

## Artigo

**Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante das Partes Aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae)**

Lins, A. C. S.; Agra, M. F.; Conceição, D. C. O.; Pinto, F. C. T.; Camara, C. A.; Silva, T. M. S.\*

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (1), 157-168. Data de publicação na Web: 4 de janeiro de 2016

<http://rvq.sbg.org.br>

**Chemical Constituents and Antioxidant Activity from Aerial Parts of *Clusia paralicola* and *Vismia guianensis***

**Abstract:** Phytochemical studies of aerial parts of *Clusia paralicola* (Aubl.) Choisy and *Vismia guianensis* resulted in the isolation of vismiaquinone A, 15<sup>1</sup>-ethoxy (15<sup>1</sup>R)-porphyrinolactone,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, bis-(2-methyl-heptyl)-phthalate and vitexin. The total phenolic content and antioxidant activity (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> and  $\beta$ -carotene oxidation inhibition) of extracts and fractions of *C. paralicola* and *V. guianensis* were evaluated.

**Keywords:** *Vismia*; *Clusia*; porphyrinolactone; antioxidant activity.

**Resumo**

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae) resultou no isolamento de vismiaquinona A, 15<sup>1</sup>-etoxi (15<sup>1</sup>R)-porfirinolactona,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, bis-(2-metil-heptil)-ftalato e vitexina. O teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno) dos extratos e frações de *C. paralicola* e *V. guianensis* foram avaliados.

**Palavras-chave:** *Vismia*; *Clusia*; porfirinolactona; atividade antioxidante.

\* Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

✉ [sarmiento@pesquisador.cnpq.br](mailto:sarmiento@pesquisador.cnpq.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20160011](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160011)

## Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante das Partes Aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae)

Antônio C. da Silva Lins,<sup>a</sup> Maria F. Agra,<sup>a</sup> Dário C. O. Conceição,<sup>b</sup>  
Fernanda C. T. Pinto,<sup>b</sup> Celso A. Camara,<sup>c</sup> Tania Maria S. Silva<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-graduação em Produtos e Sintéticos Bioativos, CEP 58051-900, João Pessoa-PB, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos, Departamento de Ciências Moleculares, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

\* [sarmento@pesquisador.cnpq.br](mailto:sarmento@pesquisador.cnpq.br)

Recebido em 3 de janeiro de 2016. Aceito para publicação em 3 de janeiro de 2016

### 1. Introdução

### 2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal e isolamento dos constituintes químicos

2.2. Teor de fenólicos totais, atividade frente aos radicais livres DPPH e ABTS e ensaio da atividade antioxidante no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

### 3. Resultados e Discussão

### 4. Conclusões

## 1. Introdução

O Gênero *Vismia*, pertencente à família Hypericaceae, engloba cerca de 55 espécies vegetais,<sup>1</sup> com ampla distribuição mundial, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais das América do Sul e Central e, em menores proporções, na África e Ásia.<sup>2</sup> *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy é uma árvore nativa da América tropical, encontrada na Colômbia, Venezuela, Guianas e no Brasil.<sup>3</sup> Em estudos anteriores da espécie

*V. Guianensis* identificaram a presença de catequina e procianidinas,<sup>4</sup> quinonas e xantonas,<sup>5,6</sup> flavonoides, antronas e diantronas,<sup>6,7</sup> antranoides,<sup>8</sup> benzofenonas e benzocumarinas.<sup>9</sup>

*Clusia*, pertencente à família Clusiaceae, compreende cerca de 300 a 400 espécies da região Neotropical, que ocorrem em áreas tropicais e subtropicais da América do Sul e América Central.<sup>10</sup> Dentre suas espécies, destaca-se *Clusia paralicola* G. Mariz, endêmica do Nordeste do Brasil, encontrada nos estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia e

Alagoas, em áreas de Caatinga e Floresta Atlântica.<sup>11</sup> Estudo fitoquímico conduziu a identificação de bifenilas,<sup>12</sup> diidrofenantrenos, xantonas,<sup>13</sup> benzofenonas poliiisopreniladas<sup>14</sup> e biflavonoides.<sup>15</sup>

O estresse oxidativo gerado pelo excesso de radicais livres está envolvido em processos como envelhecimento precoce, inflamações, câncer, aterosclerose, vasoespasmos e doença de Alzheimer, podendo causar danos ao DNA, proteínas e lipídios.<sup>16-18</sup> Nos últimos anos observou-se um aumento no interesse em antioxidantes naturais, como os fenóis e flavonoides presentes em plantas medicinais ou usadas na alimentação, que podem ajudar a prevenir danos oxidativos sobre constituintes celulares.<sup>19,20</sup>

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico e avaliar o potencial antioxidante das partes aéreas de *Vismia guianensis* e *Clusia paralicola*, ambas pertencentes à ordem Malpighiales, anteriormente posicionadas como membros da família Gutiferae.

## 2. Material e Métodos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-500 (500 e 125 MHz para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente) e Varian Oxford NMR 200 (200 e 50 MHz, para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente), como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano ou resíduo de solvente CDCl<sub>3</sub> e DMSO-*d*<sub>6</sub>. Os espectros de LC-ESI-MS foram obtidos em modo positivo com equipamento Esquire 3000 Plus (Bruker). Os espectros de infravermelho foram realizados em espectrofotômetro Varian 640 FT-IR em pastilhas de KBr. A determinação do poder rotatório específico das substâncias quirais foi realizada em aparelho modelo KRAUS ALPAX (Kraus Optronik, Germany), com cubeta em cristal de quartzo de 10 mL (1,0 dm<sup>3</sup>) utilizando metanol ou clorofórmio (grau espectroscópico). Para cromatografia em coluna convencional foram utilizados como

adsorvente Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Suécia) e sílica gel (230-400 mesh, Merck). Para cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de alumínio contendo sílica gel 60F254 (Merck) e como reveladores foram utilizados, além da detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), reagentes de Liebermann e ácido difenilbórico-etanolamina (1% de reagente NP em MeOH)

### 2.1. Material vegetal e isolamento dos constituintes químicos

Partes aéreas de *Vismia guianensis* foram coletadas na cidade do Conde e partes aéreas de *Clusia paralicola* foram coletadas na cidade do Cruz do Espírito Santo, ambas no estado da Paraíba. As amostras das duas espécies foram coletadas no período de outubro de 2008. As amostras vegetais foram identificadas pela Dra. Maria de Fátima Agra, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba (UFPB). Exsiccatas de *Clusia paralicola* (Agra et al. 7061) e de *V. guianensis* (Agra et al. 3219) encontram-se depositadas no Herbário Professor Lauro Xavier (JPB), Departamento de Sistemática e Ecologia da UFPB.

O material vegetal seco e pulverizado das partes aéreas de *V. guianensis* (2,3 Kg) foi extraído com etanol. O solvente da solução extrativa foi retirado através de destilação em rotaevaporador sob vácuo fornecendo 461,3 g do extrato etanólico bruto. Parte deste extrato (221,0 g) foi suspenso em metanol:H<sub>2</sub>O (1:1) e extraído com *n*-hexano, clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e acetato de etila (AcOEt) fornecendo 12,4 g; 21,6 g; 43,2 g e 53,3 g das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanol:H<sub>2</sub>O, respectivamente.

A fração CHCl<sub>3</sub> (17,0 g) foi submetida a cromatografia em coluna com Sephadex LH-20<sup>®</sup> em metanol:CHCl<sub>3</sub> (1:1), obtendo-se 28 frações. As frações 1-2 e 3-4 foram reunidas separadamente e submetidas a sucessivas colunas de sílica gel utilizando-se *n*-hexano,

acetato de etila e MeOH em gradiente crescente de polaridade, resultando no isolamento de cristais vermelhos em forma de agulhas (**1**, 39,5 mg).

A fração hexânica (8,01 g) foi submetida ao mesmo procedimento anterior e forneceu os compostos **1** (23,0 mg) e **2** (15,6 mg), um sólido verde escuro amorfo, além de um precipitado branco (**3a** e **3b**, 6,4 mg) e um óleo alaranjado (**4**, 45,5 mg). As frações AcOEt e MeOH:H<sub>2</sub>O não foram estudadas.

As partes aéreas secas e pulverizadas (1,0 Kg) de *Clusia paralicola* foram extraídas com etanol. O solvente foi evaporado fornecendo 158,3 g do extrato etanólico bruto. Cerca de 78,2 g deste extrato foram suspensos em solução de metanol:H<sub>2</sub>O (1:1) e extraídos sucessivamente com *n*-hexano, CHCl<sub>3</sub> e AcOEt. Os solventes foram evaporados fornecendo as frações hexânica (29,8 g), clorofórmica (15,3 g), acetato de etila (12,2 g) e H<sub>3</sub>COH:H<sub>2</sub>O (18,4 g). A fração obtida com AcOEt após retirada do solvente apresentou um precipitado amarelo que foi filtrado e recristalizado em metanol e H<sub>2</sub>O (**5**; 431,9 mg).

**Vismiaquinona A (1)**. Cristais vermelhos. HR-ESI-MS 351,1226 [M-H]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>. (Calculado para 351,1227). RMN <sup>1</sup>H [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm), J (Hz)]: 12,91 (s, HO-8); 12,10 (s, HO-1); 7,58 (s, H-4); 7,36 (s, H-5); 7,04 (s, H-2); 6,90 (dd, 17,0 e 7,1 Hz, H-2'); 6,64 (d, 17,0 Hz, H-1'); 4,00 (s, H<sub>3</sub>CO-6); 2,53 (m, H-3'); 2,43 (s, H<sub>3</sub>CO-3); 1,14 (d, 7,0 Hz, H-4'); 1,13 (d, 7,0 Hz, H-5'). RMN <sup>13</sup>C [(125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm))]: 191,38 (C-9); 181,81 (C-10); 162,98 (C-1); 162,46 (C-8); 162,07 (C-6); 148,39 (C-3); 146,73 (HC-2'); 133,21 (C-4b); 132,06 (C-4a); 124,37 (C-2); 121,08 (C-4); 120,02 (C-7); 115,81 (C-1'); 113,72 (C-8b); 110,52 (C-8a); 103,37 (C-5); 56,3 (H<sub>3</sub>CO-6); 33,37 (C-3'); 22,4 (H<sub>3</sub>C-4'); 22,4 (H<sub>3</sub>C-5'); 22,1 (H<sub>3</sub>C-3); Ponto de fusão: 189-191 °C (ref. 197,3-198,3° C, recristalizado em acetona)<sup>21</sup>.

15<sup>1</sup>-etoxi (15<sup>1</sup>R)-porfirinolactona (**2**). Sólido amorfo verde escuro. HR-ESI-MS 637,3028 [M+H-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> e 718,6270 [M-H+K]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H [200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm), J

(Hz)] e RMN <sup>13</sup>C [(50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): ver Tabela 1. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -100° (3,3 mg/10mL em metanol). Ponto de fusão: 131-133 °C.

As substâncias β-sitosterol (**3a**) e estigmasterol (**3b**),<sup>22</sup> Bis-(2-metil-heptil)-ftalato (**4**)<sup>23</sup> e Vitexina (**5**)<sup>24,25</sup> foram identificados por comparação com dados da literatura.

## 2.2. Teor de fenólicos totais, atividade frente aos radicais livres DPPH e ABTS e ensaio da capacidade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoleico

A determinação do teor de fenólicos totais do extrato etanólico e das frações hexânica, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e metanol:H<sub>2</sub>O (1,0 mg mL<sup>-1</sup> em etanol) das partes aéreas *V. guianensis* e de *C. paralicola* foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Slinkard e Singleton, 1977,<sup>26</sup> com modificações. As análises foram realizadas com três repetições e o teor de fenólicos totais foi determinado através da equação da regressão linear obtida a partir da curva analítica construída com padrão de ácido gálico (0,5 a 20 µg mL<sup>-1</sup>) e expressos como miligramas de equivalente de ácido gálico por grama do extrato ou fração (mg EAG g<sup>-1</sup>).

A atividade sequestradora de radical livre com DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com Silva *et al.*, 2006.<sup>27</sup> Os extratos e frações foram utilizados nas concentrações de 2,5-233,3 µg mL<sup>-1</sup> e o flavonoide vitexina 7,6-46,2 µM com DPPH<sup>•</sup> (23,6 µg mL<sup>-1</sup> ou 0,6 mM em etanol). Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultrassom, a quantidade de radicais DPPH<sup>•</sup> foi registrada em espectrofotômetro de UV-Visível (517 nm). O controle positivo utilizado foi o ácido ascórbico (2,84 - 22,71 µM).

O ensaio para avaliação da atividade sequestradora de radicais livres utilizando o cátion radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) foi realizado de acordo com Re *et al.*, 1999.<sup>28</sup> As soluções-estoque dos extratos e frações (1,0 mg mL<sup>-1</sup>)

foram adicionadas a quantidades apropriadas do radical ABTS<sup>•+</sup>, concentrações finais de 2,5 a 100,0 µg mL<sup>-1</sup>. As soluções foram agitadas e, após 10 minutos, a absorvância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm. O padrão positivo utilizando foi o Trolox<sup>®</sup> (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico/0,5-4,0 µM). A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% (p<0,05) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos como CE<sub>50</sub>±D.P. e todas as concentrações foram testadas em triplicata.

A capacidade antioxidante frente o sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizado de acordo com o método descrito por Emmons, *et al.*, 1999,<sup>29</sup> com modificações. Uma alíquota de 150 µL da solução de β-caroteno (20 mg mL<sup>-1</sup> em

clorofórmio) foi adicionada a 160 µL de ácido linoléico e 660 µL de Tween 20. Foram adicionados 140 mL de H<sub>2</sub>O destilada previamente tratada em atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos. A absorvância da emulsão foi ajustada entre 0,7 a 0,6 nm a 470 nm. Alíquotas dos extratos (50-100 µg mL<sup>-1</sup>) foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e ao Trolox<sup>®</sup> (16 µg mL<sup>-1</sup>). Uma leitura inicial da absorvância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema para determinação do tempo zero, seguindo-se de leituras da absorvância a cada 20 minutos, durante o período de 100 minutos, mantendo-se as amostras em banho-maria a 40 °C. A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da oxidação. O decréscimo da leitura da absorvância das amostras foi correlacionado com o sistema que estabelece a porcentagem de oxidação:

$$\text{Redução da absorvância} = \text{Absinicial} - \text{Absfinal}$$

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

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

### 3. Resultados e Discussão

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **1** apresentaram padrões de deslocamentos químicos atribuídos a antraquinonas que foram comparados com dados espectroscópicos descritos na literatura que permitiram a identificação da vismiaquinona A já isolada dos frutos de *V. guianensis*.<sup>30</sup> O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Tabela 1) do composto **2** apresentou simpletos referentes aos hidrogênios de três metilas ligadas a anel aromático em δ<sub>H</sub> 3,40 (H-2<sup>1</sup>), 3,24 (H-7<sup>1</sup>) e 3,87 (s, H-12<sup>1</sup>) e um grupo metoxila em δ<sub>H</sub> 3,61 (s, OCH<sub>3</sub>-15<sup>3</sup>). Outros três sinais foram atribuídos a

hidrogênios olefínicos em δ<sub>H</sub> 9,43 (d, J=6,0 Hz), 9,58 (d, J=6,0 Hz) e 8,60 (d, J=5,6 Hz) H-5, H-10 e H-20, respectivamente, compatíveis a um esqueleto porfirínico de feofitinas.<sup>31,32</sup> Estes dupletos ocorreram devido ao equilíbrio tautomérico de dois átomos de hidrogênio ligados a nitrogênios do anel porfirínico. Sinais de hidrogênios vinílicos foram observados em δ<sub>H<sub>a</sub></sub> 7,98 (dd, J=18,0 e 12,0 Hz), δ<sub>H<sub>b</sub></sub> 6,28 (d, J=17,6 Hz) e δ<sub>H<sub>c</sub></sub> 6,17 (d, J=11,4 Hz), sendo atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C-3<sup>1</sup> e C-3<sup>2</sup>, respectivamente. A integração dos dois quartetos entre δ<sub>H</sub> 4,12 e 3,99 para 6 hidrogênios, indica que estes podem se referir a três grupos metilênicos. Um desses quartetos (3,99, J=7,2 Hz) refere-se ao grupo

metilênico na posição 8<sup>1</sup>, enquanto o segundo ( $\delta_H$  4,12, q,  $J=7,2$ ) são dos hidrogênios metilênicos de dois grupos etoxilas ligados aos carbonos na posição 15<sup>1</sup> e 17<sup>3</sup> (H15<sup>2''</sup> e H17<sup>4</sup>). Os tripletos em  $\delta_H$  1,10 ( $J=7,0$  Hz, CH<sub>3</sub>-H15<sup>3''</sup>) e em  $\delta_H$  0,84 ( $J=6,2$  Hz, CH<sub>3</sub>-17<sup>5</sup>), respectivamente, confirmam a existência destes grupos metilas que estão ligados aos carbonos em  $\delta_C$  60,57 (CH<sub>2</sub>-17<sup>4''</sup>), <sup>13</sup>C $\delta_C$  60,40(CH<sub>2</sub>-15<sup>2''</sup>). O quarteto em  $\delta_H$  4,47 ( $J=7,4$  Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-18 e o duplete em  $\delta_H$  4,66 (d,  $J=7,4$  Hz) foi atribuído ao H-17. A configuração relativa do C-15<sup>1</sup> foi determinada como sendo *rel-R*, baseado no deslocamento em campo baixo do H-17 ( $\delta_H$  4,66) em contraste com o deslocamento  $\delta_H$  4,16 ppm (Huang et al.,

2007)<sup>32</sup> para a configuração *rel-S* do C-15<sup>1</sup> (Nakatani et al., 1981).<sup>33</sup> Os hidrogênios vicinais H-17 e H-18 estão em posição *trans*.<sup>27</sup> O simpleto em  $\delta_H$  3,61 foi atribuído aos hidrogênios metoxílicos em C-15<sup>3</sup>. O espectro de APT mostrou sinais de carbonos vinílicos em  $\delta_C$  129,04 e 122,93 que correspondem aos carbonos C-3<sup>1</sup> e C-3<sup>2</sup>, respectivamente, do núcleo porfirínico. Os sinais em  $\delta_C$  172,44 e 173,63 foram atribuídos aos carbonos carbonílicos de éster nas posições C-15<sup>1</sup> e C-17<sup>3</sup>, respectivamente, enquanto o sinal em  $\delta_C$  51,76 é típico de carbono de metoxila (C-15<sup>3</sup>) ligada a éster. Até o momento não há relatos de isolamento deste composto e nem de feoforbídeos na família Clusiaceae.

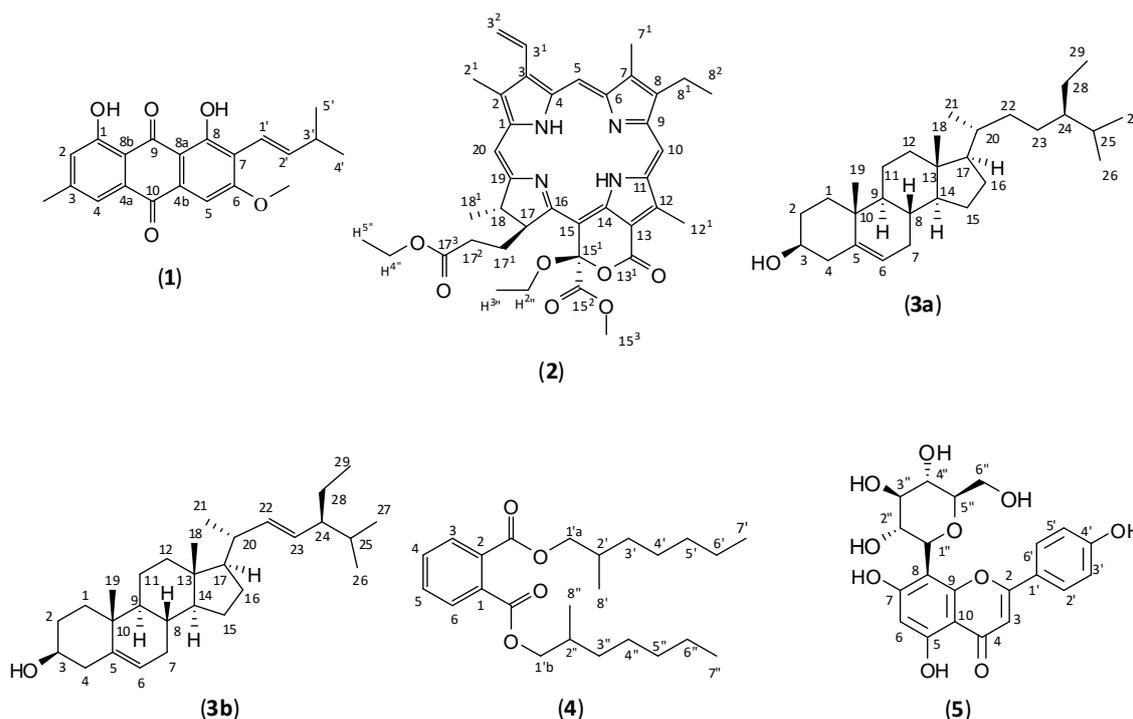
**Tabela 1.** Dados ( $\delta$  e  $J$  Hz, CDCl<sub>3</sub>) de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) e <sup>13</sup>C (50 MHz) de 15<sup>1</sup>-etoxi (15<sup>1</sup>*rel-R*)-porfirinolactona

	$\delta C(ppm)$	$\delta H(ppm)$		$\delta C(ppm)$	$\delta H(ppm)$
<b>C</b>			<b>CH</b>		
<b>1</b>	142,04		<b>5</b>	99,80	9,43 (d, $J=6,0$ Hz)
<b>2</b>	131,79		<b>10</b>	104,28	9,58 (d, $J=6,0$ Hz)
<b>3</b>	136,29		<b>17</b>	53,44	4,66 (d, $J=7,4$ Hz)
<b>4</b>	136,55		<b>18</b>	50,28	4,47 (q, $J=7,4$ Hz)
<b>6</b>	155,59		<b>20</b>	93,64	8,60 (d, $J=5,6$ Hz)
<b>7</b>	136,55		<b>3<sup>1</sup></b>	129,04	7,98 (dd, $J=12$ e 18 Hz)
<b>8</b>	145,25		<b>CH<sub>3</sub></b>		
<b>9</b>	150,22		<b>2<sup>1</sup></b>	12,14	3,40 (s)
<b>11</b>	137,78		<b>7<sup>1</sup></b>	11,30	3,24 (s)
<b>12</b>	131,79		<b>12<sup>1</sup></b>	12,32	3,87 (s)
<b>13</b>	-		<b>18<sup>1</sup></b>	22,64	1,58 (d, $J=7,2$ Hz)
<b>13<sup>1</sup></b>	161,87		<b>8<sup>2</sup></b>	17,49	1,68 (t, $J=7,4$ Hz)
<b>14</b>	136,54		H15 <sup>3''</sup>	14,13	1,10 (t, $J=7,0$ Hz)
<b>15</b>	101,88		17 <sup>5</sup>	14,13	0,84 (t, $J=6,2$ Hz)
<b>15<sup>1</sup></b>	104,99		<b>OCH<sub>3</sub></b>		
<b>15<sup>2</sup></b>	172,44		<b>15<sup>3</sup></b>	51,76	3,61 (s)
<b>16</b>	166,27				
<b>17<sup>3</sup></b>	173,63				
<b>19</b>	172,80				
<b>CH<sub>2</sub></b>					
<b>3<sup>2</sup></b>	122,93	6,17 <sub>cis</sub> (d, $J=11,4$ Hz) 6,28 <sub>trans</sub> (d, $J=17,6$ Hz)			
<b>8<sup>1</sup></b>	19,80	3,98 (q, $J=7,2$ Hz)			
<b>17<sup>1</sup></b>	31,54	1,97-2,06 (m)			
<b>17<sup>2</sup></b>	31,93	1,94-2,07 (m)			
<b>17<sup>4</sup></b>	60,57	4,12 (q, $J=7,2$ Hz)			
<b>15<sup>2''</sup></b>	60,40	4,12 (q, $J=7,2$ Hz)			

O espectro de massas de alta resolução mostrou o pico em  $m/z$  637,3028  $[M+H-OCH_2CH_3]^+$  correspondendo a fórmula molecular ( $C_{37}H_{41}N_4O_6$ ) (calculado para  $C_{37}H_{41}N_4O_6$  637,3020).

Os espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  para **3a** ( $\beta$ -sitosterol) e **3b** (estigmasterol), **4** [*bis*-(2 metil-heptil)-ftalato] e **5** (vitexina) foram

comparados com dados espectroscópicos descritos na literatura.<sup>34-36</sup> O isolamento de estigmasterol<sup>37</sup> e  $\beta$ -sitosterol<sup>38</sup> já foram relatados no gênero *Vismia*, enquanto a ocorrência de *bis*-(2 metil-heptil)-ftalato já foi relatado na família Clusiaceae.<sup>35</sup> O flavonoide vitexina foi isolado dos ramos e folhas de *Clusia columnaris*.<sup>39</sup>



**Figura 1.** Compostos isolados de *V. guianensis* e *C. paralicola*

A avaliação do teor de fenólicos totais do extrato e frações dos extratos de partes aéreas de *V. guianensis* e *C. paralicola* mostrou que as frações obtidas com acetato de etila de ambas espécies vegetais apresentaram as maiores quantidades de compostos fenólicos (**Tabelas 2 e 3**). Os ensaios de atividade sequestradora frente aos radicais livres DPPH $^{\bullet}$  e ABTS $^{\bullet+}$  mostraram que o extrato e frações apresentaram

atividade antioxidante, destacando-se a fração AcOEt de *V. guianensis* ( $CE_{50}=6,61\pm 0,03 \mu g mL^{-1}$ ). Da mesma forma, frente ao radical ABTS $^{\bullet+}$ , a fração AcOEt também foi a mais ativa das amostras obtidas das partes aéreas de *V. guianensis* ( $CE_{50}=6,82\pm 0,11 \mu g mL^{-1}$ ), valor próximo ao observado para o padrão positivo Trolox $^{\circledR}$  com  $CE_{50}=1,71\pm 0,095 \mu g mL^{-1}$  (Tabela 2).

**Tabela 2.** Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante de extrato etanólico e frações obtidas das partes aéreas de *V. guianensis*

Amostras ( <i>V. guianensis</i> )	Teor de Fenólicos Totais (MG EAG g <sup>-1</sup> ± D.P.M.)*	DPPH* (EC <sub>50</sub> )* <sup>a</sup>	ABTS** (EC <sub>50</sub> )* <sup>a</sup>	Proteção do β- caroteno* <sup>b</sup>
Extrato EtOH	240,66±0,03	6,76±0,05	8,07±0,11	30,87±0,99
Fração hexânica	84,58±0,004	27,0±0,15	13,37±0,17	64,44±2,36
Fração CHCl <sub>3</sub>	135,70±0,02	17,31±0,42	7,95±0,25	54,84±0,86
Fração AcOEt	266,57±0,01	6,61±0,03	6,82±0,11	39,80±1,35
Fração MeOH:H <sub>2</sub> O	232,88±0,03	7,79±0,17	9,95±0,11	38,79±2,12
Ác. Ascórbico	-	6,97±0,09	-	-
Trolox <sup>®</sup>	-	-	1,71±0,09	81,42±3,62

\* (mg EAG g<sup>-1</sup> ± D.P.)= miligramas de equivalente de ácido gálico/grama de extrato ou fração ± desvio padrão;

\*<sup>a</sup> Concentração de amostra necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de radical livre em µg mL<sup>-1</sup> ± D.P.;

\*<sup>b</sup> % da inibição da oxidação em 60 minutos.

O extrato e as frações obtidas das partes aéreas de *C. paralicola* foram capazes de sequestrar os radicais livres DPPH\* e ABTS\*\* com valores de CE<sub>50</sub> entre 37,9±0,35 a 129,4±2,12 µg mL<sup>-1</sup> (Tabela 3) e a fração AcOEt foi também a mais ativa (Tabela 3).

Esta atividade antioxidante pode ser devida a presença do flavonoide vitexina (CE<sub>50</sub>=9,2±0,12 µg mL<sup>-1</sup>) que também foi testado frente ao radical DPPH\* e apresenta comprovada atividade antioxidante.<sup>40,41</sup>

**Tabela 3.** Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante de extrato etanólico e frações obtidas das partes aéreas de *C. paralicola*

Amostra ( <i>C. paralicola</i> )	Fenólicos Totais (mg EAG g <sup>-1</sup> ± D.P.)*	DPPH* (CE <sub>50</sub> )* <sup>a</sup>	ABTS** (CE <sub>50</sub> )* <sup>a</sup>	Proteção do β- caroteno* <sup>b</sup>
Extrato EtOH	64,6±2,8	44,0±0,52	20,6±0,22	57,58±0,9
Fração hexânica	31,7±0,5	117,1±1,60	52,6±0,38	54,69±0,8
Fração CHCl <sub>3</sub>	64,9±1,0	66,9±0,26	18,3±0,32	55,57±2,2
Fração AcOEt	92,4±0,5	37,9±0,35	15,2±0,86	60,17±2,9
Fração MeOH:H <sub>2</sub> O	34,3±0,5	129,4±2,12	59,3±0,41	54,03±0,2
Vitexina	-	9,2±0,12	-	-
Ác. Ascórbico	-	5,7±0,06	-	-
Trolox <sup>®</sup>	-	-	1,71±0,09	62,04±1,0

\* (mg EAG g<sup>-1</sup> ± D.P.)= miligramas de equivalente de ácido gálico/grama de extrato ou fração ± desvio padrão;

\*<sup>a</sup> Concentração de amostra necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de radical livre em µg mL<sup>-1</sup> ± D.P.;

\*<sup>b</sup> % da inibição da oxidação em 60 minutos.

Já existem relatos da atividade antioxidante dos frutos de *V. guianensis*<sup>30,42</sup> e de *C. parvicola*,<sup>15</sup> sendo os resultados compatíveis aos descritos neste trabalho.

O fato das frações acetato de etila (AcOEt) de *V. guianensis* e *C. parvicola* apresentarem os menores valores de CE<sub>50</sub>, quando comparados aos demais extratos e frações obtidos pode ser atribuído ao teor de fenólicos totais. Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas.<sup>43-45</sup> A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se, principalmente, às suas estruturas químicas e propriedades redutoras e atuando na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação dos fenólicos antioxidantes são relativamente estáveis.<sup>46,47</sup>

Nas avaliações de atividade antioxidante utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico verificou-se que transcorridos 60 minutos do início do ensaio entre 30,87±0,99 e 64,44±2,36 % do  $\beta$ -caroteno foi preservado em contato com o extrato e frações de *Vismia guianensis* (**Tabela 2**), sendo a fração hexânica a mais ativa. Uma possível explicação seria a presença de compostos com atividade antioxidante e de natureza lipofílica, como tocoferóis e tocotrienóis, que possivelmente possam existir na fração hexânica.<sup>48</sup>

#### 4. Conclusões

O estudo químico das frações CHCl<sub>3</sub> e hexânica de partes aéreas de *V. guianensis* permitiu o isolamento dos compostos vismiaquinona A,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, bis-(2-metil-heptil)-ftalato e 15<sup>1</sup>-etoxi (15<sup>1</sup>*rel-R*)-porfirinolactona, sendo este feoforbídeo

inédito na literatura. O estudo químico da fração AcOEt de *C. parvicola* possibilitou o isolamento do flavonoide vitexina. As frações AcOEt de *V. guianensis* e *C. parvicola* mostraram-se com o maior teor de fenólicos e atividade antioxidante, indicando que os fenólicos contidos nestas fases podem ser responsáveis pela inibição dos radicais livres.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, FACEPE e CAPES.

#### Referências Bibliográficas

- Mabberley, D. J. *The Plant-Book*. Cambridge University Press: New York, 1993.
- Pinheiro, R. M.; Mac-Quhae, M. M.; Bettollo, G. B. M.; Monache, F. D. Prenylated anthranoids from *Vismia* species. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1737. [[CrossRef](#)]
- Ewan, J. Synopsis of the South American species of *Vismia* (Guttiferae). *Bulletin of the United States National Museum* **1962**, *35*, 293. [[Link](#)]
- Gonzales, J. G.; Monache, F. D.; Monache, G. D.; Bettolo, G. B. M. Chemistry of the genus *Vismia*. Part VII. Vismione A from the leaves of *Vismia guianensis*. *Planta Medica* **1980**, *40*, 347. [[CrossRef](#)]
- Bilia, A. R.; Yusuf, A. W.; Braca, A.; Keita, A.; Morelli, I. New prenylated anthraquinones and xanthenes from *Vismia guineensis*. *Journal of Natural Products* **2000**, *63*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Botta, B.; Monache, G. D.; Monache, F. D.; Bettolo, G. B. N.; Menchini, F. Vismione H and prenylated xanthenes from *vismia guineensis*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1217. [[CrossRef](#)]
- Politi, M.; Sanogo, R.; Ndjoko, K.; Guilet, D.; Wolfender, J. -L.; Hostettmann, K.; Morelli, I. HPLC-UV/PAD and HPLC-MS<sup>n</sup> analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new

- bianthrone. *Phytochemical Analysis* **2004**, *15*, 355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>8</sup> Lins, A. C. S.; Oliveira, W. A.; Santos, C. F.; Barbosa-Filho, J. M.; Santos S. G.; Camara, C. A.; Agra, M. F.; Silva, T. M. S. Inibição de la DNA topoisomerasa II-alfa humana por gama-hidroxiferruginina A, un antranoide prenilado aislado del látex de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *LabCiencia Con Noticias Técnicas de Laboratório* **2007**, *15*, 22. [[Link](#)]
- <sup>9</sup> Seo, Eun-K.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Navarro, H.; Mukherjee R.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 35. [[CrossRef](#)]
- <sup>10</sup> Bittrich, V.; Amaral, M. C. E. Flower Morphology and pollination biology of some *Clusia* species from the Gran Sabana (Venezuela). *Kew Buletin* **1996**, *51*, 681. [[CrossRef](#)]
- <sup>11</sup> Forzza, R. C.; Baumgratz, J. F. A.; Costa, A.; Hopkins, M.; Leitman, P. M.; Lohmann, L. G.; Martinelli, G.; Morim, M. P.; Coelho, M. A. N.; Peixoto, A. I.; Pirani, J. R.; Queiroz, L. P.; Stehmann, J. R.; Walter, B. M. T.; Zappi, D. Em *Catálogo de plantas e fungos do Brasil: As angiospermas do Brasil*; Forzza, R. C. et al., 2010 (eds). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 857. [[Link](#)]
- <sup>12</sup> Seo, Eun-K.; Huang, L.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D. New biphenyl compounds with DNA strand-scission activity from *Clusia paralicola*. *Journal of Natural Products* **1999**, *62*, 1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Monache, D. F.; Monache, D. G.; Botta, B.; Baitz, E. G. A Biphenyl, a Dihydrophenanthrene and a Xanthone from *Clusia paralycola*. *Heterocycles* **2002**, *56*, 589. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Porto A. L. M., Machado S. M. F., De Oliveira C. M. A., Bittrich V., Amaral M. E., Marsaioli, A. J. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 755. [[CrossRef](#)]
- <sup>15</sup> Oliveira, R. F.; Camara, C. A., de Agra, M. F.; Silva, T. M. S. Biflavonoids from the unripe fruits of *Clusia paralicola* and their antioxidant activity *Natural Product Communications* **2012**, *7*, 1597. [[PubMed](#)]
- <sup>16</sup> Sayre, D. M.; Smith, M. A.; Perry, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8*, 721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>17</sup> Ray, G.; Husain, S. A. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian Journal of Experimental Biology* **2002**, *40*, 1213. [[PubMed](#)]
- <sup>18</sup> Kaur, D.; Chugh, V.; Soni, G. Anti oxidant potential in seeds of *Coriandrum sativum*: an *in vitro* study. *Journal of Cell & Tissue Research* **2014**, *14*, 4303. [[Link](#)]
- <sup>19</sup> Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds *Trends in Plant Science* **1997**, *2*, 152. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> Hariharapura, R. C.; Srinivasan, R.; Ashok, G.; Dongre, S. H.; Jagani, H. V.; Vijayan, P. Investigation of the Antioxidant and Hepatoprotective Potential of *Hypericum mysorensense* *Antioxidants* **2014**, *3*, 526. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> Nagem, N. T.; Oliveira, F. F. Xanthenes and others constituents of *Vismia parviflora*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1997**, *8*, 505 [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2351. [[CrossRef](#)]
- <sup>23</sup> Cakir, A.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Duru, M. E.; Harmandar, M.; Kazaz, C. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, *87*, 73. [[CrossRef](#)]
- <sup>24</sup> Zhou, X.; Peng, J.; Fan, G.; Wu, Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase.

- Journal of Chromatography A* **2005**, *1092*, 216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>25</sup> Yuldashev, M.P. Flavonoids of the aerial part of *Trigonella grandiflora*. *Chemistry of Natural Compounds* **2002**, *38*, 291. [[Link](#)]
- <sup>26</sup> Slinkard, K.; Singleton, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* **1977**, *28*, 49. [[Link](#)]
- <sup>27</sup> Silva T. M. S.; Camara C. A.; Lins A. C. S.; Barbosa J. M.; Silva E. M. S.; Freitas B. M.; Santos F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 507-511. [[CrossRef](#)]
- <sup>28</sup> Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26*, 1231. [[CrossRef](#)]
- <sup>29</sup> Emmons, C. L.; Peterson, D. M.; Paul, G. L. Antioxidant Capacity of Oat (*Avena sativa* L.) Extracts. 2. In Vitro Antioxidant Activity and Contents of Phenolic and Tocol Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 4894. [[CrossRef](#)]
- <sup>30</sup> Álvarez, E. R.; Jiménez, O. J. G.; Posada, C. M. A.; Rojano, B. A.; Gil, J. H. G.; García, C. M. P.; Durango, D. L. R. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los Extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *Vitae [online]* **2008**, *15*, 165. [[Link](#)]
- <sup>31</sup> Silva, D. A.; Silva, T. M. S.; Lins, A. C. S.; Costa, D. A.; Cavalcante, J. M. S.; Matias, W. N.; Souza, M. F. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). *Química Nova* **2006**, *29*, 1250. [[CrossRef](#)]
- <sup>32</sup> Huang, X.; Li, M.; Xu, B.; Zhu, X.; Deng, Z.; Lin, W. Proteasome and NF- $\kappa$ B inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. *Molecules* **2007**, *12*, 582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>33</sup> Nakatani, Y.; Ourisson, G.; Beck, Jean-P. Chemistry and Biochemistry of Chinese drugs. VII. Citostatic pheophytins from Silkworm excreta and derived phototoxic pheophorbides. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **1981**, *29*, 2261. [[CrossRef](#)]
- <sup>34</sup> Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2351. [[CrossRef](#)]
- <sup>35</sup> Cakir, A.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Duru, M. E.; Harmandar, M.; Kazaz, C. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, *87*, 73. [[CrossRef](#)]
- <sup>36</sup> Zhou, X.; Peng, J.; Fan, G.; Wu, Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1092*, 216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>37</sup> Nguemeving, J. R.; Azebaze, A. G. B.; Kuete, V.; Carly, N. N. E. A, Beng, V. P.; Meyer, M.; Blond, Alain; Bodo, B.; Nkengfack, A. E. Laurentixanones A and B, antimicrobial xanones from *Vismia laurentii*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>38</sup> Gonzales, J. G.; Monache, D. F.; Monache, D. G.; Marini-Bettolo, G. B. Chemistry of the Genus *Vismia* VII: Vismione A from the Leaves of *Vismia guianensis*. *Planta Medica* **1980**, *40*, p. 347. [[CrossRef](#)]
- <sup>39</sup> Compagnone, R. S.; Suarez, A. C.; Leitao, S. G.; Monache, F. D. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl. *Revista Brasileira de Farmacogogia*. **2008**, *18*, 6. [[CrossRef](#)]
- <sup>40</sup> Gökbulut, A.; Özhan, O.; Karacaoğlu, M.; Şarer, E. Radical Scavenging Activity and Vitexin Content of *Vitex agnus-castus* Leaves and Fruits. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *35*, 85. [[Link](#)]
- <sup>41</sup> An, F.; Yang, G.; Tian, J.; Wang, S. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. *Neural Regeneration Research* **2012**, *7*, 2565. [[Link](#)]

- <sup>42</sup> Silvestre, R. G.; Moraes, M. M.; Lins, A. C. S.; Ralph, M. T.; Lima-Filho, J. V.; Camara, C. A.; Silva, T. M. S. Chemical composition, Anti bacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. *African Journal of Biotechnology* **2012**, *11*, 9888. [[Link](#)]
- <sup>43</sup> Naczk, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1054*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>44</sup> Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; da Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. de M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* **2007**, *30*, 351. [[CrossRef](#)]
- <sup>45</sup> Haslam, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *Journal of Natural Products* **1996**, *59*, 205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>46</sup> Soares, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição* **2002**, *15*, 71. [[CrossRef](#)]
- <sup>47</sup> Chun, S.-S.; Vatem, D. A.; Lin, Y.-T.; Shetty, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 809. [[CrossRef](#)]
- <sup>48</sup> Teixeira, J. S. R.; Moreira, L. De M.; Guedes, M. L. Da S., Cruz, F. G. A new biphenyl from *Clusia melchiorii* and a new tocotrienol from *C. obdeltifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2006**, *17*, 812. [[CrossRef](#)]