UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANÁLISE DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE), COM ENSAIOS *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM FOLHAS DE *Smilax fluminensis* Steud. (Smilacacea)

Edith Eunice Arthur Petrica Mestrado em Química, Área de Concentração: Produtos Naturais

CUIABÁ MATO GROSSO – BRASIL 2012

EDITH EUNICE ARTHUR PETRICA

ANÁLISE DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE), COM ENSAIOS *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM FOLHAS DE *Smilax fluminensis* Steud. (Smilacacea)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Química, Área de Concentração: Produtos Naturais.

Orientador: Dr. Adilson Paulo Sinhorin Co-orientadora: Dra. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin

CUIABÁ MATO GROSSO – BRASIL 2012

EDITH EUNICE ARTHUR PETRICA

ANÁLISE DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE), COM ENSAIOS *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM FOLHAS DE *Smilax fluminensis* Steud. (Smilacacea)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Química, Área de Concentração: Produtos Naturais.

APROVADA: 23 de novembro de 2012.
(ABunho')
Prof. Dr. Adilson Paulo Sinhorin (Orientador) UFMT- Campus Sinop- MT
Profa. Da. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin (Co-orientadora) UFMT- Campus Sinop – MT
Profa. Dra. Fernada Rodrigues Garcez
OFMS - Campo Grande - MS
LIEMT- Campus Bondonópolis - MT

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P495a Petrica, Edith Eunice Arthur. Análise de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com ensaios in vitro do Potencial Antioxidante em folhas de Smilax fluminensis Steud. (Smilacacea). / Edith Eunice Arthur Petrica. -- 2012 100 f. : il. color. ; 30 cm.
Orientadora: Dr. Adilson Paulo Sinhorin. Co-orientadora: Dra. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós-Graduação em Química, Cuiabá, 2012. Inclui bibliografia.
1. Flavonoides. 2. Cipó japecanga ou salsaparrilha. 3. Potencial antioxidante. 4. Smilax fluminensis Steud. 5. CLAE e RMN. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pela autora.

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada à fonte.

Aos meus queridos filhos, esposo, pais, irmãos, familiares, professores e amigos, dedico.

000

"Os analfabetos do próximo século não são aqueles que não sabem ler ou escrever, mas aqueles que recusam a aprender, reaprender e voltar a aprender."

Alvin Toffler

000

"O destino não é uma questão de chance, é uma questão de escolha, não é algo para ser esperado, é algo para ser alcançado." Willian Jennings

000

"Os que confiam no Senhor são como os montes de Sião que não se abalam, mas permanecem firmes para sempre."

Salmos 25:1

000

AGRADECIMENTOS

À DEUS fonte eterna presente da minha existência, obrigado pelo dom da vida, da sabedoria e da graça, dando esperanças no desânimo, forças nos obstáculos e fé diante dos conflitos. A quem em sua infinita bondade deu-me a oportunidade e coragem para atingir o objetivo.

Aos meus pais, meus irmãos Arnoldo, Harlei e Ruth, aos cunhados, sobrinhos, tios, avós e a toda minha família, pelo apoio, incentivo, compreensão, carinho e amor incondicionais, que de forma direta ou indireta me auxiliaram a vencer esta grande etapa.

Ao meu esposo em especial, pelo apoio incondicional em todos os momentos... Agradeço pelo seu jeito prático de ser, por me incentivar e não deixar que eu desistisse de lutar pelos meus sonhos, por ser tão forte, dedicado, paciente, compreensivo, sempre com palavras de apoio em todas as circunstâncias, não há palavras para expressar a minha gratidão!

Aos meus filhos: Éder e Hélder, pela renúncia de tantos momentos que poderiam ser vividos juntos, por terem paciência, pelo apoio para que meu sonho pudesse ser realizado, por serem bondosos, dedicados, estudiosos, inteligentes e simplesmente por sonharem em também fazer um mestrado, parabéns meus filhos, vocês são guerreiros, valentes... Isso faz com que o meu esforço tenha valido...

À minha mãe, que foi a chave mestra do meu sucesso, obrigada, apesar de por vezes não compreender minha ausência, decidi lutar, mas valeu a pena... Sou grata ao meu orientador, professor Dr. Adilson Paulo Sinhorin, por ter me aceito e acreditado que pudesse vencer, por sua determinação, bondade, compreensão, disposição, confiança, paciência, ensinamentos, por ser amigo e tão gentil em corrigir. Obrigado pelas sugestões para a confecção deste trabalho, meu sincero respeito e agradecimento.

O meu muito obrigado a minha Co-orientadora, professora Dra. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin, pelo carinho, incentivo, pelos conselhos, palavras de apoio, sempre com um sorriso para iniciar um novo dia, por corrigir meu trabalho com tanta dedicação e ótimas sugestões, por confiar que eu podia realizar este trabalho. Foi um prazer ter sua orientação.

À professora Dra. Virgínia Cláudia da Silva que iniciou a pesquisa como minha co-orientadora, pelo amor, atenção, carinho e pelo apoio no início da minha pesquisa quanto mais precisava de ajuda, estava sempre com uma palavra de apoio. Meu muito obrigado pela sua amizade.

Ao professor Dr. Gerardo Magela Vieira Júnior, pelo incentivo, ensino, ajuda, apoio, por se dispor em levar e fazer algumas das análises de RMN de ¹H e espectrometria de massas, pelo tempo disponibilizado, pelas palavras amigas, de incentivo e encorajamento.

A minha grande amiga, professora Dra. Miriam Machado Cúnico, mais do que professora, amiga, conselheira, incentivadora, exemplo de educadora, por ter acreditado em mim mesmo antes de eu ter ingressado no mestrado: obrigada pelas sugestões e correção dos meus projetos, pelas palavras de carinho, por sua bondade, exemplo, compreensão, amor, disposição, paciência, por sua amizade... Aos meus grandes amigos professores Moisés e Ana Cremonezzi que acompanharam minha vida escolar desde o início e continuam com palavras de apoio e incentivo, grande mestre! Quanta bondade em ensinar, exemplo nobre de ser seguido...

Aos meus professores que contribuíram na construção do meu conhecimento: Edna Moquiute, Moisés e Ana Cremonezi, Vanda Santos Candido, Benildes, Claudio Barroso, Nelson Souza e Neuza Squiavetto de Souza, Dario Pires de Araujo e Lívia Linquist de Araujo, Marli Knönner, Almir Marroni, Gleice e Claudio Cunha, Wilson Staut, Irineu Rosales de Souza, Albino e Miriam Marks, Marcos e Janete Cremonezi, Clea de Souza, Bento, Eunice Albuquerque, Edimar e Miriam Cunico, Claudinei, Maurinda Miotto, sempre os admirei e sabia que podia confiar.

Aos meus professores da graduação, que proporcionaram aprendizado e incentivaram a prosseguir nos estudos, exemplos dignos de serem seguidos, como me orientaram: Irene, Eliana, Edna, Lydia, Saleti, Gladys, Elane, Mariuce, Iramaia, Vinícius, Rinaldi, Demilson, Denilton, Sérgio, Edward (Vavá), Lúrnio, Antônio, Pedrão, meu muito obrigado.

Aos professores do Mestrado de Agricultura Tropical: Francisco A. Lobo, Maria C. M. Amorozo, Viginia H. Azevedo, Maria Cristina Albuquerque, Sebastião C. Guimarães, Carmen E. R. Ortiz, Patrícia Helena Azevedo, Walcylene L. M. P. Scaramuzza, meu muito obrigado pela contribuição da construção do meu conhecimento.

Aos meus professores de Mestrado em Química: Helder L. Teles, Amanda Baviera, Adilson P. Sinhorin, Eliana G. F. Dores, Evandro L. Dall'Oglio, Nair K. Honda, Valeria D. G. Sinhorin, Sebastião Claudino, Marilza Castilho Terezo, Paulo Teixeira, Ailton J. Terezo, Virginia C. Silva, Ricardo Dalla' Villa, Anderson M. Santana, Marcos Soares, Adriano B. Sirqueira, Alexandre Machado, Guillermo Schmeda-Hirshmann, que com carinho, bondade, paciência, se esmeraram para preparar os conteúdos propostos e por transmitirem conteúdos úteis na construção deste trabalho!

E professora Dra. Regina H. P. Andreata pela identificação da planta em estudo, por sua disposição em esclarecer minhas dúvidas.

Ao Carlos Parizzoto do Departamento de Química da UFMT, pela contribuição na confecção dos espectros de RMN.

Ao grande amigo Carlos Cesar Wyrepkowski doutorando pela UNESP de Araraquara, que desenvolveu parte da pesquisa em Sinop, pelas suas palavras de apoio, incentivo e ainda pela contribuição na confecção dos espectros de RMN junto com a professora Dra. Lourdes.

Também agradeço a doutoranda Márcia Cléa pela disposição em encaminhar a excicata para a prof. Dra. Regina H.P. Andreata.

Meus sinceros agradecimentos aos meus companheiros de laboratório pela amizade e companhia: doutorando Carlos Cesar Wyrepkowski, mestranda Hocelayne Fernandes, Luiz Rialto, Bárbara Qualio,

Aos amigos do laboratório de bioquímica de Sinop que suavisaram os momentos de angústia no período final da pesquisa com sua bondade sorriso, palavras amigáveis: Jhonnes, Valfran, Paula, Kelly, Flávia ...

Minha gratidão as minhas grandes amigas de mestrado: Lorena, Angélica e Micheli, que sempre tinham uma palavra de apoio e por ajudarem diretamente na resolução dos exercícios, ensinando com paciência e amor. Grasielli, Ariane, Márcia e Pâmela, meninas dedicadas! Thayana, Cláudia, Laís pelas sugestões no decorrer do trabalho, por responder meus questionamentos, ao indicar os procedimentos laboratoriais... valeu...

Aos colegas de mestrado William, João Luiz, Francisco, pelas palavras de incentivo, pelo companheirismo, trabalhos em grupo. Ao Fernando, Augusto, Breno, Thiago, Júlio César, Eduardo, Renan, Carlos Domingues, Marcos Gabriel, Eduardo, Ewerton, pela amizade, tirando minhas dúvidas, por deixarem o trabalho mais suave.

Ao Francisco e Vanilde, técnicos de laboratório pela amizade e pelas palavras amigas.

Aos professores e funcionários da Escola Estadual Nova Canaã por compreenderem minha ausência, pela amizade, obrigado aos que ajudaram nos momentos de dificuldades em conciliar as aulas com a pesquisa...

Aos meus amigos, membros da igreja Adventista do 7° dia com os quais compartilhei momentos alegres e aqueles das horas mais difíceis, o meu muito obrigado.

Pelas valiosas correções que os professores Dr. Evandro Luiz Dall'Oglio, Dr. Helder Lopes Teles apresentaram no exame de qualificação.

Aos professores: Dra. Fernanda Rodrigues Garcez, Dr. Helder Lopes Teles, ao meu orientador e coorientadora que tão bondosamente sugeriram as correções no exame de defesa da dissertação, com dedicação e profissionalismo.

xi

À Universidade Federal de Mato Grosso e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade e proporcionar este momento único.

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

"Andei...

Por caminhos difíceis, eu sei.

Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr.

E assim a cada passo que der tentarei fazer o melhor que puder.

Aprendi...

Não tanto quanto quis, mas vi que conhecendo o universo ao meu redor

aprendo a me conhecer melhor;

Assim escutarei o tempo que me ensinará a tomar a decisão certa a

cada momento.

E partirei... Em busca de muitos ideais, mas sei que hoje se encontram meu passado, presente e futuro.

Hoje sinto em mim a emoção da despedida. Hoje é o ponto de chegada.

Mas, ao mesmo tempo, tempo de partida".

(Autor desconhecido)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOH - Ácido acético

CC - Cromatografia em coluna

CCD - Cromatografia em camada delgada

CD₃OD - Metanol deuterado

CDCl₃ - Clorofórmio deuterado

CE50 - Concentração Efetiva

CLAE-FR- Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

COX-2 - cicloxigenase - 2

d - dupleto

dd – duplo dupleto

DCM – Diclorometano

dl - dupleto largo

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆ - Dimetilsulfóxido deuterado

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EA - Atividade anti-radical

EM - Espectrometria de massas

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

AcOEt - Acetato de etila

EtOH - Etanol

HepG2 e Hep3B – linhagem de células tumorais de hepatocarcinomas humanas

HO2[•] - Radical hidroperoxila

Hx – Hexano

Hz - hertz

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IV – Infravermelho

i.g.- intragástrico

J - Constante de acoplamento escalar

mM - milimolar

MeOH – Metanol

MHz - Megahertz

m - multipleto

MCF-7 - Michigan Câncer Fundation - 7,

MTT - O teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

MDA-MB-231 - linhagem celular de câncer de mama

O2 - Radical superóxido

'OH - Radical hidroxila

OMS - Organização Mundial de Saúde

PVDF - Membrana Fluoreto Polivinidileno

RMN - Ressonância magnética nuclear

- s simpleto
- sl simpleto largo
- T47D linhagem celular de câncer de mama
- TMS tetrametilsilano
- TR Tempo de retenção
- µM micromolar
- UV Ultravioleta
- δ Deslocamento químico em ppm
- λ comprimento de onda com absorção máxima no ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Smilax fluminensis Steud., a) planta jovem; b) planta com
frutos 4
Figura 2: c) Smilax cissoides Martius ex Grisebach; d) Smilax
brasiliensis Sprengel
Figura 3: e) Smilax polyantha Grisebach; f) Smilax rufescens Grisebach 5
Figura 4: g) Smilax fluminensis Steud; h) Smilax oblongifolia Pohl 5
Figura 5: Regiões onde são encontradas as diversas espécies de
Smilax
Figura 6: Smilax fluminensis Steud, a) Folhas, b) flores, c) frutos e d)
planta jovem
Figura 7: Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos: BHA - terc-
butil-hidroxianisol; BHT - terc-butil-hidroxitolueno; PG - propil galato;
TBHQ - terc-butil hidroquinona14
Figura 8: Reação colorimétrica de oxi-redução entre o radical DPPH [•] -
2,2-difenil-picril-hidrazila e o BHT - butil-hidroxitolueno 15
Figura 9: Estruturas de alguns flavonoides isolados no gênero Smilax 24
Figura 10: Secagem das folhas, maceração, rotaevaporação e eluição
em coluna de vidro
Figura 11: Cromatogramas das frações: a) SG116-124; b) SG125-149;
c) SG150-161 e d) SG201-215; obtido por CLAE num sistema eluído em
coluna Gemini Phenomenex [®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os
solvente A: TFA:H ₂ O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH)
0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min
(100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo1,0 mL/min 45
Figura 12: Cromatograma da fração SH23-28 obtido por CLAE num
sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex [®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5
$\mu m)$ usando o solvente A: TFA:H_2O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente o B:
TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -
100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min 50

Figura 13 Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) Figura 14: Cromatograma da fração SH29-32 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250.0 x 4.6 mm, 5 um) usando o solvente A: TFA:H₂O 0.05:99.95 (V/V) e Solvente o B: TFA (ACN/MeOH) 0.05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1.0 mL/min 51 Figura 15: Espectro de massas com ionização por eletrosprav (ESI-MS) Figura 17: Cromatograma mistura de padrões, obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250.0 x 4.6 mm, 5 um) usando os solvente A: TFA:H₂O 0.05:99.95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0.05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) Figura 16: As estruturas dos padrões usados na CLAE. Figura 18: Cromatograma do extrato bruto, obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250.0 x 4.6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H2O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) Figura 19: Cromatograma do extrato bruto com tolueno, obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250.0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo1,0 Figura 20: Núcleo proposto para SG116-124: quercetina-3-O-α-Lramnopiranosídeo(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo-[7-O- α -Lramnopiranosídeo]......65 Figura 21: a) Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) e b) Cromatograma da fração SG116-124, obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0.05:99.95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0.05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) Figura 22: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) para SG116-124.. 69 Figura 23: Núcleo flavonoídico proposto para SG125-161 Quercetina 3-O-β-D-galactopiranosil (hiperina)......70 Figura 24: Cromatograma da fração a) SG125-149 e b) SG150-161, foram obtidos por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando o solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min Figura 25: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO d₆) para SG125-Figura 26: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO d₆) para SG125-Figura 27: Núcleo flavonoídico proposto para SG201-215, guercetina-3-Figura 28: a) Espetro de massas. c) Cromatograma da fração SG201-215, obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250.0 x 4.6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0.05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min...... 80 Figura 29: a) Cromatograma da fração SG201-215, b) Cromatograma da fração SG201-215 fortificada com padrão de quercetina, c) Sobreposição dos cromatogramas "a" e "b", obtidos por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5

xviii

µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) Figura 30: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) para SG201-215...... 82 Figura 31: Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) para SG201-215 83 Figura 33: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) para SH29-32..... 86 Figura 34: a) Espectro de massas com ionização por eletrosprav (ESI-MS) e b) Cromatograma da fração SH29-32, obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H2O 0.05:99.95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) Figura 35: a) Cromatograma da fração SH29-32, b) Cromatograma da fração SH29-32 fortificada com padrão de quercetina, c) Sobreposição dos cromatogramas "a" e "b", obtidos por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min...... 88 Figura 36: Análise colorimétrica com DPPH em frações de Smilax Figura 37: Potencial antioxidante das frações de S. fluminensis, porcentual de DPPH remanescente. Valores apresentam as médias dos Figura 38: Cromatograma da mistura de padrões, obtido por CLAE 106 Figura 39: Cromatograma do extrato bruto, obtido por CLAE 107 Figura 40: Cromatograma da fração F3..... 108 Figura 41: Cromatograma da fração F4...... 109 Figura 42: Cromatograma da fração F5...... 110 Figura 43: Cromatograma da fração F6..... 111

Figura 44: Cromatograma da fração F7	112
Figura 45: Cromatograma da fração F9	113
Figura 46: Cromatograma da fração F10	114
Figura 47: Cromatograma da fração F11	115
Figura 48: Cromatograma da fração F12	116
Figura 49: Cromatograma da fração F13	117
Figura 50: Cromatograma da fração F14	118
Figura 51: Cromatograma da fração F15	119
Figura 52: Cromatograma da fração F17	120
Figura 53: Cromatograma da fração F18	121
Figura 54: Cromatograma da fração SA1-16	122
Figura 55: Cromatograma da fração SA17-33	123
Figura 56: Cromatograma da fração SD37-52	124
Figura 57: Cromatograma da fração SD53-70	125
Figura 58: Cromatograma da fração SE26-49	126
Figura 59: Cromatograma da fração SE50-61	127
Figura 60: Cromatograma da fração SE62-75	128
Figura 61: Cromatograma da fração B26-30	129
Figura 62: Cromatograma da fração B31-35	130
Figura 63: Cromatograma da fração SG116-124	131
Figura 64: Cromatograma da fração SG125-149	132
Figura 65: Cromatograma da fração SG150-161	133
Figura 66: Cromatograma da fração SG201-215	134
Figura 67: Cromatograma da fração SF69-79	135
Figura 68: Cromatograma da fração SH23-28	136
Figura 69: Cromatograma da fração SH29-32	137

LISTA DE QUADROS

Quadro 6: Sistema cromatográfico utilizado nas análises de CLAE 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados do fracionamento do extrato bruto de Smilaxfluminensis37
Tabela 2: Dados do fracionamento da fração F8 de Smilax fluminensis 38
Tabela 3: Dados do fracionamento da fração F8-15-20 de Smilaxfluminensis
Tabela 4: Dados do fracionamento da fração F8-45-48
Tabela 5: Dados do fracionamento da fração F8-56-84
Tabela 6: Dados do fracionamento da fração F8-21-44
Tabela 7: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração F8-49-55 44
Tabela 8: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração F15 (1,1 g) 47
Tabela 9: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração F15 (1,2 g) 48
Tabela 10: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração SD37-52(495 mg) e SE26-49 (799 mg) total 1294 mg
Tabela 11: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fraçãoSC35-47 49
Tabela 12: Dados do fracionamento em sílica gel 60 da fração F16
Tabela 13: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração F16-14-21(Frações - SC)53
Tabela 14: Compostos fenólicos identificados no extrato das folhas deS. fluminensis
Tabela 15: Compostos não identificados no extrato e frações das folhasde S. fluminensis
Tabela 16: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹ H obtidos paraSG116-124 comparados com dados da literatura
Tabela 17: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹ H obtido paraSG125-161 comparados com dados da literatura
Tabela 18: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹³ C obtido paraSG125-161 comparados com dados da literatura
Tabela 19: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹ H obtidos paraSG201-215 comparados com dados da literatura
Tabela 20: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹³ C obtidospara SG201-215 comparados com dados da literatura.77

Tabela 21: Dados d	e deslocamento	químico de RM	N de	¹ H obtido para	
SH29-32 comparado	s com dados da	literatura			83

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Procedimento geral para a separação do extrato bruto de	
S. fluminensis	34
Esquema 2: Procedimento utilizado para a separação do extrato bruto	
de Smilax fluminensis	36
Esquema 3: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8 de	
Smilax fluminensis	39
Esquema 4: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-	
15-20 de Smilax fluminensis	40
Esquema 5: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-	
45-48 de Smilax fluminensis	41
Esquema 6: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-	
56-84 de Smilax fluminensis	42
Esquema 7: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-	
21-44 de Smilax fluminensis	43
Esquema 8: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-	
49-85 de Smilax fluminensis	44

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE QUADROS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxii
LISTA DE ESQUEMAS	xiv
RESUMO	xxviii
ABSTRACT	xxix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Levantamento botânico: a família Smilacaceae	6
2.2 O gênero Smilax	7
2.2.1 A espécie Smilax fluminensis Steud	8
2.2.2 Atividades biológicas descritas para o gênero	9
2.3 Considerações gerais sobre flavonoides	11
2.3.1 Potencial Antioxidante dos flavonoides	13
2.3.2 Os Radicais livres	15
2.3.3 Flavonoides como antioxidantes	17
2.4 Uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para análise de	
flavonoides	17
2.5 Isolamento e identificação de flavonoides no gênero Smilax	19
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Solventes e equipamentos	27
4.2 Cromatografia em camada delgada	27
4.3 Fase estacionária em sílica gel 60	28
4.4 Fase estacionánia composta por SephadexTM LH20	28
4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência UV/Vis (CLAE-UV)	29

4.5.1 Preparo das amostras para análise via CLAE (Clean-up)	. 29
4.5.2 Método de Análise por CLAE	. 30
4.5.3 A quantificação de flavonoides	. 30
4.5.4 Fortificação da amostra com uso de padrão	. 31
4.6 Ressonância Magnética Nuclear	. 31
4.7 Espectrometria de massas	. 31
5. EXPERIMENTAL	. 33
5.1 Coleta e identificação da espécie	. 33
5.2 Preparo do extrato	. 33
5.3 Fracionamento do extrato sem clorofila	. 35
5.4 Estudo da fração F8	. 37
5.5 Estudo da fração F8-15-20, denominada coluna A	. 40
5.6 Estudo da fração F8-45-48, denominada coluna B	. 41
5.7 Estudo da fração F8-56-84, denominada coluna C	. 42
5.8 Estudo da fração F8-21-44, denominada coluna SA	. 43
5.9 Estudo da fração F8-49-55, denominada coluna SG	. 43
5.10 Estudo da fração F15, denominada coluna SD	. 47
5.11 Estudo da fração F15, denominada coluna SE	. 48
5.12 Estudo da fração SD37-52 e SE26-49, denominada coluna SF	. 48
5.13 Estudo da fração SC35-47, denominada coluna SH	. 49
5.14 Estudo da fração F16	. 52
5.15 Estudo da fração F16-14-21, denominada coluna SC	. 53
5.16 Teste do Potencial Antioxidante	. 53
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	. 55
6.1 Substâncias identificadas por CLAE no extrato e frações de Smilax	
fluminensis	. 55
6.2 Identificação e elucidação estrutural de flavonoides e seus derivados.	. 63
6.3 Dados físicos e cromatográficos das substâncias identificadas	. 63
6.4. Identificação e elucidação estrutural de flavonoides	. 65
6.4.1 Identificação e elucidação de SG116-124	. 65
6.4.2 Identificação e elucidação estrutural de SG125-161	. 70

6.4.3 Identificação e elucidação estrutural de SG201-215	76
6.4.4 Identificação e elucidação estrutural de SH29-32	84
6.5 Teste do Potencial Antioxidante	89
7. CONCLUSÕES	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXO 1: Cromatogramas do extrato e frações de folhas de S.	
fluminensis	105

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar flavonoides presentes em extrato etanólico de folhas de Smilax fluminensis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), avaliar o potencial antioxidante das frações, isolar e identificar alguns flavonoides. Foram identificados e quantificados por CLAE, oito flavonoides: agatisflavona, amentoflavona, apigenina, canferol, quercetina, quercitrina, rutina e taxifolina. O teor de flavonoides identificados por CLAE variou entre 2,0 ppm a 125 ppm. O potencial antioxidante apresentado pelas frações foi acima de 90% de seguestro de DPPH• na maioria das frações com CE₅₀ 4,0 µg/mL a 14,0 µg/mL. Foram isolados e identificados os flavonoides: Quercetina-I3-O-α-Lramnopiranosil(1"" \rightarrow 6")- β -D-glicopiranosídeo]-7-O- α -L-

ramnopiranosídeo (SG116-124); Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina) (SG125-161); Quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosil(1^{'''}→6^{''})-O-β-D-glicopiranosídeo, (SG201-215) e Quercetina (SH29-32). O método de CLAE propiciou a quantificação e identificação de flavonóides, comprovados por análise de Ressonância Magnética Nuclear - RMN ¹H e ¹³C e por espectrometria de massas.

Palavras-chave: flavonoides, cipó japecanga ou salsaparrilha, potencial antioxidante, CLAE, RMN, *Smilax Fluminensis* Steud.

ABSTRACT: The objective of this study was to identify and quantify flavonoids present in the ethanol extract of leaves of Smilax fluminensis by high performance liquid chromatography (HPLC-UV), to evaluate the antioxidant potential of the fractions, isolate and identify some flavonoids. Were identified and quantified by HPLC, eight flavonoids: agatisflavone. amentoflavone, apigenin, kaempferol, guercetin, guercitrin, rutin and taxifolin. The content of flavonoids identified by HPLC ranged from 2.0 ppm to 125 ppm. The antioxidant potential was shown by the fractions above 90% of DPPH sequestration in most fractions with EC₅₀ 4.0 mg/mL to 14.0 mg/mL. Have been isolated and identified flavonoids: Quercetin[3-O- α -L-ramnopyranosyl(1"" \rightarrow 6")- β -D-glucopyranosyl]-7-O- α -L-ramnopyranoside (SG116-124): quercetin-3-O-B-D-galactopyranoside (hiperin) (SG125-161); Quercetin-3-O- α -L-ramnopyranosyl(1") \rightarrow 6")-O- β -D-glucopyranoside, (SG201-215) and guercetin (SH29-32). The HPLC method allowed the identification and guantification of flavonoids, supported by analysis of Nuclear Magnetic Resonance - NMR ¹H and ¹³C and mass spectrometry.

Keywords: flavonoids, japecanga or sarsaparilla vine, antioxidant potential, HPLC, NMR, *Smilax Fluminensis* Steud.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento de doenças tanto em humanos quanto em animais não é nenhuma novidade, porém, cada vez mais fica claro que a fitoterapia necessita de um controle de qualidade mais rigoroso. O uso de fitoterápicos sem conhecimento pode não trazer os benefícios esperados bem como ser nocivo ao organismo. O conhecimento tanto dos constituintes presentes nos extratos e como sua atividade biológica, faz-se necessário no momento em que cresce em importância e em escala comercial o uso de plantas para a prevenção e tratamento de doenças (ANDREATA, 1995; NASCIMENTO, 2010)

O valor dos extratos de plantas fitoterápicas deve-se a sua grande variedade, complexidade e constituintes químicos (metabólitos secundários). Alguns destes extratos apresentam efeitos terapêuticos quando administrados em organismos vivos. Outros, por sua vez, dependendo da concentração podem tornar-se tóxicos, ou não apresentar atividade. O estudo dos metabólitos secundários das plantas tem seu valor substancial, pois possibilita o discernimento e evolução do estudo sistemático das mesmas, aliado a descoberta de novos metabólitos bioativos. (CROZIER et al., 2009; OZSOY et al., 2008).

O isolamento e identificação dos compostos puros aumentam com o uso de para identificar e quantificar estes metabólitos no extrato bruto da planta. Assim, com o acúmulo de dados da literatura, dentro de pouco tempo haverá um banco de dados com grande quantidade de informações dos constituintes dos metabólitos secundários, e com isso o processo de identificação será menos laborioso, mais rápido e mais acessível (BORGES et al., 2011).

Com o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo e espécies melhoradas, para fins medicamentosos, faz-se necessário um estudo mais detalhado dos metabólitos secundários ou de substâncias bioativas, presentes nessas plantas, visto que, alguns são produzidos pelas plantas para a defesa. A aplicação de técnicas e insumos bem como o próprio melhoramento das espécies e efeitos ambientais possibilitam variação na produtividade do princípio ativo (CHEN et al.,2011).

Muitas pesquisas sobre metabólitos secundários de plantas deram origem a aproximadamente 70% dos medicamentos hoje disponíveis, proporcionando a cura de muitas doenças. Tanto o Cerrado quanto a Amazônia brasileira tem uma vasta biodiversidade, onde se acredita ser reserva de biomoléculas ainda não descobertas que poderão contribuir para a saúde humana (ENDRINGER, 2007).

Estudos etnobotânicos indicam a eficácia das plantas nos tratamentos caseiros, corraborando com estudos científicos que comprovam a presença de compostos químicos nas mesmas. Para isto, testes são realizados para a extração e identificação do grupo químico presente. De acordo com Borges et al., (2011) a planta *Elatostema rugosum* apresentou atividade antiinflamatória e cicatrizante, e sugerindo a presença de flavonoides com estas propriedades.

Antes de fazer a escolha da planta a ser estudada foi realizado um levantamento etnobotânico de espécies que apresentassem efeito antiiflamatório e cicatrizante. A partir destas informações foi escolhida a espécie *Smilax fluminensis* Steud., após seu o reconhecimento no Herbário, saber onde obter quantidade suficiente da planta para estudo, por não existir pesquisa química sobre a espécie, e pelo interesse científico.

As citações etnobotânicas para o uso medicinal da espécie *Smilax fluminensis* indicam a infusão das folhas como sendo eficaz na cura de eczemas, infecções, no tratamento de diabete, problemas estomacais, de olhos, fraqueza, entre outras doenças, justificando a pesquisa (GUARIM NETO e MORAIS, 2003; MEDEIROS et al., 2007; ALVES et al. 2008).

É nesse sentido que esse trabalho vê a possibilidade de conhecer, proteger e usufruir de maneira sustentável os benefícios que as plantas medicinais podem oferecer (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

2

Diante disso, torna-se importante a realização deste trabalho, a fim de identificar a presença de flavonóides em *Smilax fluminensis* Steud., além de incentivar a preservação do meio ambiente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão serão citados os trabalhos mais relevantes sobre análise de flavonoides existentes na literatura, com o objetivo de esclarecer alguns pontos importantes relacionados a este trabalho. Também, será abordado um pouco sobre as características da família Smilacaceae, aspectos botânicos da espécie *Smilax fluminensis* Steud e incidência de flavonoides no gênero *Smilax*.

A classificação botânica para esta espécie é a seguinte:

Reino: Plantae Divisão: Magnoliophyta Classe: Liliopsida Ordem: Liliales Família: Smilacaceae Gênero: *Smilax* Algumas das espécies do gênero *Smilax* encontradas no Brasil Figuras

1 a 4.



Figura 1: Smilax fluminensis Steud., a) planta jovem; b) planta com frutos.



Laboratório de Anatomia Vegetal - ESALQ/LCB

Figura 2: c) *Smilax cissoides* Martius ex Grisebach; d) *Smilax brasiliensis* Sprengel.



Laboratório de Anatomia Vegetal - ESALQ/LCB Figura 3: e) Smilax polyantha Grisebach; f) Smilax rufescens Grisebach.



Laboratório de Anatomia Vegetal - ESALQ/LCB Figura 4: g) Smilax fluminensis Steud; h) Smilax oblongifolia Pohl.

2.1 Levantamento botânico: a família Smilacaceae

A família **Smilacaceae** foi nomeada em 1799 e deriva do grego *smîlaks akos*, espinho ou raspador, nome nativo de uma trepadeira espinhosa comum sobre carvalhos europeus na região do mediterrâneo. É conhecida como japecanga: ya-ape-canga, que tem a casca seca, em tupi. A família é da ordem das Liliales, monocotiledôneas, composta de plantas dióica-s, lianas ou trepadeiras herbáceas, raramente arbustos ou subarbustos. Popularmente conhecida como salsaparrilha ou japecanga, cipó japecanga, aputá. Podendo ser encontrada também na floresta atlântica, floresta mesofila e pantanal, com ótima adaptação e ocorrência mundial (Figura 5), nas regiões tropicais e subtropicais (ANDREATA, 2006).



Fonte: Index of /nh/maps/Plantae/Monocotyledoneae/Smilacaceae/Smilax out. 2012. Figura 5: Regiões onde são encontradas as diversas espécies de Smilax.

Na literatura existem mais de 615 espécies de *Smilax*, descritas por botânicos, no período de 1753 a 2010.

O material pesquisado nesta revisão está dividido em 16 artigos sobre estudo botânico (Quadro 1, p.7), 28 artigos sobre atividade biológica (Quadro 2, p.9), 37 artigos sobre isolamento de flavonóides (Quadro 4, p.20) no gênero e **s**ubstâncias isoladas de espécies do gênero *Smilax* (Quadro 5, p.20)

Espécie	Referência
S.sifilitica	WILLDENOW, 1806; VIREY, 1834; GRISENBACH, 1842; GEIGER, et al., 1885; SILVA 2010
S. rotundifolia e glauca	HOLZINGER,1903
S. obtusângula e áspera	BERGER, 1953
S.kraussiana	SANSOME, 1959
S. campestris	GATTUSO, 1995
S. goiazana	PALHARES e SILVEIRA, 2005; PALHARES et al., 2009
S. elastica, fluminensis, japicanga, quinquenervia, remotinervia, rufenses, espicato, satamina e estenofila	ANDREATA, 2006
S. fluminensis	OLIVEIRA et al., 1973; ANDREATA e MENEZES, 1999; SOUZA et al., 2005; SOARES, 2010

Quadro 1: Estudo botânico de diversas espécies no gênero *Smilax*

Foram encontrados alguns trabalhos sobre identificação botânica da *Smilax fluminensis* Steud., onde o mais recente abordou morfoanatomia, perfil químico e propagação da espécie (SOARES, 2010).

2.2 O gênero Smilax

O gênero *Smilax* compreende 615 espécies, com cerca de 390 espécies reconhecidas, das quais 14 espécies são encontradas exclusivamente no Brasil com ampla distribuição. Algumas espécies são utilizadas na medicina popular e na indústria de fitoterápicos (ANDREATA, 1995).

As espécies brasileiras do gênero *Smilax* são lianas arbustivas ou subarbustivas, monocotiledôneas, podendo tornar escadente, quando
encontram suporte, com ramos e caules aculeados, folhas simples, alternas, glabras, providas de lâmina, pecíolo e bainha bem diferenciados (ANDREATA, 2006).

Em várias partes do mundo é reconhecido o emprego de espécies de *Smilax* não só como medicinal (sistema subterrâneo, caule e folhas), mas também como recurso alimentício ("rizomas", caules e folhas comestíveis) e para a construção (fibras) (MEDEIROS et al, 2007)

Estas espécies apresentam ampla distribuição no Brasil, sendo encontradas em: São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco, Ceará, Maranhão, Pará, Roraima, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, estendendo-se para Argentina, Paraguai e Bolívia. (Andreata, 1997).

No gênero *Smilax* são encontradas as seguintes classes de metabólitos secundários: saponinas esteroidais, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos que variam em suas propriedades medicamentosas.

2.2.1 A espécie Smilax fluminensis Steud

A espécie *Smilax fluminensis* Steud., é conhecida popularmente por: salsaparrilha, japecanga, salsa, salsinha, quina-de-cipó, cipó-quina (Figura 6). Sua distribuição ocorre desde a Bolívia, Paraguai, Argentina, e Brasil, onde a espécie é encontrada nos estados do Pará, Roraima, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e região centro-oeste.

A identificação da espécie é muito complexa por basear principalmente em características do androceu, apresentar variabilidade morfológica, o que dificulta a identificação taxonômica (Figura 6). A caracterização citogenética contribui para o esclarecimento de problemas taxonômicos e para o aumento da confiabilidade de fitoterápicos (MARTINS e APPEZATTO-DA-GLÓRIA, 2006; ANDREATA, 1997).



Figura 6: Smilax fluminensis Steud, a) Folhas, b) flores, c) frutos e d) planta jovem.

2.2.2 Atividades biológicas descritas para o gênero

Desde a antiguidade este gênero é reconhecido pelo efeito medicinal, onde o extrato de folhas e raízes é empregado para o tratamento de sífilis, brucelose, nefrite, gota, reumatismo, afecções cutâneas, asma, dor de dente, ferimentos, e também como antitumorogênico, antidiabete, antidemência, como depurativo do sangue, diurético e outros. O quadro 2 apresenta de forma resumida os principais estudos.

Atividade biológica/parte da planta	Referências
	XU et al., 2005; ZHANG et al., 2008;
Atividade antioxidante	OZSOY et al., 2008; ZHAO et al.,
(raiz, rizoma, folhas)	2008; KHAN et al., 2009; ZHANG et
	al., 2009; CHANG-WEI et al., 2011.
Depurativo do sangue, diurético, doenças renais, antidiabético (rizomas e folhas)	HARTWICH, 1902; PECKOLT, 1936; HOENE, 1955; CHHABRA et al., 1993; LI et al., 2009; ABDALA et al., 2008; Zhang et al., 2009;
Antissifilítico (rizoma e folhas)	HARTWICH, 1902
Citotoxicidade a células HeLa,	LIU et al., 2007; SA et al., 2008; XU et
antitumoral, anticarcinogênica e	al., 2008; WU et al., 2010;
hepatoprotetora (rizomas)	WUNGSINTAWEEKUL et al., 2011.
Reumatismo crônico e	HOENE, 1955; HE, 2007, WU et al.,
aterosclerose (rizomas e folhas)	2010.
Doenças coronarianas e neuro- degenerativas (rizomas e folhas)	CHHABRA et al. 1993; BAN et al., 2006; YE et al., 2007; CHEN et al., 2011.

Quadro 2: Alguns estudos sobre atividade biológica do gênero *Smilax*

A seguir estão descritos alguns artigos abordando estudos envolvendo a atividade biológica em espécies do gênero Smilax.

O extrato aquoso de rizomas de *Smilax china* apresentou efeito antiinflamatório e antinociceptivo quando comparado ao ácido acetil salicílico em ratos via gavagem, além do efeito de supressão da atividade da enzima ciclooxigenase (COX-2) (SHU et al., 2006).

No extrato de rizomas de *Smilax glabra* foram identificados os isômeros do flavonoide astilbina e da saponina smilagenina que apresentaram efeito de apoptose em células de hepatomas humanas HepG2 e Hep3B *in vitro* (SA et al., 2008).

Sieboldogenina foi isolada da fração de acetato de etila do extrato bruto de *S. china* e apresentou atividade nos testes *in vitro* de lipooxigenase e atividade antiinflamatória *in vitro* e *in vivo* com ratos (KHAN et al., 2009).

A atividade anticancerígena do extrato bruto de rizomas de *Smilax china* foi avaliada por ensaio clonogênico, ensaio de MTT e contra células HeLa. A fração rica em flavonoides apresentou boa atividade. Foram avaliadas a citotoxicidade e efeito antiproliferativo *in vitro* com canferol-7-O- β -D-glicosídeo isolado, exibindo ótima atividade anticancerígena (LI et al., 2007).

O estudo com *Smilax glabra* sugere que o co-tratamento com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico pode melhorar a disfunção hepática e as alterações histopatológicas. Os resultados *in vivo* sugeriram o efeito protetor do extrato de *Smilax glabra* como agente quelante contra estresse oxidativo induzido e mostrou eficiência significativa na redução da carga de chumbo no sangue e tecidos de ratos (XIA et al., 2010).

Análises da fração de acetato de etila das raízes e rizomas de *Smilax china* permitiram a identificação de seis polifenóis que por bioensaios apresentaram atividade citotóxica nos testes contra tumor de mama para células tipo *Michigan Cancer Fundation - 7* (MCF-7) e linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) com concentração efetiva, CE_{50} de 2,1 a 38,9 µg/mL, e induziram ambos a apoptose (LI et al., 2010).

As saponinas esteroidais isoladas de rizomas de *Smilax aspera* foram avaliadas quanto a sua atividade citotóxica em células amnióticas normais e de câncer de pulmão de humanos, usando testes com 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), com valores entre 32,98 -94,53 µM (IVANOVA et al, 2011)

Todas as substâncias isoladas de rizomas de *Smilax corbularia* foram avaliadas quanto à atividade estrogênica e anti-estrogênica, usando células que respondem a estrogênios de câncer de mama humanas MCF-7 e T47D, onde os flavanonóis ramnosídeos apresentaram efeito supressivo na concentração de 1 µM e atividade estrogênica na concentração de 100 µM e aumentaram o efeito de co-tratamento E2 em células T47D na concentração de 0,1 µM (WUNGSINTAWEEKUL et al. 2011).

Frações do extrato de *Smilax china* apresentaram atividade antihiperuricemica e atividade nefroprotetora em ratos induzidos a hiperuricêmia. As substâncias isoladas: ácido caféico, resveratrol, rutina e oxiresveratrol, mostraram diferentes atividades de inibição na xantina oxidase em testes *in vitro* (CHEN et al., 2011).

Extratos de rizomas, folhas e casca de *Smilax canariensis* mostraram um aumento da diurese, n-butanol (27%) e extrato de acetato de etila (35). O aumento da diurese produzido por estes dois extratos foi muito próximo dos valores de hidroclorotiazida (32%) ou furosemida (39%), usado como diuréticos de referência (ABDALA et al., 2012).

2.3 Considerações gerais sobre flavonoides

Os flavonoides formam um grupo de cerca de 4000 compostos de ocorrência natural e são metabólitos secundários de plantas, responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e reprodução, desenvolvidos na adaptação ao estresse ambiental, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (FALCÃO, 2006; CRUZ; SILVA, 2010).

Os flavonoides são produtos de origem biossintética mista, biossintetizados através da rota (ou via) do ácido chiquímico (ou chiquimato) e também do acetato (acetil coenzima A). Flavonoides são grupos de compostos que apresentam uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (Quadro 3). A maioria dos compostos flavonoídicos encontrados na natureza é polissubstituída e apresenta no mínimo um grupo hidroxila.

Posição dos grupos OH	Flavonol	Flavanonol	Flavan-3-ona	Antocianidina
	$\begin{bmatrix} 2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 &$	2 3 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	N C C OH	
3, 5, 7, 3`, 4`	Quercetina	Taxifolina	Catequina	Cianidina
3, 5, 7, 4`	Canferol			Malvidina (3`, 4`-OMe)
5, 7, 3`, 4`	Luteolina			
3, 5, 7, 3`, 4`	Rutina (Quercetina-3- O-Rutinosideo)			
5, 7, 4`	Apigenina	Flavanona Naringenina		
5, 7	Crisina			
3, 5, 7, 3`, 4`, 5`				Delfinidina

Quadro 3: Esqueletos das principais classes de compostos polifenólicos

2.3.1 Potencial Antioxidante dos flavonoides

O método mais comum para a quantificação de flavonoides em produtos vegetais é o ensaio espectrofotométrico da reação do radical 2,2difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), sendo um teste simples e muito utilizado para avaliar o potencial antioxidante (BLOIS, 1958).

DPPH[•] é um radical livre estável, não-natural, cujas propriedades diferem dos radicais de oxigênio altamente reativos tais como a hidroxila, alcoxila e superóxido que desempenham um papel importante nos processos biológicos oxidativos. Inúmeros compostos químicos têm apresentado uma correlação estreita entre a atividade de redução do DPPH[•] e atividade antioxidante determinada para modelos biológicos e não biológicos (MALTERUD & RYDLAND, 2000).

Antioxidantes são substâncias que podem retardar ou inibir a oxidação evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação. Dessa forma, em nível celular, impede a oxidação de lipídeos e proteínas de membranas e danos ao núcleo celular. Estes compostos, geralmente apresentam estrutura química aromática e contém pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil hidroquinona (TBHQ) e o propil galato (PG), muito utilizados pela indústria de alimentos. O uso dos antioxidantes sintéticos teve início nos anos 40. A estrutura fenólica destes compostos (Figura 7) permite a doação de um hidrogênio a um radical livre, interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres e podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (RAMALHO & JORGE, 2006).



Figura 7: Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos: BHA - terc-butilhidroxianisol; BHT - terc-butil-hidroxitolueno; PG - propil galato; TBHQ - tercbutil hidroquinona.

Estudos toxicológicos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos apresentam efeito nocivo. O BHT está relacionado a doenças pulmonares (HOCMAN, 1988). O BHA induz hiperplasia gastrointestinal; e o TBHQ reduz o nível de hemoglobina e hiperplasia de células basais (CRUCES-BLANCO et al., 1999; MADHAVI; SALUNKHE, 1995 apud RAMALHO & JORGE, 2006).

Para avaliar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos existem diversos métodos que determinam à habilidade dos antioxidantes em sequestrar radicais, como o que envolve um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio, o DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Figura 8). É o mais empregado devido a sua rapidez, praticidade e sensibilidade nas análises (BOLONI; MIRANDA & FRAGA, 2006; SOUSA et al., 2007; BORGES, 2011).

A solução metanólica do DPPH[•], de coloração púrpura violeta, absorve luz no comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante, ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 8). Nesta reação, a solução metanólica de DPPH[•], de coloração violeta, torna-se amarelada, forma reduzida, em virtude da presença do grupamento picril e o grau desta descoloração, que é monitorada espectrofotometricamente, indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Os resultados podem ser expressos em porcentagem de sequestro de radicais e/ou por porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (MIRANDA & FRAGA, 2006; SOUSA et al., 2007; BORGES, 2011).

Os compostos químicos como polifenóis, têm a capacidade de capturar e deslocar elétrons, caracterizando essas substâncias com propriedades antioxidantes. Assim, o ensaio de redução do radical livre DPPH[•], um teste de previsão do potencial antioxidante, pode ser utilizado para o rastreio de substâncias químicas sintéticas e de produtos naturais (MIRANDA & FRAGA, 2006), Figura 8.



Figura 8: Reação colorimétrica de oxi-redução entre o radical DPPH[•] - 2,2difenil-picril-hidrazila e o BHT - butil-hidroxitolueno.

O interesse em avaliar a capacidade antioxidante das plantas é devido à presença de compostos fenólicos e de flavonoides, encontrados nas frutas, vegetais, grãos, nozes, folhas e flores, como responsáveis pelas propriedades antioxidantes (RAMARATHNAM et al., 1995; MOURE et al., 2001).

2.3.2 Os Radicais livres

Os radicais livres são substâncias formadas endogenamente no organismo humano ao longo do processo oxidativo, como a respiração. Os radicais possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo. Um radical pode ser formado pela perda ou ganho de um elétron de um não radical, ou através de fissão homolítica de uma ligação covalente (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; BRASILEIRO-FILHO, 2006).

O papel das reações dos radicais livres nas doenças humanas, na biologia e na toxicologia é a deterioração. A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis em alimentos, tornando-os impróprios para consumo, pela degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, e com formação de compostos poliméricos tóxicos (RAMALHO & JORGE, 2006; ROESLER et al., 2007).

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs), nitrogênio (ERNs) e o sistema de defesa antioxidante presente no organismo. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H₂O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^{\bullet}), hidroperoxila (HO_2^{\bullet}), hidroxila ($^{\bullet}OH$) e, o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons. O radical superóxido (ou ânion superóxido) (O_2^{\bullet}) é o mais comum e abundante radical existente nas células (COHEN, 1989, ARORA et al., 2002; SAHU et al., 2010), porém o radical hidroxila é o mais nocivo.

gerado por fontes 0 radical livre pode ser endógenas desencadeadas por diversas atividades como a respiração, inflamações, ação dos peroxissomos, alimentação, além da ação de enzimas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres são: ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas, atividades que causem algum tipo de estresse e alimentos inadequados. A partir disso várias patologias têm sido identificadas como: artrite, aterosclerose, diabetes, catarata, esclerose múltipla, inflamações crônicas, disfunção cerebral, cardiopatias, enfisema, envelhecimento, câncer, etc. (AMES et al., 1993; BIANHI; ANTUNES, 1999 apud NASCIMENTO, 2010).

Para diminuir os efeitos nocivos dessas moléculas, devem-se incluir elementos que doem espontaneamente os elétrons que estão faltando nos

seus orbitais, impedindo a ação do radical oxigênio e a reação em cadeia da formação de novos radicais livres, caracterizados pelos antioxidantes, presentes em frutas e vegetais (ARORA et al., 2002; NASCIMENTO, 2010; SAHU et al., 2010).

2.3.3 Flavonoides como antioxidantes

Os benefícios dos flavonoides estão geralmente relacionados às propriedades antioxidantes e inativadoras de radicais livres. Estas moléculas são consideradas ingredientes ativos nas plantas medicinais, pois possuem a capacidade de proteger o organismo sequestrando os radicais livres produzidos pelo organismo ou obtido através da alimentação (GALIZIA et al., 2001; ISHIGE et al., 2001). Há relatos que relacionam a redução de doenças crônicas e degenerativas com o aumento da ingestão de dietas ricas em antioxidantes (ROESLER et al., 2007).

Vários estudos abordam o potencial antioxidante de algumas espécies de *Smilax*, tais como: *S. china* (LEE et al., 2001; XU et al., 2005; ZHAO et al., 2008; KHAN et al., 2009), *S. glabra* (ZHANG et al., 2009; XIA, 2010); *S. campestris* (Rugna et al., 2007), *S. excelsa* (OZSOY et al., 2008), *S. aspera* (LONGO & VASAPOLLO, 2006) e *S. bracteata* (ZHANG et al., 2008) *S. lanceaefolia* (LAITONJAM & KONGBRAILATPAM, 2010).

2.4 Uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para análise de Flavonoides

Algumas das principais técnicas de separação de compostos fenólicos são: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia de poliamida e a eletroforese de papel. A CCD ainda é um meio de análise de flavonóides muito acessível. A CLAE desde a sua introdução na década de 1970 é usada para separação e fracionamento de polifenóis e de todas as classes de flavonoides, como um método rápido, simples e versátil em extratos

vegetais e por isso muitos trabalhos de revisão descrevem o método tais como o de Marston e Hostettmann (2009), que se referem às aplicações da CLAE para análise qualitativa e quantitativa de flavonoides.

Os flavonoides podem ser separados, quantificados e identificados em uma operação por acoplamento da CLAE com detector ultravioleta (UV), espectrômetro de massa ou com ressonância magnética nuclear (RMN). Ainda, recentemente, a técnica de eletroforese capilar (EC) vem ganhando atenção pelos pesquisadores. Uma característica que confere grande benefício para a análise de flavonoides é a presença do anel aromático. Este excelente cromóforo é, naturalmente, UV ativo e por esta razão os flavonoides são fáceis de detectar. Os espectros de UV são informativos, proporcionando informação estrutural que permite distinguir o tipo de fenol e da oxidação padrão.

Grande número de técnicas tem sido utilizado para a separação e extração de flavonoides. Estas incluem: CLAE, sistema eletroforese (CE)-DAD, contra corrente, além de diversas fases estacionárias como: Diaion, Amberlite XAD-2 e XAD-7, Fractogel TSK/Toyopearl HW-40, resinas de filtração Sephadex. Entre outros a escolha de métodos e estratégias varia de grupo de pesquisa e depende muitas vezes da classe dos flavonoides estudados (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

A separação física da CLAE depende da composição de duas fases: veículo fluído (fase móvel) e fase estacionária. O uso de pressões elevadas permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária (na ordem de até 3,0 µm), localizada no interior da coluna cromatográfica, que resulta em maior área superficial e sítio de absorção, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Essas partículas minúsculas permitem o uso de colunas, volumes de amostras e de fase móvel em menor escala (SKOOG, 2002; RIBANI et al., 2004; YANG et al., 2008).

A cromatografia é uma técnica analítica de caracterização, detecção e separação, que pode ser utilizada para: identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes; purificação de compostos, separando as substâncias indesejáveis e, separação dos componentes de uma mistura. Este método possui alta sensibilidade, flexibilidade. especificidade e estabilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas precisas, adequação à separação de compostos não voláteis ou termicamente frágeis, e aplicáveis às substâncias de grande interesse para a indústria. A dificuldade do método relaciona-se ao elevado custo, velocidade analítica limitada e dificuldade de aprendizagem do método (RIBANI et al., 2004).

Este sistema pode ser usado com fins preparativos, para separar compostos em pequenas concentrações, com pequeno tempo de análise e permitindo a otimização e seletividade no processo de separação, com possibilidade de acoplamento a outras técnicas de detecção (SKOOG, 2002).

2.5 Isolamento e identificação de flavonoides no gênero Smilax

No gênero *Smilax* foram isoladas muitas substâncias (Quadro 4) com destaque para: astilbina, neosmitilbina, taxifolina, isoastilbina, transresveratrol, saponina, quercetina, canferol, isoramnetina, apigenina, catequina, diidrocanferol, scirpusina, canferol-3,7-O-α-Ldiramnopiranosídeo, rutinosídeo, smilasídeo, helonioisídeo, furostanol, βsitosterol, ácido gálico, ácido caféico, ácido gentísico, entre outros.

Foram encontrados 37 artigos sobre isolamento de substâncias químicas em diversas espécies do gênero *Smilax*, destes, cinco grupos de pesquisadores estudaram as folhas, um utilizou os frutos e os demais analisaram rizomas, foram abordados apenas os principais artigos.

O Quadro 4 apresenta algumas espécies do gênero Smilax estudadas e número de compostos isolados e no Quadro 5 são descritas as substâncias isoladas em algumas espécies do gênero Smilax e a parte da planta utilizada.

Espécie do gênero	Compostos isolados	Referência
glabra	25	CHIEN & ADAM, 1979; CHEN et al., 2002; CHEN et al., 2007; GUO et al., 2007; LIU et al., 2007; LI et al., 2009; ZHANG et al., 2011; KUBOTA et al., 2010
sieboldii	12	WOO, DO & SON, 1992
campestris	12	RUGNA, GUMI & WAGNER, 2002; RUGNA et al., 2007
bracteata	16	LI et al., 2002; ZHANG et al., 2008
riparia	8	CHO et al., 2003; LI et al., 2006
china	25	CHA & LEE, 2007; SHAO et al., 2007; XU et al., 2008; SHAO, GUO & GUO, 2009; ZHAO et al., 2009
ferox	6	YANG e GUO, 2010
aspera	6	IVANOVA et al., 2011
bockii	16	GUO et al., 2004; XU et al., 2005
corbularia	48	WUNGSINTAWEEKUL et al., 2011

Quadro 4: Espécies do gênero Smilax e número de compostos isolados

Quadro 5: Substâncias isoladas de espécies do gênero Smilax

Espécie	Substância	Parte da planta	Referência
	astilbina; engeletina; ácido O-(3)-cafeoil chiquímico; ácido chiquímico; ácido ferúlico; α-sitosterol; glicose	rizoma	CHIEN & ADAM, 1979
Smilax glabra	3-O-α-L-ramnopiranosil- $(1\rightarrow 2)$ -[α-L- ramnopiranosil- $(1\rightarrow 6)$]-β-D-glicopiranosil 3β,20α-diidroxi-5α-furostano-22(23)-eno- 26-O-β-D-glicopiranosídeo, Riparosídeo B, 3-O-α-L-ramnopiranosil- $(1\rightarrow 2)$ -[α-L- ramnopiranosil- $(1\rightarrow 6)$]-β-D-glicopiranosil- 3β,16β-diidróxi-5α-pregnan-20-ona-16-O- [ácido 5-O-β-D-glicopiranosil-5-hidróxi-4- metil-pentanoico] éster 26-O-β-D- glicopiranosídeo, ácido sucrosil ferúlico, 7- O-metil-10-oxitimol gentiobiosídeo	rizoma	Ll et al., 2007
	taxifolina, neoastilbina, astilbina, neoisoastilbina, isoastilbina	rizoma	CHEN et al., 2007
	neosmitilbina	rizoma	CHEN et al., 2002

	Substância	Parte da planta	Referência
	astilbina, 3-O-metilastilbina	rizoma	GUO et al., 2007
	β-ciclodextrina astilbina, taxifolina, ácido 5-O-cafeoil chiquímico, ácido chiquímico, trans-resveratrol	rizoma	ZHANG et al., 2009
	trans-resveratrol, trans-resveratrol-3-O- glicopiranosídeo, 3-O-glicopiranosil diosgenina, saponina, pocianidina B2	rizoma	KUBOTA et al., 2010
Smilax sieboldii	smilaxina A, smilaxina B, smilaxina, sieboldiina A, sieboldiina B, laxogenina-3- O-α-L-arabinopiranosil $(1\rightarrow 6)$ -β-D- glicopiranosídeo, laxogenina-3-O-β-D- glicopiranosil $(1\rightarrow 4)$ -[α-L-arabinopiranosil $(1\rightarrow 6)$]-β-D-glicopiranosídeo, tigogenina- 3-O-β-D-glicopiranosil- $(1\rightarrow 4)$ -[α-L- arabinopiranosil $(1\rightarrow 6)$]-β-D- glicopiranosídeo, sieboldogenina-3-O-β-D- glicopiranosídeo, sieboldogenina-3-O-β-D- glicopiranosídeo, sieboldogenina-3-O-β-D- glicopiranosídeo, sieboldogenina-3-O-β-D- glicopiranosídeo, sieboldogenina 3-O-α-L-arabinopiranosil $(1\rightarrow 6)$ -β-D-glicopiranosídeo, sieboldogenina, 5α,25(S)-spirostano-6- ona-3β,27-diol	rizoma	WOO, DO & SON, 1992
Smilax	quercetina, canferol, isoramnetina	rizoma	RUGNA, GUMI & WAGNER, 2002
campestris	quercetina, canferol, isoramnetina, rutinosídeo, quercetina 3-O-glucosídeo, canferol 3-O-glucosídeo e leucoantocianidinas	rizoma	RUGNA et al., 2007
Smilax bracteata	(2S,3S)-5-O-β-D-glicopiranosiloxi-6-metil- 3'-metóxi-3,7,3'-triidroxiflavona, (2S,3S)-5- O-β-D-glicopiranosiloxi-6-metil-4'-metóxi- 3,7,4'-triidróxi flavanona, 3β-(3',5'- diidroxifenil)-2-α-(4"-hidroxifenil)- diidrobenzofurano-5-carbaldeídeo (1-p-O- coumaroil-6-O-feruroil)-β-D-frutofuranosil- α-D-glicopiranosídeo, (1-p-O-coumaroil- 3,6-di-O-feruroil)-β-D-frutofuranosil-α-D- glicopiranosídeo, (6-O-feruroil)-β-D- frutofuranosil-(6-O-acetil)-α-D- glicopiranosídeo	rizoma	LI et al, 2002

	Substância	Parte da planta	Referência
	smilasídeos G–L, helonioisídeo A, heloniosídeo B, smilasídeo E, (1- <i>p</i> -Ο- coumaroil-6-O-feruroil)-β-D-frutofuranosil- α-D-glicopiranosídeo	rizoma	ZHANG et al., 2008
Smilax riparia	apigenina 7-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo, catequina-(4 α \rightarrow 6)- epicatequina, apigenina 7-O- α -L- ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D- glicopiranosídeo,	folhas	CHO et al., 2003
	3-O-α-L-ramnopiranosil- $(1\rightarrow 2)$ -[α-L- ramnopiranosil- $(1\rightarrow 6)$]-β-D-glicopiranosil; 3β,20α-diidroxi-5α-furostano-22(23)-ena 26-O-β-D-glicopiranosídeo, riparosídeo B, 3-O-α-L-ramnopiranosil- $(1\rightarrow 2)$ -[α-L- ramnopiranosil- $(1\rightarrow 6)$]-β-D-glicopiranosil 3β,16β-diidroxi-5α-pregnano-20-ona 16-O- [ácido 5-O-β-D-glicopiranosil 5-hidroxi-4- metil-pentanoico] éster 26-O-β-D- glicopiranosídeo, ácido éster sucrosil ferúlico e 7-O-metil-10-oxitimol gentiobiosídeo	rizoma	LI et al, 2006
	diidrocanferol, 3, 5, 4'-triidroxistilbena, 3, 5, 2', 4'-tetraidroxistilbena, diidrocanferol 3-O-α-L-ramnosídeo engeletina e quercetina 4'-O-β-D-glicosídeo	rizoma	FENG et al., 2003
	canferol-7-O-β-D-glicosídeo	rizoma	LI et al., 2007
	taxifolina-3-O-glicosídeo, trans- resveratrol, oxiresveratrol, engeletina, resveratrol, scirpusina A	rizoma	SHAO et al., 2007
Smilax	canferol-7-O-α-L-ramnopiranosídeol, canferol-3,7-O-α-L-diramnopiranosídeol	folhas	CHA e LEE, 2007
china	astilbina, canferol-7-Ο-β-glicosídeo		XU et al., 2008
	diidrocanferol-S-O-β-D-glicosídeo, diidroquercetina-3-O-glicosídeo, 3, 5, 7, 3', 5'-pentaidroxi-flavanonol, astilbina, quercetina-3'-O-glicosídeo, scirpusina A, trans-resveratrol, resveratrol, engeletina, isoengeletina, oxiresveratrol	rizoma e raízes	SHAO, GUO e GUO, 2009
	resveratrol, oxiresveratrol, 3, 5, 3', 4' - tetraidroxil astilbina	rizoma	ZHAO et al., 2009

	Substância	Parte da planta	Referência
Smilax	canferol, quercetina, isoramnetina, canferol-7-O-β-D-glicopiranosídeo, diidrocanferol	rizoma	XU et al., 2004
DOCKII	engeletina, isoengeletina, n-butil-β-D- frutopiranosídeo, ácido caféico	rizoma	XU et al., 2005
Smilax	diidrocanferol, canferol, astilbina,	rizoma	YANG e
ferox	engeletina, resveratrol e β-sitosterol	nzoma	GUO, 2010
Smilax corbularia	(2R,3R)-2"-acetil astilbina, (2R,3R)-3"- acetil astilbina, (2R,3R)-4"-acetil astilbina, (2R,3R)-3"-acetil engeletina, (2R,3S)-4"- acetil isoastilbina, 2-(4-hidroxifenil) - 3, 4, 9, 10 – tetraidro - 3, 5 - diidroxi -10-(3, 4- diidroxifenil)-(2R,3R,10R)-2H,8H-benzo [1, 2-b:3, 4-b] dipiran-8-ona, 2-(4- hidroxifenil)-3,4,9,10-tetraidro-3, 5-diidroxi- 10-(3, 4-diidroxifenil)-(2R, 3R, 10S)-2H, 8H-benzo [1,2-b:3,4-b] dipiran-8-one, 3,4- diidro-7-hidroxi-4-(3,4-dihidroxifenil)-5- [(1E)-2-(4-hidroxifenil) etenil]-2H-1- benzopiran-2-ona, 3,4-diidro-7-hidróxi-4- (3,4-dihidroxi-fenil) 5-[(1E)-2-(3,4- dihidroxifenil) etenil]-2H-1-benzopirano-2- 1, 3,4-diidro-7-hidroxi-4-(4-hidroxi-3- metoxifenil)-5-[(1E)-2-(4-hidroxifenil) etenil]-2H-1-benzopiran-2-ona, e 5,7,3',4'- tetrahidroxi-3-fenilcoumarina	rizoma	WUNGSINT AWEEKUL et al. 2011
Smilax aspera	(25S)-26-O- β -D-glicopiranosil-5 β - furostano-1 β ,3 β ,22 α ,26-tetraol-1-O- β -D- glicopiranosídeo, (25S)-26-O- β -D- glicopiranosil-5 β -furostano-1 β ,2 β ,3 α ,26- hexaol e (25S)-26-O- β -D-glicopiranosil-5 β - furostano-3 β ,22 α ,26-triol-3-O- α -L- ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D- glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D- glicopiranosídeo e (25S)-26-O- β -D- glicopiranosídeo e (25S)-26-O- β -D- glicopiranosíl-5 β -furostano-3 β ,22 α ,26-triol- 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D- glicopiranosídeo; trans-resveratrol; (+) catequina; (-) epicatequina	rizoma	IVANOVA et al, 2011

Abaixo são apresentadas as estruturas de algumas substâncias isoladas no gênero Smilax (Figura 9).





Para o isolamento dos compostos de espécies do gênero Smilax foram utilizados vários métodos: CLAE, sistema eletroforese (CE)-DAD, sonificação, microondas, contra corrente e diversas resinas, como: sílica gel, Sephadex, amberlite XAD e celulose; foram identificados por CLAE, RMN ¹H e ¹³C e espectrometria de massas (m/z) (CHEN et al., 2007; YANG et al., 2008; ZHANG et al., 2009; IVANOVA et al., 2011).

Para a determinação estrutural de flavonoides a ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C) é uma técnica bastante útil, por meio da relação entre energia absorvida e a frequência, medida na faixa de megahertz (MHz) do espectro eletromagnético. Este método é útil para identificar a origem e a pureza dos produtos estudados (CORREIA; SKOOG, 2002) o que possibilita determinar o tipo de flavonoide, analisando os sinais relativos ao anel C e o padrão de substituição para o anel A e B.

A demanda, aliada à vasta diversidade brasileira, surge como uma grande oportunidade e indica a necessidade de estudos de bioprospecção, assumindo que a flora brasileira é verdadeiramente um valioso e promitente acervo de novas e potenciais substâncias.

Contudo, é necessário reconhecer que pesquisas sobre a composição química, a atividade biológica, o modo de ação, a eficiência no sistema de produção e a toxicidade de plantas e respectivos metabólitos são indispensáveis para o uso seguro dos produtos alternativos.

Assim, considerando a importância da biodiversidade, da bioprospecção de novas moléculas e da classe de flavonoides para a saúde, como já foi descrito, foram propostos os objetivos a seguir.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir para o estudo químico do gênero *Smilax* por meio do estudo fitoquímico da espécie *Smilax fluminensis* Steud., utilizando CLAE e avaliação do potencial antioxidante.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar flavonoides em extrato de folhas de Smilax fluminensis Steud., utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Avaliar o potencial antioxidante de extratos e frações, através da técnica de supressão de radicais livres, empregando-se o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH*);
- Isolar e elucidar a estrutura de flavonoides da espécie usando técnicas de cromatograficas, Ressonância Magnética Nuclear e espectrometria de massas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Solventes e equipamentos

As folhas foram selecionadas, lavadas em água corrente e secadas sob ventilação à temperatura ambiente por sete dias, a moagem foi num Triturador Trapp modelo TRF-70 1,5 CV, com granulometria média de 1,0 mm.

Os solventes utilizados no preparo dos extratos e na eluição das colunas cromatográficas (acetato de etila, acetona, clorofórmio, ácido acético, diclorometano, etanol e metanol) apresentaram pureza analítica.

A concentração do extrato foi feita sob pressão reduzida de 600 mmHg em evaporador rotativo IKA RV 05 basic, com temperatura média do banho termostático de 40 °C, equipado com bomba par a vácuo Kolbach modelo 131 1/4CV.

Para a leitura de absorbância na análise da atividade antirradicalar foi utilizado um espectrofotômetro UV-vis-Varian, modelo Cary 50, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e capacidade de 3,0 cm³ e leitura a 517 nm em temperatura ambiente de aproximandamente 25 °C.

Foram usados outros equipamentos: Balança analítica Shimadzu, modelo AY220, com capacidade máxima de 220,0000 g; Máquina de Gelo, Everest; Estufa de secagem e esterilização Solab; Ultra purificador de água, Gehaka, condutância máxima de 0,05 µScm⁻¹; banho ultrassônico Unique; micropipetas automáticas da Capp.

4.2 Cromatografia em camada delgada

As placas para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram preparadas com sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck e em cromatoplacas pré-preparadas de sílica gel 60 da Merck e eluídas com clorofórmio e metanol em proporções variadas, segundo a polaridade. Para

revelação das substâncias, as cromatoplacas foram expostas a vapores de iodo e irradiação de luz ultravioleta com $\lambda = 254$ nm e 366 nm em Câmara UV - Biothec.

4.3 Fase estacionária em sílica gel 60

As colunas cromatográficas de baixa pressão foram preparadas utilizando gel de sílica, com tamanhos de partícula de 60 A (70-230 mesh), marca Merck, que representou cerca de vinte vezes a massa da pastilha (extrato + sílica), sendo suspendida com o primeiro solvente da fase móvel do gradiente em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, metanol/água, água/ácido acético) e empacotada em coluna de vidro até total decantação e estabilização da sílica. A pastilha foi preparada com extrato incorporado à sílica na proporção de 1:1, a mistura foi homogeneizada até formar um pó fino e então aplicada no topo da coluna, seguido de eluição de acordo com gradiente crescente polaridade. As frações foram coletadas de acordo com o tamanho da coluna e da fração, variando entre 50 mL a 250 mL.

4.4 Fase estacionária composta por Sephadex[™] LH20

A fase estacionária Sephadex[™] LH20 (75,0 g) foi ativada em metanol (500 mL) como fase móvel e mantida em repouso por 24 horas, seguido de empacotamento em coluna de vidro (4,0 cm x 60,0 cm), sendo o solvente (metanol) de eluição passado até sua completa estabilização. O extrato (1,2 g) foi dissolvido com o mínimo possível de eluente e filtrado em cartucho de filtração C18 (Supelco) e então aplicado no topo da coluna, sendo eluído até completo esgotamento. A relação amostra x fase estacionária representou 40 pratos teóricos (proporcional a altura da amostra), coletando frações de 3,0 mL a 10 mL da amostra, visando a purificação do composto.

4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência UV/Vis (CLAE-UV)

As análises cromatográficas foram realizadas com um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), marca Varian Pro Star 325 UV/VIS equipado com detector UV-*dual wavelength*, operado por programa Galaxy.

A separação cromatográfica foi efetuada utilizando coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m), equipada com pré coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (4,0 x 3,0 mm).

Nas análises por CLAE-UV foram usados os solventes (acetonitrila, ácido trifluoroacético e metanol) pureza HPLC, obtidos comercialmente da Merck e os padrões utilizados foram: apigenina, canferol, quercetina, quercitrina e rutina adquiridos de Sigma *Life Science* e Fluka, os padrões amentoflavona e agastiflavona foram isolados de folhas de *Cenostigma macrophyllum, a* taxifolina foi isolada de folhas de *Casearia gossypiosperma* e hidroquinona foi isolada de folhas de *Casearia decandra* (VIEIRA JUNIOR, 2010). Estes padrões isolados tiveram suas estruturas elucidadas por análises de RMN de ¹H e ¹³C, espectrometria de massas e identificadas na Universidade Estadual de São Paulo, em Araraquara-SP.

4.5.1 Preparo das amostras para análise via CLAE (Clean-up)

Todos os extratos e frações analisadas via CLAE foram submetidas previamente à extração em fase sólida (SPE) em cartuchos (Supelco[®]) de fase reversa (C18) composto por: 500 mg de adsorvente, membrana filtrante de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) 17 mm x 0,45 µm (Varian Syringe Filter), sendo ativados com 4,0 mL de metanol e eluídos com 5,0 % de água ultra pura. Cada fração obteve o volume final da fase móvel de 5,0 mL, com concentração de 1000 ppm. As frações metanólicas foram filtradas em discos (Millipore[®]) com poro 0,45 µm, analisadas por CLAE-UV/*dual wavelength*.

4.5.2 Método de Análise por CLAE

A caracterização química das frações e subfrações seguiu a metodologia de Chen et al., (2007) e Soares (2010) com adaptações. O método de detecção simultânea foi realizado com padrões autênticos dos flavonoides taxifolina, quercitrina, rutina, quercetina, canferol, apeginina, agatisflavona e amentoflavona, cromatograma na Figura 17, (pág. 58).

As amostras do extrato bruto, frações e subfrações foram filtradas em cartucho de purificação Supelco e eluídas por CLAE utilizando o gradiente apresentado no Quadro 6 e detectadas a 254 nm e 360 nm.

Solvente A	TFA:H₂O	0,05:99,95 (V/V)
Solvente B	(TFA: ACN) (ACN/MeOH)	(0,05: 99,95) (20/80)(V/V)
Gradiente	0-50 min (5%B -100%B) 50-60 min (100%B)	
Fluxo	1,0 mL/min	
Volume de injeção	20,0 µL	

Quadro 6: Sistema cromatográfico utilizado nas análises de CLAE.

4.5.3 A quantificação de flavonoides

A quantificação de flavonoides foi feita pela área da integração dos picos gerados e correlacionados com a área do tolueno diluído à concentração de 20 ppm e as amostras injetadas (inclusive padrões) na concentração de 1000 ppm, destas soluções, utilizou-se: 50 µL de tolueno / 100 µL de amostra. Sendo preparada uma solução final composta por 150 µL. Devido a diluição da solução, o cálculo da concentração foi corrigido para 6,6 ppm de tolueno, considerado o solvente da solução final. Foi

escolhido o tolueno devido ao tempo de retenção diferente das substâncias presentes na amostra (Figura 18, p. 59 e Figura 19, p.60).

4.5.4 Fortificação da amostra com uso de padrão

Para comprovação da presença do flavonoide identificado por CLAE, que apresentou pico com alta concentração do flavonoide, foi realizada a fortificação da amostra. Para injetar no CLAE foi preparada uma solução composta pelo padrão do flavonoide identificado no cromatograma com concentração de 1000 ppm e as amostras também na concentração de 1000 ppm. Utilizou-se: 20 µL da solução padrão e 50 µL de amostra. Sendo preparada uma solução final composta por 70 µL. Devido a diluição da solução, o cálculo da concentração foi corrigido para 285 ppm, considerado o solvente da solução final.

4.6 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear foi realizada em equipamento Varian Modelo: Mercury 300 MHz. Os espectros unidimensionais de RMN de ¹H de ¹³C foram obtidos no Departamento de Química, da UFMT, e registrados em espectrômetro operando a 300 MHz para o núcleo de ¹H e 75 MHz para ¹³C, utilizando-se metanol deuterado da Merck em tubos de 5,0 mm com a amostra.

4.7 Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos no IQ – UNESP (Araraquara) em um espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Analitica, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi analisada no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS2,) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). A geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS) foram no modo positivo e negativo para os experimentos em múltiplos estágios (MSn), sob as seguintes condições: voltagem do capilar - 4 V, voltagem do *spray* - 5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSn realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O *software* Xcalibur versão 1.0 (Thermo Finigan®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

5. EXPERIMENTAL

5.1 Coleta e identificação da espécie

A planta foi coletada na Comunidade Tapaihuna, pertencente ao município de Nova Canaã do Norte – MT em 26/9/2010; autenticado por R. C. Z. Leitzke. Os espécimes foram identificados pela Profa. Dra. Regina Helena Potsch Andreata da Universidade de Santa Úrsula (USU), especialista em *Smilacaceas*. As excicatas desta espécie foram depositadas na coleção do Herbário da Universidade de Santa Úrsula (RUSU) (nº 254 e 256) e no Herbário Centro-Norte-Mato-Grossense (CNMT), da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), campus Sinop-MT (nº 1606, 1607 e 1608).

5.2 Preparo do extrato

O extrato bruto foi obtido a partir de 6,1 kg de folhas frescas que produziu 2,4 Kg de folhas secas em pó. O material vegetal foi acondicionadoem pote de vidro e misturado com 6,0 L de etanol. Em seguida, o recipiente foi hermeticamente fechado, o material foi deixado em maceração por uma semana, filtrado e eliminado o solvente por evaporação sob pressão reduzida, Figura 10 e Esquema 1.

O processo de extração foi repetido por mais cinco vezes, com o solvente evaporado sob pressão reduzida, reutilizando e completando o volume para 6,0 L, totalizando 20,0 L de etanol de pureza analítica - PA. Foi obtido 480,0 g de extrato bruto que foi parcialmente solubilizado com 1,5 L de metanol-água (1:1, V/V), o que resultou por filtração numa fração em suspensão com clorofila de 180,0 g e outra fração sem clorofila de 280,0 g, Esquema 1.



Esquema do tratamento aplicado ao extrato e frações de folhas de S. fluminensis

Esquema 1: Procedimento geral para a separação do extrato bruto de *Smilax fluminensis.*



Figura 10: a) Secagem das folhas, b) maceração, c) rotaevaporação e d) eluição em coluna de vidro.

5.3 Fracionamento do extrato sem clorofila

O extrato sem clorofila foi fracionado por extração em fase sólida com 300,0 g sílica gel 60 suspendida em hexano, e empacotada em funil de decantação com volume de 4,0 L, numa altura de 25,0 cm, eluída com hexano até completa estabilização da fase estacionária. Sobre a sílica foi depositada a pastilha (280,0 g de extrato e 114,0 g sílica), e a eluição foi com: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, metanol-água (9:1, V/V) e metanol/água/ácido acético (7:3:1, V/V), produzindo 18 frações. As frações foram concentradas por evaporação sob pressão reduzida e analisadas por CLAE e por ensaio *in vitro* do potencial antioxidante com DPPH[•], com exceção das frações metanólicas F8 e F16, pois foram fracionadas em coluna cromatográfica, e não foi reservado nenhuma alíquota das mesmas para análises posteriores (Esquema 2, p.36 e Tabela 1, p.37).



Esquema 2: Procedimento utilizado para a separação do extrato bruto de *Smilax fluminensis*.

Código	Eluente	Massa (g)
F1	Hexano	0,0
F2	Diclorometano	2,31
F3	Acetato de etila	2,01
F4	Acetato de etila	8,06
F5	Acetato de etila	1,59
F6	Metanol	5,01
F7	Metanol	16,98
F8	Metanol	28,20
F9	Metanol	27,52
F10	Metanol	25,28
F11	Metanol	26,95
F12	Metanol	26,27
F13	Metanol	26,16
F14	Metanol	26,17
F15	Metanol	24,52
F16	Metanol	17,72
F17	Metanol/água (7:3)	4,42
F18	Água/ácido acético (9:1)	6,76

Tabela 1: Dados do fracionamento do extrato bruto de Smilax fluminensis

5.4 Estudo da fração F8

A fração F8 (28,2 g) foi fracionada em coluna cromatográfica de (6,0 cm x 65,0 cm) de acordo com a metodologia descrita no item 4.3, utilizando 890,0 g de sílica gel 60 (70-230 mesh), como fase estacionária, que representou cerca de vinte vezes a massa da pastilha (2,5 cm, extrato e sílica). A coluna foi empacotada com sílica e 1,0 L de acetato de etila até total decantação, sendo utilizado como eluente: acetato de etila (3,0 L), acetona (1,5 L), etanol (2,0 L), metanol (2,0 L), metanol/água (1,5 L), e água/ácido acético (2,0 L), que foram reutilizados após evaporação sob

pressão reduzida. Foram coletadas 135 frações para F8, com volume aproximado a 150 mL. O fracionamento do extrato, frações e subfrações, foi monitorado por CLAE (descrito no item 4.2) e CCD, possibilitando reagrupar as frações por semelhança na mobilidade cromatográfica, Esquema 3 e Tabela 2.

Código	Frações	Coluna	Eluente	Massa (mg)
F8	1-5		Acetato de etila	120
F8	6-10		Acetato de etila	94
F8	11-14		Acetato de etila	45
F8	15-20	А	Acetato de etila	2432
F8	21-44	SA	Metanol	92
F8	45-48	В	Metanol	2131
F8	49-55	SG	Metanol	2305
F8	56-84	С	Metanol	10660
F8	85-101		Metanol	6956
F8	102-112		Metanol	833
F8	113-117		Metanol/água (7:3)	1181
F8	118-135		Água/ácido acético (9:1)	1099

 Tabela 2: Dados do fracionamento da fração F8 de Smilax fluminensis



Esquema 3: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8 de *S. fluminensis*.

5.5 Estudo da fração F8-15-20, denominada coluna A

A primeira coluna cromatográfica foi denominada coluna A, eluída a partir da fração F8-15-20 (2,432 g). Esta fração foi sendo submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica (1,5 cm x 30,0 cm) composta de sílica gel 60 (70-230 mesh), (20 g), empacotada com clorofórmio, seguindo a metodologia descrita no item 5.4. Utilizou-se como eluente o gradiente de polaridade de clorofórmio, metanol, metanol/água, e água/ácido acético. Foram coletadas 35 frações com aproximadamente 20 mL, dando origem as frações A1 a A35 que foram reagrupadas em oito frações por análise em CCD e CLAE. Não houve isolamento de substância, Esquema 4 e Tabela 3.



Esquema 4: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-15-20 de *Smilax fluminensis*.

nunninensi	3		
Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
А	1-7	Clorofórmio	128
А	8	Clorofórmio	142
А	9-11	Metanol	273
А	12-17	Metanol	523
А	18-24	Metanol	474
А	25-29	Metanol	271
А	30-32	Metanol	491
А	33-35	Metanol/água (7:3)	58

Tabela 3: Dados do fracionamento da fração F8-15-20 de Smilax fluminensis

5.6 Estudo da fração F8-45-48, denominada coluna B

A coluna B eluída a partir da fração da F8-45-48 (2,131 g) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica (2,5 cm x 40,0 cm) de sílica gel 60, (70-230 mesh)(40 g), empacotada com clorofórmio. Utilizou-se como eluente o gradiente de polaridade de clorofórmio, metanol, metanol/água, e água/ácido acético. Foram coletadas 35 frações de 18 mL cada, dando origem as frações B1 a B35. Posteriormente, foram reunidas em nove novas frações pela semelhança cromatográfica em CCD e CLAE, porém não houve isolamento de substância. O tratamento destinado à fração F8-45-48 (B) está representado no Esquema 5 e Tabela 4.



Esquema 5: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-45-48 de *Smilax fluminensis*.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
В	1-4	Clorofórmio	420
В	5-10	Clorofórmio	715
В	11-14	Metanol	160
В	15-16	Metanol	103
В	17-18	Metanol	63
В	19-20	Metanol	82
В	22-25	Metanol/água (8:2)	6,2
В	26-30	Metanol/água (6:4)	23,7
В	31-35	Água/ácido acético (9:1)	27,7

Tabela 4: Dados do fracionamento da fração F8-45-48

5.7 Estudo da fração F8-56-84, denominada coluna C

A fração F8-56-84 (10660 mg) foi submetida a um fracionamento dando origem a coluna cromatográfica C, eluída em coluna de vidro de 3,5 cm x 60,0 cm, preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh)(100 g), empacotada com metanol, seguindo um gradiente de polaridade de metanol, metanol/água, e água/ácido acético, seguindo a metodologia descrita no item 5.4. Foram coletadas 33 frações de aproximadamente 25 mL cada, dando origem as frações C1 a C33. Posteriormente, foram reunidas em seis novas frações pela semelhança cromatográfica em CCD e CLAE, conforme a Tabela 5, porém não houve isolamento de substância. O tratamento destinado à fração F8-56-84 (C) está representado no Esquema 6 e Tabela 5.



Esquema 6: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-56-84 de *Smilax fluminensis*.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)		
С	1-2	Metanol	420		
С	3-6	Metanol	450		
С	7-8	Metanol	530		
С	9-16	Metanol/água (8:2)	4540		
С	17-23	Metanol/água (6:4)	1043		
С	24-33	Água/ácido acético (9:1)	3114		

Tabela 5: Dados do	fracionamento	da fração	F8-56-84
--------------------	---------------	-----------	----------

5.8 Estudo da fração F8-21-44, denominada coluna SA

A fração F8-21-44 SA (92,0 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica (3,5 cm x 60,0 cm) de Sephadex LH20 (60 g), empacotada com metanol seguindo a metodologia descrita no item 4.4 e eluída em sistema isocrático com metanol, coletando-se um total de 58 frações de aproximadamente 4,0 mL cada. Posteriormente, foram reunidas em três novas frações pela semelhança cromatográfica em CCD e CLAE, conforme a Tabela 6 e Esquema 7.



Esquema 7: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-21-44 de *Smilax fluminensis*.

Tabela 6: Dados do fracionamento da fração F8-21-44						
Código	Frações	Eluente	Massa (mg)			
SA	1-16	Metanol	32			
SA	17-33	Metanol	42			
SA	34-58	Metanol	17			

Recuperou-se 98,9 % do material cromatografado.

5.9 Estudo da fração F8-49-55, denominada coluna SG

A fração F8-49-55 (1555 mg) foi submetida à filtração em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) por três vezes, visando a separação dos flavonoides, variando lentamente a polaridade dos solventes, porém com esta metodologia não foi possível. A fração foi completamente reagrupada
descartando apenas as frações retidas na sílica. Para a purificação foi utilizada como fase estacionária a Sephadex LH-20, empacotada conforme a descrição do item 4.4 e eluída em sistema isocrático com metanol resultando em 230 subfrações de aproximadamente 4,0 mL cada, posteriormente foram reagrupadas em doze frações devido à semelhança em CCD e CLAE, conforme a Tabela 7 e Esquema 8.



Esquema 8: Procedimento utilizado para fracionamento da fração F8-49-55 de *Smilax fluminensis*.

Tabela 1. Dadee da initiação em Cophadex En 20 da nação 10 10 00							
Código	Frações	Eluente	Massa (mg)				
SG	1-10	Metanol	19				
SG	11-40	Metanol	36				
SG	41-53	Metanol	93				
SG	54-82	Metanol	654				
SG	83-95	Metanol	37				
SG	96-115	Metanol	119				
SG	116-124	Metanol	58				
SG	125-149	Metanol	91				
SG	150-164	Metanol	32				
SG	165-200	Metanol	67				
SG	201-215	Metanol	29				
SG	216-230	Metanol	36				

Tabela 7: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração F8-49-55

Recuperou-se 81,7 % do material adsorvido.

A seguir são apresentados cromatogramas das frações semi purificadas obtidas da coluna SG para análise de RMN, Figura 11.



Figura 11: Cromatogramas das frações: a) SG116-124; b) SG125-149; c) SG150-161 e d) SG201-215; obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo1,0 mL/min.

Purificação da fração SG116-124

A substância SG116-124 (58,0 mg) foi isolada da fração metanólica F8-49-55 de *S. fluminensis*, por eluição com metanol em coluna aberta de Sephadex LH20 e o produto obtido apresentou-se como um sólido amorfo, amarelo escuro, solúvel em metanol.

A análise deste sólido não possibilitou sua identificação por CLAE, pois apresentou tempo de retenção (22 min), diferente dos padrões comerciais utilizados, (Figura 11a, p.45). No entanto, foi identificado por RMN ¹H e m/z, itens 4.6 e 4.7, como: Quercetina-[3-O- α -L-ramnopiranosídeol(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glicopiranosídeo]-7-O- α -L-ramnopiranosídeo.

Purificação da fração SG125-161

As substâncias SG125-149 (91,0 mg) e SG150-161 (32,0 mg) foram isoladas da fração metanólica F8-49-55 de *S. fluminensis*, por eluição com metanol em coluna aberta de Sephadex LH20 e o produto obtido apresentou-se como um sólido amorfo, amarelo escuro, solúvel em metanol.

Este sólido não pode ser identificado por CLAE porque apresentou tempo de retenção (25,6 min) diferente dos padrões comerciais utilizados, (Figuras 11b e Figura 11c, p.45). Após as devidas análises as frações foram reagrupadas com a fração SG125-149 e SG150-161, e posteriormente, após análises de comparação entre estas frações, as mesmas foram reagrupadas na fração SG125-161. No entanto, foi identificado por RMN ¹H e RMN ¹³C, itens 4.6, como: Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina).

46

Purificação da fração SG201-215

A substância SG201-215 (29 mg) foi isolada da fração metanólica F8-49-55 de S. fluminensis, por eluição com MeOH em coluna aberta de Sephadex LH20 e o produto obtido apresentou-se como um sólido amorfo, amarelo escuro, solúvel em metanol,

A análise deste sólido por CLAE apresentou tempo de retenção (31.4 min), semelhante ao padrão comercial rutina, (Figura 11d, p.45), No entanto, foi identificado por RMN ¹H, RMN ¹³C e m/z, itens 4.6 e 4.7, como: Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo(1''' \rightarrow 6'')-O- β -D-glicopiranosídeo.

5.10 Estudo da fração F15, denominada coluna SD

A fração F15 (24,52 g) foi escolhida para purificação devido ao grande número de picos no cromatograma na região dos flavonoides (Figura 46) e seu alto valor no teste de potencial antioxidante. Uma parte da fração F15 (1,1 g) foi submetida à separação em coluna de Sephadex LH-20, empacotada com metanol seguindo a metodologia descrita no item 4.4 e eluída em sistema isocrático com metanol resultando em 153 frações de aproximadamente 5.0 mL cada. Posteriormente, foram reunidas em sete novas frações devido à semelhanca em CCD e CLAE, Tabela 8.

Tabe	Tabela 8: Dados da littração em Sephadex LH-20 da fração F15 (1,1 g)								
(Código	Frações	Eluente	Massa (mg)					
	SD	1-21	Metanol	53,2					
	SD	22-36	Metanol	107,6					
	SD	$\textbf{37-52} \rightarrow \textbf{SF}$	Metanol	192,8					
	SD	53-70	Metanol	145,0					
	SD	71-84	Metanol	184,3					
	SD	85-124	Metanol	189,5					
	SD	125-153	Metanol	246,3					

Recuperou-se 93,2 % do material cromatografado.

5.11 Estudo da fração F15, denominada coluna SE

Mais uma parte da fração F15 (1,2 g) foi submetida à filtração em coluna de Sephadex LH-20, para obter uma quantidade maior de massa. Esta foi eluída com metanol resultando em 150 frações de aproximadamente 5,0 mL cada, que posteriormente foram reunidas em oito novas frações devido à semelhança em CCD e CLAE, Tabela 9. A análise das frações obtidas neste fracionamento não possibilitou o isolamento de nenhuma substância pura.

Tabela 9: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração F15 (1,2 g)							
Código	Frações	Eluente	Massa (mg)				
SE	1-15	Metanol	47				
SE	16-25	Metanol	118				
SE	$\textbf{26-49} \rightarrow \textbf{SF}$	Metanol	489				
SE	50-61	Metanol	125				
SE	62-75	Metanol	163				
SE	76-96	Metanol	78				
SE	97-129	Metanol	86				
SE	130-150	Metanol	42				

Recuperou-se 95,6 % do material analisado.

5.12 Estudo da fração SD37-52 e SE26-49, denominada coluna SF

As frações SD37-52 e SE26-49 foram reagrupadas conforme a semelhança dos cromatogramas formando a coluna SF (1294 mg) e que foi submetida à filtração em coluna de Sephadex LH-20, para obter uma quantidade maior de massa. Esta foi eluída com metanol resultando em 165 frações de aproximadamente 4,0 mL cada, que posteriormente foram reunidas em onze novas frações devido à semelhança em CCD e CLAE , conforme a Tabela 10.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
SF	1-8	Metanol	10
SF	6-9	Metanol	19
SF	10-22	Metanol	77
SF	23-42	Metanol	60
SF	43-54	Metanol	88
SF	54-68	Metanol	145
SF	69-75	Metanol	96
SF	76-96	Metanol	126
SF	97-124	Metanol	184
SF	125-153	Metanol	204
SF	154-165	Metanol	131

Tabela 10: Dados da separação em Sephadex LH-20 da fração SD37-52 (495 mg) e SE26-49 (799 mg) total 1294 mg.

Recuperou-se 88,1 % do material adsorvido.

5.13 Estudo da fração SC35-47, denominada coluna SH

A fração SC35-47 (44,7 mg) foi submetida à separação em coluna de Sephadex LH-20. Foi eluída com metanol resultando em 50 subfrações de aproximadamente 3,0 mL cada, posteriormente foram reagrupadas em seis frações devido à semelhança em CCD e CLAE, Tabela 11.

Tabela 11: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração SC35-47							
Código	Frações	Eluente	Massa (mg)				
SH	1-18	Metanol	16,4				
SH	19-22	Metanol	1,6				
SH	23-28	Metanol	2,1				
SH	29-32	Metanol	3,5				
SH	33-36	Metanol	5,4				
SH	37-50	Metanol	9,8				

Recuperou-se 86,8 % do material adsorvido.

Purificação da fração SH23-28

A substância SH23-28 (2,1 mg) foi obtida da fração SC35-47, por eluição com MeOH em coluna aberta de Sephadex LH20, o produto obtido apresentou-se como um sólido de coloração amarelada, solúvel em metanol. Na Figura 12, encontra-se a análise deste sólido por CLAE. Por análise de EM/EM (Figura 13), foi encontrado o valor m/z 627,09 sugerindo que tenha uma aglicona quercetina e dois grupos glicosilados, porém não foram realizados análise de RMN, por insuficiência de massa.



Figura 12: Cromatograma da fração SH23-28 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando o solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente o B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 13: Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) da fração SH23-28.

Purificação da fração SH29-32

A substância SH29-32 (3,5 mg) foi obtida da fração SC35-47, por eluição com metanol em coluna aberta de Sephadex LH20, o produto obtido apresentou-se como um sólido de coloração amarelada, solúvel em metanol. A análise deste sólido por CLAE e CCD apresentou tempo e fator de retenção semelhante ao padrão comercial quercitrina, sugerindo ser um flavonoide (Figura 14) confirmado por espectrometria de massas (Figura 15) e por fortificação da fração com quercetina seguindo o método proposto no item 4.5.4, p.31 (Figura 35, p.88).



Figura 14: Cromatograma da fração SH29-32 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando o solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e o Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 15: Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) da fração SH29-32.

5.14 Estudo da fração F16

F16 (17,72 g) foi fracionada em coluna cromatográfica de (6,0 cm x 65 cm) utilizando 890,0 g de sílica gel 60 (70-230 mesh), como fase estacionária em 50,0 cm, que representou cerca de vinte vezes a massa da pastilha 2,5 cm (extrato e sílica), que foi preparada com extrato incorporado à sílica na proporção de 1:1, homogeneizada até formar um pó fino e então aplicada no topo da coluna, seguindo a metodologia descrita no item 4.3. A sílica gel 60 foi suspendida em 1,0 L de acetato de etila e empacotada em coluna de vidro até total decantação da fase estacionária e, eluída gradiente de polaridade: acetato de etila (1,5 L) e metanol (8,0 L). Os solventes foram reutilizados após evaporação em pressão reduzida. Foram coletadas 61 frações para F16, com volume aproximado a 150 mL. O fracionamento do extrato, fração e subfrações, foi monitorados por CLAE (descrito no item 4.5) e CCD, possibilitando reagrupar as frações pela semelhança na mobilidade cromatográfica em Sete novas frações pela semelhança cromatográfica em CCDA, conforme Esquema 1 (p.34) e Tabela 12.

······································							
Código	Frações	Eluente	Massa (mg)				
F16	1-8	Acetato de etila	20,5				
F16	9-13	Metanol	361,9				
F16	$14-21 \rightarrow SC$	Metanol	510,0				
F16	22-33	Metanol	4171,0				
F16	34-39	Metanol	379,5				
F16	40-49	Metanol	235,9				
F16	50-61	Metanol	393,4				

 Tabela 12: Dados do fracionamento em sílica gel 60 da fração F16

5.15 Estudo da fração F16-14-21, denominada coluna SC

A fração F16-14-21 (510 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de Sephadex LH20 (60 g), empacotada com metanol seguindo a metodologia descrita no item 4.4 e eluída em sistema isocrático com metanol, coletando-se 47 frações de 20 mL cada. Posteriormente, foram reunidas em 13 novas frações pela semelhança cromatográfica em CCDA, Tabela 13.

(Frações - SC)			
Código	Frações	Eluente	Massa (g)
SC	1-11	Metanol	102
SC	12-26	Metanol	285
SC	27-34	Metanol	70
SC	35-47	Metanol	45

Tabela 13: Dados da filtração em Sephadex LH-20 da fração F16-14-21 (Frações - SC)

Recuperou-se 98,4% do material adsorvido.

5.16 Teste do Potencial Antioxidante

No teste do potencial antioxidante foram analisadas as frações e subfrações do extrato de *S. fluminensis*, seguindo a metodologia de Miranda e Fraga (2006), usando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), como fonte de radical livre.

O potencial antioxidante foi determinado pela capacidade do extrato sequestrar o radical livre DPPH[•] (Figura 8, p.15). Este método baseia-se no potencial do radical DPPH[•] oxidar flavonoides ou compostos fenólicos presentes no extrato.

As amostras foram preparadas nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 10, 15, 30, 50 µg/mL das quais foi utilizado 1,0 mL de cada, e adicionado a 0,5 mL da solução de DPPH[•] 0,004% em metanol. As soluções foram agitadas e mantidas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo reacional ocorreu a leitura de absorbância a 517 nm, em espectrofotômetro. Como branco foi utilizado 1,0 mL da solução metanólica do extrato e 0,5 mL de metanol. Como controle positivo foi utilizado 1,0 mL do padrão de quercetina, na concentração de 1000 µg/mL em metanol e 0,5 mL de solução de DPPH[•]. Como controle negativo foi utilizado 1,0 mL de metanol e 0,5 mL de solução de DPPH[•]. O potencial antioxidante foi calculado como a porcentagem do radical DPPH[•], que reagiu com o extrato (% DPPH seqüestrado).

A porcentagem da atividade antirradicalar foi calculada por [A_{DPPH}-(A_{amostra}-A_{branco})]x100/A_{DPPH} (onde A_{DPPH} é a absorbância do DPPH, A_{amostra} é a absorbância de DPPH da amostra e A_{branco} é a absorbância do branco). As atividades foram determinadas por triplicata e os resultados expressos pelas médias dos valores encontrados. A concentração efetiva CE₅₀, foi definida pelo decréscimo em 50% da concentração de DPPH calculados a partir dos resultados encontrados, que foram expressos pela porcentagem de sequestro de DPPH e pela concentração efetiva que é quantificado pela leitura espectrofotométrica.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados de identificação e quantificação de flavonoides por CLAE nas frações, a avaliação do potencial antioxidante das principais frações e elucidação de alguns flavonoides por técnicas de RMN e espectrometria de massas.

6.1 Substâncias identificadas por CLAE no extrato e frações de Smilax fluminensis

A identificação e quantificação de flavonoides do extrato a partir das folhas de *Smilax fluminensis* foram determinadas por meio da CLAE, cujos cromatogramas foram adquiridos a 254 nm e 360 nm, de acordo com o método descrito na seção 4.5 (p.29). Os flavonoides encontrados mostraram sua absorção máxima no ultravioleta, próximo a esses comprimentos de onda (Tabela 14).

Flavonoides, concentração em µg/mL									
Frações/ subst.	Taxifolina	Quercitrin	aRutina	Quercetina	Canferol	Apigenina	Agatisflavona	Amentoflavona	Total
(min.)	28,1	30,2	31,6	34,8	38,1	38,5	40,9	44,1	Σ
Extrato bruto	78	4	11	8	14	15	7	62	199
F3	2	3	2	3	2	4	1	1	18
F4	1	5	4	2	3	2	3	1	21
F5	2	3	8	1	2	1	-	-	17
F6	1	-	1	7	2	2	1	1	15
F7	5	3	5	12	6	4	1	3	39
F9	3	-	10	5	5	3	2	23	51
F10	1	-	9	14	5	3	2	19	53
F11	7	5	4	6	5	2	2	16	47

Tabela 14 : Compostos fenólicos identificados no extrato das folhas de S.

 fluminensis

Flavonoi	Flavonoides, concentração em µg/mL								
Frações/ subst.	Taxifolina	Quercitrina	Rutina	Quercetina	Canferol	Apigenina	Agatisflavona	Amentoflavona	Total
(min.)	28,1	30,2	31,6	34,8	38,1	38,5	40,9	44,1	Σ
F12	-	2	2	3	-	-	-	20	27
F13	5	11	6	7	4	5	2	22	62
F14	17	7	7	9	4	4	1	25	74
F15	11	18	-	7	2	2	5	1	46
F17	5	-	11	19	8	5	4	17	69
SA1-16	1	31	83	5	1	1	1	2	125
SA17-33	8	7	15	3	-	3	1	1	38
SD37-52	5	38	-	6	-	-	1	-	50
SD53-70	5	17	15	12	-	1	-	-	50
SE26-49	5	8	2	-	-	-	-	1	16
SE50-61	3	78	-	2	-	-	-	-	83
SE62-75	4	98	-	2	1	-	-	-	105
B26-30	2	-	-	-	-	-	-	-	2
B31-35	-	31	9	9	-	-	3	1	53

Tabela 14 (cont.)

Dados obtidos por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B) fluxo1,0 mL/min.

Não foram apresentados os resultados das frações F8 e F16, pois haviam sido analisadas em outra proporção de solventes e tempo de eluição (Solvente B: MeOH/ACN, 74:26 e solvente A: H₂O/AcOH, 99:1, V,V) tempo de corrida de 20 minutos num sistema isocrático e coluna Varian Pro Star (com grande alargamento de pico e baixa separação) e não foi reservado nenhuma parte das amostras. A fração F1, obtida com hexano não apresentou massa e a fração F2 não foi analisada, porque foi extraída com diclorometano e, o foco do trabalho eram os flavonoides. As estruturas dos padrões usados na CLAE (Figura 16) e cromatogramas da mistura dos padrões e do extrato estão representados na Figura 17 e 18.



Figura 16: Estrutura dos padrões usados na CLAE.



Figura 17: Cromatograma mistura de padrões foi obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando o solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo1,0 mL/min.



Figura 18: Cromatograma do extrato bruto foi obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando o solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo1,0 mL/min.



Figura 19: Cromatograma do extrato bruto com tolueno obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando o solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.

Através das análises por CLAE foram identificados oito flavonoides: taxifolina, quercitrina, rutina, quercetina, canferol, apigenina, agatisflavona e amentoflavona. A presença de flavonoides foi comprovada por comparação do tempo de retenção com os padrões externos, que foram injetados separadamente, Figura 17, p.58). O resultado da somatória da concentração de flavonoides variou entre 2 µg/mL e 125 µg/mL nas frações e 199 µg/mL no extrato bruto filtrado, representando a concentração em relação ao padrão interno (Tabela 14, p.55).

Os flavonoides foram quantificados pelo cálculo da área do pico em estudo, comparado com a área do tolueno, resultando na concentração em micrograma de flavonoides por grama de extrato (µg/mL).

No trabalho desenvolvido por Chen *et al.*, (2007) conseguiram identificar: taxifolina, neoastilbina, astilbina, neoisoastilbina e isoastilbina, contida no rizoma *S. glabra*. O método proposto pelos autores visou determinar a linearidade, a precisão e a estabilidade de cada analito. Foi desenvolvido um método para CLAE usando uma curva de calibração para quantificação e com fortificação das amostras (acrescentando uma alíquota de flavonóide conhecido), em que o método comprovou ser simples, reprodutível, sensível, rápido e confiável e que foi completamente validado.

Em outro estudo foram identificadas e quantificadas por CLAE as substâncias: taxifolina-3-O-glicosídeo, resveratrol 3-β-mono-D-glicosídeo, oxiresveratrol, engeletina, resveratrol e scirpusina A, num estudo com rizomas de *Smilax china*. A identificação ocorreu por comparação com padrões externos que foram injetados separadamente e quantificados usando uma curva de calibração (SHAO et al., 2007).

Além dos flavonoides identificados também foram encontrados muitos compostos não identificados (aproximadamente 40 compostos). Estes compostos não foram identificados por não haver padrões autênticos para comparação. Por isso foram tabelados separadamente como compostos não identificados, Tabela 15.

61

	Compostos, concentração em µg/mL								
Fração∖ Tempo (min)	11-20*	20-25*	26-30*	31-35*	36-40*	41-45*	46-50*	51-60*	Σ
Extrato bruto	75	4	136	65	93	23	318	684	1398
F3	59	42	16	13	19	6	4	5	164
F4	3	3	1	12	14	10	7	19	69
F5	12	15	4	10	6	-	3	-	50
F6	3	5	3	23	20	2	7	3	66
F7	5	27	15	55	33	4	10	1	151
F9	30	25	10	31	17	4	14	4	134
F10	24	21	7	12	22	9	11	7	113
F11	8	16	9	27	15	10	11	5	102
F12	24	9	-	29	32	-	-	-	95
F13	32	28	7	27	23	17	24	10	168
F14	1	15	19	46	21	7	1	-	111
F15	18	-	12	31	21	10	10	-	102
F17	7	7	12	19	41	20	-	-	106
SA1-16	24	12	21	12	10	3	7	2	91
SA17-33	71	14	44	37	21	1	13	12	213
SD37-52	13	6	49	38	2	3	1	1	114
SD53-70	12	6	55	91	44	-	-	-	208
SE26-49	4	6	10	13	4	-	-	-	37
SE50-61	6	6	22	54	-	-	-	22	109
SE62-75	20	8	27	36	3	-	-	-	93
B26-30	5	12	1	3	-	-	10	4	36
B31-35	12	16	11	19	23	4	16	20	120

Tabela 15: Compostos não identificados no extrato e frações das folhas de *S. fluminensis*

Dados obtidos por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando o solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B) fluxo1,0 mL/min.

Considerando que os compostos não identificados com tempo de retenção entre 11 min. e 60 min., o resultado da somatória da concentração de todos os picos não identificados presentes nas frações que variaram entre 36 ppm e 213 ppm nas frações e 1398 ppm no extrato bruto filtrado, representando a concentração em relação ao padrão interno. A fração com menor concentração de flavonoides produziu um cromatograma com poucos picos, como B26-30 (anexo 1, Figura 61, p.129).

6.2 Isolamento, identificação e a elucidação estrutural de flavonoides e seus derivados

O estudo químico de *S. fluminensis* resultou no isolamento de cinco substâncias, identificadas como flavonoides, para as quais foram apresentadas propostas de elucidação por análise dos dados espectroscópicos de RMN ¹H e ¹³C, por espectrometria de massas, por comparação com dados obtidos da literatura e CLAE. Foram propostas estruturas para os componentes das seguintes frações: SG116-124, SG125-149, SG150-164, SG201-215 e SH29-32.

Os flavonoides isolados e identificados foram numerados e nomeados seguindo a metodologia abordada no *review* de Marston e Hostettemann (2006).

6.3 Dados físicos e cromatográficos das substâncias identificadas

SG116-124: Quercetina-[3-O-α-L-ramnopiranosil(1["]→6")-β-Dglicopiranosil]-7-O-α-L-ramnopiranosídeo. Aspecto: sólido amarelo escuro Fórmula molecular: $C_{33}H_{40}O_{20}$ Solubilidade: metanol e DMSO RMN ¹H: página 63. Massa molecular: 756 g/mol; página 69. CLAE: Figura 21b, página 68. **SG125-161:** Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina). Aspecto: sólido amarelo escuro Fórmula molecular: $C_{21}H_{20}O_{12}$ Solubilidade: metanol e DMSO RMN ¹H: página 74. RMN ¹³C: página 75. Massa molecular: 464 g/mol CLAE: Figura 24, página 73.

SG201-215: Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil(1^{'''} \rightarrow 6^{''})-O- β -D-glicopiranosídeo.

Aspecto: sólido amarelo escuro Fórmula molecular: C₂₇H₃₀O₁₆ Solubilidade: metanol e DMSO RMN ¹H: página 82; RMN ¹³C: página 83. Massa molecular: 610 g/mol CLAE: Figura 28, página 80.

SH29-32: Quercetina. Aspecto: Sólido amorfo amarelo Fórmula molecular: $C_{15}H_{10}O_7$ Solubilidade: metanol e DMSO Massa molecular: 302 g/mol, página 87 RMN ¹H: página 86.

6.4. Identificação e elucidação estrutural de flavonoides



6.4.1 Identificação e elucidação de SG116-124

Figura 20: Núcleo proposto para SG116-124: quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosil-[7-O- α -L-ramnopiranosídeo]

н	^a SG 116-124 *δH (ppm), m, <i>J</i>	^b (PIZZOLATTI, 2003) *δΗ (ppm), m, <i>J</i>
6	6,22 (d, 3,0)	6,42 (d, 2,2)
8	6,40 (d, 3,0)	6,75 (d, 2,2)
2'	7,62 (d, 3,0)	7,57 (d, 2,1)
5'	6,86 (d, 9,0)	6,86 (d, 8,4)
6'	7,67 (dd, 3,0/6,0)	7,67(dd, 2,1/8,5)
1"	5,07 (d, 3,0)	5,54 (d, 1,6)
2"	3,82 (dl)	3,84 (dd,1,6/3,3)
3"	3,63 (s)	3,63 (s)
4"	3,34 (s)	3,30 (s)
5"	3,36 (s)	3,35 (s)

Tabela 16: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹H obtidos para SG116-124 comparados com dados da literatura

65

	^a SG 116-124	^b (PIZZOLATTI, 2003)
Н	*δΗ (ppm), m, <i>J</i>	`*δΗ (ppm), m, <i>J</i>
6"	1,13 (d, 6,0)	1,12 (d, 6,1)
1""	4,52 (d, 1,0)	4,39 (d, 1,5)
2""	3,27, (s)	3,29 (s)
3'''	3,42 (s)	3,40(s)
4""	3,07 (dl)	3,08 (dl, 9,3)
5""	3,62 (s)	3,62 (s)
6""	1,11 (d, 6,0)	1,05 (d, 6,1)
1""	5,12 (sl)	5,34 (d, 7,7)
2""	3,40 (s)	3,38 (s)
3""	3,56 (s)	3,36
4""	3,58 (s)	3,58
5""	3,43 (sl)	3,39
6""	3,61 (s)	3,60 (dd)

Tabela 16 (cont.)

^a dados obtidos por RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD);

^b (600 MHz, DMSO d₆).

* δ - deslocamento químico (ppm), multiplicidade: d - dupleto, dd - duplo dupleto; dl - dupleto largo; m - multipleto; s - simpleto, sl - simpleto largo; *J* - constante de acoplamento (Hz).

O espectro de RMN de ¹H de SG116-124 (Figura 22) apresentou sinais para hidrogênios aromáticos em 7,62 ppm (d, J = 3,0 Hz, H-2'); 7,67 ppm (dd, J = 3,0 Hz e 6,0 Hz, H-6'); 6,86 ppm (d, J = 9 Hz, H-5'); 6,40 ppm (d, J = 3,0 Hz, H-8) e 6,22 ppm (d, J = 3,0 Hz, H-6). Os deslocamentos químicos de hidrogênio juntamente com os padrões de acoplamento indicaram esta substância como um flavonoide, cuja unidade aglicônica foi caracterizada como 3, 3', 4', 5, 7 pentaidroxiflavona (quercetina).

Além destes dados, ainda no espectro de RMN de ¹H a presença de múltiplos sinais na faixa entre 3,25 a 3,96 ppm, os quais em conjunto com os sinais de hidrogênios anoméricos entre 5,07 e (dd, J = 6,0 Hz e 1,5 Hz, H-1"), 4,52 ppm (d, J = 1,5 Hz, H-1") e 5,12 ppm (sl, H-1"") fornecem um indicativo da presença de três unidades de açúcar. A primeira uma glicose,

pela presença de hidrogênios metilênicos em 1,13 (d, 6,0 Hz, H-6''), a segunda trata-se da ramnose, devido à presença de hidrogênios metílicos em 1,11 ppm (d, J = 6,0 Hz, H-6''') e o terceiro açúcar foi identificado pela intensidade de sinais de hidrogênios anoméricos entre 5,12 ppm (sl, H-6'''). As configurações das unidades piranosídicas foram evidenciadas pela constante de acoplamento dos hidrogênios anoméricos como β -glicose e duas α -ramnose (PIZZOLATTI et al., 2003).

A quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosil(1→6)-β-D-glicopiranosil-[7-O-α-L-ramnopiranosídeo] pode ser identificada por CLAE e por RMN de ¹H e RMN ¹H e para confirmar a estrutura, foi proposta uma fragmentação, sendo a massa da molécula protonada *m/z* 757,52. A fragmentação EM/EM [M -H]⁻ gerou fragmentos representativos de *m/z* 609 [M-147-H]⁻ e *m/z* 301 [M-147-163-H]⁻, indicando as perdas de ramnose (147) e glicose (163), respectivamente, (calculado para C₃₃H₄₀O₂₀, *m/z* 756), Figura 21a.





Figura 22: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) para SG116-124.

6.4.2 Identificação e elucidação estrutural de SG125-161



Figura 23: Núcleo flavonoídico proposto para SG125-161: Quercetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo (hiperina).

00120	To Foomparadoo com adado da F	
Н	^a SG125-161	^b (SANTOS et al. 2005)
	* δH (ppm), m, <i>J</i>	* δΗ (ppm), m, <i>J</i>
6	6,21 (d, 3,0)	6,20 (d, 1,8)
8	6,41 (d, 3,0)	6,41(d, 1,8)
2'	7,54 (d, 3,0)	7,54 (d, 2,2)
5'	6,82 (d, 9,0)	6,82 (d, 8,4)
6'	7,67 (d/d, 3,0/9,0)	7,66 (d/d, 2,2/8,4)
1"	5,37 (d, 6,0)	5,37 (d, 7,5)
2"	3,57 (m)	3,57 (m)
3"	3,55 (m)	3,38 (m)
4"	3,65 (m)	3,66 (m)
5"	3,10 (m)	3,34 (m)
6"	3,51 e 3,60 (m)	3,31 e 3,46 (m)

Tabela 17: Dados de deslocamento qu	uímico de RMN de 'H obtido para
SG125-161 comparados com dados da	a literatura

^a Espectros obtidos por RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD);

^b Quercetina 3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina) (400 MHz DMSO d₆);

^{*} δ - deslocamento químico (ppm), multiplicidade: d - dupleto, dd - duplo dupleto, m - multipleto; s - simpleto, sl - simpleto largo; *J* - constante de acoplamento (Hz).

C	° SG125-161	° (SANTOS et al., 2005)			
0	δ (ppm)	δ (ppm)			
2	157,0	156,9			
3	134,0	134,0			
4	178,0	178,0			
5	161,0	161,7			
6	98,9	99,3			
7	164,9	164,9			
8	93,7	94,1			
9	157,3	156,8			
10	104,7	104,3			
1'	121,6	121,6			
2'	116,8	116,5			
3'	144,7	145,4			
4'	148,8	149,0			
5'	115,0	115,3			
6'	121,9	122,5			
1"	102,4	102,4			
2"	71,1	71,7			
3"	73,9	73,7			
4"	68,5	68,5			
5"	76,9	76,3			
6"	60,4	60,4			

Tabela 18: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹³C obtido para SG125-161 comparados com dados da literatura

^a Espectros obtidos por RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD);

^b Quercetina 3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina) (100 MHz DMSO d₆);

As frações SG125-149 e SG150-161 foram reagrupadas após as análises de CLAE (Figura 24), sendo identificadas como a mesma substância por meio de comparações com dados obtidos na literatura. O espectro de RMN de ¹H de SG125-161 apresentou sinais para hidrogênios aromáticos em 7,54 ppm (d, J = 3,0 Hz, H-2'); 7,67 (dd, J = 3,0 e 6,0 Hz, H-6'); 6,82 ppm (d, 9,0, H-5'); 6,41 ppm (d, J = 3,0 Hz, H-8) e 6,21 ppm (d, J = 3,0 Hz, H-6). Os deslocamentos químicos de hidrogênio juntamente com os padrões de acoplamento indicaram esta substância como um flavonoide, cuja unidade aglicônica foi caracterizada como 3, 3', 4', 5, 7 pentaidroxiflavona (quercetina), Tabela 17 e Figura 25.

Os dados do espectro de RMN de ¹H apresentam a presença de múltiplos sinais na faixa entre 3,10 ppm a 3,80 ppm, os quais em conjunto com os sinais de dois hidrogênios anoméricos em 5,37 ppm (d, 6,0 Hz, H-1") fornecem um indicativo da presença de uma unidade glicosídica, identificada como galactose. Na pesquisa realizada por Santos et al., (2005), foi evidenciada a presença da unidade glicosídica pela constante de acoplamento dos hidrogênios anoméricos como β -galactose.

A posição do açúcar foi identificada em C-3 devido aos deslocamentos químicos de C-2 e C-3 quando comparados à quercetina, que não possui substituição no oxigênio em C-3. Nesta substância, em estudo, o deslocamento químico de C-3 variou em 10 ppm, está mais desprotegido, confirmando a substituição nesta posição (AGRAWAL, 1989).

Baseado nos dados obtidos na literatura para flavonóis e para heterosídeos flavônicos, foi realizada a atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³C considerando a existência de uma substância majoritária (Tabela 18), sendo que o sinal em 102,4 ppm foi atribuído ao carbono anoméricos da galactose (C1"). O carbono metilênico da galactose (C6") foi atribuído ao sinal em 60,4 ppm. A ligação da unidade galactopiranosila, foi atribuída a C6", pelo fato do sinal apresentar deslocamento de 6,2 ppm em relação aquele da unidade monomérica não substituída (SILVERSTEIN et al., 2007). A cadeia heterosídica foi atribuída para a estrutura 3-O- β -Dgalactopiranosila. O deslocamento do sinal referente ao carbono anomérico da galactose, em torno de 5,0 ppm, quando comparado com a glicose não substituída indica heterosídeo flavonoídico do tipo flavanol-3-O-galactose (SILVERSTEIN et al., 2007). Os carbonos aromáticos segundo Santos et al., (2005), foram atribuídos para C8 (93,7 ppm), C6 (98,9 ppm), C5' (115,3 ppm), C2' (116,8 ppm) e C6' (121,9 ppm). O sinal referente à carbonila foi atribuído a C4 e os carbonos não hidrogenados foram atribuídos pela comparação com dados anteriormente descritos para quercetina 3-O-β-Dgalactopiranosídeo: C3 (134,0 ppm), C5 (161,0 ppm), C7 (164,9 ppm), C9 (157,3 ppm), C10 (104,7 ppm), C1' (121,6 ppm), C3' (144,7 ppm) e C4' (148,8 ppm) (SANTOS et al., 2005), Tabelas 18 e Figuras 26.



Figura 24: Cromatograma da fração a) $\overset{\text{MG}}{\text{G}}$ 125-149 e b) SG150-161, foram obtidos por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando o solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo1,0 mL/min.



Figura 25: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO d₆) para SG125-161.



6.4.3 Identificação e elucidação estrutural de SG201-215



Figura 27: Núcleo flavonoídico proposto para SG201-215: quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil (1''' \rightarrow 6'')- β -D-glicopiranosídeo (rutina).

30201-215 comparados com dados da ineratura.				
L	^a SG201-215	^b (NIASSY <i>et al.</i> 2004)		
	* δH (ppm), m, <i>J</i>	* δΗ (ppm), m, <i>J</i>		
6	6,18 (sl)	6,19 (d, 1,9)		
8	6,39 (sl)	6,38 (d, 1,9)		
2'	7,72 (d, 1,0)	7,52 (d, 1,9)		
5'	6,90 (d, 9,0)	6,83 (d, 9,0)		
6'	7,62 (d/d, 3,0/6,0)	7,53 (d/d, 2,2/9,0)		
1"	5,33 (d, 6,0)	5,34 (d, 7,1)		
1'''	4,21 (d, 1,0)	4,38 (d, 1,1)		
6'''	0,94 (s)	0,98 (s)		
açúcares	2,9-3,4 (m)	3,2- 3,7 (m)		

Tabela 19: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹H obtidos para SG201-215 comparados com dados da literatura.

^a Espectros obtidos por RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD);

^b (200 MHz, CD₃OD).

^{*} δ - deslocamento químico (ppm), multiplicidade: d - dupleto, dd - duplo dupleto, m - multipleto, s - simpleto, sl – simpleto largo; *J* - constante de acoplamento (Hz).

С	^a SG201-215 [δ (ppm)]	^ь (NIASSY <i>et al.</i> 2004) [δ (ppm)]
	157,7	156,7
3	132,4	133,4
4	176,6	177,4
5	161,3	161,3
6	100,2	98,7
7	166,7	164,1
8	92,5	93,7
9	155,9	156,5
10	104,2	104,0
1'	122,1	121,3
2'	116,3	116,4
3'	145,8	144,8
4'	149,5	148,4
5'	116,1	115,2
6'	121,7	121,7
1"	104,3	102,0
2"	74,4	74,9
3"	77,2	77,4
4"	69,7	70,5
5"	76,0	76,0
6"	67,9	69,3
1'''	102,3	101,6
2"'	71,3	70,7
3""	69,1	70,5
4""	71,7	71,9
5""	68,6	68,4
6'''	17,2	17,3

Tabela 20: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹³C obtidos para SG201-215 comparados com dados da literatura.

^aEspectros obtidos por RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD); ^b (50 MHz, CD₃OD).

As atribuições para os deslocamentos químicos referentes a fração SG201-215 foram baseados na literatura, (NIASSY et al., 2004). O espectro de RMN de ¹H de SG201-215 (Tabela 19, Figura 30) apresentou sinais para hidrogênios aromáticos em 7,72 ppm (d,d J = 1,0 e 6,0 Hz, H-2'); 7,62 ppm (dd, J = 3,0 Hz e 6,0 Hz, H-6'); 6,88 ppm (d, J = 9,0 Hz, H-5'); 6,40 ppm (d, J = 3,0 Hz, H-8) e 6,22 ppm (d, J = 3,0 Hz, H-6). Os deslocamentos químicos de hidrogênio juntamente com os padrões de acoplamento indicaram esta substância como um flavonoide, cuja unidade aglicônica foi caracterizada como 3, 3', 4', 5, 7 pentaidroxiflavona (quercetina).

Além destes dados, ainda no espectro de RMN de ¹H a presença de múltiplos sinais na faixa entre 2,9 e 3,4 ppm, os quais em conjunto com os sinais de hidrogênios anoméricos entre 5,33 ppm (d, J = 6,0 Hz H-1") e 4,21 ppm (d, J = 1,0 Hz, H-1") fornecem um indicativo da presença de duas unidades de açúcar. A primeira uma glicose, pela presença de hidrogênios metilênicos em 1,28 (d, 6,0 Hz, H-6"), a segunda trata-se da ramnose, devido à presença de hidrogênios metílicos em 0,94 ppm (d, J = 6,0 Hz, H-6"). As configurações das unidades piranosídicas foram evidenciadas pela constante de acoplamento dos hidrogênios anoméricos como β -glicose e α -ramnose (SILVERSTEIN et al., 2007).

O espectro de RMN de ¹³C desacoplado (75 MHz, CD₃OD) obtido (Tabela 20, Figura 31) apresentou muitos sinais, destes foram identificados sinais referentes a 27 átomos de carbono, com presença de um carbono metílico, um carbono metilênico, quinze carbonos metínicos e dez carbonos não hidrogenados, além de alguns sinais que sugerem a presença do contaminante ftalato. Esses dados são condizentes com um flavonol com padrão de substituição proposto para SG201-215, além de alguns sinais que sugerem a contaminação com ftalato (Figura 26). A presença de carbono (C6'') em 67,9 ppm confirma a presença de glicose na cadeia heterosídica de SG201-215 (NIASSY et al., 2004), o sinal referente à carbonila pode ser observado em 176,6 ppm.

78

Baseado nos dados obtidos na literatura para flavonóis e para heterosídeos flavônicos, foi realizada a atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³C. os sinais em 102,3 ppm e 104,3 ppm foram atribuídos aos carbonos anoméricos da ramnose (C1"') e da glicose (C1"), respectivamente. A região de ligação da unidade ramnose foi atribuído a C6", pelo fato do sinal apresentar deslocamento de 6.2 ppm em relação aquele da unidade monomérica não substituída (SILVERSTEIN et al., 2007). O grupo metila da ramnose foi atribuído ao sinal com deslocamento em 13,20 ppm (C6") (NIASSY et al., 2004). A cadeia heterosídica foi atribuída para a estrutura α -L-ramnopiranosil-(6 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosil. O deslocamento do sinal referente ao carbono anomérico da glicose, em torno de 5,0 ppm, quando comparado com a glicose não substituída indica heterosídeo flavonoídico do tipo flavanol-3-O-glicosila (SILVERSTEIN et al.. 2007). Os carbonos aromáticos segundo Niassy et al. (2004), foram atribuídos para C8 (92,5 ppm), C6 (100,2 ppm), C5' (116,1ppm), C2' (116.3ppm) e C6' (121.7 ppm). O sinal referente à carbonila foi atribuído a C4 e os carbonos não hidrogenados foram atribuídos pela comparação com dados anteriormente descritos para rutina: C3 (132,4 ppm), C5 (161,3 ppm), C7 (166,7 ppm), C9 (153,4 ppm), C10 (104,2 ppm), C1' (128,7 ppm), C3' (145,8 ppm) e C4' (149,5 ppm) (NIASSY et al., 2004); Tabelas 19 e 20 e Figuras 28, 29, 30 e 31.

A quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil(1^{'''} \rightarrow 6'')- β -D-glicopiranosídeo (rutina) pode ser identificada por CLAE (Figuras 28b, 29a, 29b e 29c), por RMN de ¹H e RMN ¹³C e espectrometria de massas, permitindo confirmar a estrutura, com uma proposta de fragmentação para a molécula *m/z* 609,12. A fragmentação EM/EM [M + H]⁺ gerou o fragmento representativo de *m/z* 301,21 [M-147-163+H]⁺, indicando a perda da ramnose (147) e da glicose (163), (calculado para C₂₇H₃₀O₁₆, *m/z* 610), Figura 28a.




2001 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 Min

Figura 29: a) Cromatograma da fração SG201-215, b) Cromatograma da fração SG201-215 fortificada com padrão de quercetina, c) Sobreposição dos cromatogramas "a" e "b", obtidos por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 30: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) para SG201-215.



Figura 31: Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) para SG201-215.

6.4.4 Identificação e elucidação estrutural de SH29-32



SH30 comparados com dados da literatura.			
Н	^a SH29-32	^b (SOUZA, 2011)	^c (CERUKS et al., 2007)
	* δH (ppm), m, <i>J</i>	* δH (ppm), m, J	* δΗ (ppm), m, <i>J</i>
6	6,18, (d, 3,0)	6,20 (d, 2,0)	6,19 (d, 1,9)
8	6,39, (d, 3,0)	6,40 (d, 2,0)	6,38 (d, 1,9)
2'	7,73, (d, 3,0)	7,34 (d, 1,9)	7,21 (d, 1,7)
5'	6,87 (d, 9,0)	6,90 (d, 8,4)	7,20 (s)
6'	7,61, (dd, 3,0/9,0)	7,30 (dd, 1,9/8,4)	6,86 (dd, 8,2/1,7)
1"			5,23 (d, 1,0)
2"			3,10-3,90 (m)
3""			3,10-3,90 (m)
4""			3,10-3,90 (m)
5"'			3,10-3,90 (m)
6""			0,79 (d, 5,2)

Tabela 21: Dados de deslocamento químico de RMN de ¹H obtido para SH30 comparados com dados da literatura.

^a Espectros dados obtidos por RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD);

^b Quercetina (400 MHz, CD₃OD);

^cQuercitrina (300 MHz, DMSO-d₆).

* δ - deslocamento químico (ppm), multiplicidade: d - dupleto, dd - duplo dupleto, m - multipleto, *J* - constante de acoplamento (Hz).

O espectro de RMN de ¹H de SH29-32 apresentou sinais que por análises sugerem que este composto seja um flavonoide, Figura 6. Baseado na identificação por CLAE e comparando os resultados obtidos com os valores abordados na literatura pode-se propor que a fração SH29-32 seja quercetina. No espectro de ¹H foram visualizados sinais entre 6,0 ppm e 8,0 ppm correspondente a anéis aromáticos, (CERUKS et al., 2007; SOUZA, 2011), considerando os dois dubletos com deslocamento em 6,18 ppm (d, J = 3,0 Hz) e 6,39 ppm (d, J = 3,0 Hz) sugerem hidrogênios aromáticos, H6 e H8, do anel A, considerando a presença de hidroxilas em C5 e C7. Os sinais relativos ao anel B apresentaram deslocamento em 7,73 ppm (d, 3,0 Hz) 6,87 ppm (d, 9,0 Hz), e 7,61 ppm (dd, 3,0 e 9,0 Hz), sugerindo os hidrogênios aromáticos: H2', H5' e H6', respectivamente. Estes valores de *J* são condizentes com acoplamento entre hidrogênios em *meta* e *orto,* Ceruks et al., (2007), Tabela 21 e Figura 33.

No entanto, os valores dos deslocamentos químicos destes hidrogênios, associados aos sinais do espectro de massas confirmou a estrutura proposta, pois foi encontrado somente um íon com valor de *m/z* de 301,27, que pode ser observado por ESI-MS em modo negativo, o que permite fazer a proposta de fragmentação $[M + H]^+$, que consiste no flavonoide aglicona quercetina calculado para $C_{15}H_{10}O_7$: *m/z* 302 Figura 34a.



Figura 33: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) para SH29-32.



Nin

8

ø 4

N

0

-100

B:

TFA

com





Figura 35: a) Cromatograma da fração SH29-32, b) Cromatograma da fração SH29-32 fortificada com padrão de quercetina, c) Sobreposição dos cromatogramas "a" e "b", obtidos por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.

6.5 Teste do Potencial Antioxidante

O ensaio é baseado na propriedade do DPPH[•] apresentar uma forte absorção no espectro visível, no comprimento de onda de 517 nm, caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons livres. Quando o DPPH[•] é colocado em presença de substâncias capazes de sequestrar radicais livres, a absorção é inibida, resultando em uma descoloração estequiométrica e independente de qualquer atividade enzimática. Esta reação proporciona mudança de cor de violeta para amarelo e a absorbância a 517 nm, diminui. A baixa absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres (SOUSA et al., 2007). O DPPH[•] é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com radicais estáveis (BANERJEE et al., 2005). Na Figura 36 podem ser observadas fotos do teste colorimétrico com DPPH[•] de algumas frações.



Figura 36: Análise colorimétrica com DPPH em frações de *Smilax fluminensis*.

Dentre as amostras ativas analisadas as que apresentaram potencial antioxidante mais pronunciado foram as do extrato metanólico: F9 a F15 e SE62-75 com CE₅₀ = 4,0 µg/mL; tendo como base de comparação o padrão de quercetina com CE₅₀ = 2,0 µg/mL. Enquanto que as frações F3 a F7, F17, SA1-16, SD37-52 e B31-35 apresentaram CE₅₀ = 8,0 µg/mL, valor em que o ácido ascórbico apresentou atividade. As frações SD53-70, SE26-49 e SE50-61 apresentaram atividade com CE₅₀ = 10,0 µg/mL, sendo que SA17-33 com CE₅₀ = 15,0 µg/mL, B26-30 com CE₅₀ = 50,0 µg/mL, Figura 37. As frações F3 a F5 (anexo 1, Figuras 40-42) apresentaram atividade razoável sendo superadas pelas frações F6 a F17 (anexo 1, Figuras 43-52) com concentrações semelhantes aos valores obtidos na curva de calibração realizada com quercetina e com resultados superiores aos obtidos com o ácido ascórbico.

As subfrações tiveram atividade variável de acordo com a concentração de flavonoides, sendo que as frações SA1-16; SA17-33; SD37-52; SD53-70; SE26-49; SE50-61; SE62-75; B31-35 (anexo 1, Figuras 54-60, 62) apresentaram valores semelhantes; porém B26-30 (Figura 61) apresentou potencial antioxidante inferior as demais, devido a baixa concentração de compostos fenólicos.



Figura 37: Potencial antioxidante das frações de *S. fluminensis*, porcentual de DPPH remanescente. Valores apresentam as médias dos experimentos realizados em triplicata.



Figura 37 (cont.): Potencial antioxidante das frações de *S. fluminensis*, porcentual de DPPH remanescente. Valores apresentam as médias dos experimentos realizados em triplicata.

Em um estudo análogo feito por Peres et al., (2009), verificaram que o potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *M. vacciniifolia,* determinado pelo método que emprega o radical livre DPPH[•], é maior para a fração acetato de etila, que apresentou uma CE_{50} de 9,9 ± 0,03 µg/mL e que a fração hexânica foi a menos ativa, apresentando o maior valor de CE_{50} que foi de 235,4 ± 3,20 µg/mL.

Neste estudo, foi observado que a maioria dos extratos teve capacidade sequestradora semelhante aos padrões quercetina e ácido ascórbico. Desta forma, ao se avaliar a capacidade sequestrante de radical livre dos extratos de *S. fluminensis*, foi observado que as frações com menor teor de flavonoides, apresentaram a menor capacidade sequestrante, mas que os extratos polares, que mostraram elevado teor de flavonoides, apresentaram elevado potencial antioxidante (TADHANI et al., 2007).

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos da análise química do extrato etanólico e frações das folhas de *Smilax fluminensis* Steud, espécie que ainda não havia sido estudada, foi possível identificar e quantificar através de análise por CLAE os flavonoides: agastiflavona, amentoflavona, apigenina, canferol, quercetina, quercitrina, rutina, taxifolina, em concentrações significativas. Sendo assim, foi favorável a avaliação do potencial antioxidante, identificação e isolamento de flavonoides, sendo descritos na espécie pela primeira vez na literatura para a espécie.

Foi também possível isolar e identificar os flavonoides: Quercetina [3-O- α -L-ramnopiranosil(1"' \rightarrow 6")- β -D-glicopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (SG116-124); Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (hiperina) (SG125-161); Quercetin-3-O- α -L-ramnopiranosil(1"' \rightarrow 6")-O- β -D-glicopiranosídeo, (SG201-215) e Quercetina (SH29-32).

Considerando que os resultados da capacidade antioxidante dos extratos e frações dependem das concentrações de flavonoides, a maioria destas apresentou valores equivalentes ao da quercetina nos ensaios de avaliação de atividade sequestradora de radicais livres frente ao DPPH. Embora os flavonoides identificados e/ou isolados já tenham sido descritos no gênero e em outras espécies de diferentes famílias vegetais; os resultados do presente trabalho contribuiram para o conhecimento da composição química do gênero e do potencial antioxidante de seus representantes. Assim, o extrato e frações de *Smilax fluminensis* surgem como uma grande alternativa na área dos antoxidantes e indicam a necessidade de estudos de bioprospecção devido ao alto valor medicinal do gênero.

92

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA, S.; HERRERA, M. D.; BENJUMEA, D., PÉREZ-PAZ, P. **Diuretic** activity of *Smilax canariensis*, an endemic Canary Island species. Journal of Ethnopharmacology, v. 119, n. 1, 2, p. 12 - 16, Set. 2008.

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 of flavonoids. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.

ALVES, C. Q. Flavonoides, antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* TUL. (Leguminosae). 2007. 108f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Cahia, 2007

ALVES, E. O.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. B. Levantamento Etnobotânico e Caracterização de Plantas Medicinais em Fragmentos Florestais de Dourados-MS. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 2, p. 651 - 658, mar./abr., 2008.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.** Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, v. 90, p. 7915 - 7922, 1993.

ANDERSEN, O.; MARKHAM, K. R.; **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Editora Taylor & Franacis, New York, 2006.

ANDREATA, R. H. P. **Revisão das espécies brasileiras do gênero Smilax** Linnaeus (Smilacaceae). 1995. 397f. Tese (Doutorado em Botânica) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1995.

ANDREATA, R. H. P. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax Linnaeus* (Smilacaceae). Botânica, v. 47, p. 7 - 244, 1997.

ANDREATA, R. H. P. **Smilacaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas,** Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil Rodriguésia, v. 57, n. 3, p.647 - 657, 2006.

ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science, v. 82, p. 1227 - 1238, 2002.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. Food Chemistry, v. 90, p. 727 - 733, 2005.

BAN, J. Y.; JEON, S. Y.; BAE, K. W.; SONG, K. S.; SEONG, Y. H. Catechin and epicatechin from Smilacis chinae rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid β protein (25–35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation. Life Sciences, v. 79, n. 24, 10, p. 2251 - 2259, Nov., 2006.

BARBOSA, J. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante. 2009, 133p. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, v. 181, p. 1199 - 1200, 1958.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 5, p. 5195 - 5200, 2004.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma Abordagem Sobre Métodos Analíticos para Determinação da Atividade Antioxidante em Produtos Naturais. Enciclopédia Biosfera, v.7, n.12, p.1-20, 2011.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 7^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 1488p.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. **Constituíntes fenólicos polares de** *Schinus terebinthifolius* **Raddi (Anacardiaceae).** Química Nova, v. 30, n. 3, p. 597 - 599, 2007.

CHA, B. C.; LEE, E. H. Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of *Smilax china* Linne. Division of Animal Science and Biotechnology, v. 38, n. 1, p. 31 - 36, 2007.

CHANG-WEI, L.; KUN, L.; YOU, C.; YONG-YU, S. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. Forestry Studies in China, v.9, p.114-119, 2007.

CHHABRA, S.R.; STEAD P.; BAINTON, N.J.; SALMOND, G.P.C.; STEWART, G.S.A.B.; WILLIAMS, P.; BYCROFT, B.W. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* ATCC 39048 by analogues of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. Journal of Antibiotics, v. 46, p. 441 - 454, 1993.

CHEN, L.; YE, Y. H.; YI, QI. X.; CHEN, T. Simultaneous quantification of five major bioactive flavonoids in Rhizoma *Smilacis glabrae* by highperformance liquid chromatography Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 43, n. 5, p. 1715 - 1720, 11 Apr., 2007.

CHEN, L.; YIN, H. F.; LAN, Z.; MA, S.; ZHANG, C.; YANG, Zhonglin; LI, Ping; LIN, Baoqin. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. Journal of Ethnopharmacology, v. 135, n. 2, p. 399 - 405, 17 Mai., 2011.

CHEN, T.; LI, J. X.; CAI, Y.; XU, Q. A flavonol glycoside from *Smilax* glabra. Chinese Chemical Letters, v.13, n.6, p.537-538, 2002.

CHIEN, N. Q.; Adam, G. Constituents of *Smilax glabra* (Roxb.). Part 4: Natural substances of plants of the Vietnamese flora. Pharmazie, v. 34, n. 12, p. 841 - 843, 1979.

CHO, E. S.; KIM, J. L.; KIM, H.; CHON, I. J.; HAM, I.; WHANG, W. K. **The** anti-oxidative compounds of *Smilax riparia* leaves. College of Pharmacy, v. 47, n. 5, p. 300 - 306, 2003.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? Annals of Internal Medicine, v. 111, n. 11, p. 918 - 931, 1989.

CORREIA, P. D. **Espectroscopia de RMN.** Funchal, abril de 2002, 53p. Monografia do Departamento de Química da Universidade da Madeira, 2002.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. **Dietary phenolics:** chemistry, bioavailability and effects on health. Natural Product Reports, London. v. 26, p. 1002 - 1043, 2009.

CRUZ, A. P. G. Avaliação da influência da extração e microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante. Ago. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Rio de Janeiro, 2008.

DAI, Y.; PAN, G. Traditional chinese medicine composition for reducing blood uric acid. Faming Zhuanli Shenqing, 6pp. 2010.

ENDRINGER, D. C. Química e atividades biológicas de Hancornia Speciosa Gomes (Apocynaceae): Inibição da enzima conversora de Angiotensina (Eca) e efeito na Quimioprevenção de Câncer. Ago., 2007. 259f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas na área de Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

FALCÃO, D. Q.; COSTA, E. R.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KUSTER, R. M,; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 73 - 76, 2006.

GALIZIA, M.S.; WAITZBERG, D.L. **Mecanismos de ação dos radicais livres e antioxidantes.** Revista brasileira de nutrição clínica, v. 16, n. 2, p. 79 - 89, 2001.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do **Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico.** Acta botânica brasileira v.17, n.4, p.561-584, 2003.

GUO, J. QIAN, F.; LI, J.; XU, Q.; CHEN, T. Identification of a new metabolite of astilbin, 3'-O-methylastilbin, and its immunosuppressive activity against contact dermatitis. Clinical Chemistry, v. 53, n. 3, p. 465 - 471, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3 ed. London: Oxford University Press, 1999.

HARTWICH, C. Beiträge zur Kenntnis der Sarsaparillwurzeln. Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, v. 240, n. 5, p. 325 - 335, 1902.

HE, Z. Manufacture of sustained/controlled-release agent containing flavonoids and/or saponins of *Smilax china*. Faming Zhuanli Shenqing, 7pp. 2007.

HOCMAN, G. Chemoprevention of cancer: phenolic antioxidants (BHT, BHA). The Internacional Jounal of Biochemistry, v. 20, n. 7, p. 639 - 651, 1988.

HOEHNE, F. C. **Plantas aquáticas.** São Paulo: Secretaria de Agricultura de São Paulo, 168p. 1955.

HOU, L.; ZHOU, B. L.; YANG, L.; LIU, Z. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides. Chemistry and Physics of Lipids, v. 129, 209p., 2004.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radical Biology and Medicine, v. 30, p. 433 - 446, 2001.

IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; BATSALOVA, T.; DZHAMBAZOV, B.; KOSTOVA, I. New furostanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. Fitoterapia, v. 82, n. 2, p. 282 - 287, 2011.

JIANG, Xinyu; SHI, Shuyun; ZHANG, Yuping and CHEN, Xiaoqing. Excellent combination of HPLC-RSD-DAD-ESI/MS and HSCCC experiments to screen and identify radical scavengers from *Neo-Taraxacum siphonanthun*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 21, n. 8, p. 1524 - 1529, 2010.

KHAN, I.; NISAR, M.; EBAD, F.; NADEEM, S.; SAEED, M.; KHAN, H.; SAMIULLAH, F. K.; KARIM, N.; AHMAD, Z. Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin from *Smilax china* Linn.: Experimental and computational studies. Journal of Ethnopharmacology, v. 121, n. 1, p. 175-177, 12 Jan., 2009.

KUBOTA, R.; ITOU, M.; OOGURO, S.; IIDA, A.; SAWABE, A. **Skin-whitening agents in** *Smilax glabra.* Pacifichem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, HI, United States, p. 15 - 20, Dec., 2010.

LAITONJAM, W. S.; KONGBRAILATPAM, B. D. Studies on the chemical constituents and antioxidant activities of extracts from the roots of *Smilax lanceaefolia* Roxb. Natural Product Research, v. 24, n. 12, p. 1168-1176, 2010.

LEE, C. J.; LEE, J. H.; SEOK, J. H.; HUR, G. M.; PARK, J. S.; BAE, S.; LIM, J. H.; PARK, Y. C. Effects of Betaine, Coumarin and Flavonoids on Mucin Release from Cultured Hamster Tracheal Surface Epithelial Cells. Phytotherapy Research, v. 18, p. 301 - 305, 2004.

LI, G. S.; JIANG, W. L.; YUE, X. D.; QU, G.W.; TIAN, J. W.; WU, J.; FU, F. H. Effect of astilbin on experimental diabetic nephropathy in vivo and in vitro. Planta Medica, v. 75, n. 14, p. 1470 - 1475, 2009.

LI, J. Z. & XING, K. Y. Description of the immatures stages of *Ophrida xanthospilota* (Baly) (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae) from China. Proceedings of the Entomological Society of Washington, v. 110, p. 693 - 700, 2008.

LI, J.; BI, X.; ZHENG, G.; HITOSHI, Y.; IKEDA, T.; NOHARA, T. **Steroidal glycosides and aromatic compounds from** *Smilax riparia*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v. 54, n. 10, p. 1451 - 1454, 2006.

LI, S. Y.; FUCHINO, H.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M. **New Phenolic Constituents from** *Smilax bracteata.* Journal Natural Product, v. 65, p. 262 - 266, 2002.

LIN, L. M., LI, W. S.; CHEN, W. L.; YEH, A. **Oxidation of Catechols and Flavonoids by DPPH**. Journal of the Chinese Chemical Society, v. 57, p. 883 - 887, 2010.

LIU, J.; HUANG, S.; ZHANG, Y.; CHI, R. **Extracting flavonoids from** *Smilax glabra* by microwave-assisted method. Hubei Key Lab of Novel Reactor and Green Chemical Technology, Wuhan Institute of Technology, Wuhan, Hubei Province, Zhongyaocai, v. 30, n. 12, p. 1591 - 1595, 2007.

LI, Y. L.; GAN, G. P.; ZHANG, H. Z.; WU, H. Z.; LI, C. L.; LIU, J.W. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology, v. 113, p. 115 - 124, 2007.

LONGO, L.; VASAPOLLO, G. Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. Food Chemistry, v.94, n.2, p.226-231, Jan. 2006.

MACHADO, F. A. V. Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., Leguminosae, barbatimão. 2005. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2005.

MALTERUD, K. E.; RYDLAND, K. M. Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, p. 5576 - 5580, 2000.

MARSTON, A. & HOSTETTEMANN, K. Separation and Quantification of Flavonoids. In: ANDERSEN, O.; MARKHAM, K. R.; Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. New York: Editora Taylor & Franacis, 2006.

MARTINS, L. R. R., CORTEZ, L. E. R.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. G. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de ¹H e ¹³C do acetato de acantoaustralida. Revista Brasileira de Farmacognosia [online]. 2006, vol.16, n.4, pp. 490-496.

MEDEIROS, M. F. T.; SENNA-VALLE, L.; ANDREATA, R. H. P. **Histórico e o uso da "salsa parrilha" (***Smilax* **spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 27 - 29, jul. 2007.

MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade Sequestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. Medicinal Chemistry, p. 1 - 14, dez, 2006.

A. C. S. MOURA, W. VILEGAS, L. C. SANTOS. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta linn*. (fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. Quim. Nova, v. 34, n. 7, p.1136-1140, 2011.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. **Natural antioxidants form residual sources.** Food Chemistry, v. 72, p. 145 - 171, 2001.

NASCIMENTO, R. J. **Potencial Antioxidante de Resíduo Agroindustrial de Goiaba.** 2010, 110f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.

NIASSY, B.; UM, B. H.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; KONÉ, M.; ANTON, R. **Flavonoides de** *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis.* Journal Comptes Rendus Chimie, v. 7, p. 993 - 996, 2004.

OZSOY, N.; CAN, A.; YANARDAG, R.; AKEV, N. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. Food Chemistry, v. 110, n. 3, p. 571 - 583, 2008.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introduction to spectroscopy. 3. ed. USA: Thomson Lerning, 579p. 2001.

PECKOLT, O. **Sobre a planta produtora da Japecanga.** Revista Flora Medicinal, v. 2, n. 9, p. 513 - 517, 1936.

PÈREZ-JIMÈNEZ, J. ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÌAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. **Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results.** Food Research International, v. 41, n. 3, p. 274 - 285, 2008.

PERES, M. T. L. P.; SIMIONATTO, E.; HESS, S. C.; BONANI, V. F. L.; CANDIDO, A. C. S.; CASTELLI, Caroline; POPPI, N. R.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; FACCENDA, Odival. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). Química Nova, v. 32, n. 4, p. 897 - 901, 2009. PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR., A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de Bauhinia forficata (Leguminoseae). Química Nova, v. 26, n. 4, p. 466 - 469, 2003.

PIZZAIA, D.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B; MARTINS, A. R.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Análise do cariótipo de cinco espécies de *Smilax* (Smilacaceae) http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2009/GP023-29235.pdf acesso em 13/04/2011. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética • Brasil www.sbg.org.br - ISBN 978-85-89109-06-2. 30 ago. a 02 set. 2009.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755 - 760, 2006.

RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. **The contribution of plant food antioxidants to humans health.** Trends in Food Science & Technology, v. 6, n. 3, p. 75 - 82, 1995.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771 - 780, 2004.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. **Atividade antioxidante de frutas do cerrado.** Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RUGNA, A.; GURNI, A.; WAGNER, M. Variational study of flavonols in male and female specimens of *Smilax campestris* Griseb.Smilacaceae. Acta Farmacêutica Bonaerense, v. 21, n. 2, p. 119 - 121, 2002.

RUGNA, A.; RICCO, R.; GURNI, A.; WAGNER, M. Effects of sunlight on polyphenol production in female specimens of *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). Latin American Journal of Pharmacy, v. 26, n. 3, p. 420 - 423, 2007.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J,; KUSTER, R. M. Flavonóides *O*glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. vol. 15, n. 4, p. 321 - 325, 2005.

SA, F.; GAO, J. L.; FUNG, K. P.; ZHENG, Y.; LEE, S. M. Y.; WANG, Y.T. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of *Smilax glabra* Roxb. extract on hepatoma cell lines. Chemico-Biological Interactions, v. 171, n. 1, p. 1 - 14, 10 Jan., 2008.

SAHU, S.; DAS, P.; RAY, M.; SABAT, S. C. Osmolyte modulated enhanced rice leaf catalase activity under salt-stress. Advances in Bioscience and Biotechnology, v. 1, p. 39 - 46, 2010.

SANSOME, E. Pachytene in *Puccinia kraussiana* Cooke, on *Smilax kraussiana*. University College, Ibadan, Nigeria. Nature, v. 184, p. 1820-1821, 05 Dez., 1959.

SHAO, B.; GUO, H. Z.; CUI, Y. J; LIU, A. H.; YU, H. L.; GUO, H.; XU, M.; GUO, D. Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in *Smilax china* by high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 44, n. 3, p. 737 - 742, 2007.

SHAO, B.; ZHONG, C. Y.; GUO, H. Z.; GUO, D. Flavonoids and stilbenes from *Smilax china*. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing, v. 40, n. 11, p. 1700 - 1703, 2009.

SILVA, D. A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, M. F. V.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) *Brizicky* (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O-α-Lramnopiranosídeo Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy v, 15 n. 1, p. 23-29, Jan./Mar., 2005.

SILVA, J. M. Anatomia, perfil químico de duas espécies do gênero *Smilax* L. (Smilacaceae) 2010. 68f. Dissertação (Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior Luiz de Queiroz, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE, D. J.; tradutor ALENCASTRO, R. B. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookmann. p. 621 - 647, 2002.

SOARES, A. N. **Morfoanatomia, perfil químico e propagação de Smilax** *fluminensis* **Steud. (Smilacaceae)** Piracicaba, 2010, 75f. Dissertação (Mestre em ciências, area de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Escola Superior Luiz de Queiroz, 2010.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. **Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais.** Química Nova, v. 30, n. 2, p. 351 - 355, 2007.

SOUZA, J. P. B. *Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal. 2011, 179p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto – USP, 2011.

SOUZA, S. O. C.; DE TONI, K. G. L.; ANDREATA, R. H. P.; COSTA, G. C. Anatomia e vascularização das flores estaminadas e pistiladas de *Smilax fluminensis* Steud (Smilacaceae). Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 56, n. 87, p. 107 - 121, 2005.

VANDRESEN, F. Constituição Química, Atividades Antibacteriana, Antiedematogênica e Toxicidade Frente à *Artemia Salina* da espécie Vegetal *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) *Troncoso* (Verbenaceae). Maringá, junho de 2005. 182f. Dissertação (mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Maringá, 2005.

VIEIRA JÚNIOR, G. M. **Contribuição ao estudo dos metabólitos** secundários do gênero *Casearia* e de algumas de suas atividades biológicas. Araraquara, março de 2010. 364f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araquarara, 2010.

WOO, M. H.; DO, J. C.; SON, K. H. Five New Spirostanol Glycosides From the Subterranean Parts of *Smilax Sieboldii* Food Five New Spirostanol Glycosides From the Subterranean Parts of *Smilax Sieboldii*. Journal of Natural Products. v.55, n.8, p.1129-1135, Aug., 1992.

WU, L. S.; Wang, X. J.; WANG, H.; YANG, H. W.; JIA, A. Q.; DING, Q. **Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in** *Smilax china* **L. Journal Ethnopharmacology, v.130, n.3, p.460-464, Aug., 2010.**

WU, X. R.; LIU, Z. G.; YAN, R. L.; SUN, W. F. Separation and purification of total flavonoids in *Smilax glabra* by polyamide resins. Journal of Chinese medicinal materials, v. 32, n. 10, p. 1606 - 1609, 2009.

WU, L. S.; WANG, X. J.; WANG, H.; YANG, H. W.; JIA, A. Q.; DING, Q. **Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in** *Smilax china* **L.** Journal of Ethnopharmacology, v. 130, n. 3, p. 460 - 464. 9 Ago., 2010.

WUNGSINTAWEEKUL, B.; UMEHARA, K.; MIYASE, T.; NOGUCHI, H. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (Smilacaceae). Phytochemistry, v. 72, n. 6, p. 495 - 502, 2011.

XIA, D.; YU, X.; LIAO, S.; SHAO, Q.; MOU, H.; MA, W. Protective effect of **Smilax glabra extract against lead-induced oxidative stress in rats.** Journal of Ethnopharmacology, v. 130, n. 2, p. 414 - 420, 20 Jul., 2010,

XU, J.; LI, X.; ZHANG, P. LI, Z. L.; WANG, Y. Antiinflammatory constituents from the roots of *Smilax bockii* warb. Archives of Pharmacal Research, v. 28, n. 4, p. 395 - 399, 2005.

XU, W.; LIU, J. W.; LI, C.; WU, H. Z.; XU, L.; WEN, Y. W. Kaempferol-7-O- β -d-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G2/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. Cancer Letters, v. 264, n. 2, p. 229 - 240, 18 Jun. 2008.

YANG, A.; GUO, X. Chemical constituents of rhizomes of Smilax ferox. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, v. 35, n. 17, p. 2293 - 2295, Sep., 2010.

YANG, C.; TANG, Q. J.; ZHANG, L. Z.; WENYING, L. **Preparative isolation** and purification of phenolic acids from *Smilax china* by high-speed counter-current chromatography. Separation and Purification Technology, v. 61, n. 3, p. 474 - 478, 15 Jul., 2008.

YE, X. C.; Li, W. X.; YAN, Y.; YANG, X. L. Method for extracting effective components from Smilax china with antiinflammatory and analgesic effects. Faming Zhuanli Shenqing, 9pp. 2007.

ZHANG, L.; LIAO, C. C.; HUANG, H. C.; SHEN, Y. C.; YANG, L. M.; KUO, Y. H. **Antioxidant phenylpropanoid glycosides from Smilax bracteata** . Phytochemistry, v. 69, n. 6, p. 1398 - 1404, Apr, 2008.

ZHANG, Q. F.; CHEUNG, H. Y. **Development of capillary electrophoresis fingerprint for quality control of Rhizoma** *Smilacis Glabrae.* Phytochemical Analysis, v.22, n.1, p.18-25, 2011.

ZHANG, Q. F. LI, S. C.; LAI, W. P.; CHEUNG, H. Y. β -Cyclodextrin facilitates simultaneous analysis of six bioactive components in Rhizoma *Smilacis Glabrae* by capillary zone electrophoresis. Food Chemistry, v. 113, n. 2, p. 684 - 691, 15 Mar., 2009.

ZHANG, Q. F.; ZHANG, Z. R.; CHEUNG, H. Y. Antioxidant activity of **Rhizoma** *Smilacis Glabrae* extracts and its key constituent-astilbin. Food Chemistry, v.115, n.1, p.297-303, Jul., 2009.

ZHAO, Z. X.; JIN, J.; FANG, W.; RUAN, J. I. Antioxidant activity of polyphenol constituents from *Smilax china*. Yiyao Daobao. v. 27, n. 7, p. 765 - 767, 2008.

ZHAO, Z. X.; JIN, J.; ZHU, C. C.; ZHANG, C. X; RUAN, J. I. **Study on Antioxidant Stilbenes from the Rhizomes of** *Smilax china*. **Traditional Chinese Drug**. Research & Clinical Pharmacology Science Technology and Engineering, v. 121, n. 1, p. 175 - 177, 12 Jan, 2009. ANEXO 1

Cromatogramas das frações de S. fluminensis



Figura 38: Cromatograma da mistura de padrões obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 39: Cromatograma do extrato bruto obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 40: Cromatograma da fração F3 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 41: Cromatograma da fração F4 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 42: Cromatograma da fração F5 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 43: Cromatograma da fração F6 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 44: Cromatograma da fração F7 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 45: Cromatograma da fração F9 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 46: Cromatograma da fração F10 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 47: Cromatograma da fração F11 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.


Figura 48: Cromatograma da fração F12 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 49: Cromatograma da fração F13 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 51: Cromatograma da fração F15 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 53: Cromatograma da fração F18 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 µm) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 54: Cromatograma da fração SA1-16 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 55: Cromatograma da fração SA17-33 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 56: Cromatograma da fração SD37-52 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 57: Cromatograma da fração SD53-70 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 58: Cromatograma da fração SE26-49 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 60 Cromatograma da fração SE62-75 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 61: Cromatograma da fração B26-30 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 62: Cromatograma da fração B31-35 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 63: Cromatograma da fração SG116-124 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 64: Cromatograma da fração SG125-149 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 65: Cromatograma da fração SG150-161 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 66: Cromatograma da fração SG201-215 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 67: Cromatograma da fração SF69-79 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 68: Cromatograma da fração SH23-28 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.



Figura 69: Cromatograma da fração SH29-32 obtido por CLAE num sistema eluído em coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250,0 x 4,6 mm, 5 μ m) usando os solvente A: TFA:H₂O 0,05:99,95 (V/V) e Solvente B: TFA (ACN/MeOH) 0,05:(20/80)(V/V), com gradiente: 0-50 min (5%B -100%B) e 50-60 min (100%B), a 254 nm e 360 nm e fluxo 1,0 mL/min.