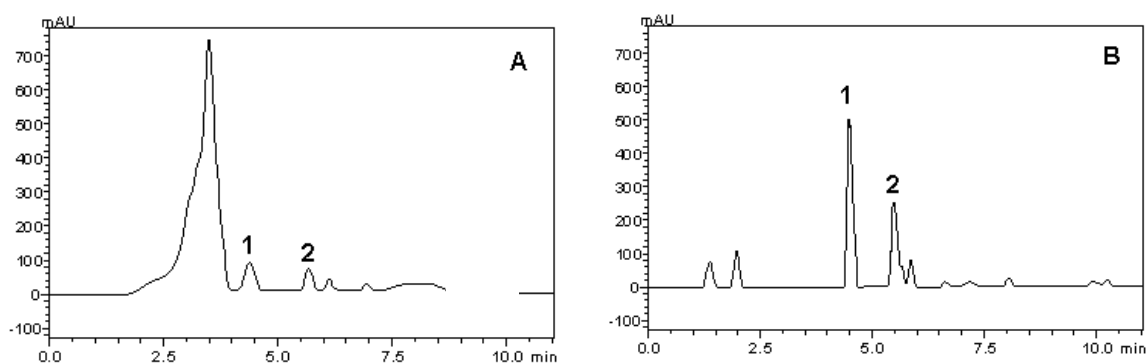


Figure S2. Representative chromatogram of dichloromethane fraction (**A**); LC-UV chromatogram of the isolated lupeol and  $\beta$ -amyrin (**B**). Peaks are identified as: **1** – lupeol and **2** –  $\beta$ -amyrin.

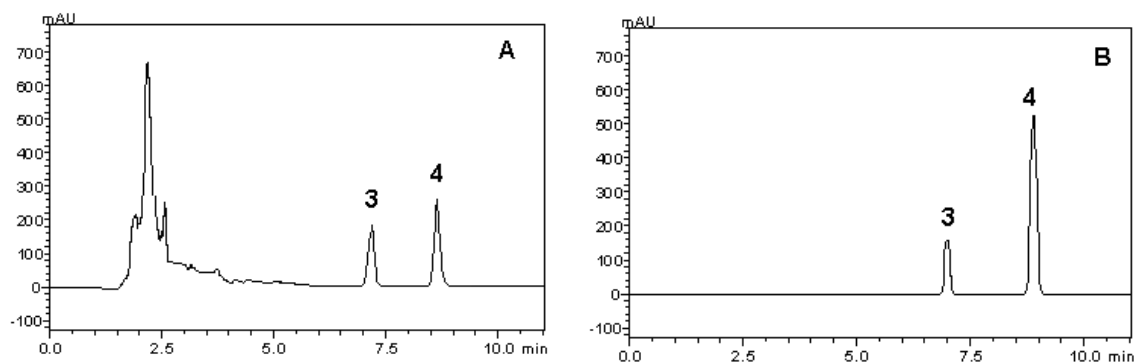


Figure S3. Representative chromatogram of dichloromethane fraction (**A**); LC-UV chromatogram of the isolated  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol (**B**). Peaks are identified as: **3** –  $\beta$ -sitosterol and **4** – stigmasterol.

Table S1. Percentage of lupeol and  $\beta$ -amyrin in mixture **1+2**; percentage of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in mixture **3+4**, percentage and quantification of the four compounds in dichloromethane fraction

Compounds	Quantities					
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction		Mixture 1 + 2		Mixture 3 + 4	
	mg/g	Percentage (%)	mg/g	Percentage (%)	mg/g	Percentage (%)
$\beta$ -sitosterol	58.5 $\pm$ 0.5	5.85	-	-	366.6 $\pm$ 0.12	36.66
stigmasterol	125.2 $\pm$ 0.08	12.52	-	-	61.5 $\pm$ 0.06	61.52
$\beta$ -amyrin	199.8 $\pm$ 0.4	19.98	240.5 $\pm$ 0.7	24.05	-	-
lupeol	282.0 $\pm$ 0.1	28.20	734.7 $\pm$ 0.06	73.47	-	-

**4.3** JANOVIK, V.; BOLIGON, A.A.; CRUZ, R.C.; PEREIRA, R.P.; ROCHA, J.B., ATHAYDE, M.L. Antioxidant activities and HPLC/DAD analysis of phenolics and carotenoids from the barks of *Cariniana domestica* (Mart.) Miers.

Manuscrito submetido ao periódico **Journal of Ethnopharmacology**



**Antioxidant activities and HPLC/DAD analysis of phenolics and carotenoids from the barks of *Cariniana domestica* (Mart.) Miers**

Vanessa Janovik<sup>a</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>, Ritiel Correa da Cruz<sup>a</sup>, Danielle Fontana Pereira<sup>a</sup>, Romaiana Picada Pereira<sup>b</sup>, João Batista Teixeira da Rocha<sup>b</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Phytochemical Research Laboratory, Department de Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil,

<sup>b</sup> Toxicological Biochemistry Research Laboratory, Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

\*Correspondence: Tel.: +55 55 3220 9618, Fax: +55 55 3220 8248

E-mail address: [margareth@smail.ufsm.br](mailto:margareth@smail.ufsm.br) (M. L. Athayde)

Postal address: Department de Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

## Abstract

*Ethnopharmacological relevance:* The species *Cariniana domestica* belongs to Lecythidaceae and is popularly known as Jequitibá. There are no reports considering biological studies on this species, although the bark infusion is popularly used in folk Brazilian's medicine as antimicrobial and anti-inflammatory remedies.

*Aim of the study:* To evaluate the antioxidant activities from different bark extracts using DPPH and TBARS assays, as well as identify and quantify phenolic compounds and carotenoids by means of HPLC/DAD.

*Materials and methods:* The plasma lipid peroxidation (TBARS assay) was induced with iron sulfate in male Wistar rats and the radical scavenging activity was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Folin-Ciocalteu was used to determine the phenolic content. Carotenoids and phenolics were identified by DAD, and HPLC analysis was carried out using isocratic and gradient systems, respectively.

*Results:* The barks of *C. domestica* demonstrated good antioxidant activity, being ethyl acetate the most active fraction. TBARS assay varied from  $11.11 \pm 0.85$  to  $44.5 \pm 2.31$ , and DPPH from  $6.5 \pm 0.81$  to  $19.5 \pm 1.32$   $\mu\text{g/mL}$ . The phenolic content ranged from  $54.6 \pm 0.33$  to  $309.3 \pm 2.73$ . Beta-carotene ( $3.73\% \pm 1.02$ ) was found in dichloromethane fraction. Several phenolic compounds were identified in ethyl acetate fraction, being caffeic acid the most abundant compound ( $50.81\% \pm 0.64$ ).

*Conclusion:* Results obtained indicated that *C. domestica* exhibits great antioxidant properties, which may prevent diseases caused by the overproduction of free radicals and also it might be used as a potential source of natural antioxidant agents, confirming, at least in part, its popular uses.

*Keywords:* *Cariniana*, triterpenes, polyphenols, carotenoids, TBARS, DPPH, HPLC/DAD

## 1. Introduction

In recent years, great interest in finding natural antioxidants from plant materials has been considered. Numerous crude extracts and pure natural compounds from plants were reported to have antioxidant and radical-scavenging

activities (Barla et al., 2007). Intensive research has been carried out either to characterize the antioxidant properties of extracts from several plant materials and/or to isolate and identify the compounds responsible for those activities (Kintzios et al., 2010). Often, antioxidant activities of herbal extracts are determined against different free radical species, such as the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) the bleaching rate of which is monitored at a characteristic wavelength in the presence of the sample extract (Kusar et al., 2006).

Oxidative stress is defined as the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide, superoxide anion or hydroxyl radical, and the ability of enzymatic and non-enzymatic biological systems to protect against their injury. As a consequence of oxidative stress, oxidation of proteins, lipids and DNA can occur that leads to cell degeneration and even cell death. Different therapeutic strategies have been proposed for the prevention and treatment of ROS-mediated diseases, with special emphasis on antioxidant therapy. (Paz et al., 2010).

The World Health Organization (WHO) estimates that 65–80% of the population of the developing countries depends on medicinal plants for basic pharmaceutical care (WHO, 1998). Accordingly, the WHO has been stimulating studies involving medicinal plants, with the aim of evaluating the potential benefits of using them. There is still a lack of knowledge of the clinical efficacy and safe use of many of these remedies. Brazil has a great diversity of plants, which increases the chances of identification of substances with pharmacological activities. Moreover, plants are known to offer excellent perspectives for the discovery of new therapeutic products (Boligon et al., 2009).

Recent researches suggest that a wide variety of phytochemicals, such as phenolics and carotenoids, are able to prevent or slow down oxidative stress-induced damage leading to cancer (Alesiani et al. 2009). Some studies indicate that dietary polyphenols have a protective effect against coronary heart disease (Engler and Engler, 2006), cancer (Fang et al., 2002) and neurodegenerative diseases (Lau et al., 2005).

Besides phenolic compounds, some findings suggest that also phytosterols and triterpenes, groups of chemicals largely found in a variety of vegetables, may be responsible, at least in part, for preventive effects on the development of diseases

caused by EROs (Tapiero et al., 2003). Effectiveness of compounds such as  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, and campesterol in the inhibition process of lipid peroxidation have been established (Yoshida and Niki, 2003; Conforti et al., 2008).

Moreover, carotenoids like lycopene and  $\beta$ -carotene have very well known antioxidant activity. Reports have confirmed that lower incidence of age-related chronic diseases is associated to the consumption of carotene-rich vegetables (Sanguetha, 2009). Lycopene exerts potent anti-inflammatory effects through its action as an antioxidant and free radical scavenger, which may reduce cellular damage (Pennathur et al., 2010), while  $\beta$ -carotene, besides it is a known quencher of ROS and singlet oxygen in particular, is also widely applied in photoprotective compounds (Eicker et al., 2003).

*Cariniana domestica* belongs to Lecythidaceae and is popularly known in Brazil as jequitibá-roxo. Lecythidaceae is composed of 10 genera and 230 species, being a dominant group in neotropical forests and an important element of Central and South America biodiversity (Tsou and Mori, 2007). The genus *Cariniana* consists of small to very large trees, and there are few reports in the literature concerning to chemical constituents and ethnopharmacological uses of *Cariniana spp.*, although the bark infusion of these species is commonly used as antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial remedies (Neto and Morais, 2003; Silva et al., 2009, Lima et al., 2002). Preliminary phytochemical investigations of our group concerning the barks of *C. domestica* indicated the presence of a large number of triterpenoids and phenolic compounds. This feature allied to the importance of the oxidative stress in the pathogenesis of various diseases led us to better evaluate the antioxidant potential of this plant. Simultaneously, phytochemical analysis led to the isolation, identification and quantification of two mixtures of triterpenoids, previously published (Janovik et al., 2011) as well as the identification of several phenolic compounds, besides lycopene and  $\beta$ -carotene and its HPLC/DAD analysis.

## **2. Methods**

### *2.1. Chemicals, apparatus and general procedures*

Silica Gel 60, Silica Gel 60 F<sub>254</sub> for coated plates, solvents for the extractions, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, methanol and *n*-butanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

(DPPH), quercetin, rutin, kaempferol, gallic, chlorogenic and caffeic acids standards were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).  $\beta$ -carotene (>95%) and lycopene were acquired from SIGMA-ALDRICH. Folin-Ciocalteu was acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Silica Gel Merck 70-230 mesh was used for column chromatography. High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU-20A5 with integrator CBM-20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and software LC Solution 1.22 SP1.

## 2.2. Plant collection and extractions

The barks of *C. domestica* were collected in Tangará da Serra - Mato Grosso do Sul, Brazil, in March of 2008. Exsiccate was archived as voucher specimen in the herbarium of Department of Pharmacology at UFSM (SMDB 11818).

Plant material was dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder was macerated with ethanol 70% (v/v). After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure. This procedure was repeated twice and the extracts were combined. The remained aqueous extract obtained was partitioned with solvents in increasing polarity: dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. At the end of all extractions procedures, each extract was evaporated under reduced pressure to obtain the dried fractions. Crude extract was obtained by evaporating the ethanolic extract until dryness.

## 2.3. Radical-Scavenging Activity – DPPH Assay

The antioxidant activity of the fractions and the crude extract was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to a slightly modified method previously described by Choi et al. (2002). Spectrophotometric analysis was used to measure the free radical scavenging capacity and to determine the scavenging concentration or inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). The DPPH quenching ability was expressed as IC<sub>50</sub>. Six different ethanol dilutions of each fraction and crude extracts at 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.81  $\mu$ g/mL were mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution. After 30 minutes, the readings were made in spectrophotometer (Shimadzu-UV-1201) at 518

nm, where the radical DPPH show the maximum absorption. A solution of DPPH (1 mL; 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and ascorbic acid in the same concentrations used for the fractions and the crude extracts provide the positive control. Ethanol was used to calibrate the spectrophotometer. The test was performed in triplicate and the calculation of the antioxidant activity followed the equation:

$$\% \text{inhibition} = 100 - \frac{[(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100]}{\text{Abs}_{\text{control}}}$$

Where:  $\text{Abs}_{\text{sample}}$  is absorbance of each fraction;  $\text{Abs}_{\text{blank}}$  is absorbance of fractions without adding the DPPH;  $\text{Abs}_{\text{control}}$  is absorbance of ethanol solution in DPPH.

The percentage of inhibition was calculated and a graphic of percentage of inhibition versus concentration was constructed. Correlation coefficients were optimised (Tsimogiannis et al., 2006).

#### *2.4. Determination of total phenolics*

The determination of total phenolic contents was performed by the Folin-Ciocalteu method (Chandra and Mejjia, 2004). Briefly, 0.5 mL of 2N Folin-Ciocalteu reagent was added to a 1 mL of each sample (0.15 mg/mL) and this mixture was allowed to stand for 5 min before the addition of 2 ml of 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . The solution was then allowed to stand for 10 minutes before reading at 730 nm. The total phenolic content was expressed in milligrams equivalents of pyrogallol acid (PGAE) per gram of each fraction. The equation obtained for the calibration curve of pyrogallol acid in the range of 0.005 to 0.030 mg/mL was  $y = 34.443x - 0.0942$  ( $r = 0.9984$ ).

#### *2.5 In vitro Fe(II)-induced lipid peroxidation in rats' brain*

Male Wistar rats weighing 270-320g and with age from 3 to 3.5 months, from our own breeding colony were kept in cages of 3 or 4 animals each, with continuous access to food and water in a room with controlled temperature ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. The animals were maintained and in

accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA).

Rats were decapitated under mild ether anesthesia, and the encephalic tissue was rapidly dissected and placed on ice. Tissues were immediately homogenized in cold 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 4000 x g to yield a pellet that was discarded and a low-speed supernatant (S1) was used for the TBARS assay (Puntel et al., 2007).

After centrifugation, an aliquot of 100  $\mu$ L of S1 was incubated for 1 h at 37°C with pro-oxidants agent (10  $\mu$ M of Iron Sulfate) in presence or absence of plant extracts and then used for TBARS determination. The concentration range of each tested extract is shown in Table 3. TBARS production was determined as described by Puntel et al., (2007).

### *2.6 HPLC-DAD qualitative and quantitative analysis of polyphenols*

Reverse phase chromatography analysis were carried out with a Phenomenex C<sub>18</sub> column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5  $\mu$ m diameter particles, volume injection was 40  $\mu$ L and the gradient elution was conducted according to the Evaristo and Leitão (2001) method slightly modified. The UV absorption spectra of the standards as well as the samples were recorded in the range of 230-400 nm.

Stock solutions of standards were prepared in methanol in the range of 0.0025-0.045 mg/mL. Quantification was carried out by the integration of the peaks using external standard method, considering the 254 nm for gallic acid, 327 nm for chlorogenic and caffeic acids and 365 nm for the three flavonoids (quercetin, rutin and kaempferol). All the samples and standards solutions as well as the mobile phase were degassed and filtered through 0.45  $\mu$ m membrane filter (Millipore). The chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

### *2.7 Quantification of $\beta$ -carotene and identification of lycopene by HPLC*

Standard solutions of  $\beta$ -carotene were prepared in mobile phase, at concentrations from 0.2 to 0.6 mg/mL. The dichloromethane fraction was dissolved in mobile phase. Each concentration was injected three times and the calibration curve was obtained by linear regression.

The  $\beta$ -carotene analysis was carried out under isocratic conditions using a  $C_8$  column (4.6 mm x 250 mm), packed with 5  $\mu$ m diameter particles. The mobile phase was acetonitrile:methanol:ethyl acetate with 1% of acetic acid (88:8:4, v/v/v) and the flow rate, 0.8 mL/min. Detections were done at 453 nm and the injection volume was 60  $\mu$ L. Identification of  $\beta$ -carotene was achieved by comparing retention time and UV/DAD spectra with those of standard. All chromatographic operations were performed at room temperature and in triplicate.

### 2.8 Statistical analysis

Data from the TBARS assay were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range tests when appropriated using the statistical software SPSS 10.0 for Windows. TBARS graphics were constructed using the Slide Write 4.032 Bit Edition program. Statistical p values were calculated to quantify levels of significance for each treatment type. A significant p value ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , or  $p < 0.001$  when appropriate) means that there exists significant difference between the two sets of data being analyzed. Correlation coefficient ( $r$ ) to determine the relationship between two variables and the standard deviations in the DPPH and total phenolics assays were calculated from the data obtained from three separate experiments using MS Excel for Windows.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Phenolic contents and free radical scavenging activities (DPPH)

Antioxidant profile of crude extract and fractions of stem bark is shown in Figure 1. Total phenolic contents (TP) assayed by the method of Folin-Ciocalteu expressed in milligrams equivalent of pyrogalllic acid (PGAE) per gram of each fraction and  $IC_{50}$  determinations by the DPPH method are given in Table 1. The DPPH assay is used as a tool to the *in vitro* evaluation of extracts and fractions and its results can indicate the presence of antioxidant compounds in plant extracts. DPPH solutions show a strong absorption band at 518 nm appearing as a deep violet color. In the presence of an active radical scavenger, the absorption vanishes and the resulting decolourization is stoichiometric at a selected range with respect to the degree of reduction. The remaining DPPH, measured after a certain time, corresponds inversely to the radical scavenging activity of the antioxidant and the



degree of discoloration indicates the free radical scavenging efficiency of the fractions (Kulisic et al. 2004).

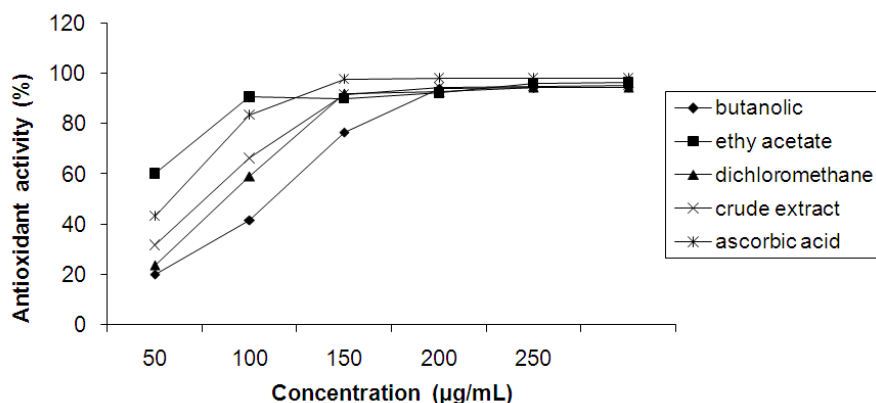


Figure 1. Antioxidant activity of crude extract, dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions from the bark of *C. domestica*.

Table 1. Total phenolic content and antioxidant activity ( $IC_{50}$ /DPPH) for crude extract and fraction of *C. domestica*

Extract / fraction	TP <sup>a</sup> ± S.E. <sup>b</sup> (mg/g)	$IC_{50}$ <sup>c</sup> ± S.E. (µg/mL)	$IC_{50}$ <sup>d</sup> ± S.E. (µg/mL)
Crude extract	268 ± 3.26	12.3 ± 1.15	18.1 ± 2.02
Dichloromethane	54.6 ± 0.33	16.4 ± 0.35	44.5 ± 2.31
Ethyl acetate	309.3 ± 2.73	6.5 ± 0.81	11.11 ± 0.85
<i>n</i> -butanol	132.2.0 ± 1.96	19.5 ± 1.32	15.2 ± 1.14
Ascorbic acid	-	9.0 ± 0.79	-

<sup>a</sup> TP = total phenolic expressed as pyrogallol acid equivalents (mg/g fraction ± S.E.); <sup>b</sup> S.E.= Standard error; <sup>c</sup> =  $IC_{50}$  (µg/mL) values for inhibition by fractions and crude extract of DPPH oxidation capacity; <sup>d</sup> =  $IC_{50}$  (µg/mL) values for inhibition by fractions and crude extract of TBARS production induced by Fe (II) in brain preparations.

The quantitative determination of the polyphenolic content of *C. domestica* used Folin-Ciocalteu as the main reagent and pyrogallol acid as reference. In order, the phenolic contents obtained were ethyl acetate fraction > crude extract > butanolic fraction > dichloromethane fraction. Investigations of qualitative composition of plant

extracts revealed the presence of high concentrations of phenolics in the extracts obtained using polar solvents (Canadanovic et al., 2008).

Comparing the content of polyphenolic and antioxidant activity ( $IC_{50}$ ), we can correlate the phenolic content of ethyl acetate fraction and its lower  $IC_{50}$ . This relationship of phenolic content and polarity is well documented (Chandra & Meija, 2004, Tung et al., 2007). Contradictorily, recent work has suggested that not always the relation phenolic content – antioxidant activity can be established (Conforti et al., 2009).

Butanolic fraction exhibited larger phenolic content than dichloromethane fraction, but its  $IC_{50}$  was higher. The structure of the phenolic groups and possible changes in hydroxyl, by glycosylation as an example, cause a decrease in antioxidant activity, due to the reduction in the number of hydroxyls and the steric hindrance that sugar gives, difficulting the connection to the free radical (Cho et al., 2003). There are also compounds that react strongly with the DPPH, and others that have a mechanism for slower reaction (Tsimogiannis and Oreopoulos, 2006).

Dichloromethane fraction expressed good  $IC_{50}$  value ( $16.4 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$ ) and the lowest phenolic content. Probably the carotenoids and phytosterols/triterpenes identified in this fraction can play a role in antioxidant capacity.

### 3.2 Inhibition of lipid peroxidation (TBARS assay)

Several studies have focused in the use of natural therapeutic antioxidant compounds that can afford protection in a variety of *in vitro* and *in vivo* models of human pathologies, including neurotoxicity models (Bastianetto and Quirion, 2002). In TBARS assay, free Fe (II) can induce neurotoxicity via stimulation of the Fenton reaction and its levels are increased in some degenerative disease (Bostanci and Bagirici, 2008). In this study, ethyl acetate fraction presented the best value of  $IC_{50}$  ( $11.11 \pm 0.85 \mu\text{g/mL}$ ), followed by butanol fraction ( $15.2 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$ ), crude extract ( $18.1 \pm 2.02 \mu\text{g/mL}$ ) (Figure 2). Dichloromethane expressed the lowest inhibition ( $44.5 \pm 2.31 \mu\text{g/mL}$ ). The results have shown a positive correlation between HPLC/DAD analysis, in which all tested phenolic compounds were identified and quantified in ethyl acetate fraction. We can assume that phenolic compounds are closely related to inhibition of lipid peroxidation.

Additionally, the four substances previously isolated and quantified from *C. domestica* ( $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol and  $\beta$ -amyrin) were also tested. A previous work developed by Prasad et al. (2007), evaluated the TBARS levels in mice tissues, to which it was previously administrated lupeol and the results indicate that lupeol was found to protect mice tissues. However, we cannot establish a relationship since in our study, lupeol was not administrated *in vivo*. Previously to that, Geetha et al., (1998) evaluated the effects of triterpenes in induced arthritis in rats, and the authors could observe an inhibition of lipid peroxidation by lupeol. In this case, the authors also performed a previous treatment. Mora et al., (2006) investigated the influence of incorporating phytosterols on the UVA-induced formation of lipid-peroxidation products (TBARS) in keratinocytes. The results demonstrated that sitosterol induces a significant decrease ( $-30\%$ ) of TBARS relative to the used control whereas stigmasterol markedly increases lipid peroxidation ( $+70\%$ ).

The results obtained in our study were not satisfactory (Figure 3) and we can reasonably explain it on the basis of the low solubility of these apolar compounds in the reagents commonly used in TBARS assay. Previous work developed by Pereira et al., (2009) evaluated the activity of four flavonoids. Rutin ( $IC_{50} = 28.8 \mu\text{g/mL}$ ), quercitrin ( $12.2 \mu\text{g/mL}$ ) and quercetin ( $1.4 \mu\text{g/mL}$ ) have shown good results. When comparing both results, the ineffectiveness of phytosterols/triterpenes can be related to solubility aspects. Considering the literature data, it seems to be more effective to perform a pre-treatment, like an *in vivo* administration to the animals instead of perform the test with pure compounds.

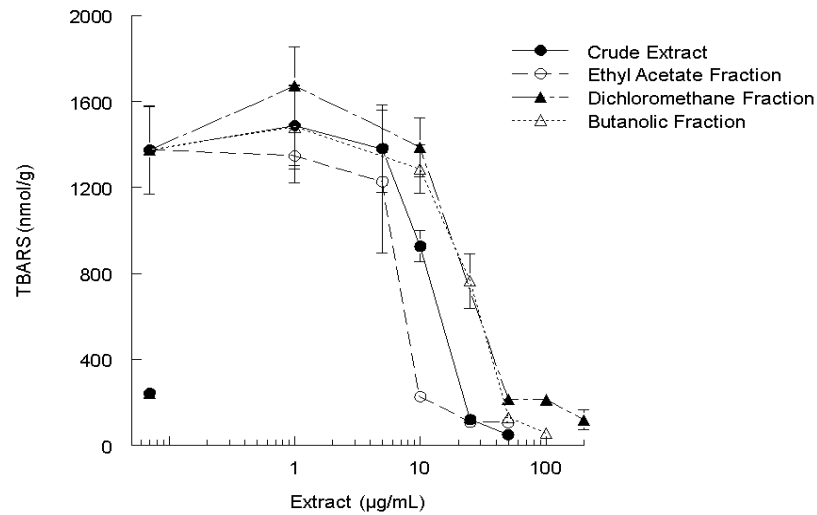


Figure 2. Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane and butanolic fractions from the barks of *C. domestica* on Fe (II) (10  $\mu$ M)-induced TBARS production in brain homogenates. The samples were incubated for 1 h with Fe (II) and the plant extracts or without (basal). Data show means  $\pm$  SEM values average from 3 to 6 independent experiments performed in duplicate.

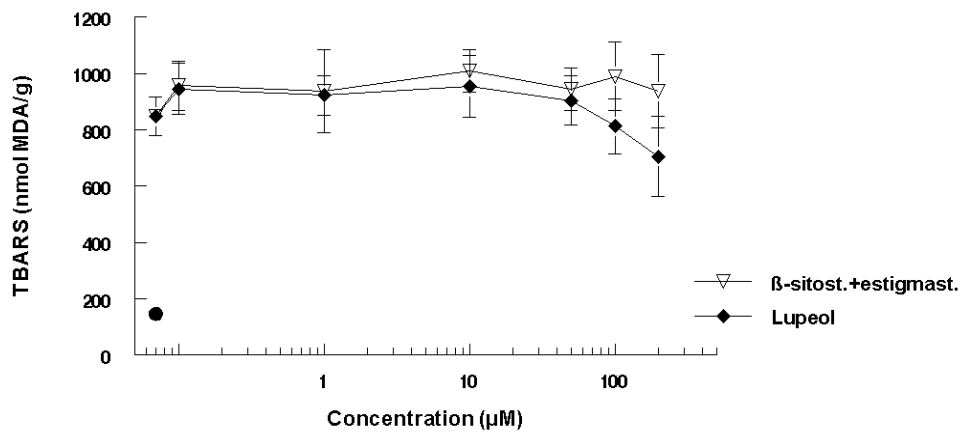


Figure 3. Effects of different concentrations of isolated compounds ( $\beta$ -sitosterol + stigmasterol and lupeol +  $\beta$ -amyryn) from the barks of *C. domestica* on Fe (II) (10  $\mu$ M)-induced TBARS production in brain homogenates. The samples were incubated for 1 h with Fe (II) and the plant extracts or without (basal). Data show means  $\pm$  SEM values average from 3 to 6 independent experiments performed in duplicate.

### 3.3 Isolation and identification of triterpenoid compounds

Phytochemical procedures whose led to the isolation and identifications of the phytosterols  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, and the triterpenes lupeol and  $\beta$ -amyrin, substances for each was performed TBARS analysis, are fully described in a previous work which is accept for publication (Janovik et al., 2011).

### 3.4 HPLC quantification of $\beta$ -carotene

Within only a few years, there has been exponential growth in research to localize carotenoid in plants, understand their metabolism, and try to increase their levels in fruits and vegetables. Different extraction techniques and numerous chromatographic methods to assay carotenoids in plants have been published (Serino et al., 2009). In this work, HPLC/DAD analysis was performed to identify and quantify  $\beta$ -carotene and lycopene in dichloromethane fraction, whose presence was previously confirmed by means of GC/MS. In this work, both compounds were separated using mixture of acetonitrile:methanol:ethyl acetate with 1% of acetic acid (88:8:4, v/v/v). For quantification, a calibration curve was constructed with reference standard  $\beta$ -carotene ( $Y = 44368x - 3707.2$  with  $r = 0.9995$ ). Figure 2 shows a representative chromatogram in which  $\beta$ -carotene (Peak 2, RT = 12.5 min) was found to represent  $3.73\% \pm 1.02$  from whole fraction. Peak 1 was identified as lycopene, although it was not possible to quantify this compound.

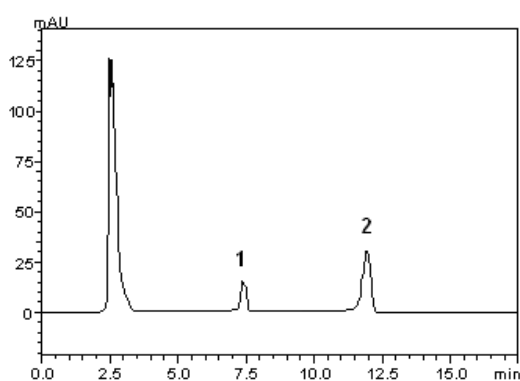


Figure 4. Chromatogram of dichloromethane fraction. Peak 1 (RT = 7.5, lycopene) and Peak 2 (RT = 12.4,  $\beta$ -carotene).

### 3.5 HPLC identification and quantification of phenolic compounds in crude extract and fractions

The crude extract and fractions from *C. domestica* were investigated for the presence of the following polyphenolic compounds: gallic, chlorogenic and caffeic acids, quercetin, rutin, and kaempferol. Identification of the compounds was done by comparison of their retention's time and UV/DAD absorption spectrum with those of the standards.

The results obtained for this HPLC screening (see Figure 5 and Table 2) indicates that ethyl acetate is the fraction which englobes the larger number of phenolic compounds. All searched standards were found to be represented in this fraction constitution. Caffeic acid was found in major quantities, followed by chlorogenic acid and kaempferol.

Table 2. HPLC/DAD of identified and quantified polyphenols in crude extract and fraction of *C. domestica*

Extract/Fraction	mg/g of dried extract or fraction <sup>a</sup>					
	GA	CFA	CLA	RT	QT	KF
<b>Crude extract</b>	3.28±0.12	-	-	0.10±0.31	0.71±0.26	-
<b>Dichloromethane</b>	2.46±0.23	-	-	0.62±0.22	-	-
<b>Ethyl acetate</b>	2.83±1.12	50.81±0.64	5.38±0.12	0.18±0.25	0.96±0.83	4.16±0.54
<b>n-Butanol</b>	-	-	-	0.02±0.41	0.06±0.22	0.34±0.92

<sup>a</sup> Results are expressed as mean (n=3) ± standard deviation

GA = gallic acid; CFA = caffeic acid; CLA = chlorogenic acid; RT = rutin; QT = quercetin; KF = kaempferol

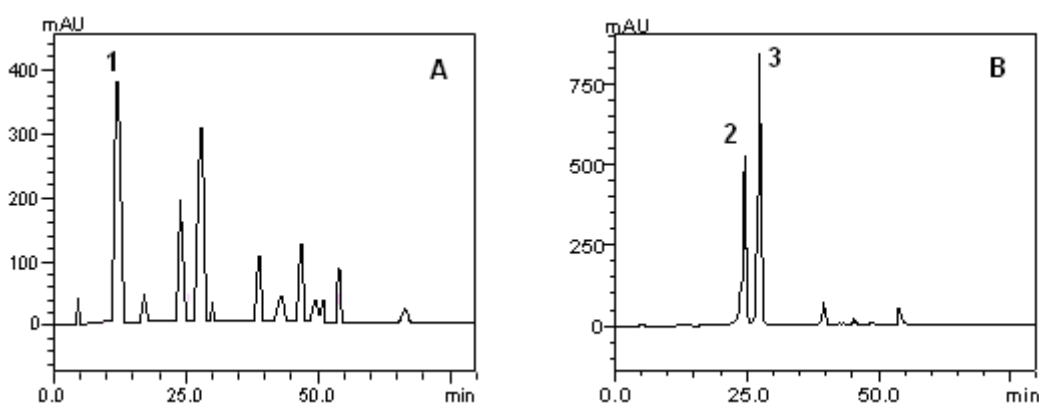
Caffeic acid belongs to hydroxy and polyhydroxy derivatives of cinnamic acid such as coumaric and ferulic acids, and these compounds have been reported as good free radical scavengers (Arrua et al., 2010). Their reactivity against this unpaired electron species is dependent on both the number of phenolic groups present in the molecule and the substitution pattern in the aromatic ring (Chen and Ho, 1997). In a comparative study of the antioxidant and antiradical capacities of a series of polyphenols, caffeic acid was among the most active compounds (Chaillou and Nazareno, 2006). Chlorogenic acid is the esterified form of caffeic acid and it is an also a well-known antioxidant. The presence of both caffeic and chlorogenic acid

in high quantities can be closely related to the lowest values of  $IC_{50}$  obtained for ethyl acetate fraction in DPPH and TBARS assays.

Gallic acid (GA) is a derivative from benzoic acid widely distributed in various plants and foods, and its various biological effects have been reported, such as anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate (Kaur et al., 2009). This compound was majorly identified in crude extract, being also present in dichloromethane and ethyl acetate fraction.

Kaempferol and quercetin are examples of flavonols with a free hydroxyl group at the C-3 position. Some studies suggest that the flavonol C-3 hydroxyl group is responsible for the high antioxidant capacity (Burda and Oleszek, 2001). Kaempferol was found in a good quantity in ethyl acetate fraction and it was also found in butanol fraction. Quercetin was found in little quantities, being the highest quantity present in ethyl acetate fraction.

Rutin (quercetin 3-O-rhamnoglucoside) which is commonly found in plants, upon the hydrolysis of the glycoside bond produces quercetin, a highly antioxidative aglycon. This natural flavonoid is a pharmacologically active phytochemical and natural antioxidant, investigated for its possible role in protection and prevention of pathologies, including Diabetes mellitus (Fernandes et al., 2010). In our study, rutin was the only compound which was found in all fractions and in crude extract, even though the quantities were low.



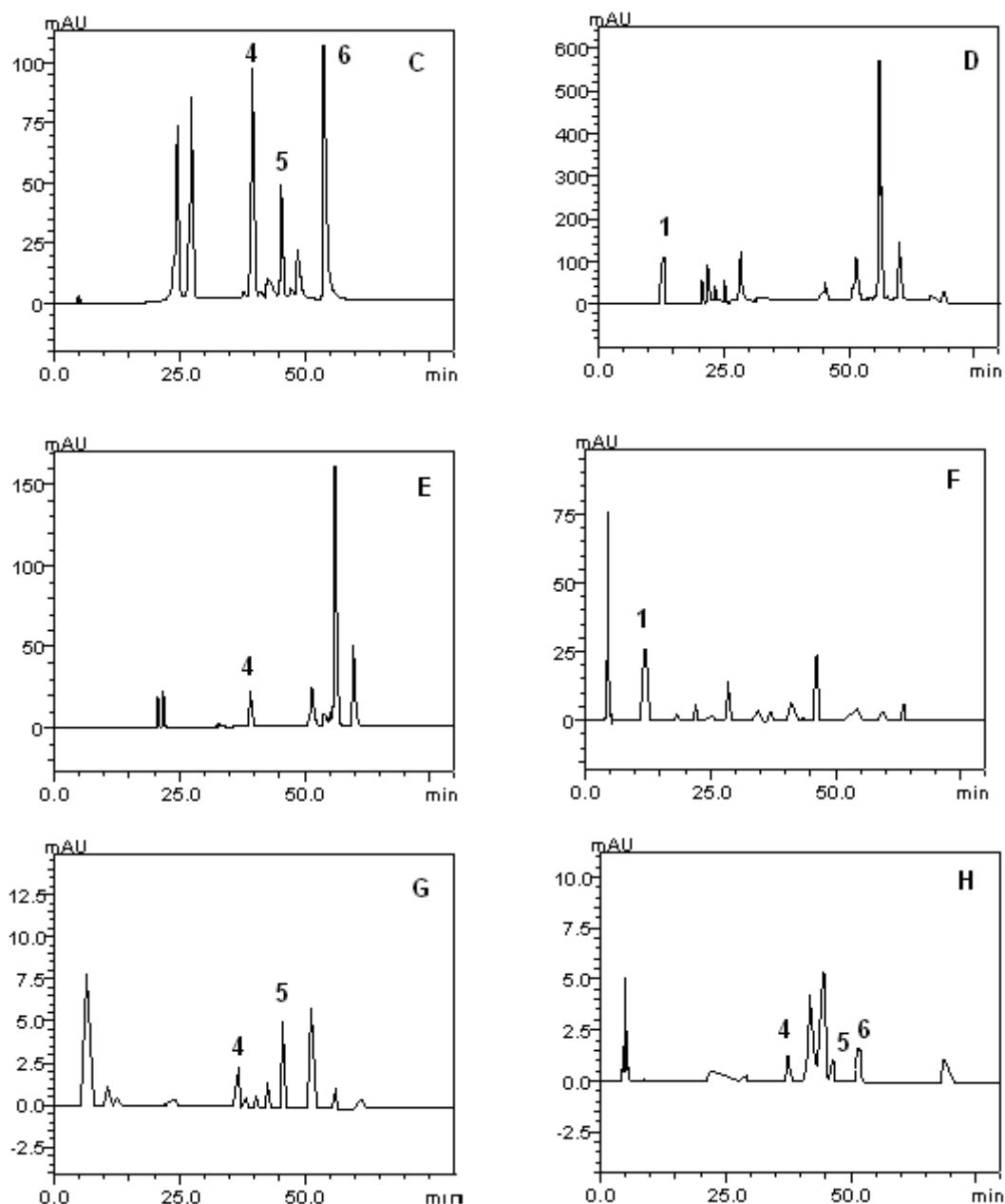


Figure 5. HPLC/DAD chromatograms obtained for polyphenols screening. A= ethyl acetate, 254 nm; B = ethyl acetate, 327 nm; C = ethyl acetate, 365 nm; D = dichloromethane, 254 nm; E = dichloromethane, 365 nm; F = crude extract, 254 nm; G = crude extract, 365 nm; H = n-butanol, 365 nm. Peaks: 1 = gallic acid; 2 = caffeic acid; 3; chlorogenic acid; 4 = rutin; 5 = quercetin; 6 = kaempferol

#### 4. Conclusion

In this study, we could establish a positive correlation between phenolic compounds and antioxidant activity with ethyl acetate fraction, which shed a light on



the positive relation, as seen that it presented the highest phenolic content and the lowest IC<sub>50</sub>- DPPH and TBARS assays. Butanolic fraction expressed a good amount of phenolics, while the IC<sub>50</sub>-DPPH was inferior of ethyl acetate fraction. This behavior can be due to the common glycosylated compounds extracted with this fraction. Dichloromethane fraction ranged the lowest phenolic content and a good activity in DPPH assay. HPLC/DAD analysis detected lycopene and  $\beta$ -carotene, which can be responsible for this good activity. As expected, the mixtures of phytosterols/triterpenes were ineffective to inhibit lipid peroxidation. HPLC/DAD analysis performed with *C. domestica* revealed the presence of important bioactive phenolic acids and flavonoids. Ethyl acetate fraction exhibited all tested compounds, being caffeic acid the most abundant.

The results furnished support to assume that *C. domestica* achieves antioxidant properties, which may be related to its popular uses. Considering the absence of scientific literature related to this species, this work is a contribution to the knowledge concerning the genus *Cariniana* and reports biological activity for *C. domestica* for the first time.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank D. F. Pereira for bringing the plant from Mato Grosso do Sul, to the Department of Chemistry, for providing the TBARS analysis and to CAPES-Br, for financial support.

### **References**

- Alesiani, D., Canini, A., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., Mastellone, C., Monaco, P., Pacifico, S., 2009. Antioxidant and antiproliferative activities of phytochemicals from Quince (*Cydonia vulgaris*) peels . Food Chemistry 118, 199-207.
- Arrua, D., Strumia, M.C., Nazareno, M.A., 2010. Immobilization of caffeic acid on a polypropylene film: synthesis and antioxidant properties. Journal of Agriculture and Food Chemistry 58, 9228–9234.
- Barla, A., Öztürk, M., Kültür, S., Öksüz, S., 2007. Screening of antioxidant activity of three Euphorbia species from Turkey. Fitoterapia 78, 423-425.

- Bastianetto, S., Quirion, S., 2002. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiology of Aging* 23, 891–897.
- Boligon, A. A., Pereira, R. P., Feltrin, A. C., Machado, M. M., Janovik, V., Rocha, J.B. T., Athayde, M. L., 2009. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology* 100, 6592-6598.
- Bostanci, M.O., Bagirici, F., 2008. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron induced neurotoxicity. *Brain Research Bulletin* 76, 57–62.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49, 2774-2779.
- Canadanovic, B.J., Cetkovic, G., Dilas S., Tumbas, V., Bogdanovic, G., Mandic, A., Markov, S., Cvetkovic, D., Canadanovic, V., 2008. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *Journal of Medicinal Food* 11, 133-143.
- Chaillou, L., Nazareno, M., 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 8397–8402.
- Chandra, S., Mejia, E.G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green teas (*Camellia sinensis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 3583-3589.
- Chen, J.H.; Ho, C.T., 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45, 2374–2378.
- Cho, E. J., Yokozawa, T., Rhyu, D. Y., Kim, S. C., Shibahara N., Park, J. C., 2003. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the DPPH radical. *Phytomedicine* 10, 544-551.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163, 1161-1168.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, M., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., 2009. The protective ability of Mediterranean dietary plants

- against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chemistry* 112, 587–594.
- Eicker, J., Kürten, V., Wild, S., Riss, G., Goralczyk, R., Krutmann, J., Berneburg, M., 2003. Beta-carotene supplementation protects from photoaging-associated mitochondrial DNA mutation. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2, 655–659
- Engler M.B., Engler M.M., 2006. The emerging role of flavonoid rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutrition Reviews* 64, 109-118.
- Evaristo, I.M., Leitão, M.C., 2001. Identificação e quantificação por DAD-HPLC da fracção fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana*, 9, 135-141.
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G., 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.
- Fernandes, A.H., Novelli, E.L.B., Okoshi, K., Okoshi, M.P., Di Muzio, B.P., Guimarães, J.F.C., Fernandes Jr., A., 2010. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 64, 214–219.
- Geetha, T., Varalakshmi, P., Latha, R.M., 1998. Effect of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark on lipid peroxidation in adjuvant induced arthritis in rats *Pharmacological Research* 37, 191-195.
- Janovik, V., Boligon A.A., Frohlich, J.K., Schwanz, T.G.S, Pozzebon, V. T., Hartz, S.A., Athayde, M.L., 2011. Isolation and chromatographic analysis of bioactive triterpenoids from the bark extract of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Natural Product Research*, *in press*.
- Kaur, M., Velmurugan, B., Rajamanickam, S., Agarwal, R., Agarwal, C., 2009. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharmaceutical Research* 26, 2133-2140.
- Kintzios, S., Papageorgiou, K., Yiakoumettis, I., Baricevic, D. Kusar, A., 2010. Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species

- by traditional and novel biosensory assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53, 773–776.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katanilic, V., Milos, M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* 85, 633-640.
- Kusar, A., Zupancic, M., Sentjurc, D., Baricevi, D., 2006. Free radical scavenging activities of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) measured by electron spin resonance. *Human Experimental Toxicology* 25, 599-604.
- Lau, F.C., Shukitt-Hale, B.J., Joseph, A., 2005. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of Aging* 26, 128-132.
- Lima, E., Filho, P.T.S., Batisda, J., 2002. Saponins from *Cariniana rubra* (Lecythidaceae). *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47, 441-447.
- Mora-Ranjeva, M.P., Charveron, M., Fabre, B., Milon, A., Muller, I., 2006. Incorporation of phytosterols in human keratinocytes consequences on UVA-induced lipid peroxidation and calcium ionophore-induced prostaglandin release. *Chemistry and Physics of Lipids* 141, 216–224.
- Neto, G.G., Morais, R.G., 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de mato grosso: Um estudo bibliográfico. *Acta Botânica Brasileira* 17, 561-584.
- Paz, G.A., Raggio, J., Gómez-Serranillos, M.P., Palomino, O.M., González-Burgos, E., Carretero, M.E., Crespo, A., 2010. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53, 165–171.
- Pennathur, S., Maitra, D., Byun, J., Sliskovic, I., Abdulhamid I., Saed, G.M., Diamond, M.P., Abu-Soud, H.M., 2010. Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 205–213.
- Pereira, R.P., Fachineto, R., Prestes, A.L., Puntel, R.L., Silva, G.N.S., Heinzmann, B.M., Boschetti, T.K., Athayde, M.L., Burger, M.E., Morel, A.F., Morsch, V.M., Rocha, J.B.T., 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical Research* 34, 973–983.

- Prasad, S., Kalra, N., Shukla, Y., 2007. Hepatoprotective effects of lupeol and mango pulp extract of carcinogen induced alteration in Swiss albino mice. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 352 – 359.
- Puntel, R. L., Nogueira, C. W., Rocha, J. B. T., 2005. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain *in vitro*. *Neurochemical Research* 30, 225–235.
- Sangheeta, R.K., Bhaskar, N., Baskaran, B., 2009 Comparative effects of  $\beta$ -carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 331, 59-67.
- Serino, S., Gomez, L., Costagliola, G., Gautier, H., 2009. HPLC assay of tomato carotenoids: validation of a rapid microextraction technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57, 8753–8760.
- Silva Junior, I.F., Cechinel Filho, V., Zacchino, S.A., Lima, J.C.S., Martins, D.T.O., 2009. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19, 242-248.
- Tapiero H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57, 321–325.
- Tsimogiannis, D. I.; Oreopoulou, V., 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3'4'-hydroxyl substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7, 140-146.
- Tsou, C.H., Mori, S.A., 2007. Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: information from combined *ndhF* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 94, 716–36.
- Tung, Y.T., Wu, J.H., Kuo, Y.H., Chang, S.T., 2007. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confuse* bark. *Bioresource Technology* 98, 1120–1123.
- World Health Organization. 1998. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. Geneva, 45

## 5. DISCUSSÃO GERAL

No Brasil, as pesquisas com plantas ainda estão muito centradas no âmbito da Universidade e Institutos de Pesquisa onde se desenvolve basicamente a fitoquímica tradicional. Muito embora já existam vários grupos nacionais envolvidos com a busca de princípios bioativos de plantas, essa pesquisa é fundamentalmente acadêmica. Apesar disso, a academia poderá contribuir de forma decisiva para o descobrimento de novas substâncias bioativas. Considerando-se que um programa de descoberta de novos fármacos é um processo muito longo, complexo e de alto custo; considerando-se ainda que o processo envolve duas etapas distintas a fase de descoberta e a de desenvolvimento e comercialização; não há dúvidas que a competência científica nacional está qualificada para atuar na primeira fase desse processo, com sucesso (MONTARI, BOLZANI, 2001).

A família Lecythidaceae abrange uma ampla variedade de espécies, das quais muito pouco é conhecido de sua composição química e propriedades biológicas. O gênero *Cariniana* apresenta pouquíssimos estudos químicos, e a espécie tratada neste trabalho, *Cariniana domestica*, não possui estudos documentados na literatura até o presente momento. Este fato, aliado ao uso popular das espécies de Jequitibá pela população, motivou o desenvolvimento deste trabalho, visando identificar as principais substâncias presentes na espécie, bem como a realização da avaliação do seu potencial como antioxidante.

Em um primeiro momento, o extrato bruto (EB) e as frações diclorometano (F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etila (F-AcOEt) e butanólica (F-BuOH) foram avaliadas quanto a sua composição química por emprego da técnica simples de cromatografia em camada delgada (CCD). Foram aplicados cerca de 2 µL de cada amostra na placa e a mesma foi eluída com o sistema de solvente diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), na proporção de 5 : 3 : 2 (v / v / v). Após eluição, a placa foi observada em câmara de ultravioleta (UV) e revelada com anisaldeído sulfúrico, com aquecimento a 100°C. Nesta análise prévia, foram observadas numerosas substâncias com características de compostos triterpênicos na F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e substâncias mais polares, com características de compostos fenólicos na F-AcOEt e EB.

Após a análise prévia por CCD, foram realizadas as dosagens de polifenóis totais, flavonóides e taninos no extrato bruto e frações, bem como a avaliação do potencial antioxidante. Para estudo de isolamento e identificação de compostos, foi escolhida a F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

O doseamento de polifenóis foi realizado conforme metodologia descrita por Chandra e Meija (2004), utilizando o reagente de Folin Ciocalteau 2N e ácido pirogálico como substância de referência. A maior concentração de compostos fenólicos encontrada nas cascas de *C. domestica* foi na F-AcOEt,  $309,3 \pm 2,73$ , seguida do EB, o qual apresentou  $268 \pm 3,26$ . Para as frações F-BuOH e F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram obtidos  $132,2 \pm 1,96$  e  $54,6 \pm 0,33$ , respectivamente.

As cascas de *C. domestica* também foram submetidas a um doseamento de flavonóides totais. A análise foi realizada utilizando cloreto de alumínio 2% como reagente, e rutina como substância de referência. A maior concentração de flavonóides totais nas cascas de *C. domestica* foi obtida para a F-BuOH,  $14,18 \pm 0,1$ , seguida da F-AcOEt,  $13,98 \pm 0,09$ . Para o EB foi obtida a concentração de  $13,69 \pm 0,05$ , e para a F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $12,0 \pm 0,12$ . As cascas de *C. domestica* foram ainda avaliadas quanto ao teor de taninos condensados, segundo método da vanilina modificado. A maior concentração de taninos condensados foi encontrada na F-BuOH,  $149,7 \pm 0,22$ , seguido do EB,  $138,2 \pm 1,85$ . As concentrações obtidas para as frações F-AcOEt e F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram  $131 \pm 0,03$  e  $136,3 \pm 0,05$ .

Existe atualmente uma ampla variedade de métodos de análise capazes de avaliar capacidade antioxidante de substâncias presentes alimentos, fluidos biológicos, vegetais, entre outros. São métodos descritos na literatura, que necessitam de equipamentos e técnicas específicas, e que medem a atividade antirradicalar desenvolvida em contato com os radicais: 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido, dentre outros. O resultado da análise depende da especificidade do radical pelos reagentes da reação de cada método (ADOM *et al.*, 2002). A reação com DPPH é um método baseado na estabilização do radical, não necessitando extração. Como apresentado na Figura 5, a reação é determinada segundo mudança de cor de violeta ao amarelo (ZHANG, 1999).

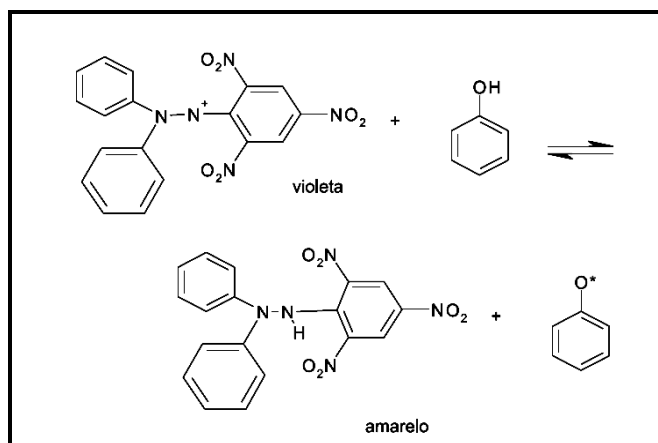


Figura 5 - Reação do DPPH com um composto fenólico  
(Reproduzido de Scotti *et al.*, 2007)

O potencial antioxidante de *C. domestica* foi avaliada pelo método do DPPH, previamente descrito por Choi *et al.*, (2002). Para a análise das cascas de *C. domestica*, a maior capacidade antioxidante observada foi para a F-AcOEt, a qual apresentou  $IC_{50} = 6,5 \pm 0,81$  (concentração necessária para inibir a atividade oxidante em 50%). A capacidade antioxidante da F-AcOEt mostrou-se superior a da substância de referência, o ácido ascórbico ( $IC_{50} = 9,0 \pm 0,79$ ). O EB apresentou  $IC_{50} = 12,3 \pm 1,15$ , seguido da F- $CH_2Cl_2 = 16,4 \pm 0,35$ . A F-BuOH demonstrou a menor atividade ( $IC_{50} = 19,5 \pm 1,32$ ).

Diversos extratos vegetais quando aplicados em modelos animais ou cultura de células neutralizam a reatividade radicalar, diminuindo lesões celulares a proteínas, lipídeos e ácidos graxos. Alguns destes compostos encontrados e extraídos de vegetais são os polifenóis, os flavonóides, os organosulfídeos e os indóis. Os compostos fenólicos formam o maior grupo de antioxidante extraído de vegetais, neutralizando a reatividade radicalar através da doação de um átomo de hidrogênio (F'GUYER *et al.*, 2003; NIKOLIC, 2006).

Os compostos fenólicos são polares e encontram-se nos vegetais sob a forma de polímeros, na qual estão os taninos e as ligninas. Os taninos hidrolisáveis contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliidrico, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. Os taninos condensados, presentes no vinho tinto, são precursores das procianidinas, formando posteriormente dímeros (SOARES, 2002).



O chá verde ou preto extraído da espécie *Camellia sinensis* constitui um extrato vegetal rico em antioxidantes. Existe uma grande variação na sua composição, mas de forma geral apresentam catequinas (epigallocatequina, epigallocatequina-3-galato, epicatequina galato e galocatequina). Em adição, no chá também encontramos flavonóides (quercetina, campferol, myricintina), cafeína, teofilina, alcalóides (teobromina), ácido polifenólicos e ácido gálico (F'GUYER *et al.*, 2003).

Neste estudo foi verificada uma correlação positiva entre o elevado teor de polifenóis e a maior capacidade antioxidante da F-AcOEt, nas análises realizadas com as cascas. Conforme será discutido adiante, a análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) revelou a presença de diversos compostos fenólicos e flavonóides como parte da constituição desta fração. Já a F-BuOH apresentou um teor de polifenóis inferior quando comparado aos valores obtidos para a F-AcOEt e o EB, apresentando também um valor maior de IC<sub>50</sub>. Neste caso foi estabelecida uma relação positiva entre o baixo teor de polifenóis e a menor capacidade antioxidante.

A estrutura dos grupos fenólicos e possíveis alterações nas hidroxilas, como por exemplo, por glicosilação, provocam um decréscimo da atividade antioxidante, devido à redução do número de hidroxilas livres e ao impedimento estérico que o açúcar proporciona, dificultando a ligação do captador ao radical livre (CHO *et al.*, 2003). Também existem compostos que reagem fortemente com o DPPH, e outros que possuem um mecanismo de reação mais lento (TSIMOGIANNIS, OREOPOULOU, 2005). É possível que a F-BuOH obtida das cascas tenha apresentado uma atividade um pouco menor devido a estas razões.

Em comparação aos resultados obtidos com a espécie *C. domestica*, podemos citar outras espécies avaliadas sob as mesmas condições analíticas, como por exemplo a espécie *Ilex paraguariensis*. Em estudo realizado por Schubert *et al.* (2007), a fração acetato de etila apresentou IC<sub>50</sub> = 13,26 µg/mL, e a butanólica, 27,22 µg/mL. As frações acetato de etila e butanólica da espécie *Scutia buxifolia*, popularmente conhecida como coronilha, expressaram os valores de IC<sub>50</sub> = 4,32 e 4,35 µg/mL (BOLIGON *et al.*, 2009).

Na determinação do teor de flavonóides totais realizada para as cascas, os resultados obtidos foram bastante semelhantes para o extrato bruto e frações, tendo

a F-BuOH apresentou um valor ligeiramente maior que as outras amostras, bem como apresentou também o maior valor de taninos condensados.

Adicionalmente ao teste *in vitro* do DPPH realizado para determinar a capacidade antioxidante de *C. domestica*, as cascas foram avaliadas quanto à inibição da peroxidação lipídica pelo método do TBARS. No ensaio do TBARS, o Fe (II), um conhecido pro-oxidante, pode induzir neurotoxicidade via estimulação da reação de Fenton, e seus níveis estão aumentados em algumas doenças degenerativas (BOSTANCI, BAGIRICI, 2008). Alguns estudos têm documentado altos níveis de TBARS em tecidos cancerosos quando comparados com tecidos normais (GUPTA *et al.*, 2004). O cérebro é particularmente sensível a ação dos radicais livres devido ao seu alto consumo de oxigênio e baixa concentração de enzimas antioxidantes. Por esta razão, o tecido encefálico de ratos é comumente utilizado neste ensaio.

Os resultados indicam que as cascas de *C. domestica* diminuíram significativamente os níveis de TBARS no tecido cerebral. As frações F-AcOEt, F-BuOH e EB apresentaram boa atividade, sendo o melhor resultado apresentado pela F-AcOEt. Os resultados obtidos em ordem de melhor atividade foram F-AcOEt ( $IC_{50} = 11.11 \pm 0.850 \mu\text{g/mL}$ ), F-BuOH ( $IC_{50} = 15.2 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$ ), EB ( $IC_{50} = 18,1 \pm 2,02 \mu\text{g/mL}$ ) e F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( $IC_{50} = 44,5 \pm 2,31 \mu\text{g/mL}$ ). Neste ensaio também foi observada uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante e alto teor de polifenóis encontrado para a F-AcOEt.

As duas misturas isoladas da F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (lupeol +  $\beta$ -amirina;  $\beta$ -sitosterol + estigmasterol) também foram submetidas ao ensaio do TBARS para investigar seu potencial antioxidante. Alguns autores já relataram resultados positivos envolvendo ensaios de peroxidação lipídica com compostos triterpênicos (PRASAD, *et al.*, 2007; GEETHA, *et al.*, 1998), entretanto, as substâncias foram administradas *in vivo* para posterior realização da análise, o que parece ser a metodologia mais adequada, levando em consideração a grande apolaridade desta classe de compostos, o que dificulta a solubilização nos reagentes polares utilizados no ensaio. Desta forma, as duas misturas não inibiram significativamente os níveis de TBARS, provavelmente devido a questão da polaridade.

Os bons resultados obtidos na avaliação da capacidade antioxidante, principalmente para a fração F-AcOEt, motivaram a realização da análise por CLAE,

com o objetivo de identificar e quantificar os principais compostos fenólicos que possam ser os responsáveis pela boa atividade. Para a realização da análise cromatográfica, foi utilizado método de gradiente de eluição. O EB e as frações foram investigadas quanto à presença dos seguintes compostos fenólicos: ácido gálico, ácido clorogênico, e ácido caféico; e dos flavonóides: quercetina, rutina e campferol (Figura 6). A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção com aqueles dos padrões.

Os resultados obtidos demonstraram que todas as substâncias testadas estão presentes na constituição da F-AcOEt das cascas. A substância encontrada em maior concentração ( $50,81\% \pm 0,64$ ) foi o ácido caféico ( $t_R = 27,42$  min), seguido do ácido clorogênico ( $5,38\% \pm 0,12$ ,  $t_R = 24,65$  min), campferol ( $4,16\% \pm 0,54$ ,  $t_R = 53,75$  min). Em menores quantidades, foram identificados ácido gálico ( $2,83\% \pm 1,12$ ,  $t_R = 13,9$ ), quercetina ( $0,96\% \pm 0,83$ ,  $t_R = 48,57$ ) e rutina ( $0,18\% \pm 0,25$ ,  $t_R = 37,84$ ). A presença destes compostos parece estar estreitamente relacionada com a boa capacidade antioxidante demonstrada por esta fração. Para a F-BuOH foram encontrados os três flavonóides testados, porém as concentrações destes compostos foram baixas: rutina ( $0,02\% \pm 0,41$ ,  $t_R = 37,51$  min), quercetina ( $0,06\% \pm 0,22$ ,  $t_R = 47,24$  min) e campferol ( $0,34\% \pm 0,92$ ,  $t_R = 53,9$  min). No EB, foram identificados o ácido gálico ( $3,28\% \pm 0,12$ ,  $t_R = 14,0$  min), rutina ( $0,10\% \pm 0,31$ ,  $t_R = 37,93$ ) e quercetina ( $0,71\% \pm 0,26$ ,  $t_R = 47,3$  min). Para a F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram identificados ácido gálico ( $2,46\% \pm 0,23$ ,  $t_R = 13,0$ ) e rutina ( $0,62\% \pm 0,22$ ).

A maior classe de compostos fenólicos é composta pelos ácidos hidroxicinâmicos, encontrados na maioria das plantas. O maior representante dos ácidos hidroxicinâmicos é o ácido caféico, que ocorre principalmente na forma esterificada com o ácido quínico, formando o ácido clorogênico (OLTHOF *et al.*, 2000). O café é a maior fonte de ácido clorogênico na dieta humana, sendo que a ingestão diária de café fornece entre 0,5 – 1 g do composto. O ácido clorogênico e o ácido caféico são antioxidantes *in vitro* e podem inibir a formação de mutações e a carcinogênese, visto que inibem a reação de N-nitrosação *in vitro* (KONO *et al.*, 1995), além de inibirem danos ao DNA (KASAI *et al.*, 2000; SHIBATA *et al.*, 1999). A associação entre o consumo de café e a baixa incidência de câncer de cólon em alguns estudos epidemiológicos (GIOVANNUCI, 1998; FAVERA *et al.*, 1998) pode ser explicada em parte, pela presença destes ácidos.

O ácido gálico, derivado do ácido benzóico também é um ácido fenólico já reportado como captador de radicais, inclusive o DPPH (FUKOMOTO, MAZZA, 2000). Um estudo evidenciou também atividade antioxidante no pH estomacal GUNCKEL *et al.*, 1998).

Os flavonóides consistem em um grupo de substâncias fenólicas de baixo peso molecular, sendo que seus efeitos benéficos para a saúde já eram conhecidos antes de estes compostos serem isolados efetivamente. Um dos efeitos mais importantes dos flavonóides é a captação de radicais livres. Experimentos *in vitro* também demonstram atividades antiinflamatória, antialérgica, antiviral e anticarcinogênica (AHERNE, O'BRIEN, 2002; NIJVELDT *et al.*, 2001). Sob o ponto de vista químico, são compostos formados por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromado unido a anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono C6-C3-C6. São subdivididos, sucintamente, como segue: flavonol, flavona, catequina, flavana, flavanona, antocianidina e isoflavonóide. Neste estudo foram identificados três flavonóis: rutina, quercetina e campferol.

A rutina, flavonóide da classe dos flavonóis, é empregada como potente antioxidante, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar (BRUNETON, 1991; NISHIKAWA *et al.*, 2007). Quercetina e campferol são flavonóis amplamente distribuídos pelo reino vegetal - apresentam significativa ação anti-inflamatória, que pode ser atribuída à inibição das enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase e inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação enzimática (YOON, BAEK, 2002).

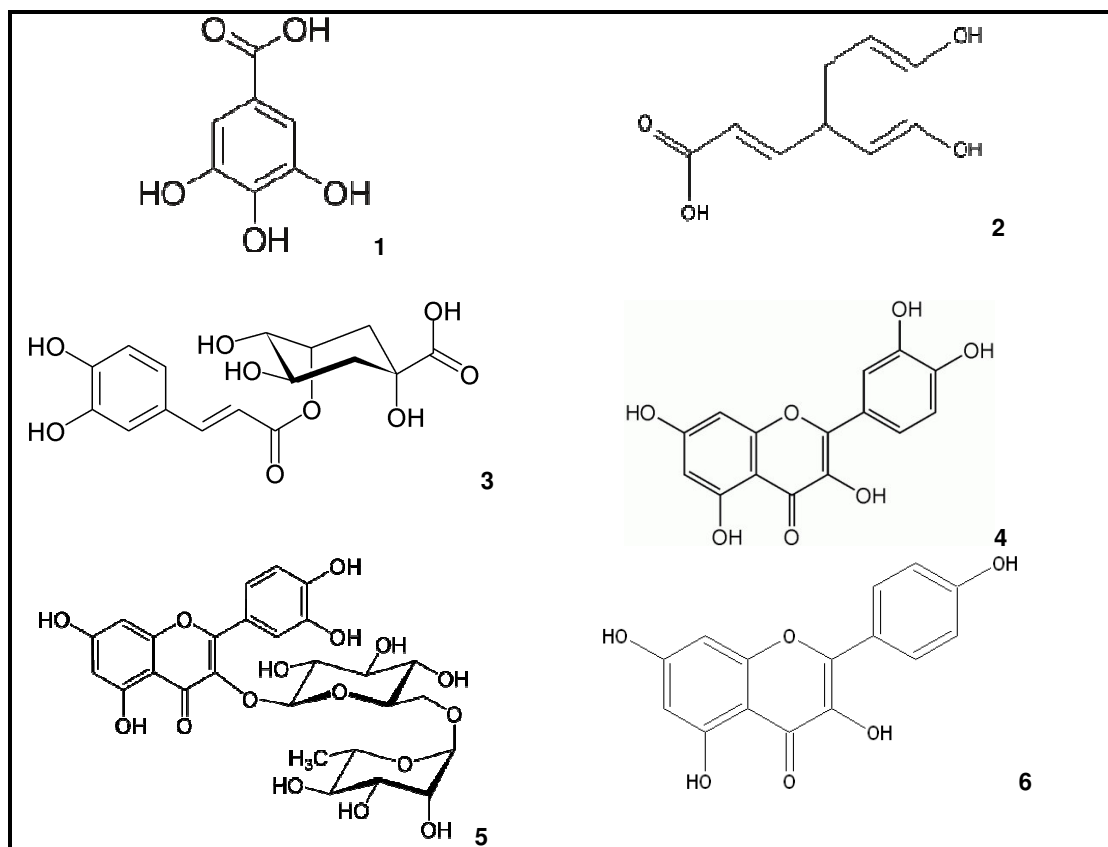


Figura 6 - Compostos fenólicos identificados por CLAE nas cascas e folhas de *C. domestica*. 1 = ácido gálico; 2 = ácido caféico; 3 = ácido clorogênico; 4 = quercetina; 5 = rutina; 6 = campferol.

Os resultados obtidos em análise por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG/MS) sugeriram a presença de  $\beta$ -caroteno e licopeno na F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Desta forma, foi realizada análise em CLAE para identificação e quantificação. O licopeno foi apenas identificado com base do tempo de retenção (tR = 7,5 min.), devido à escassez de padrão de referência. Para a análise do  $\beta$ -caroteno foi construída uma curva de calibração ( $Y = 44368x - 3307,2$ ) e os resultados foram comparados com o tempo de retenção (tR = 12,4 min). Esta substância foi encontrada em proporção de 3,73%  $\pm$  1,02. A análise também foi realizada com a F-AcOEt das cascas, porém os compostos não foram detectados nesta fração. A presença destes compostos carotenóides podem justificar a boa atividade antioxidante apresentada pela F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

As testes realizados para avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos do DPPH e TBARS, os doseamentos dos teores de polifenóis e

flavonóides, bem como as análises por CLAE de alguns compostos fenólicos e carotenóides originaram dois artigos, sendo um aceito para publicação do periódico Revista Saúde, e outro que se encontra submetido ao periódico Journal of Ethnopharmacology.

Os estudos de isolamento deste trabalho priorizaram a F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como material de partida. A F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi obtida em boa quantidade no processo de extração seqüencial e apresentou um perfil cromatográfico interessante por análise em CCD.

Sucessivos procedimentos de isolamento em coluna cromatográfica realizadas com a F-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> levaram a diversas subfrações de ± 100 mL cada, as quais foram agrupadas de acordo com a similaridade do perfil cromatográfico. A subfração F-16-38 foi submetida a um novo fracionamento em coluna, para obtenção das subfrações F-11-15, a qual originou o isolamento da mistura de lupeol +  $\beta$ -amirina, e a F-16-25, originando o mistura  $\beta$ -sitosterol + estigmasterol (Figura 7).

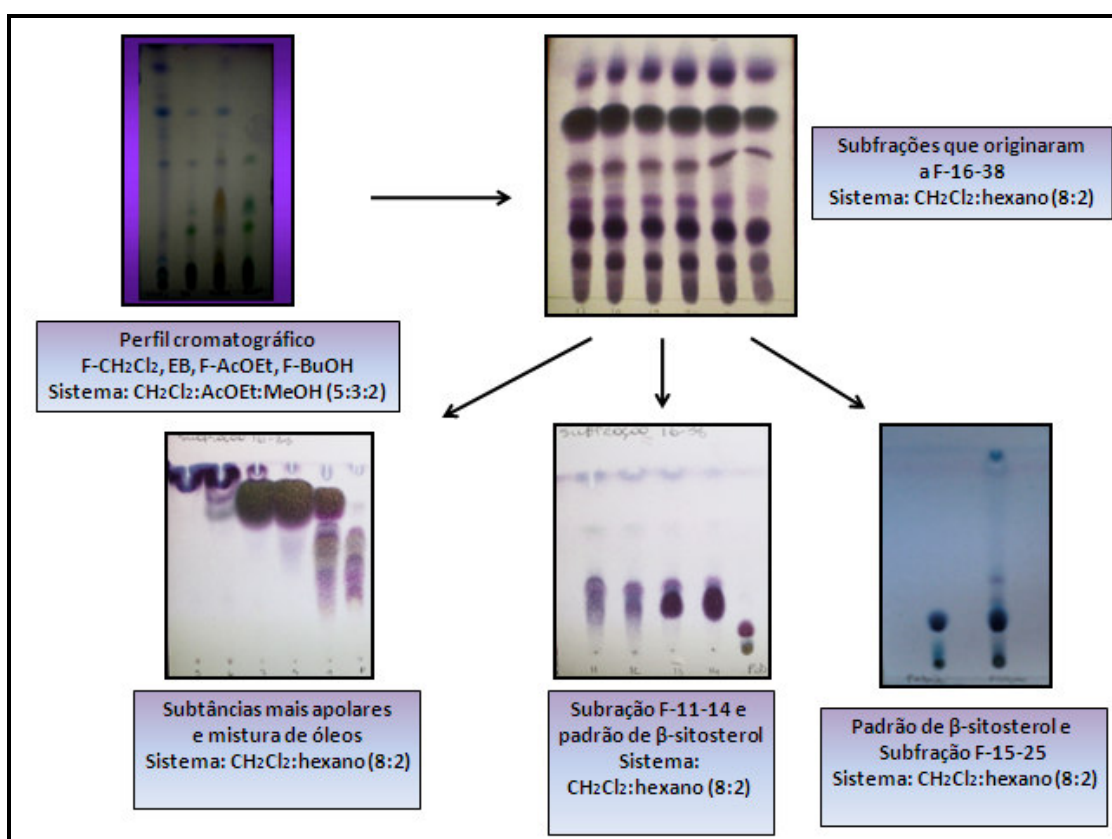


Figura 7 - Esquema ilustrativo do processo de isolamento das misturas de  $\beta$ -sitosterol + estigmasterol e lupeol +  $\beta$ -amirina.

As subfrações F-11-15 e F-16-25 foram submetidas à análise por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , análise por CG/EM e por CLAE.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da F-11-15 mostrou a presença de 60 átomos de carbono, indicando a presença de uma mistura de duas substâncias. Foram identificadas ressonâncias características em 18,4, 109,3 e 150,9 ppm, sugerindo a presença de um grupo isoprenil alocado em C-30, C-29 e C-20, respectivamente, e compatível com o esqueleto de triterpeno pentacíclico lup-20(29)-ene-3-ol (MORITA *et al.*, 2000). No espectro de  $^1\text{H}$  foram observados sinais característicos do grupo isoprenil: dois dubletos em  $\delta$  4,61 e 4,49 ppm, correspondendo aos prótons geminais olefínicos H-29a e H-29b, e um singleto correspondente a metila em  $\delta$  1,60 ppm, alocado em  $\text{CH}_3$ -30. A comparação destes dados de identificação para o composto 1 da mistura bem como os demais sinais foram comparáveis com os sinais descritos para o lupeol, previamente isolado para as folhas de *Vernonia tweediana* (ZANON *et al.*, 2008). Desta forma, o composto 1 foi identificado como lupeol.

Os sinais  $\text{sp}^2$  remanescentes no espectro de da F-11-15 foram identificados em  $\delta$  121,7 e 145,2 ppm, característicos ao núcleo da  $\beta$ -amirina (tipo oleanano), com uma dupla ligação nas posições C-12 e C-13 (ZANON *et al.*, 2008; GONZÁLEZ-LAVAUT *et al.*, 2008). No espectro de  $^1\text{H}$  foram observados sinais característicos em  $\delta$  5,10 ppm para o H-12 (1H, *t*,  $J = 3.5$  Hz) e em  $\delta$  3,13 ppm (1H, *dd*,  $J = 5.0$  e  $11.0$  Hz), atribuído ao próton em C-3. Os dados atribuídos ao composto 2 mostraram-se compatíveis com os sinais obtidos para a  $\beta$ -amirina (GONZÁLEZ-LAVAUT *et al.*, 2008).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da F-16-25 indicou a presença de 58 átomos de carbono, consistindo em uma nova mistura de compostos. Quatro sinais  $\text{sp}^2$  alocados em  $\delta$  121,7, 129,3, 138,1 e 140,8 ppm indicaram a presença de duas duplas ligações. Os sinais em  $\delta$  121,7 e 140,8 são característicos de esteróides com dupla ligação entre C-5 e C-6 (FORGO, KÖVÉR, 2004; DE-EKNANKUL, POTDUANG, 2003), enquanto que os sinais em  $\delta$  129,3 e 138,1 ppm são típicos de triterpenos com dupla ligação entre C-22 e C-23 (FORGO, KÖVÉR, 2004). Os compostos  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -ethyl-cholestan-5-en-3 $\beta$ -ol) e estigmasterol (24 $\alpha$ -ethyl-cholestan-5,22-dien-3 $\beta$ -ol) apresentam uma dupla ligação da mesma posição ( $\Delta^5$ ), fazendo com que os sinais no espectro de RMN coincidam, mostrando-se mais

intensos quando comparados com os outros dois sinais  $sp^2$  ( $\Delta^{22}$ ) que pertencem apenas ao estigmasterol (DE-EKNANKUL, POTDUANG, 2003).

Um intenso singlete em  $\delta$  5,23 ppm no espectro de  $^1H$  é característico de H-6 nos dois compostos e o duplo dubleto em  $\delta$  5,05 e 4,95 ppm pertence aos prótons olefínicos do estigmasterol. Desta forma, a mistura foi elucidada como uma mistura dos compostos  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

As subfrações contendo as substâncias isoladas também foram submetidas à análise por CG/EM. A amostra contendo lupeol +  $\beta$ -amirina apresentou picos intensos em 25,88 e 26,72 min, correspondendo a  $\beta$ -amirina e ao lupeol, respectivamente. O espectro de massas apresentou um sinal em  $m/z$  426, correspondendo ao íon molecular do lupeol. Também foram observados picos oriundos da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder, que é típica de triterpenos pentacíclicos. O espectro da  $\beta$ -amirina mostrou sinal em  $m/z$  203, o que confirma a identidade do composto. Sinais correspondentes a fragmentação Retro-Diels-Alder típica de compostos do tipo oleano e ursano foram observados em  $m/z$  218, 203, 189 (OGUNKOYA, 1981). O espectro de massa da  $\alpha$ -amirina e da  $\beta$ -amirina são muito similares, diferenciando apenas na intensidade de alguns picos, principalmente o pico 203, que é mais intenso na  $\beta$ -amirina (BUDZIKIEWICZI, 1963).

A subfração contendo  $\beta$ -sitosterol + estigmasterol apresentou picos em 24,32 e 25,25 min, correspondendo ao estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, respectivamente. Os picos mais intensos foram observados em  $m/z$  207, 205 e 412 para o estigmasterol, e em  $m/z$  213, 303 e 414 para o  $\beta$ -sitosterol (ZANON *et al.*, 2008).

Os compostos isolados foram ainda submetidos à análise por CLAE para quantificação nas misturas e na  $F-CH_2Cl_2$  obtida das cascas. Resumidamente, na F-11-15 foi obtida uma proporção de 73,47% de lupeol e 24,05% de  $\beta$ -amirina. Para a fração F-16-25 foi observada proporção de 36,66% de  $\beta$ -sitosterol e 61,52% de estigmasterol. Na quantificação dos compostos na  $F-CH_2Cl_2$ , foram observadas as proporções: lupeol (28,20%),  $\beta$ -amirina (19,98%), estigmasterol (12,52%) e  $\beta$ -sitosterol (5,85%). Os procedimentos de isolamento e as análises por métodos espectroscópicos e cromatográficos originaram o artigo que foi aceito para publicação no periódico Natural Product Research.

No anexo desta dissertação encontram-se as demais publicações científicas realizadas a partir do estudo desta espécie.



## 6. CONCLUSÕES

- Da fração diclorometano foram isolados duas misturas de fitoesteróis/triterpenos:  $\beta$ -sitosterol + estigmasterol e lupeol +  $\beta$ -amirina.
- Os compostos isolados foram quantificados por CLAE na fração diclorometano. O composto encontrado em maior quantidade foi o triterpeno lupeol, seguido da  $\beta$ -amirina, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.
- Na fração diclorometano, também foram identificados os carotenóides licopeno e  $\beta$ -caroteno.
- A análise por CLAE do extrato bruto e frações revelou a presença dos compostos: ácido gálico, ácido caféico, ácido clorogênico, rutina, quercetina e campferol. A fração acetato de etila apresentou todos os compostos testados em sua constituição.
- No ensaio realizado com o radical DPPH a fração acetato de etila apresentou a melhor capacidade seqüestradora de radicais livres.
- O ensaio do TBARS demonstrou que as frações e o extrato bruto foram capazes de inibir a peroxidação lipídica, tendo a fração acetato de etila apresentado o melhor resultado.
- Os fitoesteróis e triterpenos isolados não inibiram significativamente o peroxidação lipídica, possivelmente devido à questão da solubilidade dos compostos.
- A fração acetato de etila apresentou o maior teor de polifenóis totais.
- A fração butanólica apresentou o maior teor de taninos condensados e flavonóides totais.
- Este trabalho de pesquisa originou dois artigos científicos os quais estão publicados e/ou aceitos para publicação em revistas científicas especializadas, e um manuscrito que se encontra submetido a um periódico especializado.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOM, K. K; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6182-6187, 2002.

AHERNE, S. A; O'BRIEN, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75– 81, 2002.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1041-1047, 2002.

ANDRADE C. A., et al., Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

BAURIN, N., et al., Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 155-158, 2002.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal – as bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed editora, 2001.

BOLIGON, A. A., et al., Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6592-6598, 2009.

BOSTANCI, M. O.; BAGIRICI, F. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron induced neurotoxicity. **Brain Research Bulletin**, v. 76, p. 57–62, 2008.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia; p. 594, 1991.

BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. **Journal of American Chemical Society**, v. 85, p. 3688–3699, 1963.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, M. G., et al., Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers, **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 740-743, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21 n. 1, p. 99-105, 1997.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green teas (*Camellia sinensis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, p. 491-497, 2005.

CHO, E. J.; YOKOZAVA, T.; RHYU, D. Y.; KIM, S. C.; SHIBAHARA N.; PARK, J. C. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the DPPH radical. **Phytomedicine**, v. 10, p. 544-551, 2003.

COSENDEY, M. A. E., et al., Assistência farmacêutica na atenção básica de saúde: a experiência de três estados brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública** v. 16, p. 171-182, 2000.

DE-EKNANKUL, W.; POTDUANG P. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v. 62, p. 389-398, 2003.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas** in SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, p. 91-104, 1999.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 39–46, 2004.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FAVERA, A., et al., Meal frequency and coffee intake in colon cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 30, p. 182–185, 1998.

FENNER R., et al., Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, Ano IV, n. 2, p. 32-39, 2007.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 19, n. 1, p. 56-72, 2003.

FORGO, P.; KÖVÉR, K. Gradient enhanced selective experiments in the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, v. 69, p. 43-50, 2004.

FRANÇA, S. C. **Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas** in SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, p. 105-124, 1999.

FREISE, F. W. Plantas medicinais brasileiras. **Boletim de Agricultura**, v. 34, p. 252-494, 1933.

FUKOMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3597-3604, 2000.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P.; LATHA, R. M. Effect of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark on lipid peroxidation in adjuvant induced arthritis in rats **Pharmacological Research**, v. 37, n. 3, p. 191-195, 1998.

GIOVANNUCCI, E. Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, p.1043–1052, 1998.

GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A., et al.,. Una entidad química aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de  $\beta$ -Amirina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 85-88, 2008.

GUNCKEL, S., et al., Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. **Chemico-Biological Interactions**, v. 114, p. 45-59, 1998.

GUPTA M., et al., Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, p. 177–184, 2004.

HOSTTETMANN, K.; QUIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. EdUFSCar, 1ª edição, p. 9-36, 2003.

KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 9-13, 1998.

KASAI, H., et al., Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 38, p. 467–471, 2000.

KONO, Y.; SHIBATA, H.; KODAMA, Y.; SAWA, Y. The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. **Biochemical Journal**, v. 312, p. 947–953, 1995.

KUO, R. Y., Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1321–1344, 2009.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. S517-S520, 2003.

MACIEL, M. A. M., et al., Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MATOS, F. J. A.. **Farmácias vivas**. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará, 1998.

MICHILIS, E. Diagnóstico situacional dos serviços de fitoterapia no Estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 14, Supl. 1, p. 16-19, 2004.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORITA, M., et al., Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from *Pisum sativum*. New  $\alpha$ -amirin producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, 3453 -3460, 2000.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira** v. 17, p. 561-584, 2003.

NIKOLIC, K. M. Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 774, n. 1, p. 95-105, 2006.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural product remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 708-712, 1997.

NIJVELDT, R. J., et al., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NISHIKAWA, D. O., et al., Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel-off contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 227-232, 2007.

NOLDIN, V. F., et al., Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

OGAVA, S. E. N., et al., Implantação do programa de fitoterapia "Verde Vida" na secretaria de saúde de Maringá (2000-2003). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 13, Supl.1, p. 58-62, 2003.

OGUNKOYA, L. Application of mass spectroscopy in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, p. 121-126, 1981.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. **Human Nutrition and Metabolism**, p. 66-71, 2000.

PAZ, G. A., et al., HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 165–171, 2010.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 14, supl. 01, p. 40-44, 2004.

PINTO, A. C., et al., Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, v. 4, p. 529, 1969.

PRASAD, S.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Hepatoprotective effects of lupeol and mango pulp extract of carcinogen induced alteration in Swiss albino mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 352 – 359, 2007.

RAMARATHNAM, N., et al., The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Science Technology**, v .6, p. 75-82, 1995.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 439-448, 2001.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**, Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

SCOTTI, L. et al., Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 154-166, 2007.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santafé de Bogotá : D.C. Colômbia, 2000.



SHIBATA, H., et al., Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 1295–1297, 1999.

SCHUBERT, A., et al., Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Pharmazie**, v. 62, p. 876–880, 2007.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, F. S.; SOUSA, F. C. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006

SILVA JUNIOR, I. F., et al., Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 242-248, 2009.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5<sup>a</sup> ed. rev. e ampliada, Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 230-245, 2004.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Nutrition Reviews**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SHIMOMURA, K.; TAKAGI, K.; TADA, T. Skin-lightening cosmetics containing plant extracts. PATENT N° JP 09012441, 1995.

SOUSA, C. M. M., et al., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, A. D. L., et al., Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythydaceae). **Quimica Nova**, v. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3'4'- hydroxyl substituted members. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 7, p. 140-14, 2005.

TSOU, C. H.; MORI, S. A. Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: information from combined *ndhF* and *trnL-F* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 94, p. 716–36, 2007.

VALKO, M., et al., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

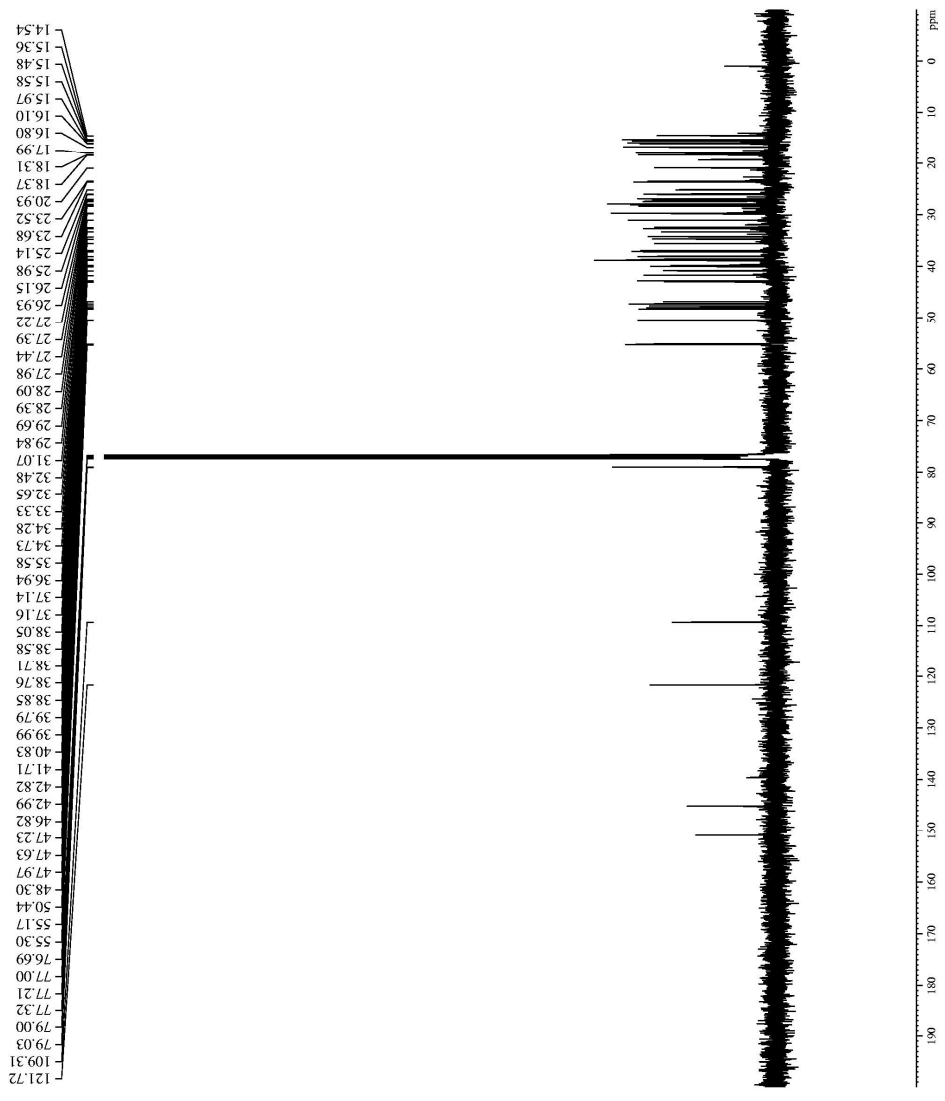
ZANON, R. B., et al., Fitoconstituintes isolados da fração diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 226-229, 2008.

ZHANG, Y. Theoretical methods used in elucidating activity differences of phenolic antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 6, p. 745-748, 1999

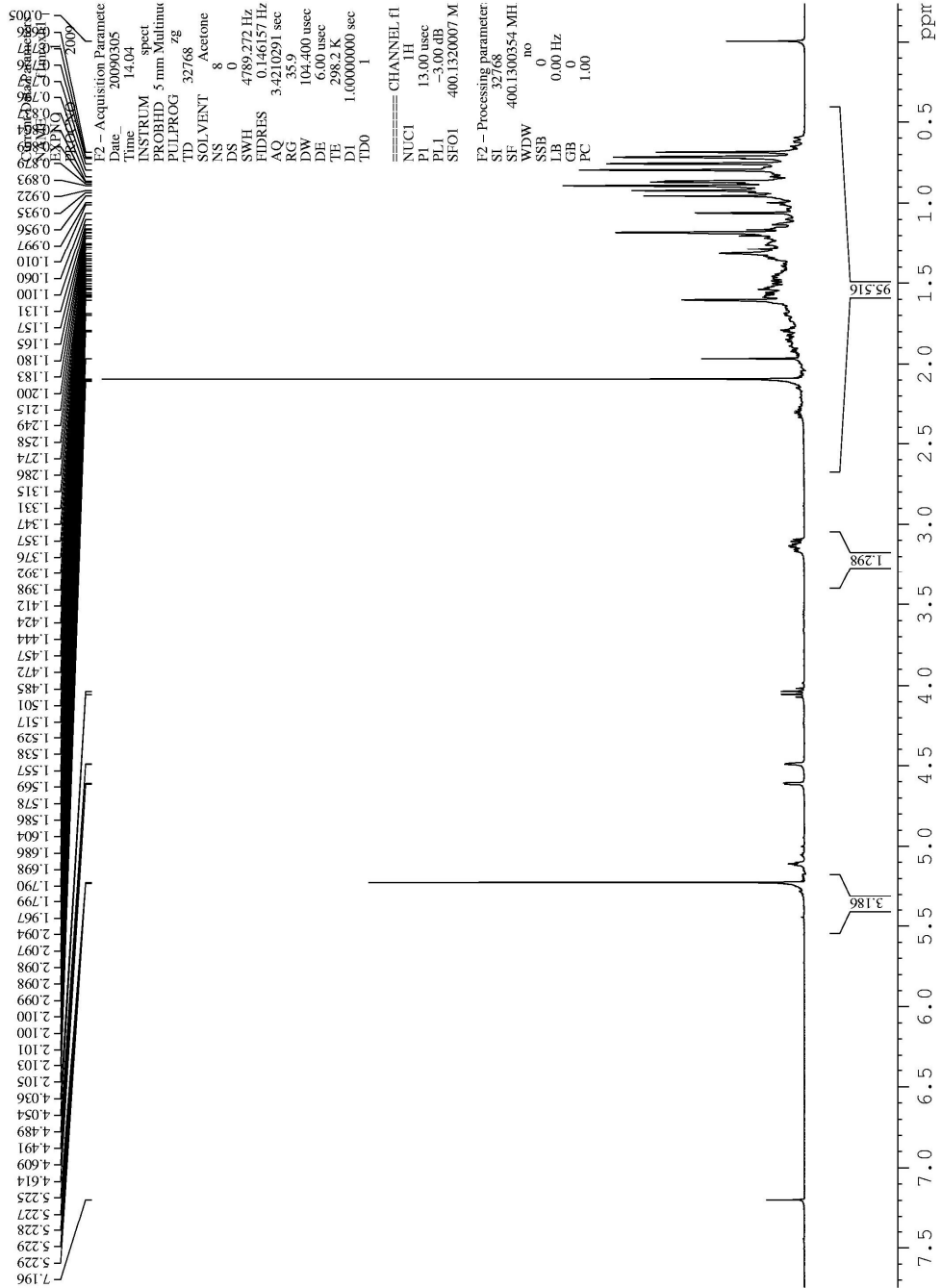
YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 5, pp. 585 - 596, 2005.

# ANEXO 1 – Espectro de <sup>13</sup>C - RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura lupeol + β-amirina

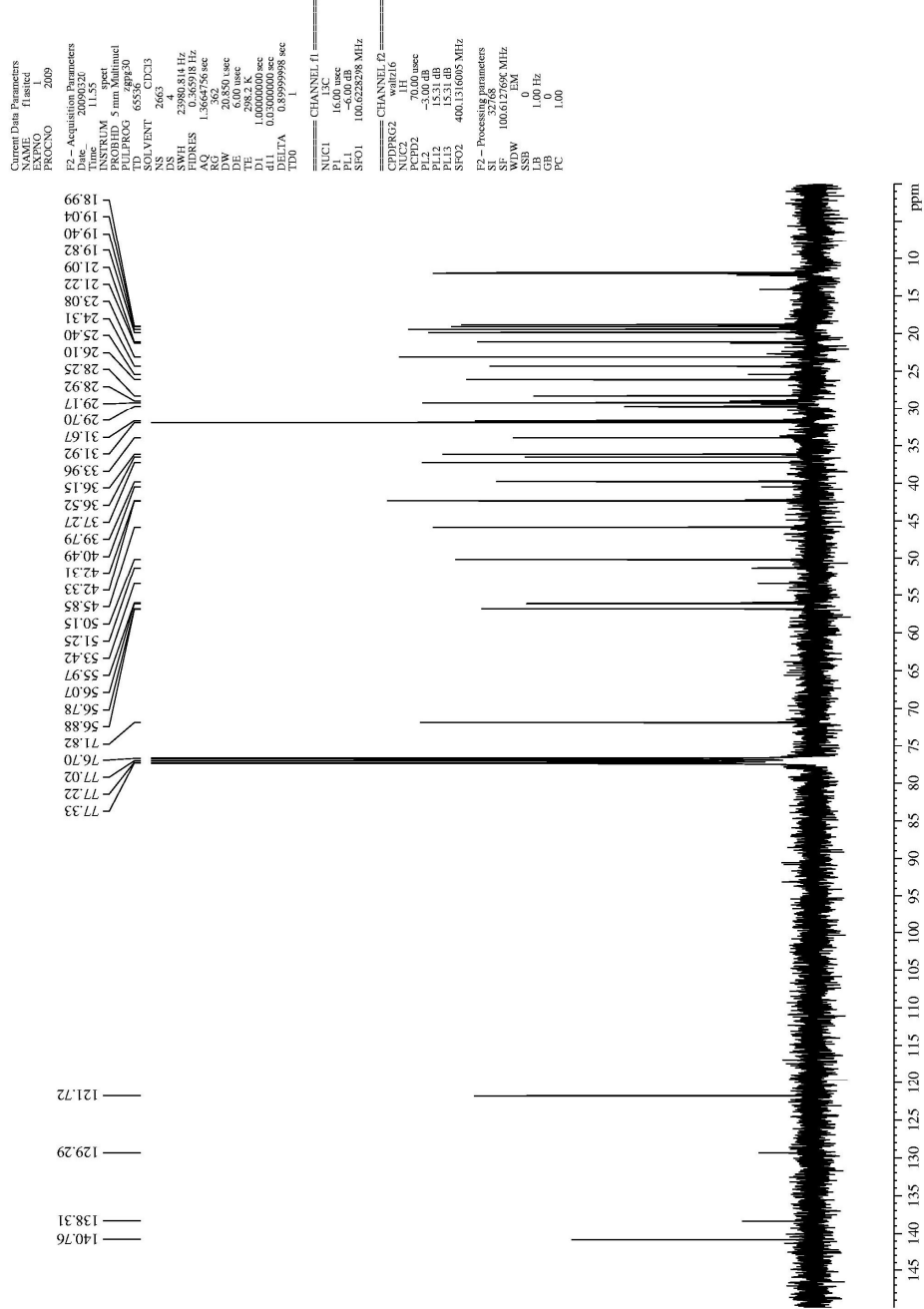
```
Current Data Parameters
=====
EXPNO      1
PROCNO     2009
Date_      20090819
Time       13:01
INSTRUM    spect
PROBHD     5 mm zgpg30
PULPROG    zgpg30
TD         65536
SOLVENT    CDCl3
DS         4
SWH        23980.814 Hz
FDRRES     0.365918 Hz
RG         1.366796 sec
RG2        962
DW         20.850 usec
DE         6.00 usec
DI         20.000000 sec
d11        1.0000000 sec
DELTA     0.89999998 sec
TD0        1
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         15.00 usec
PL1        -3.00 dB
SFO1       100.622298 MHz
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    velvz16
NUC2       1H
PCPD2      80.00 usec
PL2        -3.00 dB
PL12       14.00 dB
PL13       14.00 dB
SFO2       400.1316005 MHz
F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         100.612710 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.00
```



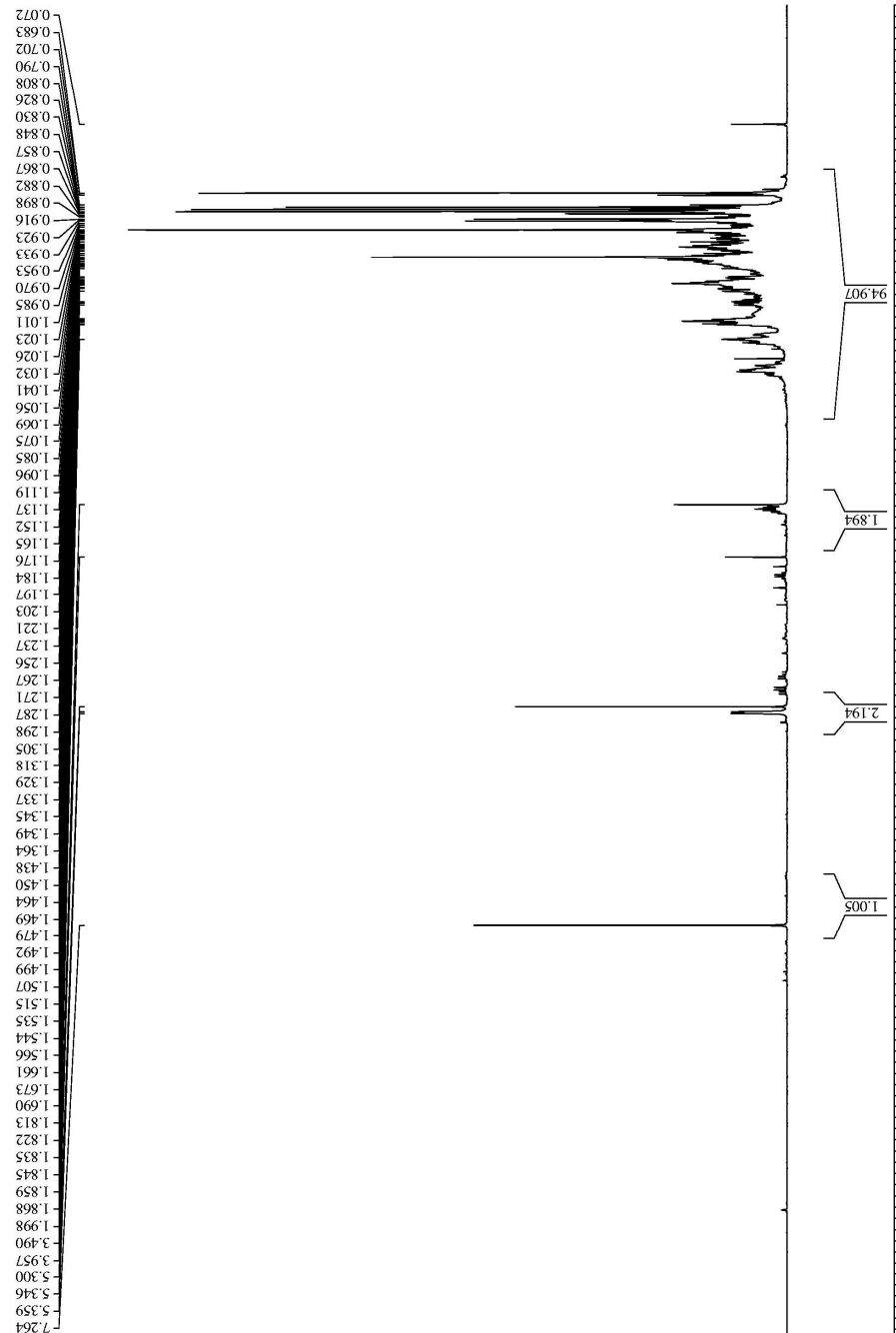
ANEXO 2 - Espectro de <sup>1</sup>H - RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura lupeol + β-amirina



# ANEXO 3 - Espectro de <sup>13</sup>C - RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura estigmasterol + β-sitosterol



**ANEXO 4 - Espectro de  $^1\text{H}$  - RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura estigmasterol +  $\beta$ -sitosterol**



**ANEXO 5 - Certificado de apresentação de trabalho científico no XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana**

**CERTIFICADO**

43

Segurança do paciente  
O farmacêutico faz a diferença.



Realização



Patrocínio Ouro



Patrocínio Bronze



Apóio



Certificamos que o trabalho intitulado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE CARINIANA DOMESTICA (MART) MIERS**

dos autores

VANESSA JANOVIK; ALINE AUGUSTI BOLIGON; JANAÍNA KIELING FROHLICH; AMANDA LUANA FORBRIG FROEDER; ANDRIELI CASSEL FELTRIN; MARGARETH LINDE ATHAYDE

foi apresentado durante o **XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e do XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana**, realizados no período de 26 a 29 de maio de 2010, no Centro de Eventos da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na qualidade de **Pôster**.

Porto Alegre, 29 de maio de 2010

Dr. Jairo de Souza Santos  
Presidente do Evento

Dr. Flávio Thiesen  
Presidente da Comissão Científica

Dr. Eduardo Savio  
Presidente FEAS

Dr. José Manuel Cardenas  
Presidente FEPAPAR

**ANEXO 6 – Certificado de apresentação de trabalho científico no XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana**

**CERTIFICADO**

44

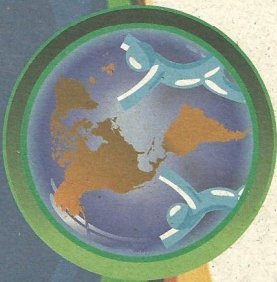
Realização

Patrocínio Ouro

Patrocínio Bronze

Apelo

Segurança do paciente  
O farmacêutico faz a diferença.



Certificamos que o trabalho intitulado

**ISOLATION OF LUPEOL AND  $\beta$ -AMYRIN FROM DICHLOROMETHANE FRACTION OF CARINIANA DOMESTICA (MART) MIERS**

dos autores

**VANESSA JANOVIK; ALINE AUGUSTI BOLIGON; THIAGO SCHWANZ; JANAÍNA KIELING FROHLICH; MARGARETH LINDE ATHAYDE**

foi apresentado durante o **XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e do XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana**, realizados no período de 26 a 29 de maio de 2010, no Centro de Eventos da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na qualidade de **Pôster**.

Porto Alegre, 29 de maio de 2010

Dr. Jairo de Souza Soares  
Presidente do Evento

Dr. Juliano da Rocha  
Presidente Executivo do Evento

Dra. Flávia Thiesen  
Presidente da Comissão Científica

Dr. Eduardo Sivic  
Presidente FEFAS

Dr. José Manuel Carlenás  
Presidente FEPAPAR



**ANEXO 7 – Certificado de apresentação de trabalho científico no XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana**

**CERTIFICADO**

42

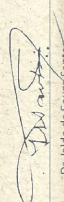
Certificamos que o trabalho intitulado

**DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS NAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE CARINIANA DOMESTICA (MART) MIERS**


dos autores

**VANESSA JANOVIK; ALINE AUGUSTI BOLIGON; JANAÍNA KIELING FROHLICH; AMANDA LUANA FORBRIG FROEDER; MARGARETH LINDE ATHAYDE**


foi apresentado durante o **XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e do XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana**, realizados no período de 26 a 29 de maio de 2010, no Centro de Eventos da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na qualidade de **Pôster**.



Dr. Juliano da Rocha




Dr. Flávia Thielen




Dr. Eduardo Savio

Porto Alegre, 29 de maio de 2010

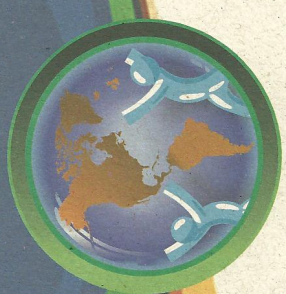


Dr. José Manuel Cardenas

**Realização**



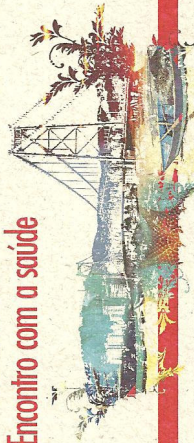
**Segurança do paciente**  
O farmacêutico faz a diferença.



**ANEXO 8 – Certificado de apresentação de trabalho científico no 15º Farmapolis**



**Encontro com a saúde**



# Certificado

**Certificamos que VANESSA JANOVIK; ALINE AUGUSTI BOLIGON; JANAÍNA KIELING FROHLICH; THIELE FACHIM DE BRUM; ROSE VANESSA BANDEIRA; LEANDRO ACUNHA SILVEIRA; MARGARETH LINDE ATHAYDE apresentaram o trabalho científico intitulado QUANTIFICAÇÃO DE  $\beta$ -SITOSTEROL E ESTIGMASTEROL POR HPLC/DAD NA FRAÇÃO DICLOROMETANO DAS CASCAS DE CARINIANA DOMESTICA (MART) MIERS. aprovado no XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos.**

Realizado de 12 a 14 de novembro de 2010 em Florianópolis/SC

*Caroline Junckes da Silva*  
 Caroline Junckes da Silva  
 Presidenta do XV Farmapolis e do SindFar/SC

Realização:



*Horacieta Scllet Müller Tierling*  
 Horacieta Scllet Müller Tierling  
 Presidenta do CRF/SC

*Maria Helena Braga*  
 Maria Helena Braga  
 Presidenta da Abentár



**ANEXO 9 – Certificado de apresentação de trabalho científico no 15º Farmapolis**



**Encontro com a saúde**



# Certificado

**Certificamos que VANESSA JANOVIK; ALINE AUGUSTI BOLIGON; THIAGO GUILHERME SCHWANZ; JANAÍNA KIELING FROHLICH; AMANDA LUANA FORBRIG FROEDER; LEANDRO ACUNHA SILVEIRA; MARGARETH LINDE ATHAYDE apresentaram o trabalho científico intitulado ANÁLISE DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DAS CASCAS DE CARINIANA DOMÉSTICA (MART) MIERS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRO DE MASSAS aprovado no XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos.**

Realizado de 12 a 14 de novembro de 2010 em Florianópolis/SC

*Caroline Junckes da Silva*  
Caroline Junckes da Silva  
Presidenta do XV Farmapolis e do Sindfar/SC





*Horacianna Lealberg*  
Horacianna Salett Muller Tierling  
Presidenta do CRF/SC



*Vanessa Braga*  
Maria Helena Braga  
Presidenta da Abentfar

**ANEXO 10 – Manuscrito submetido ao periódico *Brazilian Journal of Pharmacognosy***

Enc: [Fwd: [RBFAR] Submission Acknowledgement]

De: **Margareth Linde Athayde** (mlathayde@yahoo.com.br)  
Enviada: terça-feira, 15 de fevereiro de 2011 16:30:43  
Para: Vanessa Janovik (v.janovik@hotmail.com)

--- Em **ter, 15/2/11, margareth@smail.ufsm.br <margareth@smail.ufsm.br>** escreveu:

De: margareth@smail.ufsm.br <margareth@smail.ufsm.br>  
Assunto: [Fwd: [RBFAR] Submission Acknowledgement]  
Para: mlathayde@yahoo.com.br  
Data: Terça-feira, 15 de Fevereiro de 2011, 11:29

----- Mensagem Original -----  
Assunto: [RBFAR] Submission Acknowledgement  
De: "Cid AimbirÃ© de Moraes Santos" <[revista@sbfgnosia.org.br](mailto:revista@sbfgnosia.org.br)>  
Data: Ter, Fevereiro 15, 2011 11:24 am  
Para: "\*Margareth Linde Athayde" <[margareth@smail.ufsm.br](mailto:margareth@smail.ufsm.br)>

\*Margareth Linde Athayde:

Thank you for submitting the manuscript, "RBFAR-783 - Identification of triterpenes by GC/MS from the leaves of *Cariniana domestica* (Mart) Miers (Lecythidaceae)" to Revista Brasileira de Farmacognosia. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:  
<http://submission.scielo.br/index.php/rbfar/author/submission/50759>  
Username: margareth\_athayde

If you have any queries, please do not hesitate to contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Cid AimbirÃ© de Moraes Santos  
Revista Brasileira de Farmacognosia

Revista Brasileira de Farmacognosia  
[revista@sbfgnosia.org.br](mailto:revista@sbfgnosia.org.br)  
Tel. FAX + 55 41 3360 4062  
<http://submission.scielo.br/index.php/rbfar>

**ANEXO 11 – Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Ethnopharmacology***

Fwd: [Fwd: Submission Confirmation for your paper]

De: **Margareth Athayde** (margathayde@gmail.com)  
Enviada: quinta-feira, 24 de fevereiro de 2011 0:11:49  
Para: v.janovik@hotmail.com

----- Forwarded message -----

From: <[margareth@smail.ufsm.br](mailto:margareth@smail.ufsm.br)>  
Date: 2011/2/23  
Subject: [Fwd: Submission Confirmation for your paper]  
To: [margathayde@gmail.com](mailto:margathayde@gmail.com)

----- Mensagem Original -----

Assunto: Submission Confirmation for your paper  
De: "Journal of Ethnopharmacology" <[jethnoph@chem.leidenuniv.nl](mailto:jethnoph@chem.leidenuniv.nl)>  
Data: Qua, Fevereiro 23, 2011 6:02 pm  
Para: [marqa@ccs.ufsm.br](mailto:marqa@ccs.ufsm.br)

Dear Dr.Athayde,

Your submission entitled "Antioxidant activities and HPLC/DAD analysis of phenolics and carotenoids from the barks of *Cariniana domestica* (Mart.) Miers" has been received by journal *Journal of Ethnopharmacology*

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.