

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PAULO SENNA TAYLOR BITTENCOURT

**Perfil químico, atividade anti-inflamatória e antioxidante das cascas dos
frutos de *Libidibia ferrea*.**

MANAUS – AMAZONAS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PAULO SENNA TAYLOR BITTENCOURT

**Perfil químico, atividade anti-inflamatória e antioxidante das cascas dos
frutos de *Libidibia ferrea*.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Amazonas,
como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Química, para a
defesa do título de mestre.

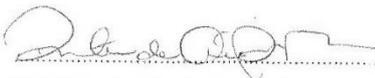
Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

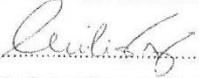
MANAUS – AMAZONAS

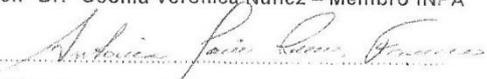
2017

Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do
aluno **Paulo Senna Taylor Bittencourt**, do Curso de
Pós-Graduação em Química, realizada no dia 15 de
março de 2017.

Às nove horas do dia 15 de março de 2017, no Auditório da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas, foi realizada a defesa pública de dissertação do aluno **Paulo Senna Taylor Bittencourt**, intitulada: “**Perfil químico e atividade anti-inflamatória de casca do fruto de *Caesalpinia férrea Martius*”**, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química. A Banca Examinadora constituiu-se dos seguintes professores: *Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Saraiva Nunomura – Presidente; Prof.ª Dr.ª Cecília Verônica Nunez – Membro INPA e Prof.ª Dr.ª Antonia Maria Ramos Franco – Membro Externo*. Após a apresentação do trabalho pelo aluno, os examinadores fizeram as observações e questionamentos de praxe. Em seguida, a Banca Examinadora reuniu-se para a definição do conceito do trabalho apresentado, tendo considerado o aluno APROVADO. Por decisão do colegiado, se aprovado, o aluno deverá entregar a versão definitiva da dissertação em 30 dias, prorrogável por mais 30 dias, observando todas as sugestões da banca examinadora. Em conformidade com o RI do PPGQ (Art. 89, § 7º e 8º), a emissão de qualquer documento comprobatório da defesa da dissertação está condicionada a entrega dessa versão no prazo máximo de 60 dias. Nada mais havendo a tratar, o Presidente agradeceu a presença de todos e deu por encerrada a sessão. *Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas*, em Manaus, 15 de março de 2017.


Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Saraiva Nunomura – Presidente


Prof.ª Dr.ª Cecília Verônica Nunez – Membro INPA


Prof.ª Dr.ª Antonia Maria Ramos Franco – Membro Externo

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B624p Bittencourt, Paulo Senna Taylor
Perfil químico, atividade anti-inflamatória e antioxidante das cascas dos frutos de *Libidibia ferrea*. / Paulo Senna Taylor Bittencourt. 2017
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. antioxidante. 2. libidibia ferrea. 3. metilgeraniina. 4. rmn. 5. ácido elagico. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Abstract

Libidibia ferrea is a medium-sized tree known as jucá, found in the North and Northeast of Brazil. The use of various parts of the tree is very common in folk medicine, especially in the distant regions of large urban centers. Jucá fruits are used in the form of tea or decoction to prevent or treat inflammation. The fruits were collected in the urban area of the City of Manaus / Amazonas. After grinding, 300 g of jucá powder were extracted by maceration with methanol for five days to obtain the crude extract. The analyzes in HPLC-MS were performed on crude methanolic extract of jucá fruit peels and crude hydrolyzed extract. Some hydrolysable tannins, HHDP acid, DHHDP acid and chlorogenic acid were identified. The crude extract was subjected to a liquid-liquid partition, to give the phases in hexane, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic phase. Tests of antioxidant activity (DPPH and ABTS) and anti-inflammatory (LOX) were performed in the phases obtained. The ethyl acetate phase was more effective in all the tests (IC_{50} DPPH = 3.32, IC_{50} ABTS = 4.12, IC_{50} LOX = 8.62), while the hexane phase presented the worst results among the fractions (IC_{50} DPPH = 59.92, IC_{50} ABTS = 211.37, IC_{50} LOX = 140.45). The AcOEt phase was subjected to column chromatography using Sephadex LH-20 and methanol as the mobile phase. The resulting AcS2 fraction was fractionated in Sephadex LH-20 again using methanol as the mobile phase, whose AcSS2 fraction was subjected to solid phase extraction using as the mobile phase H₂O/ACN mixtures. All fractions were analyzed in analytical HPLC and fractions 6 and 7 were pooled and ellagic acid and methoxygeraniine were identified, the elucidation of the substances occurred by negative-mode EM-NMR and NMR (MeOD, 500 MHz). Finally, antioxidant activity assays were performed for ellagic acid (IC_{50} DPPH = 49.57, IC_{50} ABTS = 60.00) and methoxygeraniine (IC_{50} DPPH = 8.59, IC_{50} ABTS = 6.49). The isolation method present in this work can be used to obtain other substances with antioxidant and anti-inflammatory activity and also for the quantification of these substances.

Keywords: *Libidibia ferra*, lipoxygenase, peel, DPPH, ABTS

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado saúde, sabedoria e forças para superar os obstáculos do dia-a-dia;

Aos meus pais, Maria Senna Taylor Bittencourt e Pedro Antonio Taylor Bittencourt, os quais me deram apoio, incentivo e todo amparo necessário para que eu concluísse mais esta conquista em minha vida acadêmica;

A minha orientadora, Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura, que me ajudou e guiou durante toda a realização deste trabalho. Por suas críticas e opiniões, as quais me fizeram crescer como pesquisador; pela disposição em me ajudar nos problemas e dúvidas que surgiram ao longo do tempo, mesmo tendo uma rotina tão corrida;

Aos meus colegas do grupo de pesquisa NEQUIMA, pelo companheirismo e ajuda em diversas dúvidas e análises.

Ao Dr. Emerson Lima e o Msc. Leonard do laboratório BIOPHARM, pelo auxílio nos ensaios de atividade anti-inflamatória;

Ao Dr. Sergio Massayoshi Nunomura e a Msc. Rita Sales do LAPAAM, pela colaboração com os ensaios de cromatografia líquida;

Resumo

Libidibia ferrea é uma árvore de médio porte conhecida como jucá, encontrada na região Norte e Nordeste do Brasil. O uso de diversas partes da árvore é muito comum na medicina popular, principalmente nas regiões longínquas dos grandes centros urbanos. Os frutos de jucá são utilizados na forma de chá ou decocto para prevenir ou tratar inflamações. Os frutos foram coletados na zona urbana da Cidade de Manaus/Amazonas. Após triturado, 300 g de pó de jucá foram extraídos por maceração em metanol por cinco dias obtendo-se o extrato bruto. As análises em CLAE-EM foram realizadas no extrato metanólico bruto das cascas do fruto de jucá e no extrato bruto hidrolisado, sendo identificados alguns taninos hidrolisáveis, ácido HHDP, ácido DHHDP e ácido clorogênico. O extrato bruto foi submetido a partição líquido-líquido, obtendo-se as fases em hexano, clorofórmio, acetato de etila e fase hidroalcoólica. Foram realizados testes de atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e anti-inflamatório (LOX) nas fases obtidas. A fase em acetato de etila apresentou maior eficácia em todos os testes ($IC_{50} \text{ DPPH} = 3,32$, $IC_{50} \text{ ABTS} = 4,12$, $IC_{50} \text{ LOX} = 8,62$), enquanto que a fase em hexano apresentou os piores resultados entre as frações ($IC_{50} \text{ DPPH} = 59,92$, $IC_{50} \text{ ABTS} = 211,37$, $IC_{50} \text{ LOX} = 140,45$). A fase AcOEt foi submetida a cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20 e metanol como fase móvel. A fração resultante AcS2 foi fracionada em Sephadex LH-20 novamente utilizando metanol como fase móvel, cuja fração AcSS2 foi submetida a extração em fase sólida utilizando como fase móvel misturas de H₂O/ACN. Todas as frações foram analisadas em CLAE analítica e as frações 6 e 7 foram reunidas e foram identificados o ácido elágico e a metoxigeraniina, a elucidação das substâncias ocorreu por EM-APCI modo negativo e RMN (MeOD, 500 MHz). Por fim, ensaios de atividade antioxidante foram realizados para o ácido elágico ($IC_{50} \text{ DPPH} = 49,57$, $IC_{50} \text{ ABTS} = 60,00$) e para a metoxigeraniina ($IC_{50} \text{ DPPH} = 8,59$, $IC_{50} \text{ ABTS} = 6,49$). O método de isolamento presente neste trabalho pode ser utilizado para a obtenção de outras substâncias com atividade antioxidante e anti-inflamatória e também para a quantificação dessas substâncias.

Palavra-chave: *Libidibia ferrea*, Lipo-oxigenase, Fruto, DPPH, ABTS

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1.	Objetivos gerais	17
2.2.	Objetivos específicos	17
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1.	A família Fabaceae	18
3.2.	<i>Libidibia ferrea</i>	18
3.2.1.	Uso na medicina popular	20
3.2.2.	Estudos realizados sobre a <i>Libidibia ferrea</i>	21
3.3.	Substâncias fenólicas	32
3.3.1.	Ácidos fenólicos	32
3.3.2.	Flavonóides.....	34
3.3.3.	Taninos	37
3.3.4.	Atividade antioxidante	39
3.3.5.	Atividade anti-inflamatória.....	40
4.	METODOLOGIA	42
4.1.	Coleta.....	42
4.2.	Extração dos metabólitos secundários.....	43

4.3.	Partição líquido-líquido do extrato bruto.....	44
4.4.	Hidrólise alcalina das cascas do fruto do jucá.....	45
4.5.	Separação em coluna Sephadex LH-20	45
4.6.	Extração em fase sólida	47
4.7.	Isolamento de substâncias orgânicas em CLAE-DAD	48
4.8.	Análise em RMN de ^1H e de ^{13}C	49
4.9.	Ensaio antioxidantes	49
4.9.1.	Ensaio de captura do radical livre DPPH	49
4.9.2.	Ensaio de captura do radical livre ABTS	50
4.10.	Ensaio de inibição da lipo-oxigenase (LOX).....	51
4.11.	Análise em CLAE-DAD-EM/ESI do extrato bruto hidrolisado.....	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
5.1.	Extração dos metabólitos secundários.....	52
5.2.	Hidrólise alcalina do extrato metanólico bruto de do fruto do jucá ..	54
5.3.	Separação em coluna Sephadex LH-20	66
5.4.	Isolamento de Substâncias orgânicas em CLAE-DAD.....	68
5.5.	Análise em EM-APCI e RMN de H^1 e de C^{13} das substâncias isoladas.	
	69	
5.10.1.	Espectro de massas da substância 1	69
5.10.2.	Espectro de ressonância Magnética Nuclear (RMN) da substância	
1.....		71

5.10.3. Espectro de ressonância Magnética Nuclear da substância 2	76
5.6. Ensaio antioxidantes	78
5.7. Ensaio de inibição da Enzima Lipo-oxigenase (LOX)	81
6. CONCLUSÃO	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8. ANEXOS.....	98

Lista de Cromatogramas

Cromatograma 1. Extrato bruto metanólico de Jucá pré-hidrólise (a) e pós-hidrólise (b).....	56
Cromatograma 2. Cromatograma das frações 6 e 7, misturados. (-) análise em UV 254 nm. (-) análise em UV 220 nm.....	68

Lista de Figuras

Figura 1. (a) flores da árvore de pau-ferro, (b) árvore de pau-ferro, (c) frutos de pau-ferro e (d) tronco de pau-ferro. (FONTE: http://belezadacaatinga.blogspot.com.br/2012/05/juca-caesalpinia-ferrea.html).....	20
Figura 2. Rota biossintética dos ácidos fenólicos através da rota do chiquimato (DEWICK, 2009).....	33
Figura 3. Estrutura principal dos ácidos fenólicos (STALIKAS, 2007).	34
Figura 4. Rota biossintética da narigenina e outros Substâncias (DEWICK, 2009).....	35
Figura 5. Esqueleto principal dos flavonóides.....	36
Figura 6. Estrutura molecular da geraniina. Hemiacetal 1A e 1B (KILKUSKIE et al., 1992).	38
Figura 7. Cascata do ácido araquidônico ((NEEDLEMAN; ISAKSON, 1997).	41
Figura 8. Fragmentos do íon quasimolecular 343 m/z.	58
Figura 9. Formula estrutural do ácido galoilsinápico e suas possíveis fragmentações.....	59
Figura 10. Formula estrutural do ácido metilgaloilquínico e suas possíveis fragmentações.....	60
Figura 11. Estrutura molecular suposta para o pico 6 e seus fragmentos.	61
Figura 12. Suposta estrutura molecular da substância presente no pico 7	62
Figura 13. Formula estrutural da castalagina e seus fragmentos.	63

Figura 14. Estrutura do ácido clorogênico e seus fragmentos.	65
Figura 15. Estrutura do ácido Galoil-3-O-quinico.....	65
Figura 16. Estrutura do dímero do ácido DHHDP e seus fragmentos.....	66
Figura 17. Espectro de massas da amostra 2. Fonte de ionização APCI. Modo negativo (-). Analisador íon trap.	70
Figura 18. Estrutura da substância 1 proposta e seu hemiacetal de DHHDP.	71
Figura 19. Representação dos diferentes tipos de hemiacetais de DHHDP...	72
Figura 20. Correlações dos hidrogênios por COSY ^1H - ^1H (\rightarrow) e HMBC ^{13}C (\rightarrow).	74
Figura 21. Estrutura do ácido elágico e suas correlações no espectro de HMBC.	77

Lista de fluxogramas

Fluxograma 1. Organização dos ensaios a serem realizados no extrato bruto metanólico de <i>Caesalpinia ferrea</i>	44
Fluxograma 2. Partição líquido-líquido em ordem crescente de polaridade. .	45
Fluxograma 3. Frações coletadas na primeira separação em coluna Sephadex LH-20.	46
Fluxograma 4. Frações coletadas na segunda separação em coluna Sephadex LH-20.	47

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a flora Brasileira apresenta 120 mil espécies de plantas, entre as quais, cerca de 2000 são conhecidas pela medicina popular e 200 espécies possuem estudos científicos realizados (LORENZI, 2002). A floresta Amazônica abriga grande parte desse bioma Brasileiro. Estima-se que nela haja três vezes mais espécies de plantas que o conhecido atualmente. Muitas dessas plantas são utilizadas na medicina popular, porém poucas possuem estudos científicos que comprovem sua eficiência e, até mesmo, a dosagem necessária para atingir o efeito esperado (CALDERON et al., 2009).

A utilização de plantas com fins medicinais é uma herança deixada pelos indígenas brasileiros, os quais sabiam diferenciar as plantas comestíveis que detinham algum poder de cura, das plantas que serviam somente para fins alimentícios. Porém, por mais que este conhecimento tenha sido preservado com o passar das gerações, o uso dessa medicina alternativa vem se perdendo com o passar do tempo (RUDDER, 2002). Aliar o conhecimento popular ao científico é importante, uma vez que, o mesmo vem sendo não só modificado, com o passar do tempo, como extinto, devido principalmente ao crescente desmatamento da floresta em números alarmantes nos últimos anos (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

O estudo de plantas tradicionais tem importância na preservação e manutenção da saúde em regiões menos desenvolvidas. De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 85% da população mundial faz uso da medicina tradicional e, apesar do desenvolvimento da medicina atual, o uso de plantas

medicinais facilita o tratamento de doenças em áreas longínquas e de difícil acesso. O emprego desses remédios tradicionais de eficácia cientificamente comprovada é indicado para redução dos gastos com medicamentos, especialmente para populações com pouco acesso ao sistema de saúde. Além disso, incentiva o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais. As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e no desenvolvimento de drogas modernas. A descoberta de novas Substâncias pode ser benéfica tanto para o uso direto como terapêuticos como para a síntese de novas substâncias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003)

O interesse por produtos de origem natural vem crescendo exponencialmente nos países industrializados, assim como, o uso de plantas medicinais e fitoterápicas (CALIXTO et al., 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Este trabalho apresenta o estudo de substâncias fenólicas, por meio de técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos, para determinação estrutural das substâncias presentes na casca de frutos da espécie *Libidibia ferrea*, bem como, avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico bruto. A *Libidibia ferrea*, possui várias indicações populares entre as quais, destaca-se a indicação para o tratamento de inflamações devido a injúrias na pele. Além disso, esse estudo contribuiu para abrir caminho para futuras pesquisas, agregando valor comercial ao fruto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Caracterização química das cascas dos frutos de jucá e os relacionar com as atividades antioxidante e anti-inflamatória do fruto de *Libidibia ferrea*.

2.2. Objetivos específicos

- Obter um perfil químico do extrato metanólico bruto da casca do fruto de jucá;
- Analisar a atividade inibidora da lipo-oxigenase nas frações do extrato bruto da casca do fruto de jucá;
- Realizar testes de atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH e ABTS, no extrato bruto da casca do fruto de jucá e suas frações;
- Isolar os constituintes químicos que possam, posteriormente, servir como marcadores químicos para a subfamília *Caesalpinoideae*;
- Identificar as substâncias isoladas por meio de técnicas espectroscópicas (RMN ^1H , ^{13}C mono e bidimensionais) e espectrometria de massas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. A família Fabaceae

A família Fabaceae, também chamada de Leguminosae, é conhecida por apresentar o terceiro maior número de espécies e gêneros sendo eles 19.325 e 727 respectivamente (LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A. & LOCK, 2005). No Brasil, são encontrados 2.100 espécies e 188 gêneros (LIMA, 2000). As árvores da família Fabaceae ocorrem próximo a áreas tropicais e os centros de biodiversidade diminuem a partir do distanciamento da linha do equador. Os gêneros são classificados em três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae) (LEWIS, 1987). Nas florestas Brasileiras, as Leguminosas compõem grande parte da flora (SOUZA; LORENZI, 2008).

Apresentam-se como ervas anuais ou perenes, eretas, prostradas, difusas, trepadeiras, lianas, subarbustos, arbustos e árvores de pequeno, médio ou grande porte. Possuem folhas compostas, alternadas, com pulvino; pétala adaxial diferenciada e ovário monocarpelar (CHAPPILL, 1995). Os frutos são geralmente do tipo legume, mas apresentam variações: legume bacóide, nucóide e samaróide, e também lomento, folículo, sâmara e drupa (BARROSO et al., 1999).

3.2. *Libidibia ferrea*

A *Libidibia ferrea* é uma árvore característica de regiões pluviais com ampla dispersão. Na Amazônia é conhecida como jucá, porém, no resto do Brasil é denominada como pau-ferro, pau-ferro verdadeiro, ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi e muiré-ita. O nome jucá vem da palavra indígena yuca que significa matar, visto que,

os índios utilizavam a madeira da planta para fazer seus tacapes (Nascimento *et al.*, 1996), devido a rigidez da madeira, as quais os índios tupis fabricavam claves, e os chamavam de pau-de-yucá (matar), para matar seus prisioneiros (JÚNIOR, 1981). Por fim o nome pau-ferro ocorre também devido a rigidez do lenho (SOARES, 1990).

A planta pertence à subfamília Caesalpiniaceae também denominada subfamília Caesalpinioideae (subfamília I) da família Fabaceae. No Brasil, a planta é distribuída amplamente nas regiões norte e nordeste, podendo ser encontrada também na região sudeste, onde são conhecidas duas variedades: a *Caesalpineia ferrea* var. *ferrea* e a *Caesalpineia ferrea* var. *leiostachya* (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). A espécie *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. var. *ferrea*, recentemente, sofreu alteração taxonômica sendo reconhecida cientificamente como *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea* (BREMER et al., 2003; EGGERS et al., 2010). É uma árvore de grande porte, podendo chegar à altura de 15 metros, seu tronco é liso e cerne duro, possui folhas bipinadas com folíolos oblongos, ovalados ou obcovais, com flores diclamídeas, de coloração amarelada, hemafroditas e corola de quatro pétalas subiguais e uma quinta superior, séssil, ultrapassando o cálice gamossépalo; dez estames, ovário séssil e pubescente com 10 a 20 óvulos; fruto levemente estipado, quase reto (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). O período de amadurecimento do fruto pode ocorrer durante os meses de julho até o final de novembro (LORENZI, 2002).



Figura 1. (a) flores da árvore de pau-ferro, (b) árvore de pau-ferro, (c) frutos de pau-ferro e (d) tronco de pau-ferro. (FONTE:<http://belezadacaatinga.blogspot.com.br/2012/05/juca-caesalpinia-ferrea.html>).

3.2.1. *Uso na medicina popular*

Na região amazônica é muito comum o uso da planta para fins medicinais, principalmente para o tratamento de inflamações e lesões. O extrato das folhas, em forma de decocto, é utilizado externamente com aplicação no local, em tratamento de hemorroidas, enquanto que o uso interno da decocção é indicado contra amebíase e problemas hepáticos (DI STASI & HIMURA-LIMA, 2002). O extrato da folha pode ser utilizado também contra sífilis, gota, reumatismo e escrófulas (Carvalho, 1972). O chá das folhas é indicado para o tratamento de inflamações do fígado e tuberculose (DI STASI *et al.*, 1989).

Os frutos de jucá possuem diversas indicações medicinais, principalmente no combate contra anemia, afecções nos pulmões e no fígado, além do tratamento da diabetes (SOARES, 1990), é utilizado como adstringente devido à alta concentração de taninos (BERG, 1984). A ingestão da vagem crua é utilizada no tratamento contra tosse, inflamações do fígado e baço, desarranjo menstrual e problemas renais e pulmonares (DI STASI & HIMURA-LIMA, 2002).

Tanto a tintura como o chá do fruto de jucá são utilizadas no tratamento de afecções, inflamações e na cura de ferimentos e hemorragias externas (VIEIRA, 1992).

*3.2.2. Estudos realizados sobre a *Libidibia ferrea**

Estudos comprovam que a espécie apresenta atividade quimiopreventiva contra o câncer (NAKAMURA et al., 2002), atividade antiinflamatória (CARVALHO et al., 1996; DE ARAÚJO et al., 2014), antiúlcera (BACHI et al., 1995) e inibidora da aldose redutase, uma enzima relacionada à diabetes (UEDA et al., 2001), atividade alelopática (OLIVEIRA et al., 2012), analgésica (DE ARAÚJO et al., 2014; LIMA et al., 2011), antimicrobiana (DE ARAÚJO et al., 2014; SAMPAIO et al., 2009) e antifúngica (MARTINS et al., 2014; RHAYANNY et al., 2013)

No extrato etanólico das cascas da árvore de jucá foram identificadas 26 substâncias fenólicas, através da técnica de injeção direta em espectro de massas com ionização ESI e analisador tipo íon-trap no modo negativo, entre eles o ácido gálico, ácido elágico, monogaloilglicose, ácido 3-O-galoilquínico, ácido galoilchiquímico, digaloilglicose e galotaninos, além de, derivados de castalagina,

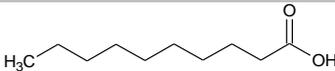
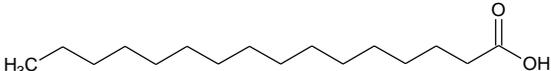
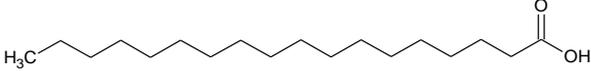
ácido valoneico dilactona, hexahidroxi-difenil-digaloil-glicose (elagitaninos e epicatequina, foram também quantificados, através do método de padrão interno, as substâncias ácido gálico ($17,68 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$), ácido 3-O-galoilquínico ($13,46 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$), galato de etila ($28,26 \pm 0,0,81 \mu\text{g/mL}$, utilizando como padrão de referência o ácido gálico, e as substâncias ácido valoneico dilactônico ($63,00 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$), ácido elágico ($57,64 \pm 1,22 \mu\text{g/mL}$) e o ácido metilelágico pentose ($4,98 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$) (WYREPKOWSKI et al., 2014). Nas cascas do fruto foram isolados o ácido galoilquínico, o ácido 3-O-elágico-4'-O- β -D-arabinopiranosídeo e um flavan-3-ol. Ainda dos frutos dessa espécie, foram isolados ácido gálico, o galato de metila (NAKAMURA et al., 2002) e o ácido elágico (UEDA et al., 2001). No caule da árvore também foram isolados o paufferol A, B e C, chalconas capazes de inibir a enzima DNA topoisomerase II (NOZAKI et al., 2007; OHIRA et al., 2013). A Tabela 1, mostra algumas dessas substâncias identificadas.

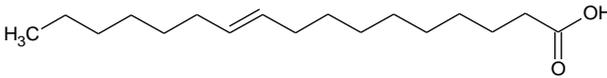
A presença de alguns ácidos graxos e terpenóides nos frutos, foram relatadas por Dias e colaboradores (2013) como o ácido linoleico, o ácido palmítico, o ácido elaidico o γ -sitosterol, o ácido esteárico e a lupenona. Nas sementes, Sawada e colaboradores (2014) identificou alguns ácidos graxos como o ácido linoleico, palmítico, oleico, esteárico, palmitolênico e caprico.

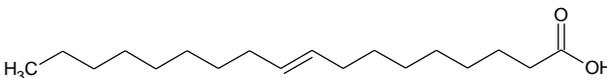
Nas folhas foram isolados alguns terpenos como o lupeol, a α -amirina e o *trans*-farnesol (COELHO, 2004; RIVERA, 1999), e três flavonoides isoorientina, vitexina e orientina (COELHO, 2004). Também foi isolado quercetina nas folhas da árvore de jucá (DA SILVA PORT'S et al., 2013). Nas sementes foram isolados alguns carboidratos como as galactomannoses (DE SOUZA et al., 2010)

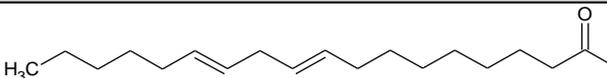
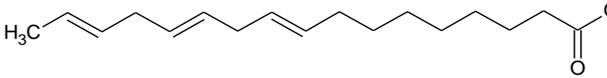
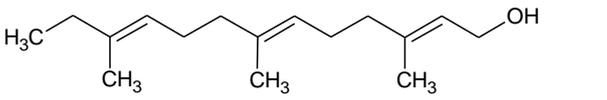
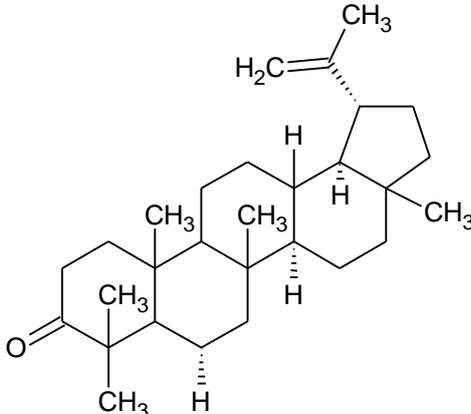
De acordo com Pereira e colaboradores (2012) os extratos em água e em metanol, e suas frações polissacarídicas da casca do fruto de jucá exibiram potencial anti-inflamatório via modulação negativa de histamina, serotonina, bradykinina, PGE₂ e NO liberado por um edema induzido por carragenina. Segundo Cavalcante e colaboradores (2014), as frações de acetato de etila dos frutos de *Libidibia ferrea* possuem potencial bactericida e ajudam a combater doenças causadas nas folhas por bactérias. Carvalho e colaboradores (1996) realizaram estudos de atividade anti-inflamatória do extrato aquoso do fruto em ratos camundongos pelo método de edema de pata induzida por carragenina. Todos os autores apresentaram resultados positivos para atividade anti-inflamatória dos frutos e também um potencial analgésico. Dias e colaboradores (2013) avaliaram o potencial anti-inflamatória dos extratos dos frutos de jucá utilizando CO₂ supercrítico.

Tabela 1. Substâncias identificadas em várias partes da planta *libidibia ferrea*.

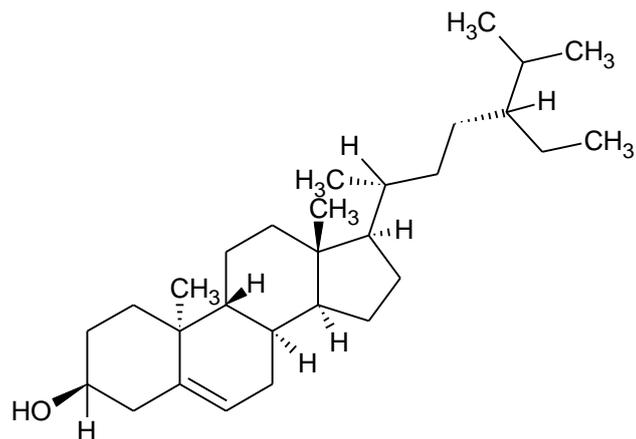
Substância	Estrutura	Parte	Referência
Ácido capríco		Frutos e Sementes	SAWADA et al. (2014)
Ácido palmítico		Frutos e Sementes	DIAS et al. (2013) e SAWADA et al. (2014)
Ácido esteárico		Frutos e Sementes	DIAS et al. (2013) e SAWADA et al. (2014)

Ácido palmitolenico  Sementes SAWADA et al. (2014)

Ácido elaidico  Frutos DIAS et al. (2013)

Substância	Estrutura	Parte	Referência
Ácido linoleico		Frutos e sementes	DIAS et al. (2013) e SAWADA et al. (2014)
Ácido linolênico		Semente	SAWADA et al. (2014)
<i>Trans</i> -farnesol		Folhas	COELHO, (2004); RIVERA, (1999)
Lupenona		Frutos	DIAS et al. (2013)

γ -sitosterol

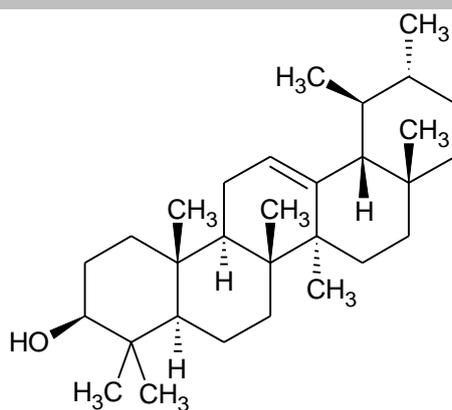


Frutos

DIAS et al.
(2013)

Substância	Estrutura	Parte	Referência
------------	-----------	-------	------------

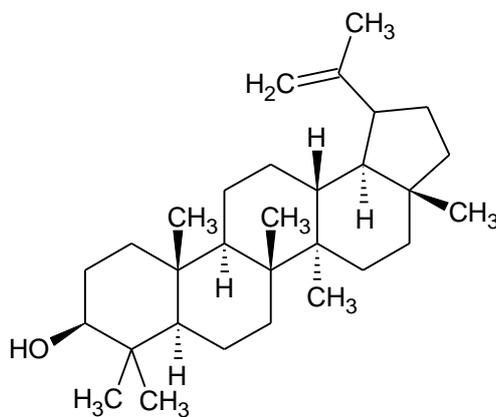
A-amirina



Folhas

COELHO,
(2004);
RIVERA,
(1999)

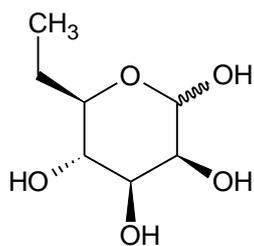
Lupeol



Folhas

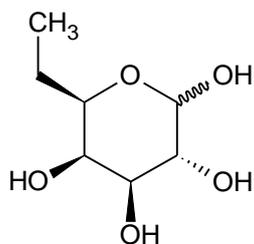
COELHO,
(2004);
RIVERA,
(1999)

D-galactose



Sementes LOPES et al., (2013)

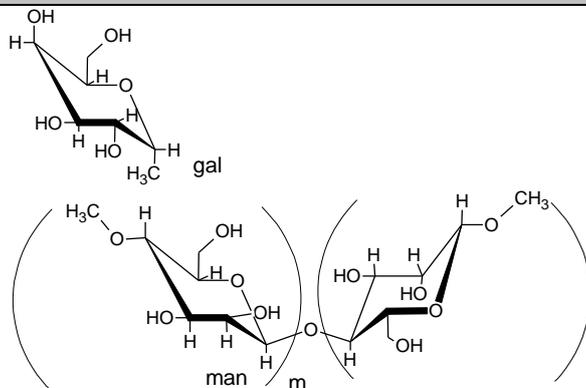
D-mannose



Sementes LOPES et al., (2013)

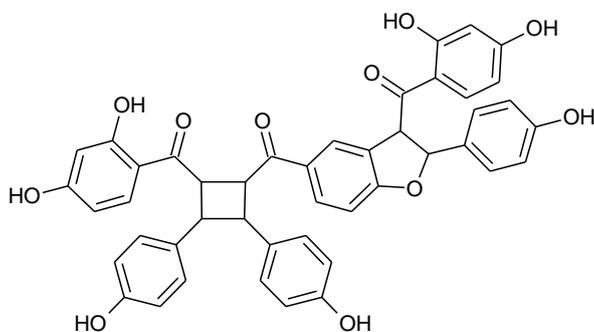
Substância	Estrutura	Parte	Referência
------------	-----------	-------	------------

Galactomannose



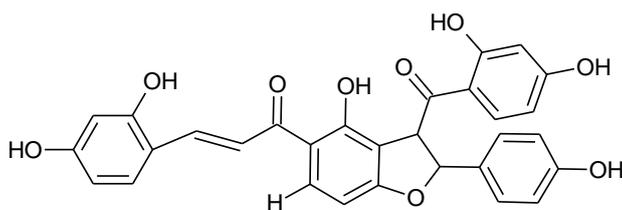
Sementes LOPES et al., (2013)

Pauferrol A



Casca NOZAKI et al., 2007

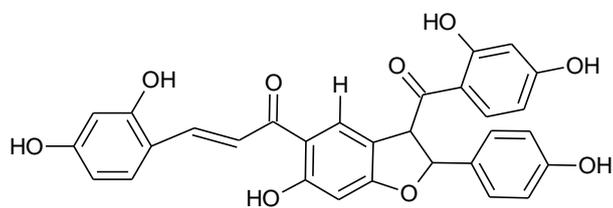
Paufferol B



Casca

OHIRA et al.,
2013

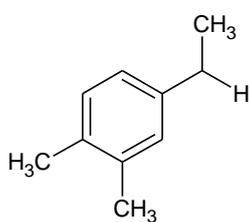
Paufferol C



Casca

OHIRA et al.,
2013

3,4-
dimetilbenzaldeído

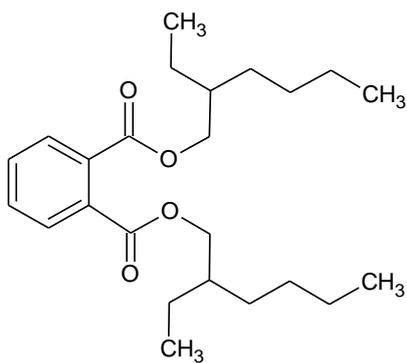


Frutos

DIAS et al.
2013

Substância	Estrutura	Parte	Referência
------------	-----------	-------	------------

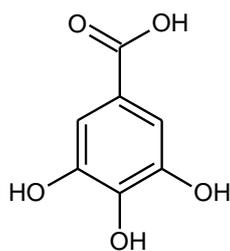
di-2-etilhexilftalato



Frutos

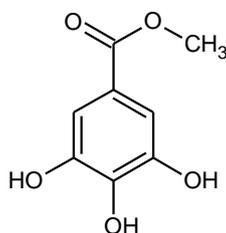
DIAS et al.
2013

Ácido gálico



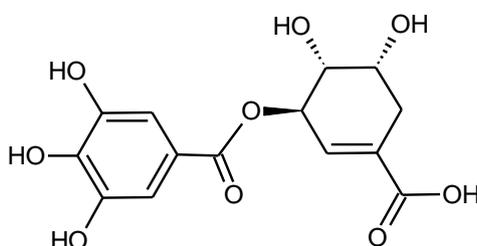
Frutos,
folhas,
casca
NAKAMURA
et al. (2002),
DE ARAÚJO
et al. (2014),
SILVA et al.
(2014),
Port's et al.
(2013)
WYREPKO
WSKI et al.,
(2014)

Metil galato



Frutos
NAKAMURA
et al. (2002),
SILVA et al.
(2013)
WYREPKO
WSKI et al.,
(2014)

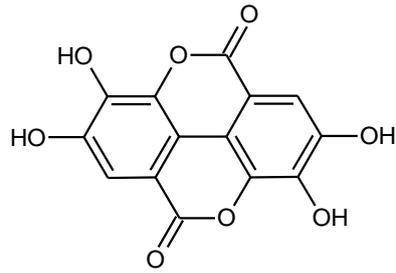
Ácido 3-O-
galoilquínico



Casca
WYREPKO
WSKI et al.,
(2014)

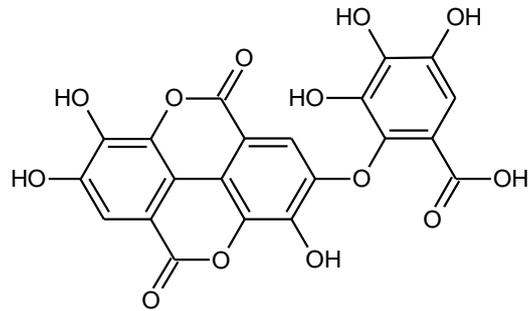
Substância	Estrutura	Parte	Referência
Galoilglicose		Casca	WYREPKO WSKI et al., (2014)

Ácido elágico



Frutos,
folhas,
casca
UEDA et al.
(2002),
VASCONCE
LOS et al.
(2013)
WYREPKO
WSKI et al.,
(2014)

Ácido vanoleico
dilactônico

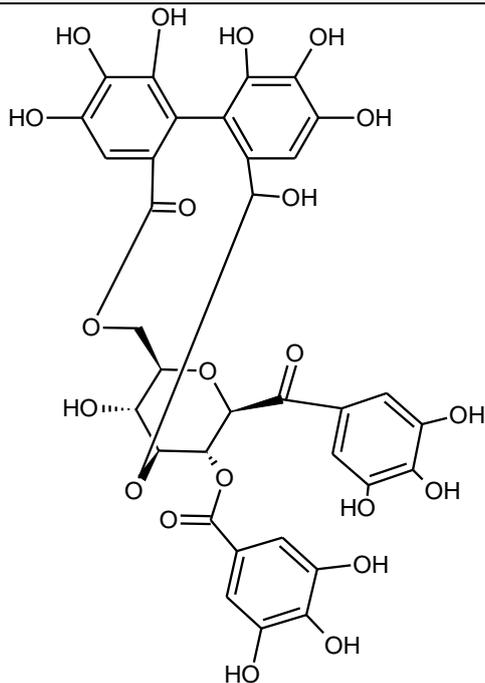


Frutos,
casca
UEDA et al.
(2002),
WYREPKO
WSKI et al.,
(2014)

Substância	Estrutura	Parte	Referência
------------	-----------	-------	------------

HHDP-

Digaloilglicose

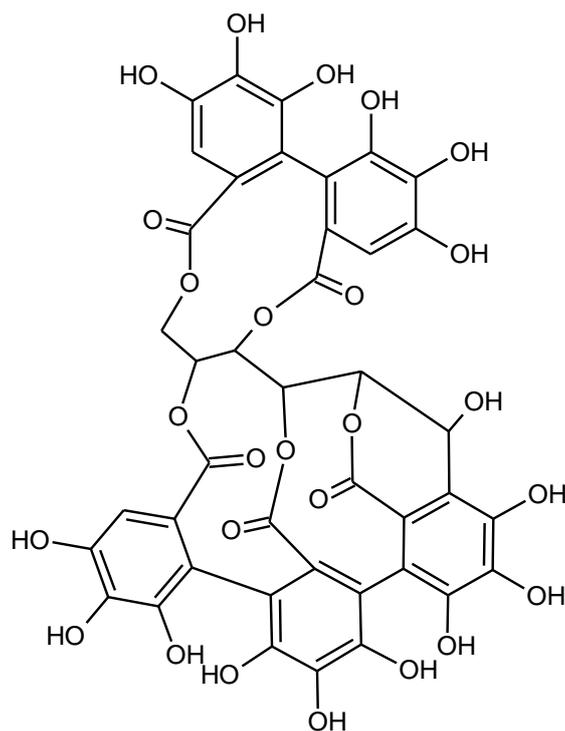


Casca

WYREPKO

WSKI et al.,
(2014)

Castalagina



Casca

WYREPKO

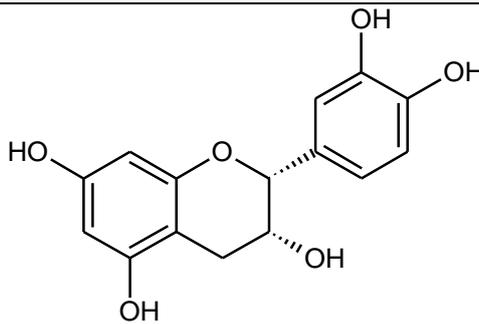
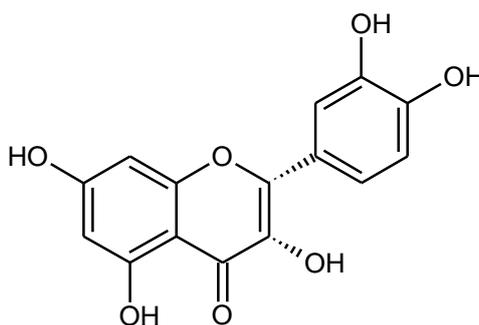
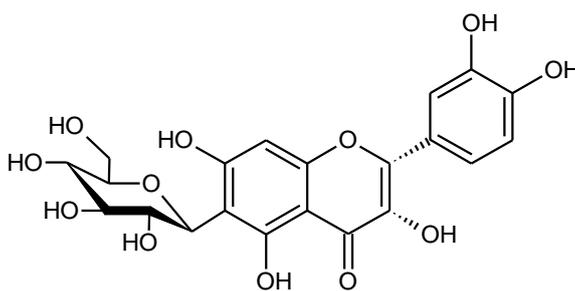
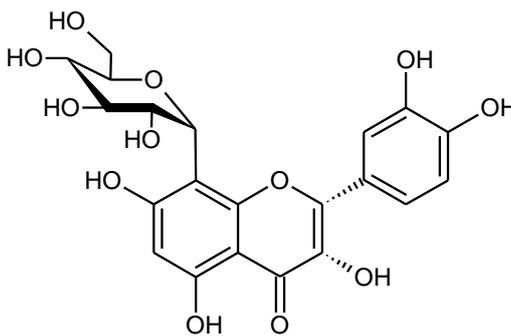
WSKI et al.,
(2014)

Substância

Estrutura

Parte

Referência

Catechina		Casca	WYREPKO WSKI et al., (2014), VASCONCE LOS et al. (2011), DE ARAÚJO et al. (2014)
Quercetina		Folhas	PORT'S et al. (2013)
Isoorientina		Folhas	COELHO (2014)
Vitexina		Folhas	COELHO (2014)

Estudos realizados por Boudjou e colaboradores (2013), revelam que a presença de compostos fenólicos está relacionado com o potencial anti-inflamatório do extrato de alguns legumes, principalmente na inibição da enzima lipo-oxigenase.

3.3. Substâncias fenólicas

A classificação das substâncias fenólicas é realizada de acordo com a sua cadeia carbônica principal, que pode variar de substâncias fenólicas simples como as benzoquinonas e até polímeros como as ligninas e os taninos. Entre os grupos das substâncias fenólicas mais estudadas estão os ácidos fenólicos e os flavonoides.

3.3.1. Ácidos fenólicos

As substâncias fenólicas possuem em suas estruturas químicas grupos hidroxilas ligados a anéis aromáticos, estão presentes em vegetais e frutos podendo estar na forma livre ou ligada a açúcares e proteínas. Essas substâncias são originárias do metabolismo secundário das plantas, sintetizados pela via do chiquimato partindo do fosfoenolpiruvato (PEP) e do D-eritrose-4-fosfato, após várias etapas de aldolização, oxidação e enolização, é obtido o ácido gálico, que é o principal componente presente em taninos hidrolisáveis, o ácido chiquímico e o ácido protocatequico, que são importantes precursores de vários ácidos fenólicos (DEWICK, 2009). A rota biossintética desses ácidos fenólicos pode ser observada na figura 3.

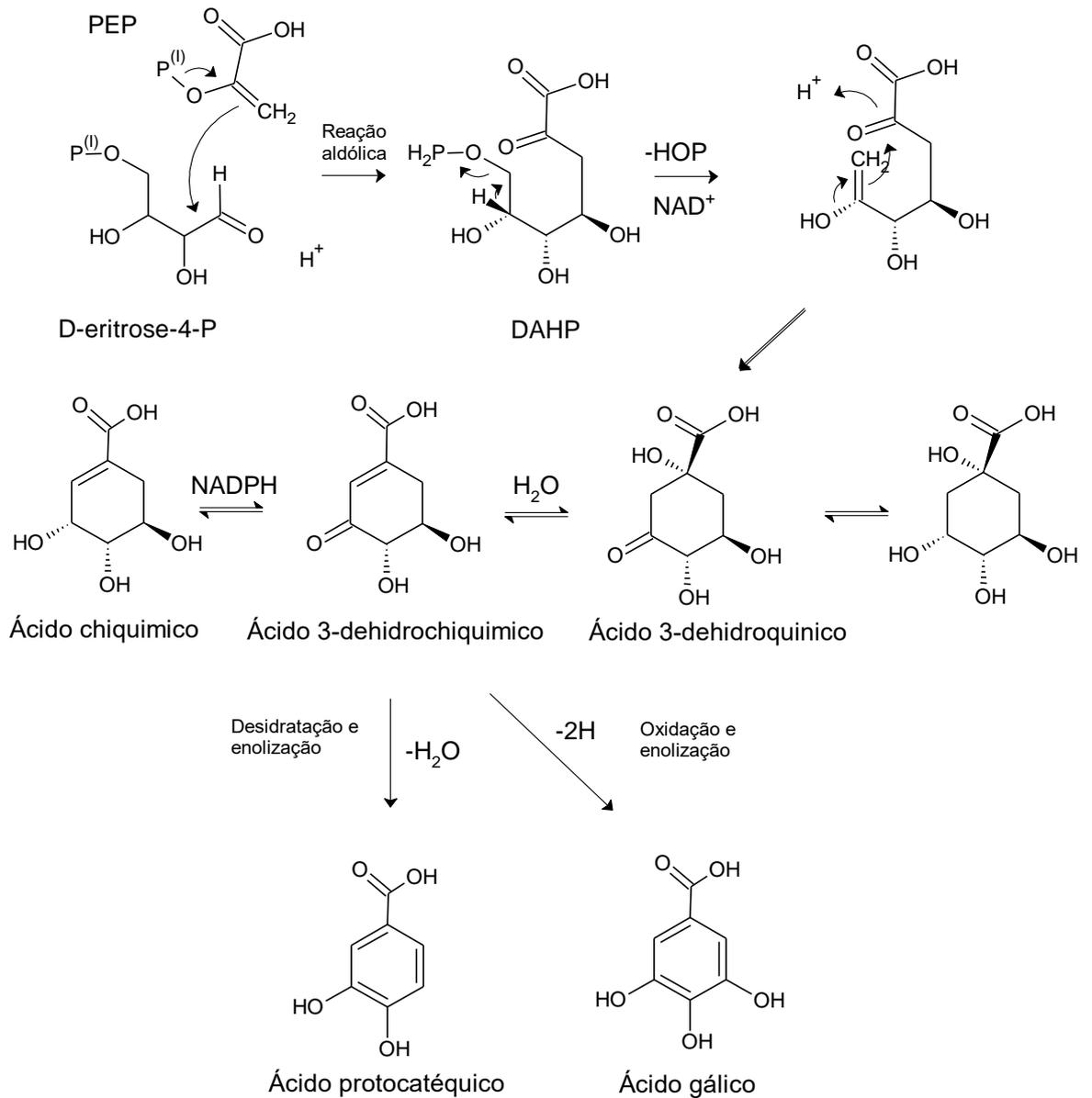


Figura 2. Rota biossintética dos ácidos fenólicos através da rota do chiquimato (DEWICK, 2009).

Esses metabólitos são essenciais no crescimento e reprodução das plantas, formando-se em condições de estresse como infecções, fermentos e radiação ultravioleta, e também atuam como agentes antimicrobianos (CROFT, 1998).

Os ácidos fenólicos são fenóis que possuem um grupo carboxílico funcional, e podem ser divididos entre ácido hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. A diferença entre eles é o tamanho da cadeia do ácido carboxílico (STALIKAS, 2007).

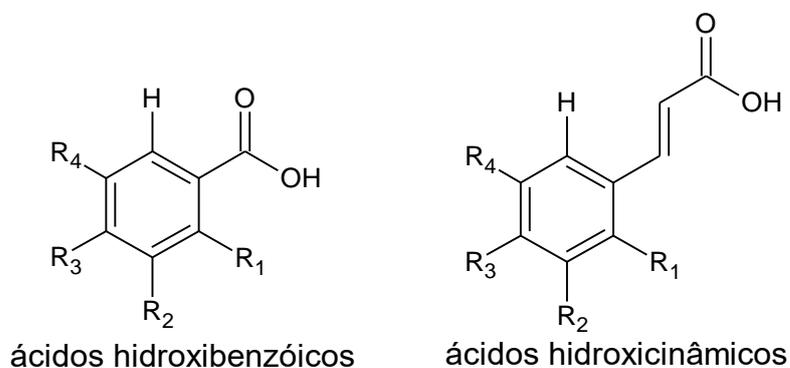


Figura 3. Estrutura principal dos ácidos fenólicos (STALIKAS, 2007).

Os ácidos fenólicos estão presentes em grande parte nos vacúolos das células vegetais realizando ligações do tipo éster, éter e acetal na celulose, apenas uma pequena fração está disposta na forma livre (STALIKAS, 2007).

3.3.2. Flavonóides

Os flavonoides são substâncias altamente distribuídas no reino vegetal e são pigmentos comuns depois da clorofila e carotenoides. Ocorrem geralmente nas plantas como derivados glicosilados e seu papel fisiológico vão desde a proteção contra a radiação ultravioleta até a reprodução da planta. Sua origem biossintética vem de um iniciador 4-hidroxi-cinnamoil-CoA com extensão da cadeia usando 3 moléculas de malonil-CoA, a formação dos flavonoides dependerá da natureza da enzima responsável pelas reações de aldolização e do tipo Claisen que irão gerar os

anéis aromáticos (DEWICK, 2009). A figura 3 representa a rota biossintética de várias substâncias, entre eles a narigenina que é percussora de vários flavonoides.

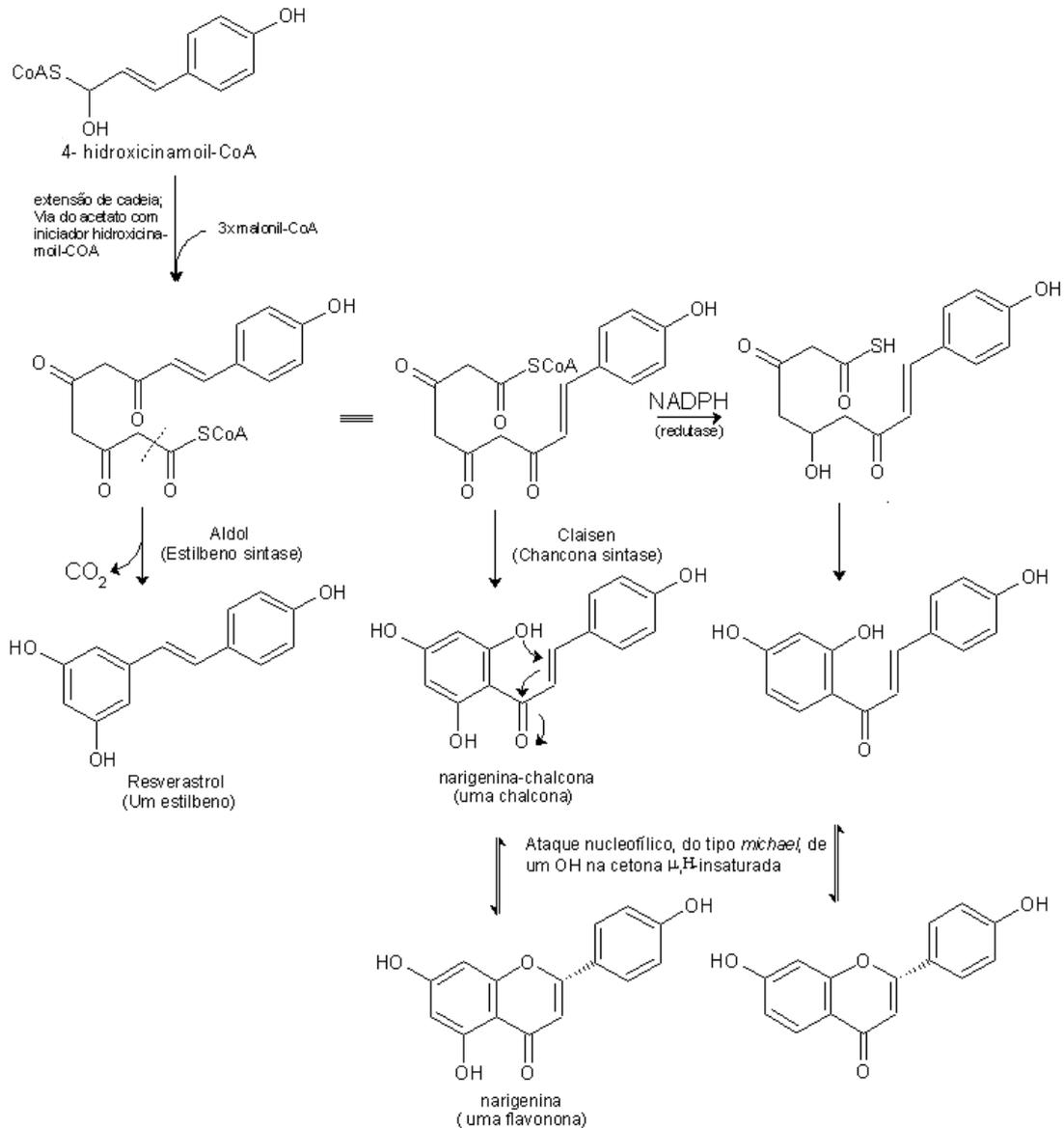


Figura 4. Rota biossintética da narigenina e outros Substâncias (DEWICK, 2009).

Outra característica importante é que os flavonoides funcionam como antioxidantes naturais nas plantas protegendo as células vegetais de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo sistema de transporte de elétrons fotossintéticos (STALIKAS, 2007)

Estruturalmente, os flavonoides são caracterizados por apresentarem três anéis fundidos como unidade estrutural básica, possuindo 15 átomos de carbono no esqueleto principal, do tipo C6-C3-C6, no qual os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos (anéis A e B) conectados por um anel contendo 3 carbonos e 1 átomo de oxigênio. A estrutura básica dos flavonoides será ilustrada na figura 6 a seguir (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

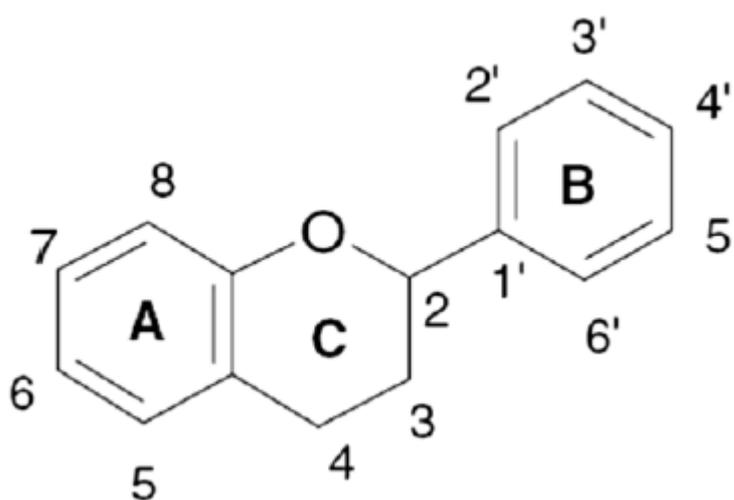


Figura 5. Esqueleto principal dos flavonóides.

As propriedades biológicas das substâncias fenólicas estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre um determinado meio. O consumo desses antioxidantes naturais, presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas de oxigênio e nitrogênio, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002).

3.3.3. Taninos

Os taninos são substâncias encontradas em grande quantidade no reino vegetal em qualquer parte das plantas. Normalmente, a maior concentração de taninos ocorre em partes que são atacadas por insetos, como as folhas e os frutos, estes últimos, de acordo com a literatura, apresentam maior concentração de taninos nas plantas. São separados de acordo com sua composição química podendo ser hidrolisáveis ou condensados (WATERMAN; MOLE, 1994).

Os taninos hidrolisáveis apresentam em sua estrutura básica, moléculas de ácido gálico (galotaninos) conectados em açúcares (D-glicopirranose) esterificadas com moléculas de ácido gálico. O ácido gálico pode formar, através de acoplamento oxidativo biaril (C-C) ou esterificação diaril (C-O), o ácido hexahidroxi-difênico (HHDP) ou ácido elágico, as moléculas de ácido gálico presentes nos galotaninos, após sofrerem reações de acoplamento oxidativo, produzem os elagitaninos, como exemplo, a geraniina (Figura 6), que é um tanino hidrolisável derivado do ácido elágico e possui no centro da molécula uma D-glicopirranose, e nesse açúcar estão ligados moléculas de ácido gálico, ácido hexahidroxi-fênico (HHDP) e o ácido dehidrohexahidroxi-fênico (DHHDP). Quando em solução, os derivados de elagitaninos podem sofrer isomerização formando duas estruturas de hemiacetais distintos (Figura 6) (KILKUSKIE et al., 1992; SCHMIDT; MAYER, 1956).

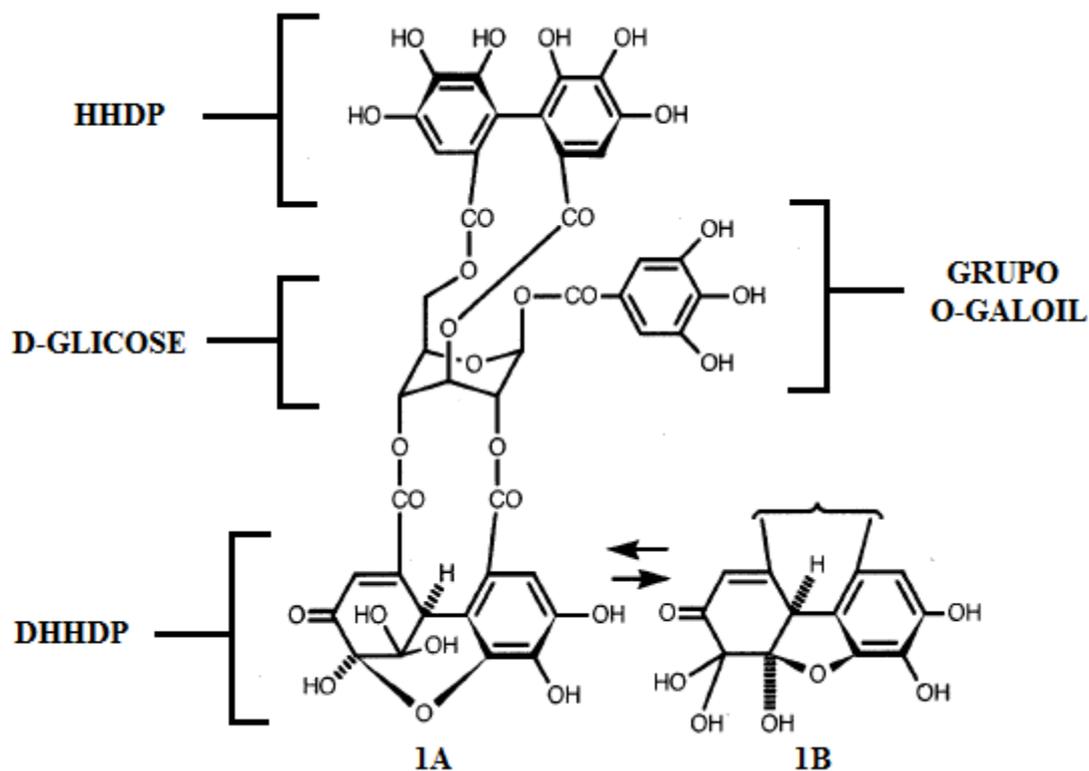


Figura 6. Estrutura molecular da geraniina. Hemiacetal 1A e 1B (KILKUSKIE et al., 1992).

As propriedades farmacológicas de substâncias polifenólicas podem originar-se principalmente da sua facilidade em estabilizar radicais livres e da quelação de metais no organismo (OKUDA; YOSHIDA, 2008).

Já estrutura dos taninos condensados apresentam substâncias vindas da via biosintética mista (chiquimato e acetato) através da formação do flavon-3-ol (catequina) como unidade básica. Comumente esses taninos são encontrados como oligômeros. Estudos utilizando taninos isolados e extratos contendo taninos comprovam o potencial anti-inflamatório dessa classe de substâncias fenólicas (OKUDA; YOSHIDA, 2008; OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 2000; THOMAS; FILHO, 1985).

3.3.4. Atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes ser enzimáticos ou não enzimáticos, tais como que α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e as substâncias fenólicas (flavonoides e taninos) (HALLIWELL, 2001). O consumo de antioxidantes naturais, como as substâncias fenólicas presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002).

Existem muitos tipos de doenças que podem ser causadas por processos degenerativos no organismo. Esses processos ocorrem devido a espécies altamente reativas de oxigênio, que se comportam como radicais livres, presentes após o metabolismo nas células. Esses radicais livres iniciam reações de peroxidação em ácidos graxos presentes nas membranas celulares, os radicais peróxidos formados, por sua vez, podem atacar proteínas da membrana causando danos à célula (HALLIWELL, 2001). Portanto, as plantas merecem atenção especial, pois sintetizam uma grande quantidade de metabólitos que podem prevenir a formação e controlar a propagação esses radicais livres. O estudo fitoquímico dessas plantas é essencial para o desenvolvimento de novas drogas, já que esses estudos visam à descoberta de possíveis princípios ativos provenientes de espécies com potencial medicinal (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

3.3.5. Atividade anti-inflamatória

Alguns estudos epidemiológicos têm mostrado que Drogas Anti-inflamatórias Não-Esteroideas (DAINEs) possuem atividade anticancerígena e regressão no crescimento de tumores em humanos. As substâncias fenólicas estão por definição, provavelmente classificadas no grupo dos DAINEs, por possuírem atividade anti-inflamatória comprovada (BOUDJOU et al., 2013; COSTAMAGNA et al., 2016; DIAS et al., 2013).

Os eicosanoides são substâncias sintetizadas por ácidos graxos essenciais com cadeia de 20 carbonos e 3,4 ou 5 ligações duplas. Nos seres humanos o precursor mais abundante é o ácido araquidônico (AA) podendo ser sintetizado pelo ácido linoleico da dieta ou ingerido diretamente como componente dietético. A biossíntese dos eicosanoides depende diretamente da liberação do AA esterificado no domínio *sn-2* pelas fosfolipases A₂ ou por fosfolipídios presentes na membrana celular. Após liberado, o AA é metabolizado rapidamente em substâncias oxigenadas por vários sistemas enzimáticos chamados ciclooxigenases (COX) e lipo-oxigenases (LOX) (ALWIN C. POWERS & DAVID D' ALESSIO, 2011).

Enzimas ciclooxigenases (COXs, prostaglandinaendoperoxido sintase), catalisam duas reações, a primeira inicia-se com a adição do oxigênio molecular no ácido araquidônico (AA) para formar Prostaglandina G₂ (PGG₂). A segunda é a conversão da PGG₂ em PGH₂ por uma peroxidase. Assim, essas enzimas COXs participam da etapa crucial da cascata metabólica do AA (Figura 6) formando

prostaglandinas pró-inflamatórias, tromboxanos e prostaciclina, que causam inflamações no organismo. O uso de esteroides em tratamentos de doenças inflamatórias é recomendado em um curto período de tempo, devido a sua toxicidade, porém, o uso prolongado de DAINES é associado a efeitos severos como hemorragias gastrointestinais devido à inibição da enzima COX-1. A inibição severa de COX-2 pode causar problemas cardiovasculares. Consequentemente é necessário o estudo de produtos naturais com efeitos colaterais mínimos (ALBERTO; ZAMPINI; ISLA, 2009).

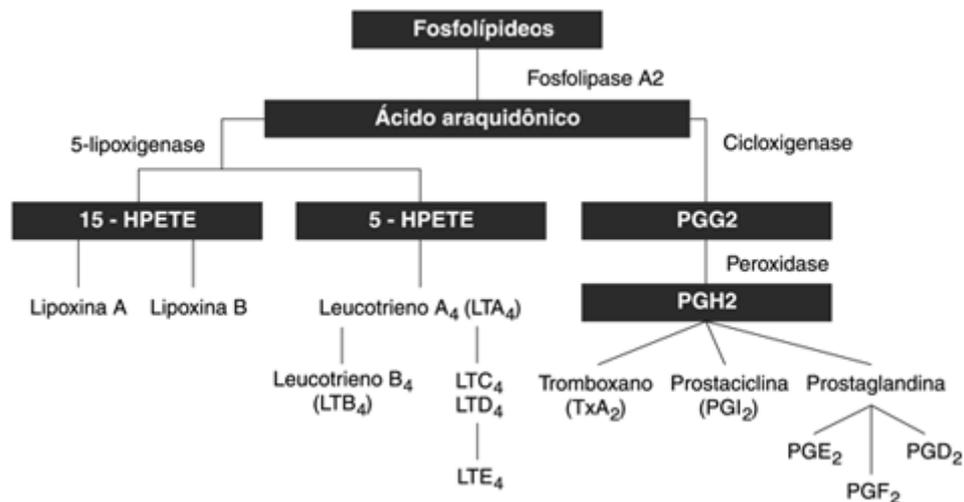


Figura 7. Cascata do ácido araquidônico ((NEEDLEMAN; ISAKSON, 1997).

As lipo-oxigenases constituem uma família de enzimas que contêm ferro não ligado ao heme e catalisam a oxidação de ácidos graxos poliênicos em hidroxiperoxidos lipídicos. O ácido araquidônico é metabolizado em hidroxiperoxi-eicosatetraenóicos (HPETE) que variam quanto ao local da inserção do grupo hidroxiperoxido. Nos seres humanos existem cinco tipos de enzimas LOX ativas, a

5(S)-LOX, 12(S)-LOX, 12(R)-LOX, 15(S)-LOX-1 e 15(S)-LOX-2. A via da 5-LOX resulta na síntese de leucotrienos (LC) que são responsáveis pela persistência e o desenvolvimento da resposta inflamatória. Os principais LCs sintetizados pela 5-LOX são o LTC₄, LTD₄ e LTE₄, que são mediadores das inflamações. Estudos mostram que a inibição dessas enzimas e os antagonistas seletivo dos receptores dos Cis-LTs são eficazes no tratamento de asma leve e moderada (ALWIN C. POWERS & DAVID D' ALESSIO, 2011).

De acordo com Di Stasi (2002), ingestão da vagem crua do jucá possui resposta frente a inflamações e problemas nos pulmões, porém, nenhum estudo sobre a inibição de enzimas 5-LOX foram realizados.

4. METODOLOGIA

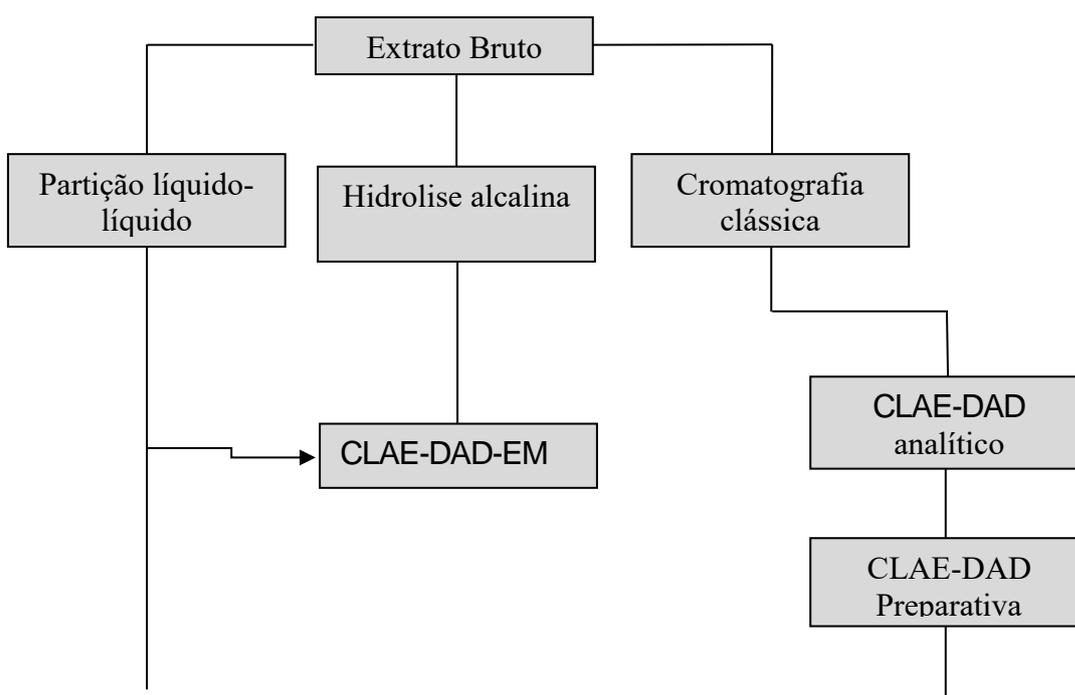
4.1. Coleta

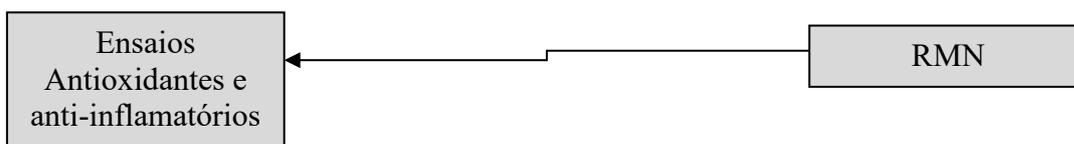
Os frutos coletados foram doados por uma moradora do Bairro de Adrianópolis com localização (-3,110803, -60,010966) na cidade de Manaus, Amazonas. Grande parte das amostras foram coletados após a queda do fruto, carregando consigo contaminantes do solo. Posteriormente, estes frutos passaram por um processo de separação do material orgânico e inorgânico presente no solo, do qual este foi coletado, como folhas, galhos, pedras e frutos que apresentaram sua estrutura comprometida por ação mecânica ou biológica. Em seguida, os frutos foram lavados em água corrente, a fim de se retirar resíduos do solo, impregnados na casca do fruto. Após a lavagem, este foi acondicionado em um freezer à temperatura de -10 °C. Os

frutos foram secos em estufa com circulação de ar à temperatura de 40 °C e, por fim, pulverizados, em moinho de facas, para aumentar o poder de extração do solvente nos metabólitos secundários presentes no fruto e armazenadas em sacos plásticos de 1 litro. A Exsicata foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e recebeu o nº 216.257.

4.2. Extração dos metabólitos secundários

O pó das vagens (300g) de *Libidibia ferrea* pulverizadas, foi macerado em metanol (1L) durante 5 dias, sendo o solvente trocado a cada 24 horas. Posteriormente, o extrato macerado foi filtrado e rotaevaporado. A partir do extrato metanólico bruto, foram realizados testes de atividade inibitória da enzima lipoxigenase e de antioxidantes (DPPH e ABTS), hidrólise alcalina dos taninos, partição líquido-líquido, separações em cromatografia clássica e moderna para determinação de Substâncias orgânicos responsáveis por tal atividade.

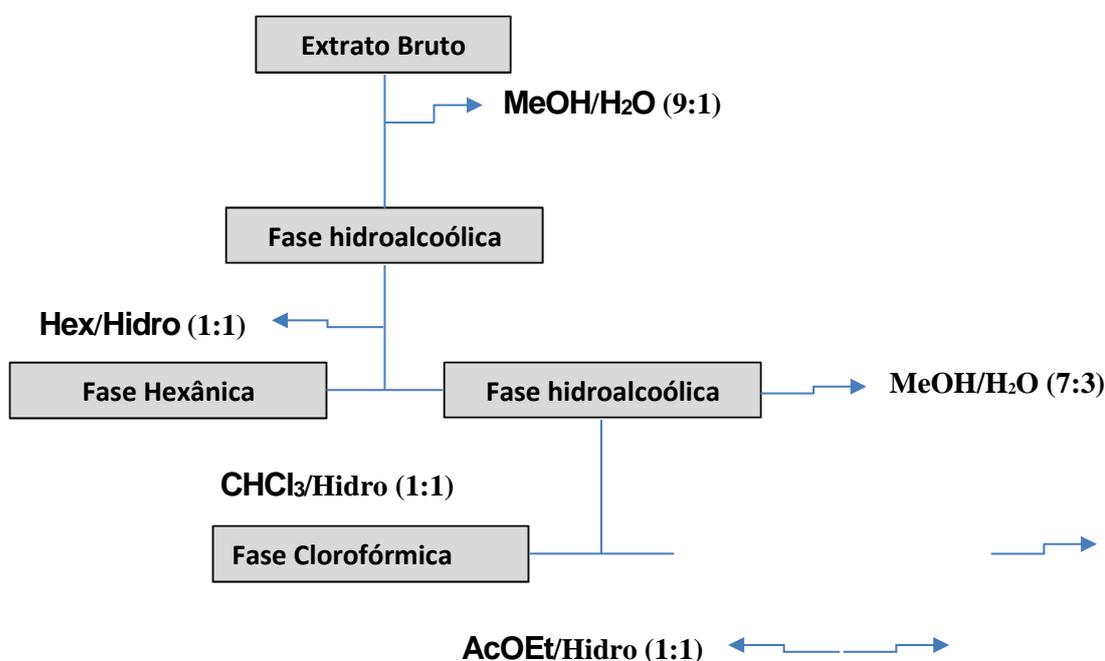


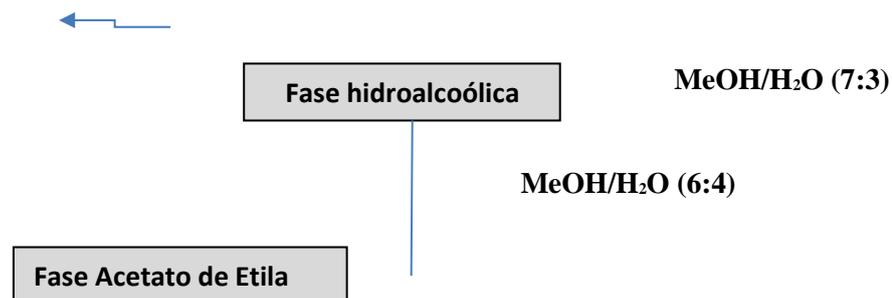


Fluxograma 1. Organização dos ensaios a serem realizados no extrato bruto metanólico de *Libidibia ferrea*.

4.3. Partição líquido-líquido do extrato bruto

As amostras de extratos metanólicos das cascas de jucá foram fracionadas por partição líquido-líquido, em solventes por ordem crescente de polaridade, utilizando inicialmente uma solução hidroalcoólica de metanol/água (9:1) e hexano na proporção 1:1 (v:v Mistura hidroalcoólica/solvente). As seguintes partições foram realizadas nas proporções de metanol/água (9:1), (7:3) e (6:4) para os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente. Todas as frações foram concentradas em rotaevaporador, congeladas, liofilizadas e pesadas para possibilitar o cálculo do rendimento.





Fluxograma 2. Partição líquido-líquido em ordem crescente de polaridade.

Nas fases obtidas, foi realizada a triagem para a avaliação da atividade anti-inflamatória e atividade antioxidante, a fim de isolar substâncias ativas.

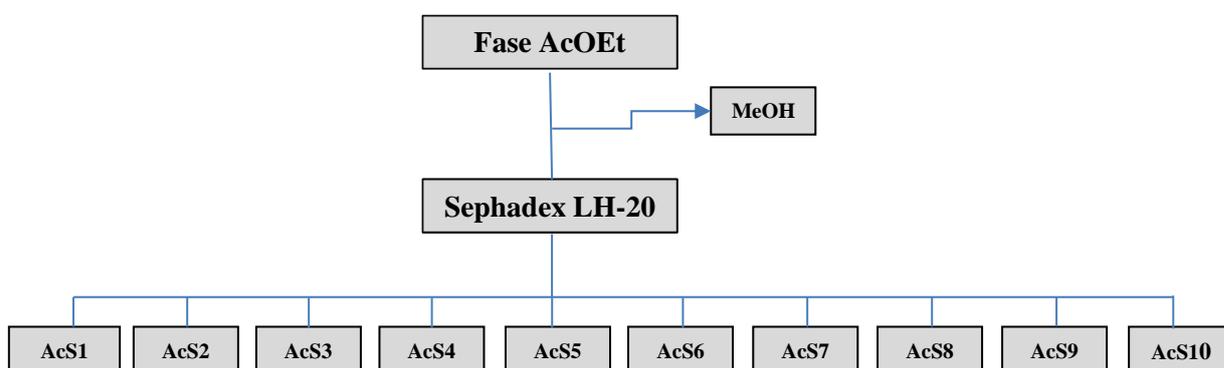
4.4. Hidrólise alcalina das cascas do fruto do jucá

A reação de hidrólise alcalina dos taninos foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de (GALVEZ, et al. 1997), onde uma solução de 48% NaOH (1:1,5 v/v) foi adicionada à 5 g do extrato metanólico das cascas de jucá, e submetido a aquecimento até atingir a temperatura de 100 °C, durante 6 horas. Em seguida, a solução foi resfriada a temperatura de 30 °C e neutralizada com uma solução de 60% H₂SO₄. As amostras hidrolisadas foram utilizadas, posteriormente, para caracterização de algumas substâncias presentes no extrato metanólico de jucá, através do perfil cromatográfico, gerado pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (EM) com fonte de ionização por electrospray (ESI) e detector íon-trap (IT).

4.5. Separação em coluna Sephadex LH-20

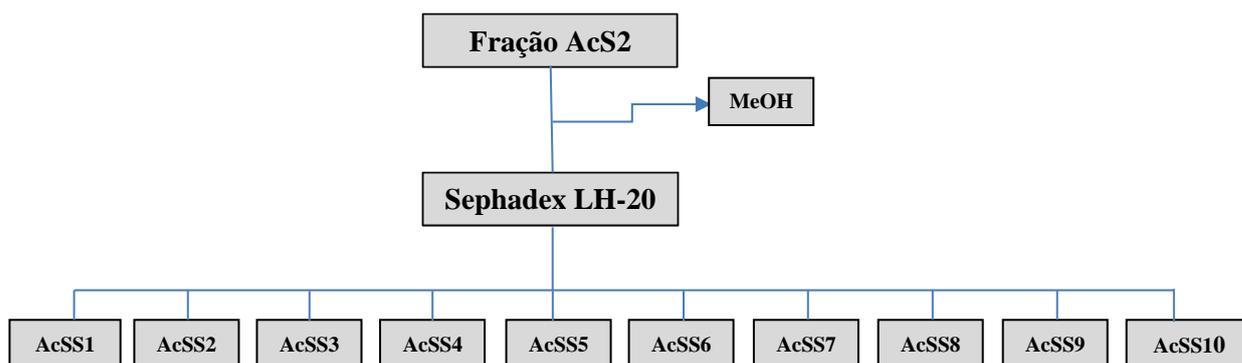
A separação cromatográfica em coluna Sephadex LH-20 foi realizada através da metodologia empregada por Yang e colaboradores (2012), com algumas

modificações. Inicialmente, 5 g da fração de acetato de etila foi dissolvida em água e adicionada em uma coluna de vidro medindo 20 mm x 600 mm, recheada com 20 g de sephadex LH-20 (Davisil®). A fase de sephadex LH-20 foi condicionada com água Milli-Q durante uma noite. A fase estacionária foi empacotada e equilibrada eluindo 10 volumes de coluna com água Milli-Q. Como eluente foi utilizado o metanol (Tedia), sendo coletado o total de 10 frações de 150 mL cada. A velocidade de separação foi auxiliada por uma bomba peristáltica. Após a coleta das 10 frações, a coluna foi regenerada adicionando 10 vezes o volume da coluna em água Milli-Q. Cada fração coletada foi seca em nitrogênio, congelada, liofilizada e pesada para posterior cálculo de rendimento. As frações resultantes da separação foram nomeadas de **AcS1** à **AcS10**.



Fluxograma 3. Frações coletadas na primeira separação em coluna Sephadex LH-20.

Para garantir a purificação dos taninos, a metodologia de separação cromatográfica por exclusão de tamanho, em Sephadex LH-20, foi realizada, novamente, na fração AcS2 que possuía a segunda maior massa (1,2606 g). Os mesmos parâmetros da metodologia anterior foram utilizados. As frações foram nomeadas de **AcSS1** à **AcSS10**.



Fluxograma 4. Frações coletadas na segunda separação em coluna Sephadex LH-20.

4.6. Extração em fase sólida

A técnica de extração em fase sólida foi realizada utilizando uma coluna de 100 mm x 10 mm, recheada com 3 g de sílica RP18 (Davisil ®), condicionada com água milli-Q por 1 hora e, em seguida, adicionaram-se 300 mg da fração **AcSS2** ao sistema. Durante a separação, foram utilizados gradientes de H₂O/ACN listados na tabela 1. Cada eluente foi preparado com volume de 100 mL.

Tabela 2. Gradiente de eluição utilizado na separação por extração em fase sólida.

Solvente	H ₂ O	ACN	Frações
Proporção (%)	100	0	1
			2
	80	20	3
			4
	60	40	5
			6
	40	60	7
			8
	0	100	9
			10

Foram utilizados 300 mg da fração AcSS2, selecionada para purificação por extração em fase sólida. No total foram coletadas 10 frações (1 a 10) a cada 50 mL de eluente. Sendo as frações 6 e 7 escolhidas, devido à semelhança em seu perfil e excelente separação obtida. Pesou-se 1 mg de cada uma das amostras dissolvidas em metanol, centrifugadas, e por fim, transferidas para um *vial*. As frações foram injetadas em CLAE-DAD analítico para o desenvolvimento do método em CLAE-DAD preparativo.

4.7. Isolamento de substâncias orgânicas em CLAE-DAD

O método para isolamento de substâncias presentes nas frações purificadas em Sephadex LH-20 da fase acetato de etila, foi realizado utilizando o kit (n°4253402) composta de duas colunas (Shimadzu) C18 Shim-pack PREP-ODS (H), com dimensões 4,6 mm x 250 mm para a analítica e 20 mm x 250 mm para a preparativa, ambas com diâmetro da partícula de 5 µm e diâmetro do poro de 100 Å. A eluição ocorreu com diferentes gradientes de (B) MeOH / (A) TFA (pH = 2): (B) MeOH / (A) TFA (pH = 2), inicialmente, 0-15 min; 25-50% B, 15-20 min; 50-25% B, 20-25 min; 25% B, e por fim, um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência preparativo (Shimadzu LC-6AD), com bomba binária, detector DAD (SPD-10A VP) foi utilizado para obtenção dos cromatogramas nos comprimentos de onda 220 nm e 254 nm. Para isolamento foram utilizadas as frações 6 (4,5 mg) e 7 (4 mg, pois, apresentaram mesmo tempo de retenção para os picos presentes no cromatograma. As duas frações foram unidas e dissolvidas em 1 mL de metanol/água (1:1), em seguida, foram

injetadas no aparelho de CLAE-DAD 250 µl da solução para separação em coluna preparativa.

4.8. Análise em RMN de ¹H e de ¹³C

As análises em RMN de ¹H e ¹³C mono e bidimensionais (HMBC e HSQC) foram realizadas em um aparelho de RMN Bruker 500 MHz, no RMN-Lab localizado na central analítica da UFAM. As amostras isoladas foram dissolvidas em 600 µL de metanol (d-4).

4.9. Ensaio antioxidantes

4.9.1. Ensaio de captura do radical livre DPPH

O ensaio de DPPH foi realizado seguindo uma metodologia adaptada (MOEIN et al., 2010), na qual uma solução 180 µL de uma solução 0,1 mM do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma) é misturada a 20 µL de amostra ou padrão. A quercetina (Sigma) foi utilizada como padrão nas concentrações de 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL. Para obtenção do branco foram adicionados 200 µL de metanol em três poços, e para a obtenção do controle foram adicionados, em outros 3 poços, 20 µL de metanol em 180 µL de DPPH. Para análise da reação foi utilizado o leitor de UV/Vis multiplaca Elx800 (BioTek) com capacidade para pratos de 96 poços. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 515 nm.

Os dados obtidos foram calculados a partir da equação 1, para obtenção da capacidade de captura (CC%) em cada concentração para então montar uma curva analítica de primeiro grau ($y = ax+b$). O valor teórico de 50% foi substituído na equação da reta para calcular a concentração necessária para captura de 50% dos radicais livres presentes na solução (IC_{50}).

$$CC_{\%} = 100 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \text{ (Equação 1)}$$

3.9.2. Ensaio de captura do radical livre ABTS

O ensaio de captura do radical $ABTS^+$ foi realizado segundo (LI et al., 2012) com modificações. O radical ABTS foi preparado misturando volumes equivalentes de uma solução aquosa de ABTS 1,1 mg/mL e 0,68 mg/mL de solução aquosa de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), a solução foi armazenada por 6 horas em local escuro à temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 50 μ L de amostra em 200 μ L de solução $ABTS^+$. O trolox (Sigma) foi utilizado como padrão nas concentrações de 20 μ g/mL, 10 μ g/mL, 5 μ g/mL, 2,5 μ g/mL, 1,25 μ g/mL. 50 μ L de metanol foram adicionados em 200 μ L de água para obtenção do branco, e para o controle 50 μ L de metanol foi adicionado à 200 μ L de $ABTS^+$. A análise foi realizada em um leitor de multiplaca UV/Vis Elx800 (BioTek), a leitura foi realizada no comprimento de onda de 750 nm. Após aquisição dos dados e obtenção da reta o IC_{50} foi calculado a partir dos da equação da reta gerada.

4.10. Ensaio de inibição da lipo-oxigenase (LOX)

Inicialmente foram preparados 100 mL de tampão Tris-HCl (pH 7,5), 10 mL de solução da enzima LOX 15,8 U (lipoxidase from soybean, 7,9 U/mg Biochemika) e 10 mL de solução de ácido linoleico (IMPEX, 100 µL de etanol + 50 µL de ácido linoleico + 20 µL de Tween 20 + 8,30 mL de tampão Tris-HCl).

O ensaio de inibição da LOX foi realizado de acordo com a metodologia utilizada por Pinto e colaboradores (2007), onde 925 µL de tampão Tris-HCl (50 mM) são misturados à 50 µL da solução de enzima 5-LOX e 50 µL de solução das frações ou padrão nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,125 µg/mL, em uma cubeta de quartzo para obtenção da curva analítica. Por fim, são adicionados 25 mL de solução de ácido linoleico e a leitura é realizada em um espectrofotômetro de UV/Vis (BioTEK) no comprimento de onda de 234 nm. Os valores de % de inibição da enzima LOX são adquiridos através da equação:

$$\%Inibição = 100 - \frac{(Abs_{Amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{Controle}} \times 100$$

Após adquirir os valores de %Inibição foi construído uma curva analítica para obtenção do IC₅₀ de cada fração.

4.11. Análise em CLAE-DAD-EM/ESI do extrato bruto hidrolisado

O ensaio foi realizado em um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador microTOF-Q (Bruker) de alta resolução, utilizando com fase estacionárias uma coluna

C18-pentafluorfenil (PFP) 150 mm x 2,1 mm. Concentração de 1 mg/mL, volume de injeção de 10 µL com split 15%(MS), fluxo de 0,3 mL/min e pressão de 4765 psi. A eluição ocorreu utilizando (A) ácido fórmico (0,1%) e (B) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico, no modo gradiente sendo: 0-2,5 min, 5% B; 2,5-35 min, 5-35% B; 35-40 min, 35-100% B; 40-43 min, 100-5% B; 45-47 min, 5% B. Foram injetadas amostras do extrato metanólico bruto e do extrato hidrolisado (OLIVEIRA; NUNOMURA; NUNOMURA, 2014).

O espectrômetro de massas operou nas seguintes condições: Fonte Eletrospray (ESI) em modo negativo; energia de colisão -3,0 V; Temperatura do capilar de 200 °C, fluxo de gás secante 7,0 mL/min; faixa espectral de 50 à 1000 m/z.

Com a obtenção do cromatograma foi possível observar a eficiência da hidrólise alcalina realizada no extrato metanólico bruto, e avaliar a composição química dos taninos através do espectro de massas de alta resolução.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Extração dos metabólitos secundários

Na extração realizada em metanol, obtiveram-se 143,15 g (47%) de extrato bruto. Após a partição líquido-líquido, pode-se afirmar que a casca do fruto possui, em grande parte da sua composição, Substâncias de natureza polar, conforme é mostrado a seguir. Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (BITTENCOURT et al.,

2013) mostraram, através do método de Folin-Ciocateau, que o extrato bruto da casca do fruto de jucá possui cerca de 30g de fenólicos / 100g de extrato metanólico.

Após obtenção das 4 fases (Hexânica, Clorofórmica, Acetato de Etila e hidroalcoólica), as soluções foram rotaevaporadas, liofilizadas e pesadas para o cálculo do rendimento (Tabela 2).

Tabela 3. Rendimento das frações da partição líquido-líquido.

Fase	Peso (g)	Porcentagem (%)
Hidroalcoólica	62,14	62,14%
Acetato de etila	19,11	19,11%
Clorofórmica	12,56	12,56%
Hexânica	3,19	3,19%
Extrato bruto	143,63	-

A fase hidroalcoólica apresentou maior rendimento, devido ao elevado teor de substâncias fenólicas, como ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis que possuem afinidade por solventes polares. As fases acetato de etila e clorofórmica, apresentaram rendimentos aproximados e inferiores em relação a fase hidroalcoólica. A natureza das substâncias extraídas nessa fase é caracterizada pela afinidade por solventes de média polaridade, sendo possível identificar a presença de taninos na mesma. Por fim, a fase hexânica, que apresentou menor rendimento, é caracterizada pela presença de ácidos graxos, terpenos e substâncias de baixa polaridade.

Sabendo que o metanol, solvente utilizado para extração por maceração, tem maior afinidade por substâncias polares, pode-se afirmar, a partir dos valores de

rendimento obtidos, que o método de extração utilizado foi satisfatório para a seleção de substâncias polares presentes nas cascas do fruto de jucá.

Estudo anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (BITTENCOURT et al., 2013), mostram que a atividade antioxidante da casca do fruto de jucá é maior na fase acetato de etila, tal fato está relacionado com a presença de substâncias fenólicas presentes na fase.

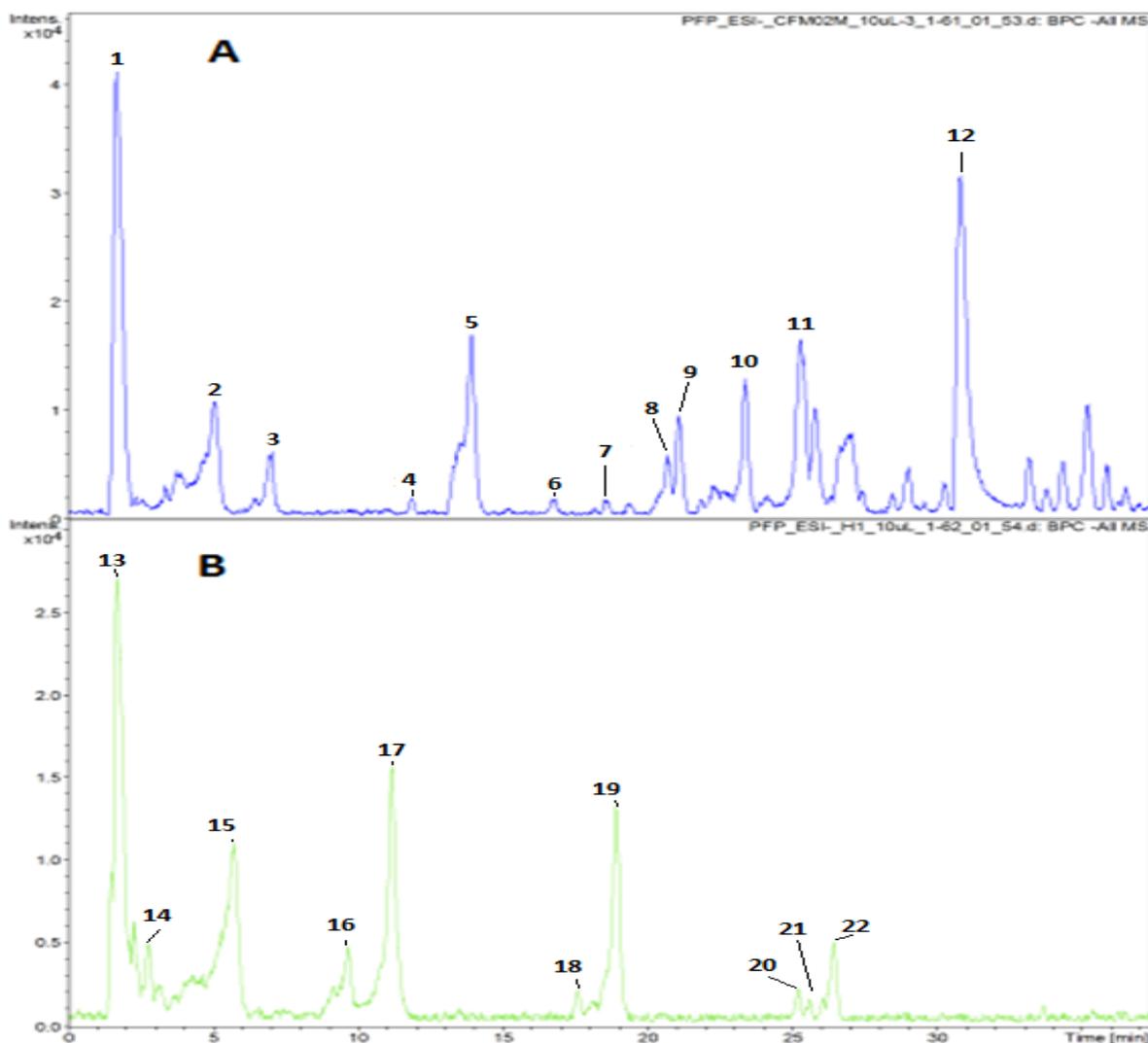
5.2. Hidrólise alcalina do extrato metanólico bruto de do fruto do jucá

As cascas dos frutos de Leguminosas são ricas em taninos hidrolisáveis que são polímeros naturais formados principalmente por derivados de ácido gálico e ácido elágico (HASLAM, 2007), estas substâncias possuem ligações do tipo éster que podem ser quebradas através de hidrólise básica formando ácido gálico livre (GARRO GALVEZ; RIEDL; CONNER, 1997). Durante o resfriamento da reação de hidrólise do extrato bruto foi observada a formação de cristais incolores e opacos no balão de fundo redondo, podendo ser o ácido gálico livre (GARRO GALVEZ; RIEDL; CONNER, 1997). A solução foi filtrada em um funil de buchner acoplado ao vácuo para retirar todo resíduo insolúvel formado na reação.

O método de separação cromatográfica moderna aliada a técnicas espectrométricas foram utilizados amplamente na identificação e quantificação de taninos (AOUF et al., 2014; GARRO GALVEZ; RIEDL; CONNER, 1997; YANG et al.,

2012). Para determinar a composição química e a eficiência da hidrólise alcalina do extrato bruto foram preparadas soluções 1 mg/mL e injetados 20 µL em um aparelho CLAE-EM de alta resolução.

O **cromatograma 1** mostra a ausência de alguns picos presentes antes da hidrólise, nota-se que a reação de hidrólise alcalina conseguiu modificar o tempo de retenção (Tr) de *algumas substâncias*. Com o auxílio dos espectros obtidos por espectrometria de massas, foi possível propor a presença de alguns taninos a partir dos fragmentos gerados relacionando-os com dados da literatura (AOUF et al., 2014; YANG et al., 2012). As **tabelas 3 e 4** relacionam os íons moleculares, fragmentos e possível substância, antes e após a hidrólise respectivamente.



Cromatograma 1. Extrato bruto metanólico de Jucá pré-hidrólise (a) e pós-hidrólise (b).

Os cromatogramas não apresentaram semelhanças nas substâncias em relação ao tempo de retenção, porém, após a hidrólise foi possível observar a presença de algumas substâncias como o ácido clorogênico (14) e o DHHDP (16) ambos com íon quasimolecular igual à 353 m/z no modo negativo.

Tabela 4. Íons quasimoleculares, fragmentos e seus respectivos tempos de retenção gerados no perfil cromatográfico de CLAE-ESI(-)-QmicroTOF-MS/MS do extrato metanólico bruto da casca do fruto de jucá.

N°	t _R (min)	[M-H] ⁻	[2M-H] ⁻	Fragmentos	Substância
1	1,6	523,1298	-	331,0671; 191,0563	Ácido Glicosediquínico
2	5,0	391,9453	-	268,9363; 169,0141	Derivado Ácido galoilsinápico
3	7,0	343,0659	687,137	191.0552	Ácido galoilquínico
4	11,9	891,695	-	814,2332; 730,8068; 562,0913; 424,9824; 325,0586 ; 146,9376	Elagitanino
5	13,9	357,083	-	183,0298	Ácido metilgaloilquínico
6	16,8	956,215	-	801,0829; 640,0654; 480,9735; 146,9378	Elagitanino
7	18,5	963,13	-	801,0812; 640,0732; 480,9735; 146,9387;	Elagitanino
8	20,7	957,1245	-	801,0830; 640,5776; 559,0406; 291,0153; 146,9390	Elagitanino
9	21,1	801,083	-	640,0748; 559,5383; 291,0151;146,9387;	Dehidroelagitanino
10	23,3	730,989	-	633,0776; 559,0466;146,9398	Derivado do ácido valoneico
11	25,3	559,047	-	469,0066; 146,9399	Dilactona do ácido dicarboxilvaloneico
12	30,8	301,001	603,009	-	Ácido elágico

O pico 1 possivelmente é um derivado do ácido quínico com a presença do pico quasimolecular de 523 m/z $[M-H^-]$ e os fragmentos 331 m/z $[M-H-192]$ e 191 m/z $[M-H-192-140]$. A perda neutra de 192 Da ocorre devido a presença de ácido quínico, e a perda de 140 Da pode estar relacionada a um resíduo de glicose.

Os picos 2 e 3 são possivelmente derivados de ácido gálico devido à presença do íon 169 m/z fragmentado a partir do íon quasimolecular 391 m/z , e na perda de 152 Da no íon galoilquínico (343 m/z).

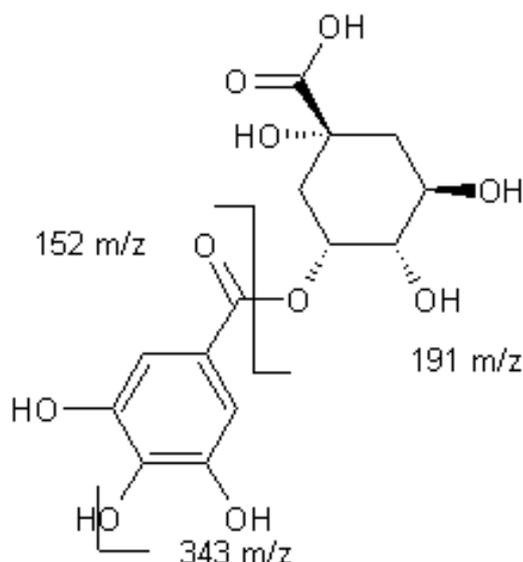


Figura 8. Fragmentos do íon quasimolecular 343 m/z .

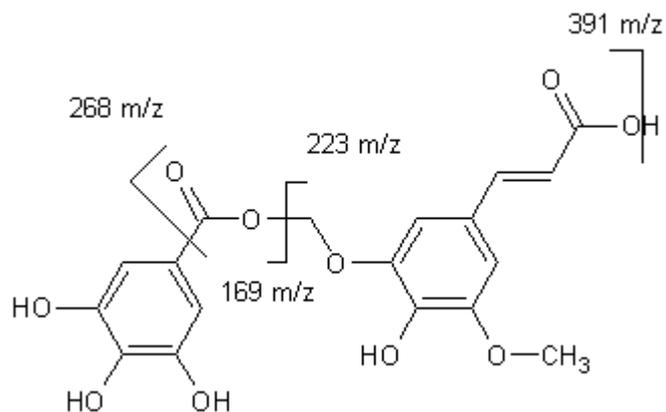


Figura 9. Formula estrutural do ácido galoilsinápico e suas possíveis fragmentações.

O pico **4** apresenta um fragmento de $325\ m/z$ podendo ser um resíduo de ácido HHDP.

O pico **5** apresenta como íon quasimolecular o pico $357\ m/z$ e o íon 183 devido à perda de $175\ u$ do ácido quínico ligado a molécula. O pico $183\ m/z$ é proveniente do ácido gálico após a metilação de uma de suas hidroxilas ligadas ao anel aromático.

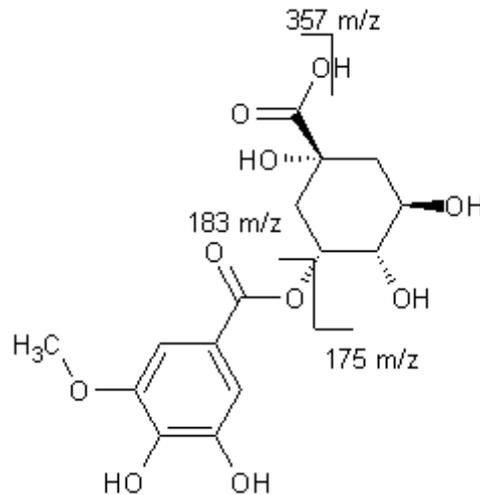


Figura 10. Fórmula estrutural do ácido metilgaloilquínico e suas possíveis fragmentações.

Os íons de maior massa apresentados nos picos **4** (891 m/z), **6** (956 m/z), **7** (963 m/z), **8** (957 m/z) **9** min (801 m/z), **10** (730 m/z) e **11** (559 m/z) apresentaram padrões de fragmentação semelhantes principalmente na presença dos íons 801 m/z , 640 m/z , 559 m/z e 291 m/z e todos também apresentaram o íon 146 m/z , referente a um resíduo de hexose presente na maioria dos taninos hidrolisáveis (OKUDA; YOSHIDA, 2008). O pico **11** do ácido elágico é identificado devido à presença do íon quasimolecular 301 m/z e seu dímero 603 m/z (YANG et al., 2012).

O pico **6** apresentou íon quasimolecular em 956 m/z [M-H]⁻, e fragmentos em 801 m/z [M-H-155]⁻, devido à perda de um resíduo de ácido 3-deidrochiquimico seguidos dos fragmentos de 480 m/z [M-H-155-321]⁻, podendo estar relacionado com a perda de um resíduo de ácido chebulico e 146 m/z [M-H-155-321-334]⁻, devido à perda de um resíduo de HHDP.

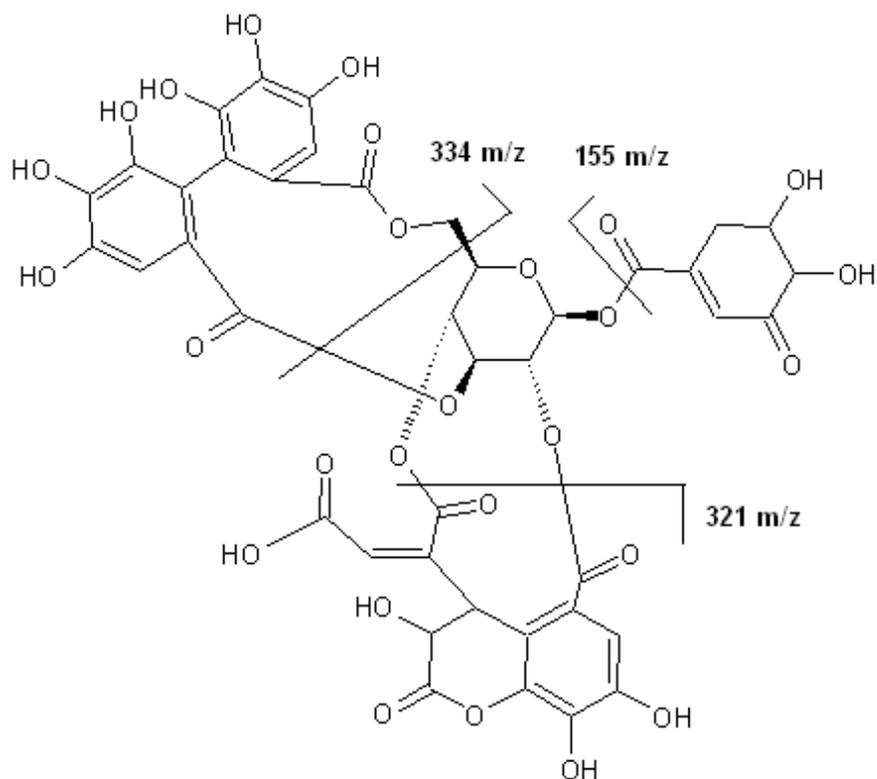


Figura 11. Estrutura molecular suposta para o pico 6 e seus fragmentos.

O pico 7 apresentou o íon quasimolecular em 963 m/z , e fragmentos em 801 m/z [M-H-162]-, podendo estar relacionado com a perda de um resíduo de ácido cafeico, e novamente os íons 480 m/z [M-H-162-321]- e 146 m/z [M-H-162-321-334]-.

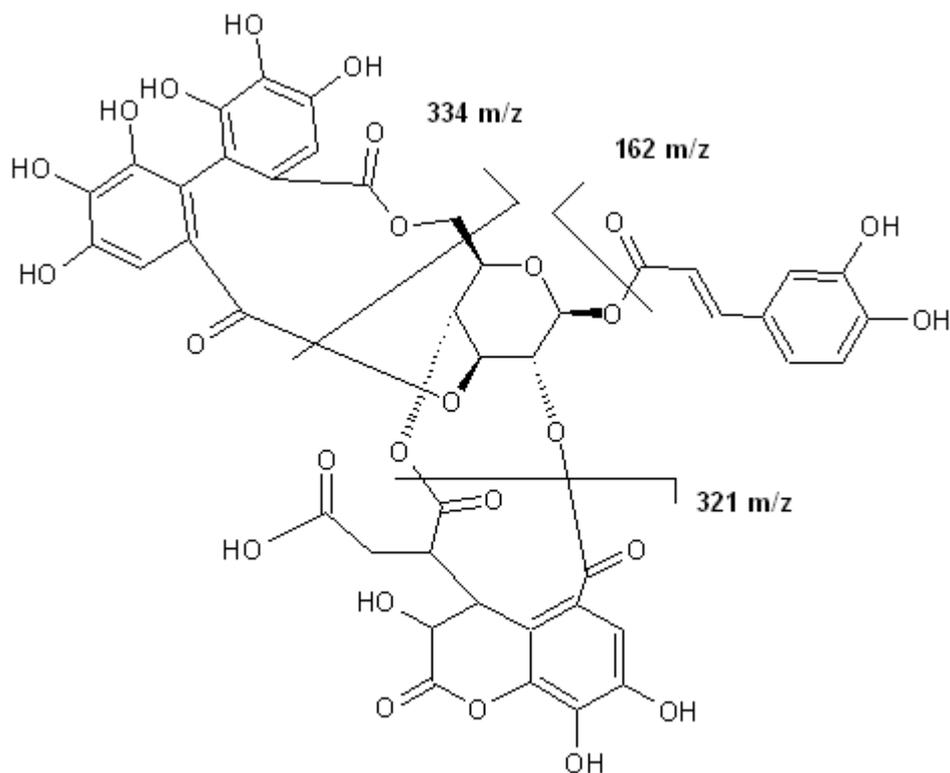


Figura 12. Suposta estrutura molecular da substância presente no pico 7.

Os picos **8**, **9**, **10** e **11** pertencem a um grupo de elagitaninos C-glicosídicos, os quais, o carbono 1 da glicose de cadeia aberta liga-se via C-C em uma parte do elagitanino, as demais moléculas também são conectadas via C-C entre os anéis fenólicos (OKUDA; YOSHIDA, 2008). A presença do íon $559\ m/z$ pode estar relacionado a presença de resíduo do grupo valoneoil. Na figura 14 abaixo é mostrado um exemplo da estrutura dos elagitanino C-glicosídicos. O pico **11** apresenta íon quasimolecular de $559\ m/z$, com a perda de 90 u forma-se o pico $469\ m/z$ [M-H-90], provavelmente relacionado a perda de dois grupos carboxílicos (CO_2H), o íon $469\ m/z$ pertence a dilactona do ácido vanoleico (WYREPKOWSKI et al., 2014).

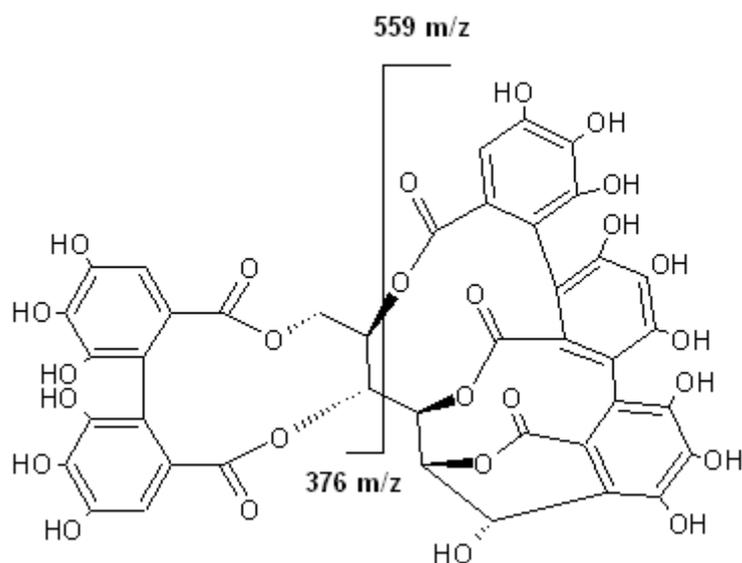


Figura 13. *Formula estrutural da castalagina e seus fragmentos.*

Após a reação de hidrólise muitos picos sumiram e deram origem a outros, mostrando que a reação foi efetiva. Substâncias com tempo de retenção maior e coincidentemente com maior massa molecular, principalmente os derivados do ácido elágico, foram extintos no cromatograma. Porém, algumas substâncias de massa molecular elevada não sofreram hidrólise representados no cromatograma 1 pelas substâncias de número **18** (976 *m/z*), **20** (933 *m/z*) e **21** (982 *m/z*).

Tabela 5. Íons presentes após a reação de hidrólise. Análise em HPLC-DAD-MS/ESI-microTOF no modo negativo.

N°	T _R	[M-H] ⁻	[2M-H] ⁻	Fragmentos (m/z)	Substância
13	1,8	297,0296		191,0572	derivado de ácido quínico.
14	2,8	409,2121		353,0195; 175,0258;	derivado de ácido clorogênico
15	5,7	361,0173		297,0300; 169,0160;	ácido galoil-3-O-quínico
16	9,6	353,0181		255,2371; 153,0216;	ácido DHHDP
17	11,2	353,0192	707,043	452,9426; 265,0370;	Dimero do ácido DHHDP
18	17,6	976,6092		886,8638; 655,9753; 520,9248; 452,9428; 353,0192; 309,0271; 146,9400;	Derivado de DHHDP
19	18,9	237,0058		-	N.I
20	25,2	933,9356		841,4151; 696,1479; 608,9585; 475,0420; 293,0326; 237,0062; 193,0145; 149,0244;	Derivado de ácido chebulico
21	25,6	982,9035		896,2710; 821,2668; 707,3950; 559,0487; 365,0496; 283,2705; 235,0259; 146,9389;	Derivado do ácido valoneico
22	26,4	409,212		306,9520; 207,0308; 146,9391	N.I

N.I = não identificado.

Alguns íons quasimoleculares não foram totalmente identificados, entretanto, devido a presença de fragmentações características de compostos fenólicos, foi possível sugerir a classe de algumas das substâncias não identificadas.

O pico **13** apresentou o íon quasimolecular em 297 m/z e seu fragmento gerou o íon 191 m/z [M-H-106]⁻, referente a presença do ácido quínico. O pico **14** de íon quasimolecular de 409 m/z apresenta fragmentos de 353 m/z [M-H-56] e 175 m/z [M-H-56-178]⁻, possivelmente a substância é um derivado de ácido clorogênico.

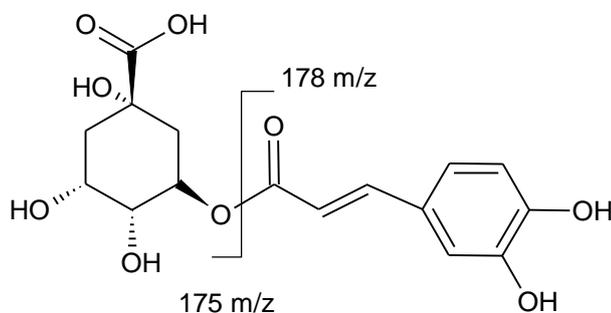


Figura 14. Estrutura do ácido clorogênico e seus fragmentos.

O pico **15** foi identificado como o ácido galoil-3-O-quínico, devido a presença do íon quasimolecular 361 m/z , e do íon 169 m/z [M-H-192] relacionado com a fragmentação do ácido quínico.

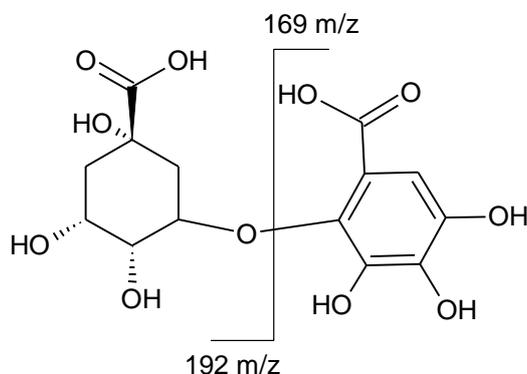


Figura 15. Estrutura do ácido Galoil-3-O-quínico.

O pico **16** e **17** foram identificados como o ácido dehidrohexahidroxidifenil (DHHDP) e seu dímero. Ambos apresentaram o íon quasimolecular de 353 *m/z*, porém, o pico 17 apresenta o íon 707,0430 *m/z*, possivelmente, relacionado a presença de seu dímero.

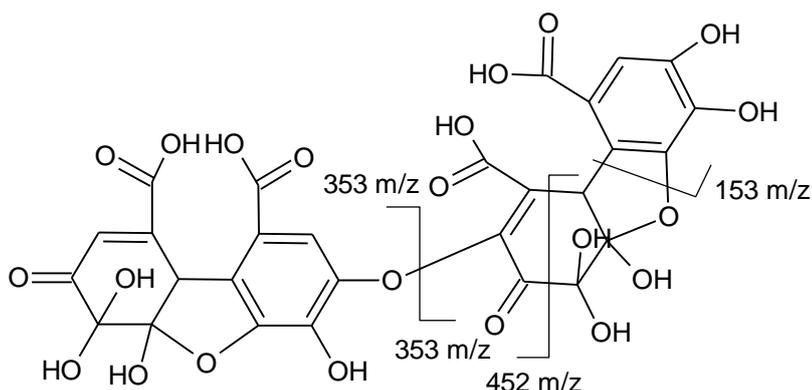


Figura 16. Estrutura do dímero do ácido DHHDP e seus fragmentos.

O pico **18** apresenta o íon quasimolecular em 976 *m/z*, e fragmentos em 655 *m/z* [M-H-321]⁻, relacionado a perda de resíduo de ácido chebulico, 353 *m/z* [M-H-321-302]⁻, relacionado a perda de resíduo de HHDP, os fragmentos sugerem que a substância é um derivado de ácido chebulico, devido a presença do grupo chebuloil. O pico **20** apresenta perdas neutras de 325 u podendo estar relacionado com um resíduo de HHDP, sendo então, identificado como um derivado de ácido elágico. Por fim, o pico **21** apresentou um pico em 982 *m/z*, em seus fragmentos é possível notar a presença de um íon 559 *m/z* típico de substâncias derivadas do ácido valoneico.

Não foi possível identificar os picos **19** e **22** devido à falta de dados na literatura.

5.3. Separação em coluna Sephadex LH-20

A separação em coluna Sephadex LH-20 tem como finalidade, particionar a amostra por tamanho de molécula, os poros presentes nessa fase possuem tamanho

específico para que sejam penetradas por substâncias de tamanho pequeno (ou massa molecular baixa) já as moléculas maiores passam por fora da fase e não são “retidas” na coluna.

A cada 150 mL de solvente uma amostra foi coletada. Após a concentração em rotaevaporador e liofilização as amostras foram pesadas e suas massas podem ser observadas na **tabela 5** abaixo.

Tabela 6. *Peso das frações obtidas em Sephadex LH-20.*

Frações	Peso da fração (g)
AcS1	3,2419
AcS2	1,2606
AcS3	0,1294
AcS4	0,0528
AcS5	0,0289
AcS6	0,013
AcS7	0,0072
AcS8	0,0052
AcS9	0,0037
AcS10	0,003

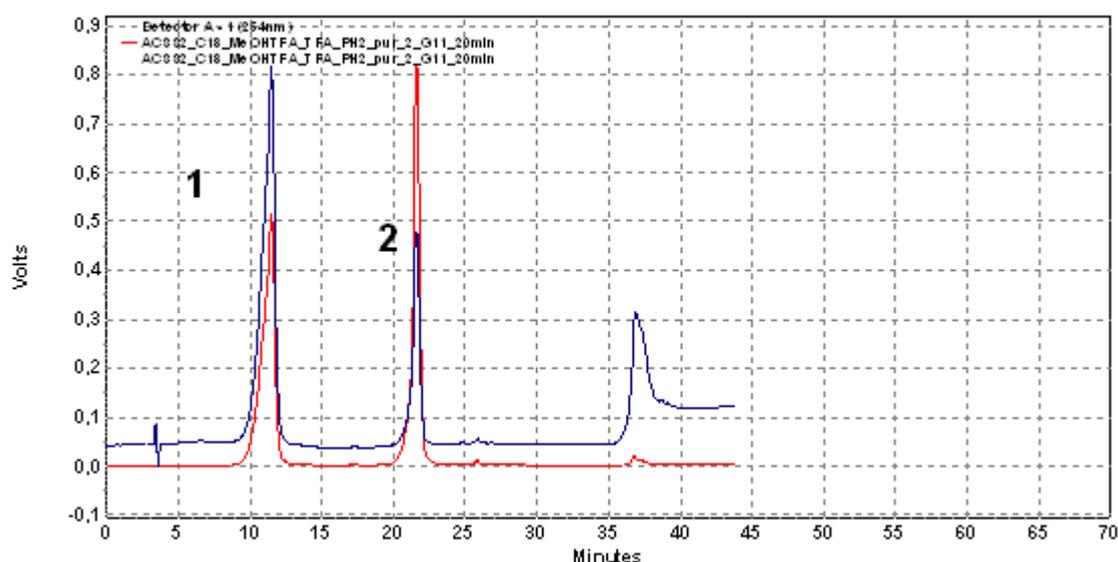
A massas das frações obtidas mostram que grande parte das substâncias estão concentrados nas duas primeiras frações (AcS1 e AcS2), por possuírem massa

molecular elevada, os taninos podem estar relacionados com esse valor de massa elevado.

Após a separação cromatográfica da fração AcS2, em coluna sephadex LH-20, a fração AcSS2 foi escolhida, devido a mesma possuir maior massa (0,742 mg), para o desenvolvimento do método de separação em CLAE-preparativa, porém, como apresentou substâncias presentes na origem da placa, foi realizado o procedimento de purificação por extração em fase sólida (SPE).

5.4. Isolamento de Substâncias orgânicas em CLAE-DAD

As amostras de frações coletadas em SPE foram analisadas em CLAE-DAD analítico e selecionadas de acordo com a separação observada. As frações 6 e 7 e por apresentarem semelhanças nos tempos de retenção foram reunidas, a separação das substâncias ocorreu de acordo com as condições apresentadas anteriormente. O cromatograma 2, mostra os picos das substâncias isoladas.



Cromatograma 2. Cromatograma das frações 6 e 7, misturados. (-) análise em UV 254 nm. (-) análise em UV 220 nm.

A substância **1**, após isolamento em CLAE preparativa, apresentou-se como um sólido branco amarelado (4 mg) em mistura. Esse sólido branco foi dissolvido em água e separado, após liofilização, um cristal amarelado foi obtido (2,0 mg). A substância **2** apresentou-se como um sólido de coloração amarelada (1,6 mg) solúvel em metanol.

Análises em CCD de fase reversa do cristal, utilizando como revelador cloreto férrico 10% (FeCl_3), revelou uma única mancha azul escura típica de taninos hidrolisáveis (WAGNER; BLADT, 2001).

5.5. Análise em EM-APCI e RMN de H^1 e de C^{13} das substâncias isoladas.

5.10.1. Espectro de massas da substância 1

A técnica de espectrometria de massas permitiu observar, algumas características pertinentes a estrutura da molécula, assim como, obter sua massa molecular. A substância **1** isolada por CLAE-DAD preparativa apresentou um pico de íon quasimolecular em 933 m/z no modo negativo $[\text{M-H}]^-$. No espectro (Figura 8) é possível observar os fragmentos 763, 445 e 301 m/z . O fragmento 763 m/z está relacionado com a perda de 170 Da do íon quasimolecular, possivelmente de um grupo galoil no modo negativo $[\text{M-H-galoi}]^-$ (Claeys, 2003). Pode-se observar também a presença do íon 169 m/z (a) que confirma a presença de ácido gálico na molécula.

O fragmento 445 m/z , resultante da fragmentação do pico 763 m/z , apresenta perda

neutra de 318 Da, típico de moléculas que possuem o ácido DHHDP (Ácido dehidrohexahidroxidifênico) [M-H-galoil-DHHDP]⁻, comuns em espécies de plantas contendo derivados de elagitaninos. E por fim, o pico 301 proveniente da fragmentação do pico 445 com perda neutra de 146 Da relacionada a presença de um resíduo de hexose [M-H-galoil-DHHDP-Hex]⁻. A figura 12 abaixo mostra o espectro de massas completo da amostra 2 no modo negativo.

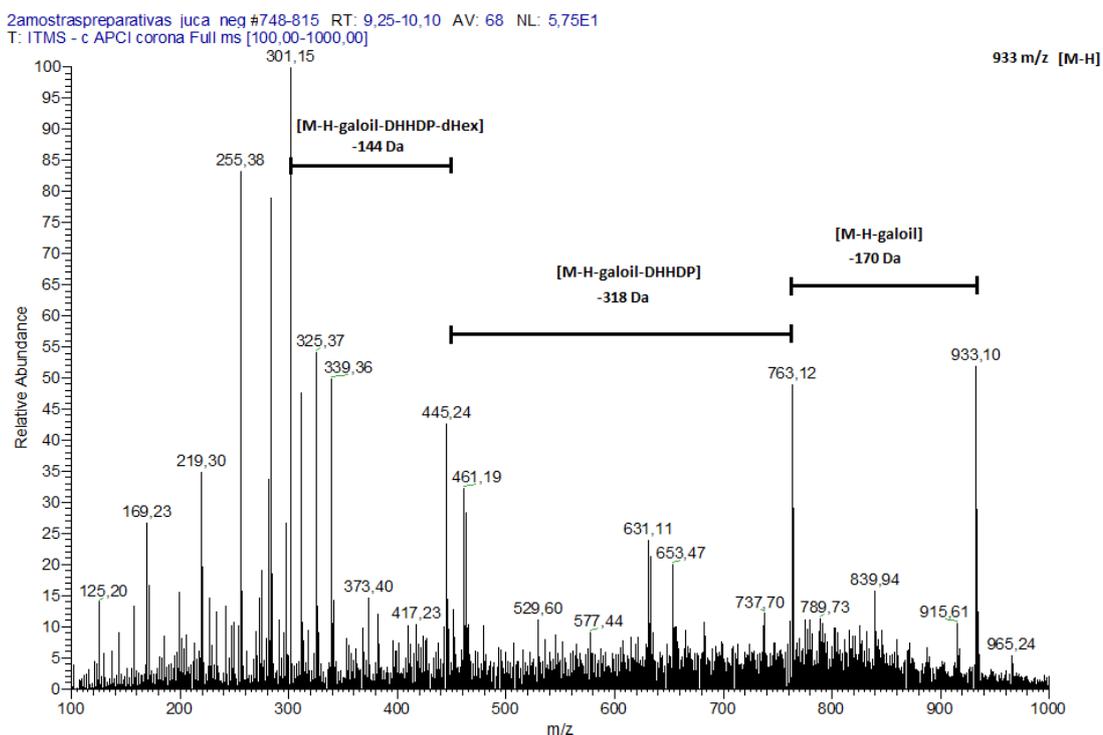


Figura 17. Espectro de massas da amostra 2. Fonte de ionização APCI. Modo negativo (-). Analisador íon trap.

De acordo com os dados obtidos no espectro de massas pode-se afirmar que a substância isolada, trata-se de um derivado de elagitanino. Com o auxílio dos espectros de RMN a substância foi elucidada conforme discussão a seguir.

5.10.2. Espectro de ressonância Magnética Nuclear (RMN) da substância 1

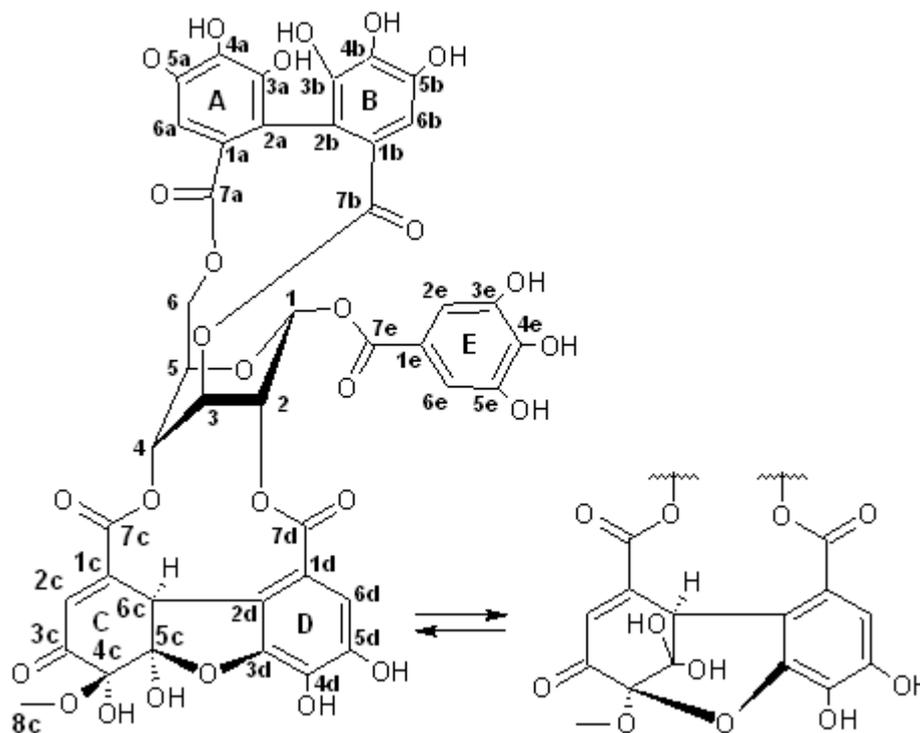


Figura 18. Estrutura da substância 1 proposta e seu hemiacetal de DHHDP.

A determinação estrutural da substância **1** foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C e HMBC ^1H - ^{13}C , comparando os deslocamentos com dados relatados na literatura. Os carbonos e hidrogênios foram nomeados de acordo com a figura 19, os anéis aromáticos foram nomeados de A à E (Ex: Carbono 6 do anel C; **C-6^c**), todos com os respectivos carbonos foram numerados de 1 a 7. O anel da glicose recebeu numerações de 1 a 6. O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,1 integrando para 2 hidrogênios (grupo galoil) (**anexo 1**), simples em δ 6,63 e 7,09 (HHDP) (**anexo 1**), dois simples em δ 5,42 e δ 6,54 sendo os sinais de hidrogênios H-2^c e H-6^c do anel C do DHHDP, também sendo possível observar o duplos dubletos em 4,93 δ ppm ($J = 1,5, 4,9$ Hz) e o dubleto em δ 6,16 ($J = 1,49$ Hz) representando os

respectivos átomos de hidrogênios em acoplamento alílico no anel C do DHHDP (**anexo 2**), além do simpleto sobreposto em δ 7,09 do anel D do DHHDP (**anexo 1**). Vários multipletos e singletos largos e multipletos são observados no intervalo de δ 6,63 – 4,33 sendo típicos na presença de glicose (**Anexo 3**). A integração de todos os hidrogênios dentro desse intervalo é igual a 6 hidrogênios

O espectro de RMN ^{13}C apresentou vários sinais de carbonos quaternários, com deslocamento químico na faixa de δ 195 – 137, sendo os sinais em δ 195 e δ 192 característicos de uma carbonila com ligação dupla conjugada (C-5^c do DHHDP) (KURIHARA; KAWABATA; HATANO, 1993). A duplicidade dos picos no espectro de RMN ocorrem devido a presença de hemiacetais de DHHDP, o qual a condensação entre as hidroxilas ocorre no Carbono C-3^b e nos Carbonos C-4^c ou C-3^c. Nos deslocamentos entre δ 170 e δ 165 são observadas as carboxilas que se conectam com o açúcar (**Anexo 4**). Também é possível observar a presença de dois picos em δ 130 e δ 125 típicos de átomos de carbonos ligados a átomos de hidrogênios do metínicos e com hidrogênios vinílicos. A presença de dois sinais δ 52 e δ 42 confirma a presença dos hemiacetais de DHDDP sendo esses sinais característicos de metinos blindados (**Anexo 5**).

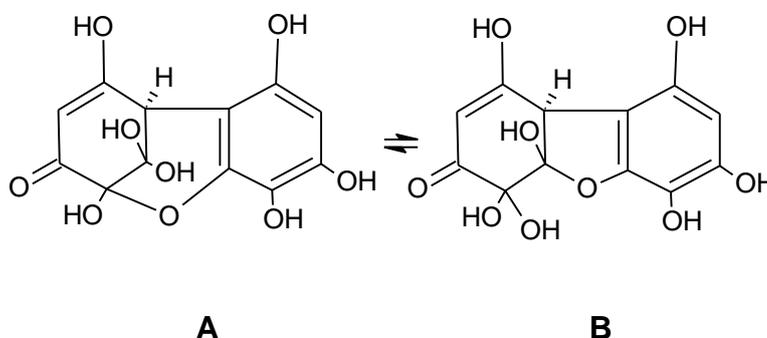


Figura 19. Representação dos diferentes tipos de hemiacetais de DHHDP.

Com o auxílio dos espectros de RMN ^{13}C e do DEPT135 foi possível confirmar a presença dos sinais de carbonos quaternários e diferenciá-los dos sinais de carbonos metínicos presentes no intervalo de δ 130 a 90. Os sinais de carbonos C-4^c e C-5^c do anel C do HHDP são observados com deslocamento químico em δ 108 e δ 96 e devido à ausência dos mesmos no espectro de DEPT135°, foram considerados carbonos quaternários mais protegidos em relação aos carbonos quaternário com ligação dupla. Também observou-se a presença de um sinal característico de carbono metilênico com deslocamento químico em δ 64,0, referente ao carbono anomérico (C-6) da glicose (KURIHARA; KAWABATA; HATANO, 1993) (**Anexo 5**).

No experimento de COSY ^1H - ^1H foi possível observar a correlação entre os sinais dos átomos de hidrogênios H-2^c e H-6^c com deslocamento em δ 6,16 e δ 4,93, respectivamente, no anel C do DHHDP. Além das correlações entre os hidrogênios da glicose (**Anexo 6**).

Os hidrogênios aromáticos, seus respectivos carbonos e sua vizinhança foram identificados com o auxílio dos espectros de HSQC (**Anexo 8 e 9**) e HMBC ^1H - ^{13}C (**Anexo 10**). As correlações obtidas através do método COSY ^1H - ^1H e HMBC ^1H - ^{13}C podem ser visualizadas na figura 18 abaixo.

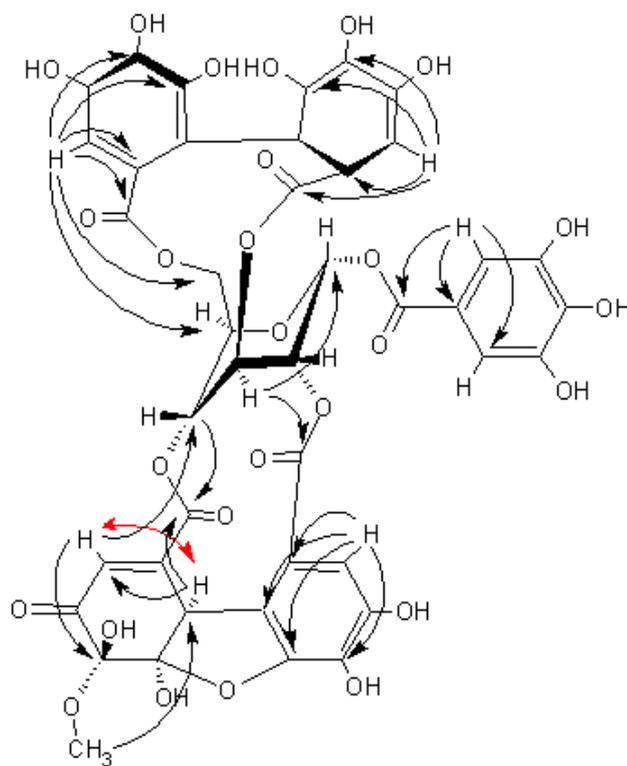


Figura 20. Correlações dos hidrogênios por COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (→) e HMBC ^{13}C (→).

Os valores de deslocamento químicos estão relacionados na tabela 6 comparando os sinais obtidos com a literatura.

Tabela 7. Comparação entre valores de deslocamentos químicos da substância 1 isolado e dos hemiacetais A e B da geraniina. (s) Singlete. (a) sinal sobreposto. (br) banda larga. (+) Sinal encontrado em HSQC. (#) Sinal encontrado em HMBC. Análises realizadas em MeOD e acetona-d₆ (KURIHARA, 1993), ambos espectros de RMN ¹H e bidimensionais em 500 MHz, RMN ¹³C em 125 MHz).

	¹ H (ppm)	¹³ C (A/B) (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)		¹ H (ppm)	¹³ C (A/B) (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
Glicose	Literatura (KURIHARA, 1993)		Substância 1		HDDP	Literatura (KILKUSKIE et al., 1992)		Substância 1	
1	6,60 (br, s)	90,8/91,8	6,62 (br, s)	92,3 ⁺	Anel B				
2	5,60 (br, s)	69,9/70,4	5,5 (br, s)	70,25/70,8 ⁺	2b	-	110,9/110,8	-	110,8 [#]
3	5,50 (br s)/ 5,60 (br, s)	63,3/62,3	5,45 (br, s)	63,03 ⁺	3b	-	145,1/145,2	-	146,1 [#]
4	5,56 (br, s)/ 5,46 (br, s)	65,9/66,8	5,42 (br, s)	67,29 ⁺	4b	-	137,8/137,3	-	140,9 [#]
5	4,81 (m)	72,6/73,1	4,9 (m)	73,5 ⁺	5b	-	145,1/145,2	-	146,1 [#]
6	4,93 (t, J = 11 Hz) e 4,33 (dd, J = 11, 8 Hz)/4,78 (m) e 4,45 (dd, J = 6, 9 Hz)	63,6/63,8	4,93 (t, J = 10 Hz) e 4,33 (dd, J = 11, 8 Hz)	64,4/64,6 ⁺	6b	7,13 (s)	110,7/110,8	6,9 (s)	111,2 ⁺
galoi(E)					7b	-	165,6/165,7	-	165,6 [#]
1e	-	125,7/125,5	-	120 [#]	DHDDP				
2e	7,2(2H, s)	117,1/117,2	7,1 (2H, Hz)	114,7 ⁺	anel C				
3e	-	145,9/147,6	-	148,5 [#]	1c	-	154,5/149,2	-	150,4 [#]
4e	-	139,7/139,7	-	138,1 [#]	2c	5,16 (s) / 4,94a (dd, J = 1,5)	46,2/51,9	5,42 (s) / 4,93a (dd, J = 1,5, 4,9)	42,27/52,70 ⁺
5e	-	145,8/145,9	-	148,5 [#]	3c	-	92,5/108,9	-	108,8 [#]
6e	7,2 (2H, s)	110,7/113,3	7,1 (2H, Hz)	114,13 ⁺	4c	-	96,3/92,3	-	96 [#]
7e	-	168,3/168,2	-	165,2 [#]	5c	-	191,8/194,8	-	191/194
HHDP					6c	6,53 (s) / 6,26 (d, J = 1,5)	128,6/125,0	6,54 (s) / 6,16 (d, J = 1,49)	130/126,9 ⁺
Anel A					7c	-	165,4	-	166,1 [#]
1^a	-	120,2/120,1	-	116 [#]	8c	-	-	3,34	49,0 ⁺
2^a	-	110,7/110,5	-	108,2 [#]	Anel D				
3^a	-	145,1/145,0	-	145,6 [#]	1d	-	119,4	-	120,2 [#]
4^a	-	136,5	-	137 [#]	2d	-	115,3	-	115,5 [#]
5^a	-	144,9/144,6	-	145,6 [#]	3d	-	143,4/147,3	-	146,5 [#]
6^a	6,67a (s)	107,6/108,1	6,63 (s)	108,2 ⁺	4d	-	139	-	140 [#]
7^a	-	164,6/164,8	-	165,09 [#]	5d	-	144,6	-	146,4 [#]
Anel B					6d	7,21 (s)/7,13a (s)	113,5	7,22/7,09a (s)	111,1 ⁺
1b	-	124,8/124,6	-	120 [#]	7d	-	166,1	-	166,1 [#]

A presença do sinal de metila em δ 3,34 no espectro de RMN ^1H e δ 49,0 no espectro de RMN ^{13}C discriminam a presença de uma metoxila, que com o auxílio do método de HMBC foi possível observar a correlação entre os sinais do hidrogênio em δ 3,34 ^1H com o carbono em δ 52,70 e assim afirmar que, o grupo metoxila está presente no anel C do DHHDP. As hidroxilas presentes no carbono C-4^c são susceptíveis a reações de metilação, acetilação e carboxilação (OKUDA; YOSHIDA, 2008), portanto a metoxila presente na proposta de estrutura foi adicionada nessa posição, sendo assim, identificada como metoxigeraniina. Seu precursor, a geraniina, é um tanino hidrolisável derivado do ácido elágico e que possui alta atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH e ABTS (LIN et al., 2008), além de atividade anti-hiperglicêmica (PALANISAMY et al., 2011), anti-hipertensiva (LIN et al., 2008), antibacteriana (THITILERTDECHA et al., 2010), analgésica (MARTINI et al., 2000), cicatrizante (AGYARE et al., 2011) e redutora da citotoxicidade no fígado causada pela ingestão de bebidas alcoólicas (LONDHE et al., 2012). Esse é o primeiro relato dessa substância na espécie *L. ferrea*.

5.10.3. Espectro de ressonância Magnética Nuclear da substância 2

A substância isolada **2**, apresentou a forma de um pó amarelado solúvel em metanol. O espectro de massas em APCI-MS no modo negativo mostrou a presença de um pico 301,15 m/z podendo estar relacionado a presença de ácido elágico. A determinação da substância **2** foi realizada de acordo com os espectros de ^1H , HSQC e HMBC.

O espectro de RMN ^1H apresentou um único pico em δ 7,47 integrando para 2H. Através do espectro de HSQC foi possível observar a correlação do sinal de hidrogênio em δ 7,47 com um carbono em δ 112,3, correlação típica de hidrogênio ligado a carbonos aromáticos. O valor da integral apresentada revela a presença de dois carbonos em ambientes químicos equivalentes. As correlações apresentadas no HMBC revelam a presença de carbonos carboxílicos (C=O) (δ 161,7), carbonos com hibridização sp^2 ligados a oxigênio (=C-O-) (δ 136,3, δ 139,4, δ 148,0) e carbonos sp^2 ligados a carbonos com mesma hibridização (=C-C=).

O espectro de HMBC ^1H - ^{13}C apresentou somente 7 sinais, porém, a massa molecular obtida para essa molécula foi de 302, isso significa que a molécula possui carbonos com ambiente químicos equivalentes. Podendo supor que se trata de uma molécula de ácido elágico. A estrutura da molécula é mostrada na figura 22 a seguir.

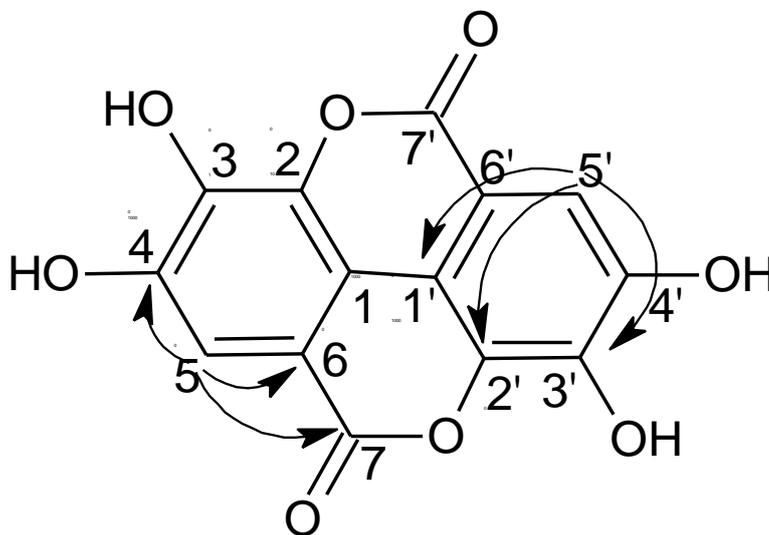


Figura 21. Estrutura do ácido elágico e suas correlações no espectro de HMBC.

A tabela 8 relaciona os dados experimentais com os dados obtidos na literatura.

Tabela 8. Comparação entre valores de deslocamentos químicos da substância 2 isolado e do ácido elágico. (s) singlete. (+) Sinal encontrado em HSQC. (#) Sinal encontrado em HMBC.

	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
	Literatura (LI et al., 1999)		Substância 2	
1, 1'	-	112,4	-	114,4 [#]
2, 2'	-	136,3	-	138,0 [#]
3, 3'	-	139,4	-	141,3 [#]
4, 4'	-	148,0	-	149,7 [#]
5, 5'	7,47 (s)	110,2	7,54 (s)	112,3 ⁺
6, 6'	-	107,6	-	109,7 [#]
7, 7'	-	159,0	-	161,7 [#]

O ácido elágico já foi isolado anteriormente na espécie, a partir, do extrato etanólico dos frutos (UEDA et al., 2001), do extrato etanólico da casca da árvore de jucá (WYREPKOWSKI et al., 2014) e nos extratos hidroalcoólicos dos frutos e folhas de jucá (VASCONCELOS et al., 2011). Essa substância possui influência importante na nutrição humana além de diversas propriedades biológicas como atividade antihipoglicêmica, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antiúlcera e antibacteriana ((UEDA et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2011)

5.6. Ensaio antioxidantes

Os ensaios antioxidantes foram realizados para rastrear possíveis substâncias ativas no extrato metanólico bruto da casca de jucá e em suas frações. Com o isolamento do metilgeraniina e do ácido elágico, tornou-se possível avaliar seus

potenciais antioxidantes na presença dos radicais livres DPPH[•] e ABTS⁺. A **tabela 9** a seguir mostra os resultados obtidos para cada amostra testada.

O IC₅₀ representa a concentração de amostra necessária para captura de 50% dos radicais livres presentes em solução, este parâmetro é utilizado para determinar a eficiência da amostra, comparada ao padrão, como antioxidante. No ensaio de DPPH, a fração hexânica (IC₅₀ = 59,92 ± 2,25 µg/mL) obteve o menor resultado na captura de radicais livres, enquanto que a fração AcOEt (IC₅₀ = 3,32 ± 0,15 µg/mL) apresentou o maior índice de captura superando o padrão de quercetina.

Tabela 9. Ensaio antioxidantes realizados no extrato bruto, frações e Substâncias isoladas da casca do fruto de jucá.

Ensaio		
Amostra	IC ₅₀ (DPPH) (µg/mL)	IC ₅₀ (ABTS) (µg/mL)
Hidroalcolólica	5,60 ± 0,28	8,23 ± 0,08
AcOEt	3,32 ± 0,15	4,12 ± 0,12
CHCl ₃	10,63 ± 0,17	22,25 ± 0,24
Hexânica	59,92 ± 2,25	211,37 ± 1,38
Substância 1	8,59 ± 0,39	6,49 ± 0,49
Substância 2	49,57 ± 2,48	60 ± 3,18
Quercetina	9,64 ± 0,06	n.a
Trollox	n.a	20,57 ± 0,47

n.a = não aplicado.

Observando os resultados de maneira ampla é possível observar que os solventes de maior polaridade possuem uma maior capacidade para extração de substâncias antioxidantes. Comparando as frações com maior polaridade podemos

observar que a fração hidroalcoólica ($IC_{50} = 5,60 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$) apresenta uma capacidade antioxidante um pouco menos que a da fração AcOEt. Esse comportamento pode ser explicado devido a maior presença de substâncias fenólicas ligadas a açúcares, o que acaba resultando na diminuição do poder antioxidante da fração. Este comportamento é observado quando são comparados a atividade antioxidante de extratos antes e depois da reação de hidrólise, onde a presença de ácidos fenólicos livres aumenta o potencial antioxidante dos extratos (VERMA; HUCL; CHIBBAR, 2009). Devido à natureza química dos solventes apolares, substâncias como ácidos graxos, esteroides e terpenos podem ser extraídos e a presença dessas substâncias pode justificar a diminuição do potencial antioxidante desta fração. Jameel e colaboradores (2015) isolou, a partir do extrato metanólico da semente de *Lens culinaris*, substâncias derivados de sitoesteróis e ácidos graxos e realizou testes de atividade antioxidante, as substâncias apresentaram IC_{50} na faixa de 20 a 80 $\mu\text{g/mL}$, mostrando o poder antioxidante das substâncias de baixa polaridade.

O ensaio com o radical ABTS apresentou o mesmo comportamento tendo a fração hexânica com maior IC_{50} ($211,37 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$) e a fração acetato de etila com menor IC_{50} ($4,12 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$). De acordo com DUDONNÉ e colaboradores (2009), através de testes antioxidantes entre 30 frutos, o ensaio de captura do ABTS está fortemente relacionado com conteúdo de fenólicos presentes nesses extratos quando comparado ao ensaio de DPPH, fato observado claramente na fração hexânica e discretamente na fração clorofórmica.

As substâncias **1** e **2** apresentaram IC_{50} de $8,59 \pm 0,39 \mu\text{g/mL}$ e $49,57 \pm 2,48 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, para o ensaio de DPPH e IC_{50} de $6,49 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$ e $60 \pm$

3,18 µg/mL, respectivamente para o ensaio de ABTS. Estudos realizados (LIN et al., 2008) com a geraniina relataram IC₅₀ de 1,27 µM para o ensaio de DPPH, valor próximo ao encontrado no presente trabalho (0,9 µM), de acordo com o mesmo autor, a atividade antioxidante da metoxigeraniina é alterada de acordo com o pH do meio líquido, podendo sofrer redução ou amplificação do poder antioxidante. A atividade antioxidante da substância 1 é maior do que atividade de padrões comerciais utilizados como conservantes, BHT (18,5 µM) e ácido ascórbico (13,1 µM) (LIN et al., 2008). Ensaio de atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS foram realizados em geraniina isolada do extrato etanólico das cascas de *Nephelium lappaceum*, neste trabalho foi relatado IC₅₀ de 7,5 µg/mL, valor próximo ao obtido com a metoxigeraniina isolada dos frutos de *Libidibia ferrea*. A fase hidroalcolica do extrato metanólico dos frutos de jucá (IC₅₀ ABTS = 8,23 ± 0,08 µg/mL) também apresenta atividade antioxidante similar ao extrato etanólico das cascas de *Nephelium lappaceum* (IC₅₀ ABTS = 6,7 ± 1,35), essa similaridade pode estar relacionada com a presença da geraniina e seus derivados nos dois extratos. Esses resultados mostram que o extrato metanólico de *Libidibia ferrea* apresenta um potencial antioxidante elevado

5.7. Ensaio de inibição da Enzima Lipo-oxigenase (LOX)

Os resultados dos ensaios de inibição da enzima lipo-oxigenase estão mostrados na **tabela 10** abaixo.

Tabela 10. Valores de concentração de inibição de 50% da enzima LOX das frações do extrato metanólico bruto de jucá.

Fração	IC ₅₀ (µg/mL)	Desvio padrão (±)
Hidro	8,70	0,86
AcOEt	8,62	0,49
CHCl ₃	10,60	0,36
Hex	140,45	3,27
Quercetina	1,7	0,02

As fases hidroalcoólica e em acetato de etila apresentaram maior eficiência na inibição da enzima lipo-oxigenase com valores de IC₅₀ = 8,70 ± 0,86 e 8,62 ± 0,49 µg/mL, respectivamente. A fase em clorofórmio também apresentou excelente resultado (IC₅₀ = 10,60 ± 0,36 µg/mL) similar ao padrão quercetina (IC₅₀ = 10,70 ± 0,11). E por fim, a fase hexânica mostrou-se menos eficaz comparado às outras fases (IC₅₀ = 140,45 ± 3,27).

Os resultados obtidos mostram que o extrato bruto da casca do fruto de jucá apresenta um potencial anti-inflamatório elevado comparando o IC₅₀ das fases com o IC₅₀ de drogas sintéticas (derivados de 7-(3-(benzo[d]tiazol-2-ylamino)-2-hydroxipropoxi)-4-metil-2H-chromen-2-ona) (SRIVASTAVA et al., 2016). Em outro estudo (BHUJADE et al., 2012) realizou-se a avaliação do potencial anti-inflamatória 5-LOX das hastes de *Cissus Quadrangularis*, uma planta indiana tradicional usada no tratamento de inflamações, e obteve para o extrato em acetato de etila, IC₅₀ igual à 654,9, resultado 80 vezes maior que o obtido para as fases clorofórmica, acetato de

etila e hidroalcoólica e 4,6 vezes maior para o resultado obtido na fase hexânica. Portanto, o extrato metanólico das cascas dos frutos de *Libidibia ferrea* possui um elevado potencial anti-inflamatório frente a enzima 5-LOX, testes de atividade anti-inflamatória devem ser realizados para a avaliação do uso de jucá para o tratamento de doenças causadas pela 5-LOX como asma, bronquite e inflamações na pele.

O comportamento das frações frente a enzima 5-LOX pode ser explicado pela presença das substâncias fenólicas extraídas. O ácido caféico e ácido gálico possuem atividade inibitória da enzima 5-LOX devido ao seu alto poder antioxidante. Os flavonoides também atuam como inibidores de LOX devido a capacidade de quelação do ferro que quebra o ciclo catalítico da LOX, além de atuarem como antioxidantes (CAROLINA et al., 2005). Os taninos assim como os flavonoides possuem capacidade de inibir a enzima LOX tanto por quelação quanto por estabilização do radical gerado pela cascata do ácido araquidônico. Estudos mostram que taninos obtidos da *Hamamelis virginiana* possuem atividade inibitória da Lipo-oxigenase e da Acetil-CoA acetiltransferase (HARTISCH; KOLODZIEJ; BRUCHHAUSEN, 1996).

A atividade anti-inflamatória também pode ocorrer sem a presença de substâncias com propriedades redutoras. Algumas substâncias conseguem mimetizar a estrutura de ácidos graxos, como acetilenos e triterpenos, inibindo a enzima LOX por ligação ou competição com os sítios ativos do substrato. (CAROLINA et al., 2005).

A enzima 5-LOX testada no ensaio, apresenta papel importante na mediação de LCs aos pulmões, sendo o LTC₄, LTD₄ e LTE₄ os principais responsáveis pela resposta inflamatória nos pulmões. A inibição da 5-LOX tem como consequência a diminuição do desenvolvimento de processos inflamatórios no pulmão como a asma

e a bronquite (ALWIN C. POWERS & DAVID D' ALESSIO, 2011). Os frutos de jucá possuem indicação popular para o tratamento de doenças inflamatórias respiratórias como as destacadas anteriormente (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), o ensaio de inibição da 5-LOX realizado neste trabalho indica um alto potencial do jucá para o tratamento dessas doenças respiratórias comprovando o uso do fruto. Estudos devem ser realizados para quantificar a dosagem de fruto necessária para um tratamento eficiente de doenças respiratórias.

6. CONCLUSÃO

O extrato metanólico da casca de jucá possui um alto potencial antioxidante e anti-inflamatório devido à presença de substâncias fenólicas como ácidos fenólicos e taninos (galotaninos e elagitaninos). A extração dos metabólitos secundários em metanol apresentou rendimento de 47%, provando que a natureza química de grande parte das substâncias presentes da casca do fruto de jucá, são de alta polaridade.

A análise em CLAE-DAD-EM do extrato bruto e extrato bruto hidrolisado serviram para identificação de algumas substâncias fenólicas presentes na amostra tais como o ácido galoilquínico, o ácido galoilsinápico, o ácido metilgaloilquínico, o elagitaninos, HDDPH, ácido clorogênico, além de alguns taninos não identificados.

Os procedimentos de separação líquido-líquido comprovaram ainda mais a natureza química das substâncias presentes no extrato bruto, uma vez que, o maior rendimento obtido foi da fração hidroalcoólica.

Os testes de atividade antioxidante e anti-inflamatória mostraram melhor resposta nas fases polares sendo a fase acetato de etila, com os maiores valores de inibição nos testes. Apesar de apresentar menor atividade antioxidante e anti-inflamatória, a fase hexânica pode apresentar mecanismos de combate a inflamações diferentes dos comuns para substâncias fenólicas, uma vez que,

algumas substâncias, como os ácidos graxos podem mimetizar a estrutura do ácido araquidônico para serem metabolizadas pelas enzimas lipo-oxigenases.

Em comparação com outras plantas de uso tradicional, a *Libidibia ferrea*, apresenta potencial elevado para o tratamento de inflamações causados pelas enzimas 5-LOX como asma, bronquite e inflamações na pele. Estudos posteriores devem ser realizados para identificação do mecanismo de inibição das substâncias presentes nos frutos de jucá, além de isolar esses princípios ativos.

A partir da fase com maior atividade antioxidante e biológica, foi possível isolar a metoxigeraniina e o ácido elágico, substâncias ativas com alto poder antioxidante, através do emprego de técnicas de separação cromatográfica clássicas e modernas. O procedimento estabelecido pode ser utilizado para a obtenção em larga escala dessas substâncias, além da possibilidade de isolamento utilizando as outras frações.

A validação do método de análise em CLAE-DAD pode ser realizada para futuro controle de qualidade do fruto de jucá.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGYARE, C. et al. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 617–624, 2011.

ALBERTO, M. R.; ZAMPINI, I. C.; ISLA, M. I. Inhibition of cyclooxygenase activity by standardized hydroalcoholic extracts of four Asteraceae species from the Argentine Puna Inhibition of cyclooxygenase activity by standardized hydroalcoholic extracts of four Asteraceae species from the Argentine Pu. v. 42, n. September, p. 787–790, 2009.

ALWIN C. POWERS & DAVID D' ALESSIO. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic. In: **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. [s.l: s.n.]. p. 1237–1275.

AOUF, C. et al. Tara tannins as phenolic precursors of thermosetting epoxy resins. **European Polymer Journal**, v. 55, p. 186–198, 2014.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem**, v. 99, p. 191–203, 2006.

BARROSO, G. M. et al. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. p. 443p., 1999.

BHUJADE, A. M. et al. Evaluation of *Cissus quadrangularis* extracts as an inhibitor of COX, 5-LOX, and proinflammatory mediators. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 989–996, 2012.

BITTENCOURT, P. S. T. et al. **ANTIOXIDANTY ACTIVITY AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF FRUITS FROM CAESALPINIA FERREA MARTIUS BY HPLC AND MASS SPECTROMETRY ANALYSIS**^{4°} **Brazilian conference on Natural Products** Natal Brazilian conference on Natural Products, , 2013.

BOUDJOU, S. et al. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1543–1550, 2013.

BREMER, B. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society Botanical Journal of the Linnean Society Blackwell Science Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 141, p. 399–436, 2003.

CALDERON, L. D. A. et al. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. v. 20, n. 6, p. 1011–1023, 2009.

CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: Novel analgesic drugs. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 6, n. 2, p. 261–279, 2001.

CAROLINA, J. et al. Determinação da atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de *Pterospartum tridentatum* Experiência Profissionalizante na Vertente. **Nutrients**, v. 28, n. 3, p. 118–129, 2005.

CARVALHO, J. C. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175–178, 1996.

CAVALCANTE, G. P. et al. Potential of ethyl acetate fractions of *Stryphnodendron adstringens* shells and fruit extracts of *Caesalpinia ferrea* to control bacterial leaf speck and on the potentiation of defense enzymes in tomato. v. 39, n. 4, p. 267–274, 2014.

CHAPPILL, J. A. Cladistic analysis of the Leguminosae: the development of an explicit phylogenetic hypothesis. **Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny**, p. 1–9, 1995.

COELHO, R. G. **Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae)**. São Paulo: [s.n.].

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Plantas medicinais e fitoterápicos**. [s.l: s.n.].

COSTAMAGNA, M. S. et al. Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. **Food Chemistry**, v. 190, p. 392–402, 2016.

CROFT, K. D. The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 435–442, 1998.

DA SILVA PORT'S, P. et al. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 875–881, 2013.

DE ARAÚJO, A. A. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.

DE SOUZA, C. F. et al. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 641–647, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products a biosynthetic approach**. Nottingham: John Wiley & Sons, 2009.

DIAS, A. M. A. et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory juice (Libidibia ferrea) extract using supercritical carbon dioxide technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 34–45, 2013.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

DUDONN??, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS,

FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768–1774, 2009.

EGGERS, L. et al. Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. In: **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. [s.l: s.n.]. p. 1122–1128.

GARRO GALVEZ, J. M.; RIEDL, B.; CONNER, A. H. Analytical Studies on Tara Tannins. **Holzforschung**, v. 51, n. 3, p. 235–243, jan. 1997.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. **Encyclopedia of Life Sciences**, n. lii, p. 1–7, 2001.

HARTISCH, C.; KOLODZIEJ, H.; BRUCHHAUSEN, F. VON. Dual Inhibitory Activities of Tannins from Hamamelis virginiana and Related Polyphenols on 5-Lipoxygenase and. n. 1, 1996.

HASLAM, E. Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2713–2721, 2007.

JAMEEL, M.; ALI, A.; ALI, M. Isolation of antioxidant phytoconstituents from the seeds of Lens culinaris Medik. **Food Chemistry**, v. 175, p. 358–365, 2015.

KILKUSKIE, R. E. et al. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 12, p. 1529–1534, 1992.

KURIHARA, H.; KAWABATA, J.; HATANO, M. Geraniin, a Hydrolyzable Tannin from Nymphaea-Tetragona Georgi (Nymphaeaceae). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 9, p. 1570–1571, 1993.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A. & LOCK, J. M. **Legume of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1987.

LI, W. J. et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of *Liriope muscari*. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1797–1808, 2012.

LI, X. C. et al. NMR assignments of ellagic acid derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 856–859, 1999.

LIMA, H. C. 2000. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica – uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

LIMA, S. M. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 169–175, 2011.

LIN, S. Y. et al. Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2485–2492, 2008.

LONDHE, J. S. et al. Geraniin and amariin, ellagitannins from *Phyllanthus amarus*, protect liver cells against ethanol induced cytotoxicity. **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1562–1568, 2012.

LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits

herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 93–99, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MARTINI, L. H. et al. Compounds extracted from Phyllanthus and Jatropha elliptica inhibit the binding of [3H]glutamate and [3H]GMP-PNP in rat cerebral cortex membrane. **Neurochemical Research**, v. 25, n. 2, p. 211–215, 2000.

MARTINS, M. et al. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (Paullinia cupana Kunth) and jucá (Libidibia ferrea Mart) extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 7,131-137, 2014.

MOEIN, M. R. et al. Analysis of antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of *Juniperus excelsa* M. B subsp. Polycarpus (K. Koch) Takhtajan essential oil. **Pharmacognosy research**, v. 2, n. 3, p. 128–31, 2010.

NAKAMURA, E. S. et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119–124, 2002.

NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P. C. The discovery and function of COX-2. **Journal of Rheumatology**, v. 24, n. SUPPL. 49, p. 6–8, 1997.

NOZAKI, H. et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290–8292,

2007.

OHIRA, S. et al. New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 37, p. 5052–5055, 2013.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T. Ellagitannins Renewed the Concept of Tannins. **Chemistry and Biology of Ellagitannins - An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols**, p. 320–374, 2008.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Correlation of oxidative transformations of hydrolyzable tannins and plant evolution. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 513–529, 2000.

OLIVEIRA, A. K. DE et al. Atividade alelopática de extratos de diferentes órgãos de *Caesalpinia ferrea* na germinação de alface. 2012.

OLIVEIRA, V. G. DE; NUNOMURA, R. DE C. S.; NUNOMURA, S. M. **DESREPLICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DOS FRUTOS DE *Mauritia flexuosa* L.f. POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**. Manaus: [s.n.].

PALANISAMY, U. D. et al. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 21–27, 2011.

PEREIRA, L. D. P. et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 642–8, 31 jan. 2012.

PINTO, M. C. et al. Determination of lipoxygenase activity in plant extracts using a modified ferrous oxidation. Xylenol orange assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 5956–5959, 2007.

RHAYANNY, M. et al. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. v. 7, n. 40, p. 3008–3013, 2013.

RIVERA, V. V. A. **Investigação teórica da reatividade de trans-trans-Farnesol isolado das folhas de Caesalpinia ferrea (Jucá)**. Manaus: [s.n.].

RUDDER, E. A. M. C. DE. **Guia compacto das plantas medicinais**. São Paulo: Editora Rideel, 2002.

SAMPAIO, F. C. et al. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289–294, 2009.

SAWADA, L. A. et al. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: Possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SCHMIDT, O. T.; MAYER, W. Natürliche Gerbstoffe. **Angewandte Chemie**, v. 68, n. 3, p. 103–115, 1956.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática : guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarium, 2008.

SRIVASTAVA, P. et al. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 67, p. 130–138, 2016.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **J. Sep. Sci.**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

STASI, L. C. DI; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

THITILERTDECHA, N. et al. Identification of major phenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. and their antioxidant activities. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1453–1465, 2010.

THOMAS, M. L. R. M. G.; FILHO, J. M. B. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 3, p. 289–300, 1985.

UEDA, H. et al. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 377–381, 2001.

VASCONCELOS, C. F. B. et al. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1533–1541, 2011.

VERMA, B.; HUCL, P.; CHIBBAR, R. N. Phenolic acid composition and

antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 947–954, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas** *Analytica Chimica Acta*, 2001.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites** *Methods in ecology*, 1994.

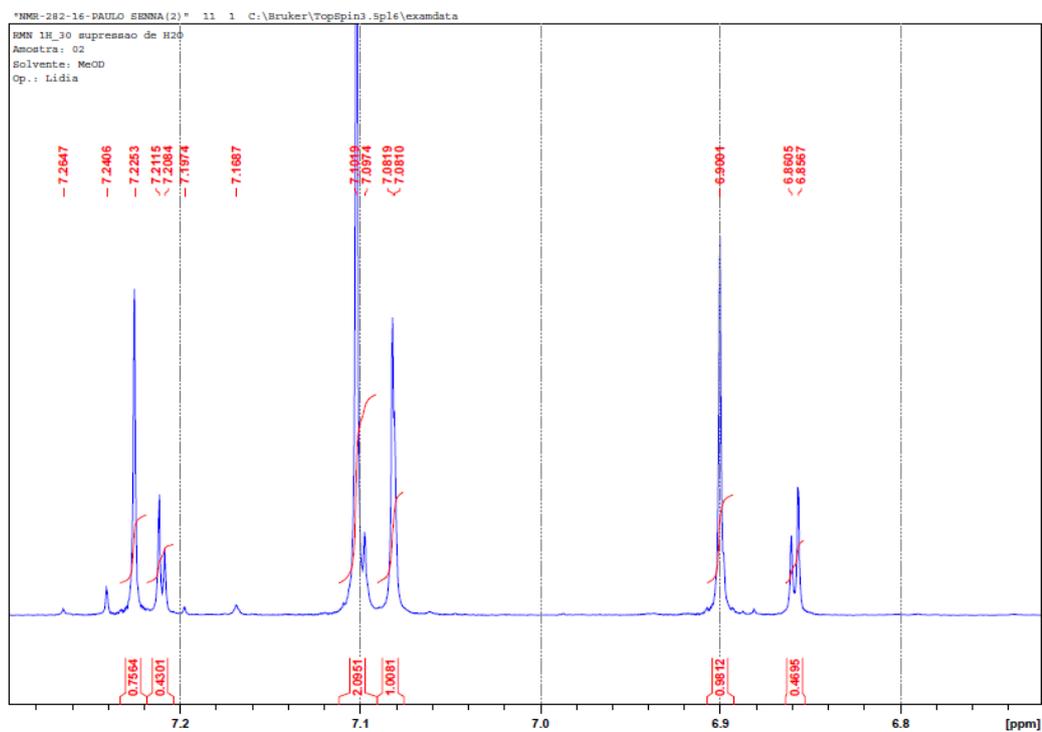
WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. **World Health**, v. 99, n. 1, p. 67–73, 2003.

WYREPKOWSKI, C. C. et al. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from caesalpinia ferrea stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16039–16057, 2014.

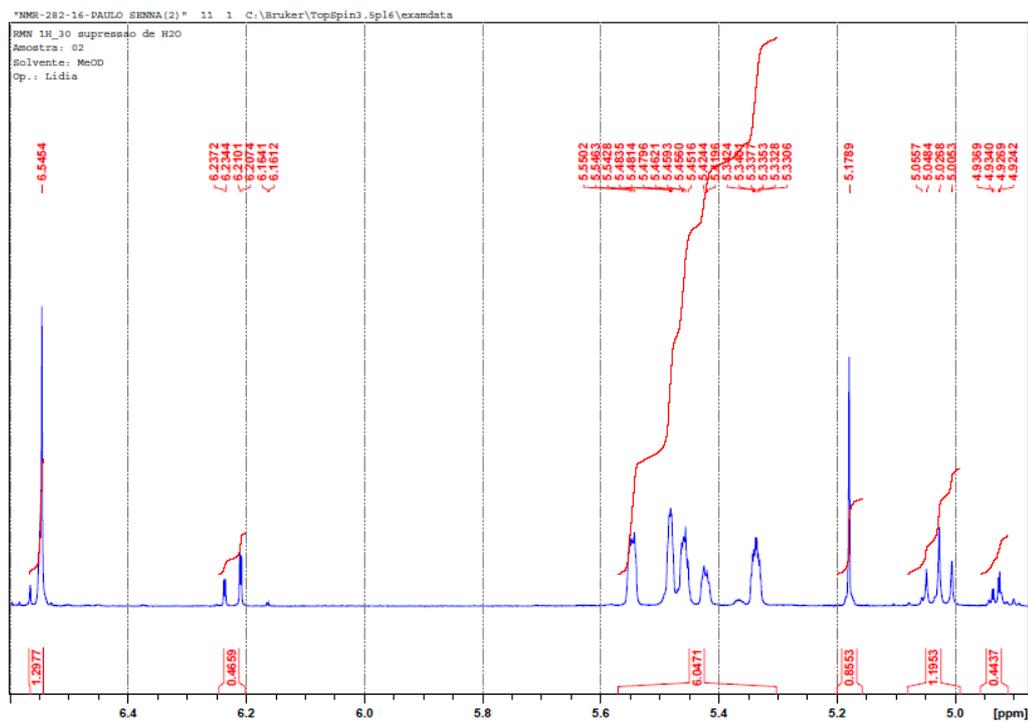
YANG, B. et al. Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 8672–8683, 2012.

<http://belezadacaatinga.blogspot.com.br/2012/05/juca-caesalpinia-ferrea.html>, acesso em 03 de Janeiro de 2015.

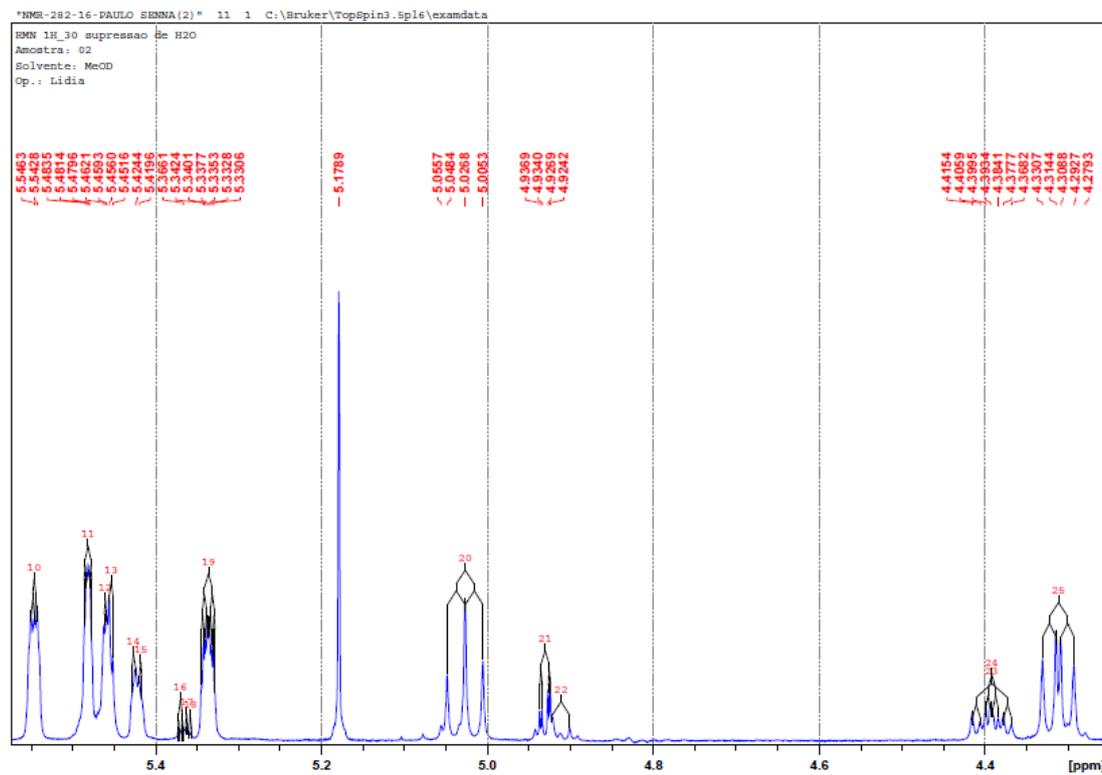
8. ANEXOS



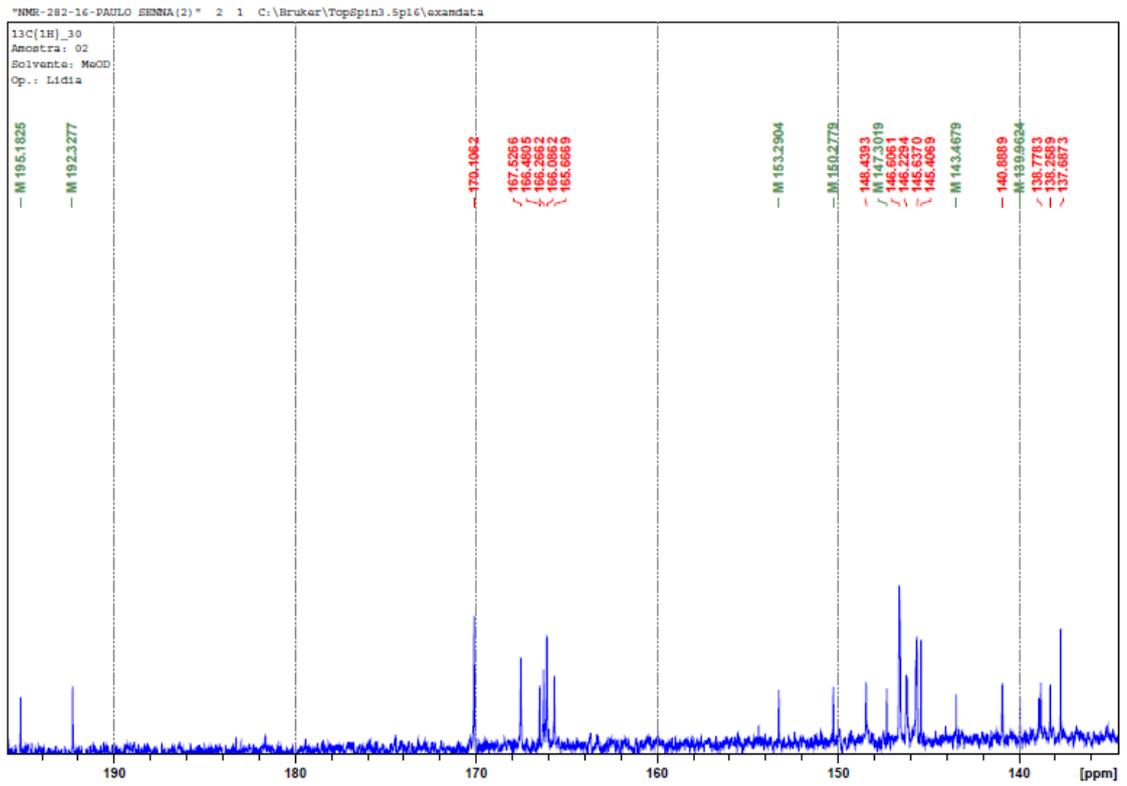
Anexo 1. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância 1 ampliada em 7,3-6,8 ppm.



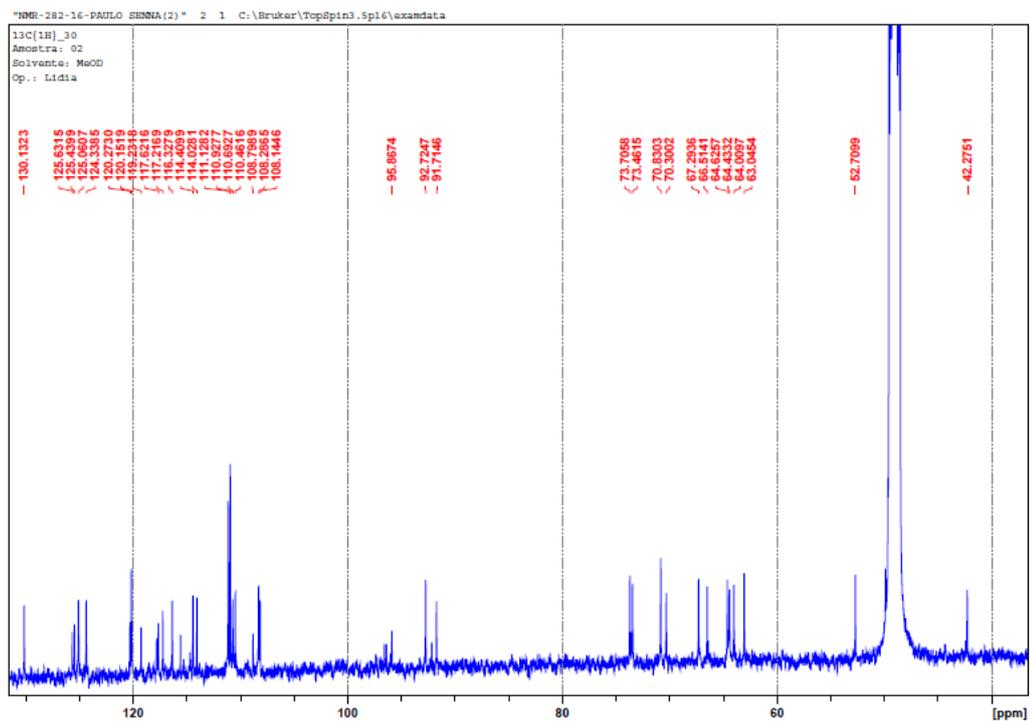
Anexo 2. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância 1 ampliada em 6,5-4,8 ppm.



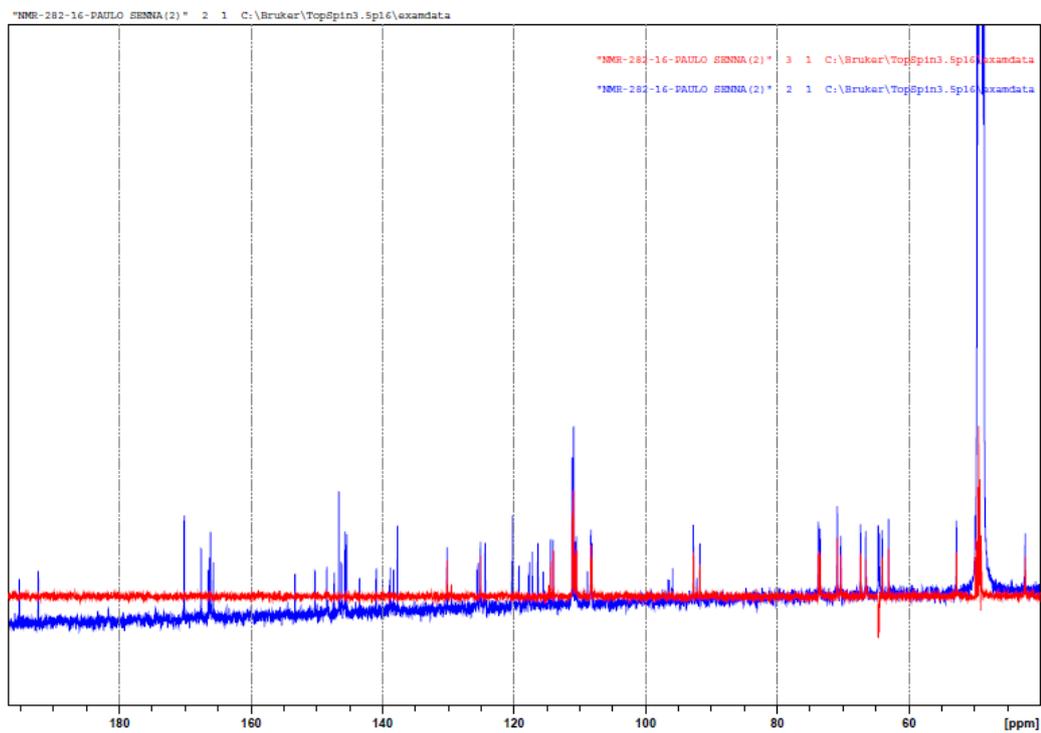
Anexo 3. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância 1 ampliada em 5,5-4,3 ppm.



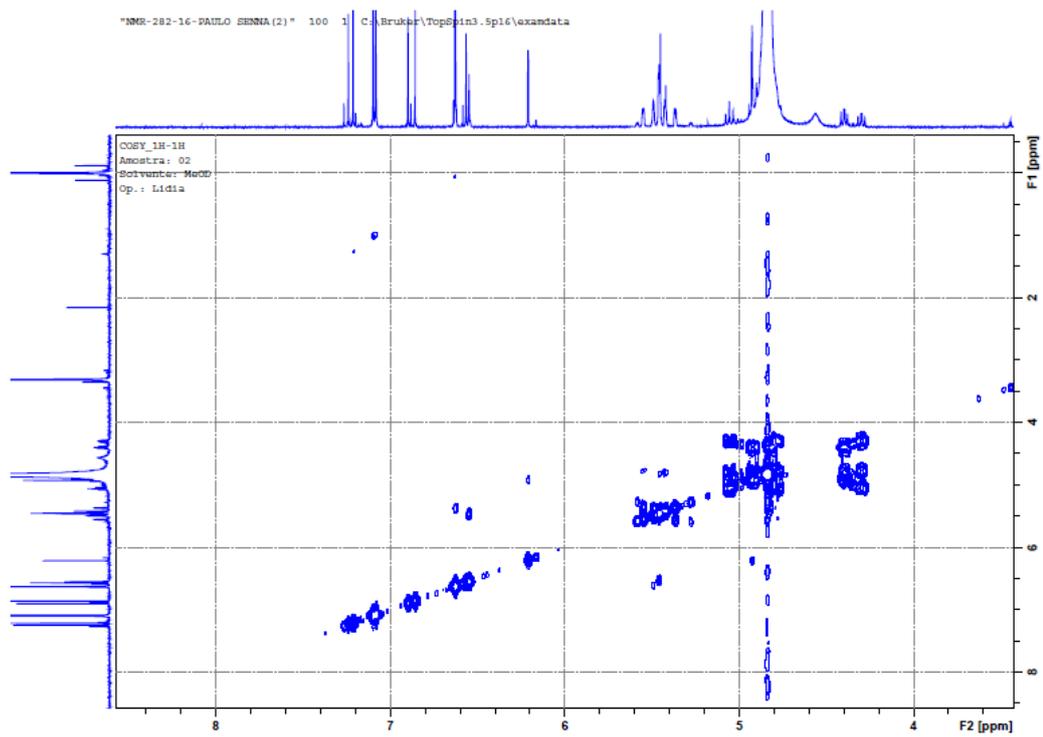
Anexo 4. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz) da substância 1 ampliada em 195-136 ppm.



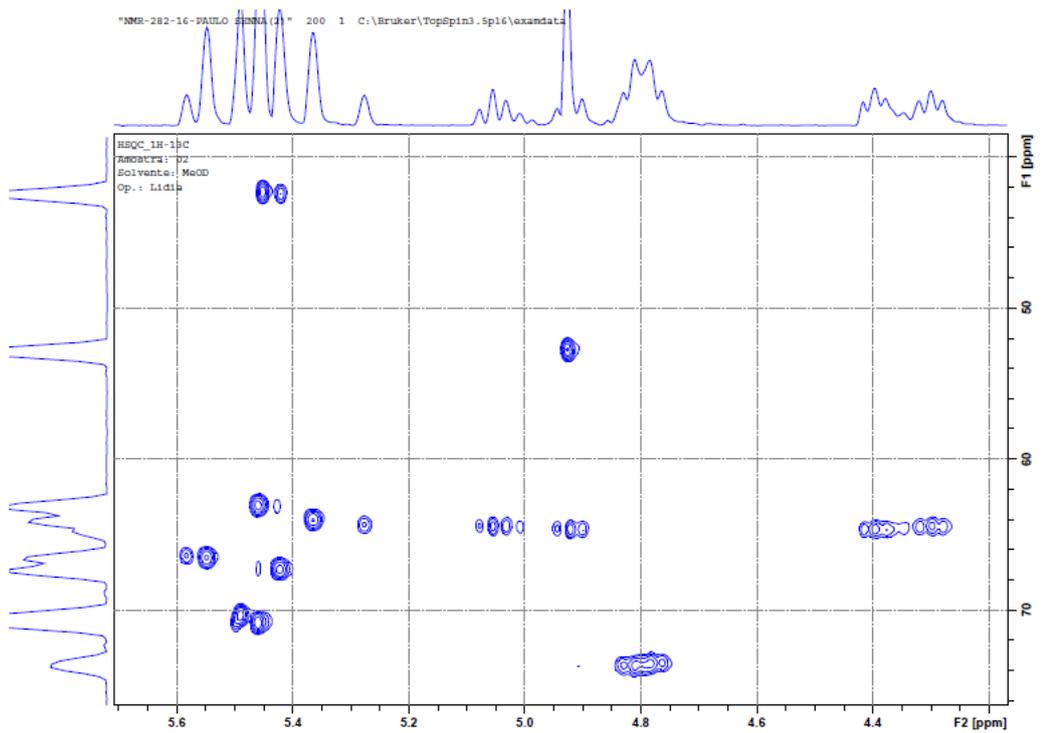
Anexo 5. Espectro de RMN 13C (125 MHz) da substância 1 ampliada em 130-40 ppm.



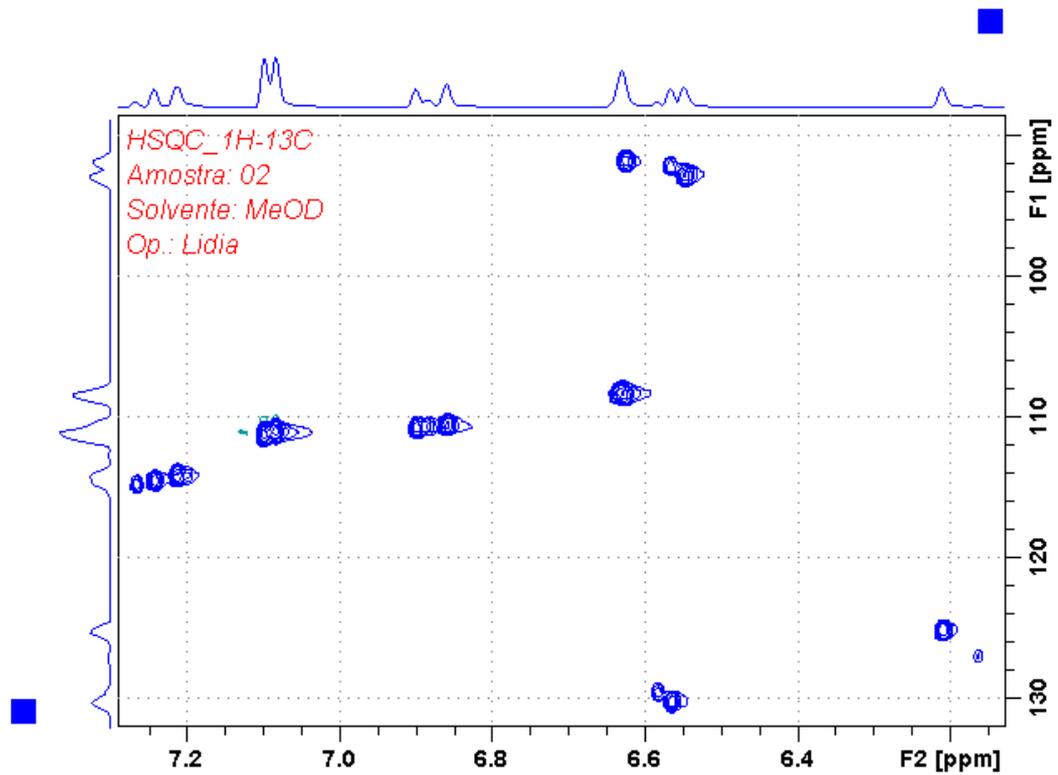
Anexo 6. Comparação entre os espectros de 13C (125MHz) e DEPT135 da substância 1.



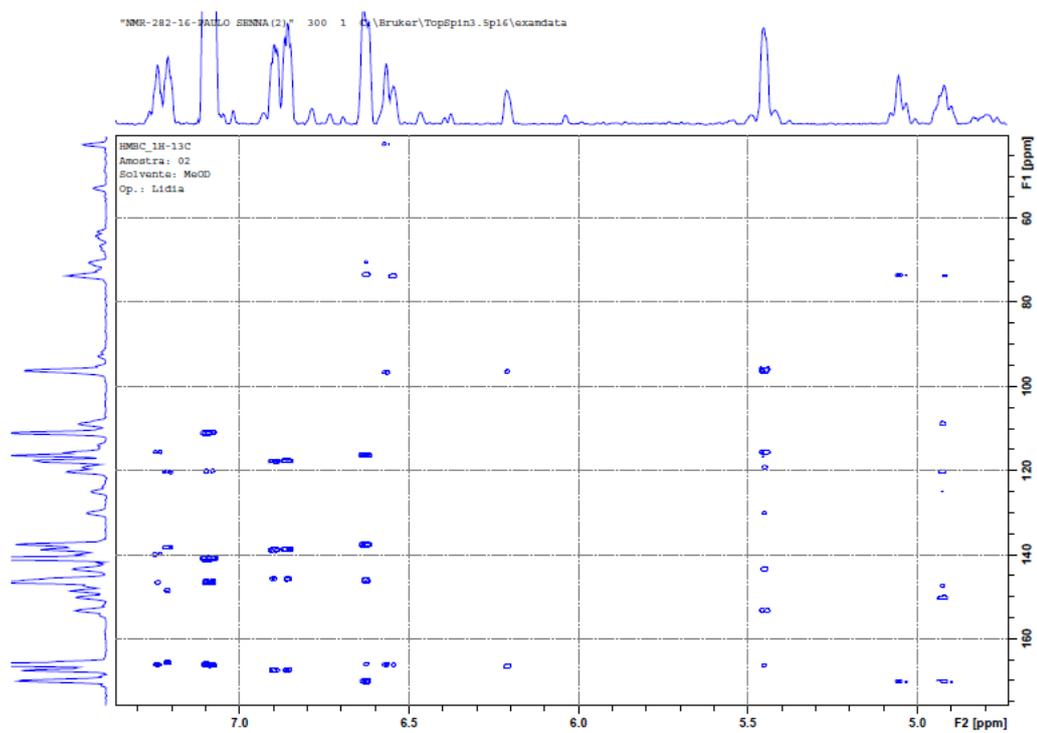
Anexo 7. Espectro bidimensional 1H-1H COSY da substância 1.



Anexo 8. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC da substância 1. Expandido (5,6-4,2 ppm).



Anexo 9. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC da da substância 1. Expandido (7,2-6,2 ppm).



Anexo 10. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HMBC da substância 1. Expandido (7,5-5,0 ppm).