

CONSTITUÍNTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DE FLAVONOÍDES ISOLADOS DE *Clusia lanceolata* (Clusiaceae)***Rafaela O. Ferreira^{a,*}, Almir R. de Carvalho Junior^a, Cristiano J. Riger^a, Rosane N. Castro^a, Tania M. S. da Silva^b e Mário G. de Carvalho^a**^a Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23851-970, Seropédica – RJ, Brasil^b Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife – PE, Brasil

Recebido em 14/03/2016; aceito em 19/05/2016; publicado na web em 20/07/2016

CHEMICAL CONSTITUENTS AND *IN VIVO* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAVONOIDS ISOLATED OF *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). The phytochemical investigation of *Clusia lanceolata* leaves yielded fourteen compounds including six flavones, vitexin, isovitexin, isovitexin-2''-O- α -L-rhamnopyranoside, vitexin-2''-O- α -L-rhamnopyranoside, orientin and isoorientin, two phaeophytins [13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin a and 13²-hydroxy-(13²-R)-phaeophytin a], two triterpenes, α - and β -amyrin, and four steroids, β -sitosterol, stigmaterol, sitosterone and stigmaterone. Their structures were assigned based on spectroscopic analysis, including two-dimensional NMR techniques and comparison with literature data. The antioxidant capacity *in vivo* of vitexin and mixing isovitexin-2''-O- α -L-rhamnopyranoside and vitexin-2''-O- α -L-rhamnopyranoside was evaluated using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as the biological system model and hydrogen peroxide as a stressor agent. The results showed that the tested flavonoids were able to protect the yeast cell against the oxidative damage caused by H₂O₂.

Keywords: Clusiaceae; *Clusia lanceolata*; flavonoids; antioxidants; *Saccharomyces cerevisiae*.**INTRODUÇÃO**

Plantas da família Clusiaceae têm sido motivo de estudos fitoquímicos, por apresentarem metabólitos especiais com estruturas diversificadas e com atividades biológicas, principalmente os pertencentes às classes de benzofenonas, biflavonoides e xantonas.^{1,2} Nesta família, o gênero *Clusia*, constituído por aproximadamente 250 espécies,³ tem recebido mais atenção quanto ao estudo químico e farmacológico. Estudos realizados com este grupo de plantas levaram a caracterização de metabólitos especiais pertencentes a várias classes, tais como: benzofenonas, floroglucinóis, biflavonoides, bifenilas e xantonas.^{1,4-7} Entre as atividades relacionadas para substâncias e/ou extratos obtidos de plantas deste gênero, destacam-se as propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes.^{5,6,8}

Clusia lanceolata Cambess, popularmente conhecida como cebola-da-mata, é uma espécie endêmica nas restingas fluminenses, cujos extratos de folhas apresentaram atividade antioxidante *in vitro*.⁹ Não há registro do uso medicinal e poucos são os dados sobre estudo fitoquímico relacionado a esta espécie. Em trabalho anterior descrevemos a identificação de isovitexina-2''-O- α -L-rhamnopyranosídeo, vitexina-2''-O- α -L-rhamnopyranosídeo, isoorientina e orientina em extratos de folhas de *C. lanceolata* por CLAE-EM.⁹ Em continuação a busca por substâncias com propriedades antioxidantes em espécies do gênero *Clusia*,^{5,9} são apresentados neste trabalho os resultados do estudo fitoquímico de extratos de folhas de *C. lanceolata* e avaliação da atividade antioxidante *in vivo* de algumas das substâncias isoladas.

PARTE EXPERIMENTAL**Procedimentos experimentais gerais**

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizaram-se placas de sílica gel PF₂₅₄ (Whatman e Silicle), as quais foram observadas sob luz UV 254 e 366 nm e reveladas com soluções de sulfato cérico e vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento. As separações cromatográficas em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60 (Vetec, 70-230 mesh e 230-400 mesh) e Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich). Os experimentos de RMN de ¹H e ¹³C (uni- e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE II (500/125 MHz), utilizando-se CDCl₃, DMSO-*d*₆ e CD₃OD como solventes e os sinais residuais destes em relação ao TMS como referência. Os espectros no IV foram registrados em espectrômetro VERTEX-70, tendo sido as amostras preparadas sob a forma de filme sobre cela de NaCl ou pastilha de KBr. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos no espectrômetro GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu. As análises fotométricas foram registradas em espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240.

Coleta e identificação do material botânico

O material botânico, folhas de *Clusia lanceolata*, foi coletado na Restinga de Grumari no município do Rio de Janeiro-RJ em abril de 2012. O material botânico foi identificado pelo técnico Me. Thiago Amorim (RBR – UFRRJ). A exsiccata de número 35424 está depositada no herbário RBR, da UFRRJ.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

Folhas secas (230,0 g) foram trituradas e submetidas à extração com CH₂Cl₂ e, posteriormente, em MeOH, através de maceração a temperatura ambiente. As soluções resultantes após filtração foram concentradas sob pressão reduzida, fornecendo os extratos brutos em

*e-mail: rafaellaoliveira@ufrrj.br

#This paper is part of the PubliSBQ Special Issue in honor of the late Prof. Angelo da Cunha Pinto.

CH₂Cl₂ (CLFD, 23,0 g) e MeOH (CLFM, 20,0 g). Parte do extrato CLFM (17,0 g) foi solubilizada em uma solução MeOH/H₂O (7:3) e submetido a partições líquido/líquido, e foram obtidas as frações em *n*-hexano (CLFMH, 1,6 g), CHCl₃ (CLFMC, 1,5 g), AcOEt (CLFMAC, 3,5 g) e BuOH (CLFMBU, 2,0 g), respectivamente. A fração AcOEt forneceu um precipitado identificado como vitexina (1, 110,0 mg).

Parte da fração AcOEt (3,0 g) foi filtrada em Sephadex LH-20 usando MeOH como eluente, foram obtidas 6 frações, após monitoramento por CCD. A quinta fração forneceu a isovitexina (2, 5,0 mg). A segunda e a quarta frações foram filtradas novamente em Sephadex LH-20 usando MeOH como eluente e forneceram, respectivamente, a mistura de isovitexina-2''-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo e vitexina-2''-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo (3 + 4, 40,0 mg) e a mistura de isoorientina, orientina e isovitexina (5 + 6 + 2, 12,0 mg).

O extrato CLFD (20,0 g) foi fracionado através de cromatografia em coluna (CC) em gel de sílica 60, empregando-se como eluentes, em modo isocrático, *n*-hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, fornecendo quatro frações. A segunda fração (7,0 g) foi submetida a CC em sílica gel 60, empregando-se como eluentes *n*-hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt em gradiente crescente de polaridade, fornecendo as misturas de α e β -amirina (7 + 8, 1,2 g) e β -sitosterol com estigmasterol (9 + 10, 30,0 mg). A terceira fração (10,0 g) foi submetida a CC (sílica gel 60) e eluída com CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade, fornecendo 10 frações. A terceira fração desta coluna forneceu a mistura de *rel*-13²-hidroxi-(13²-*S*)-feofitina e *rel*-13²-hidroxi-(13²-*R*)-feofitina (11 + 12, 70,0 mg). A quinta fração foi submetida à nova CC (sílica gel 60) e eluída com CH₂Cl₂ e AcOEt, fornecendo a mistura de sitosterona e estigmasterona (13 + 14, 35,0 mg). Uma solução de 1,0 mg/mL em metanol grau HPLC da mistura de isovitexina-2''-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo (3) e vitexina-2''-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo (4) foi injetada no aparelho CLAE-DAD da Shimadzu com coluna C18 Betasil-Thermo (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) a 29 °C. As substâncias foram eluídas com gradiente de fase móvel binária composta por: (A) ácido acético a 1% em água e (B) metanol. O sistema de eluição teve como condição inicial a eluição de 60% de B por 10 minutos, seguido de um gradiente linear de B até 28% até 12 minutos e, 28% de B até 15 minutos, com fluxo de 1,3 mL/min e volume de injeção de 20 μ L das substâncias. A faixa de comprimento de onda (λ) 200 nm a 500 nm foi utilizada na investigação. Todas as substâncias foram submetidas à análise de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e, adicionalmente, as substâncias 7, 8, 13 e 14 foram identificadas inclusive com análise por CG-EM.

Vitexina (1): Sólido amarelo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ _H (mult.; *J* em Hz; H): 6,79 (*s*; H-3), 13,17 (*s*; OH-5), 6,27 (*s*; H-6), 8,02 (*d*; *J* = 8,5; H-2', 6'), 6,87 (*d*; *J* = 8,5; H-3', 5'), 4,73 (*d*; *J* = 9,8; H-1''). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ _C: 163,9 (C-2), 102,5 (C-3), 182,1 (C-4), 160,4 (C-5), 98,1 (C-6), 162,6 (C-7), 104,6 (C-8), 156,0 (C-9), 104,0 (C-10), 121,6 (C-1'), 129,0 (C-2', 6'), 115,8 (C-3', 5'), 73,4 (C-1'').

Isovitexina (2): Sólido amarelo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ _H (mult.; *J* em Hz; H): 6,66 (*s*; H-3), 13,53 (*s*; OH-5), 6,32 (*s*; H-6), 7,88 (*d*; *J* = 8,5; H-2', 6'), 6,90 (*d*; *J* = 8,5; H-3', 5'), 4,57 (*d*; *J* = 10,0; H-1''). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ _C: 163,9 (C-2), 103,0 (C-3), 182,2 (C-4), 161,4 (C-5), 109,0 (C-6), 163,7 (C-7), 94,0 (C-8), 156,6 (C-9), 103,6 (C-10), 121,4 (C-1'), 128,7 (C-2', 6'), 116,3 (C-3', 5'), 73,3 (C-1'').

Isovitexina-2''-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo (3): Sólido amarelo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) e ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz). Ver Tabela 1.

Vitexina-2''-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo (4): Sólido amarelo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) e ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz). Ver Tabela 1.

Isoorientina (5): Sólido amarelo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ _H (mult.; *J* em Hz; H): 6,67 (*s*; H-3), 13,57 (*s*; OH-5), 6,47 (*s*; H-6),

7,40 (*d*; *J* = 2,5; H-2'), 6,88 (*d*; *J* = 9,0; H-5'), 7,42 (*dd*; *J* = 2,5 e 9,0; H-6'), 4,58 (*d*; *J* = 10,0; H-1''). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ _C: 163,6 (C-2), 102,8 (C-3), 181,9 (C-4), 160,7 (C-5), 108,9 (C-6), 163,6 (C-7), 93,5 (C-8), 156,2 (C-9), 103,3 (C-10), 121,3 (C-1'), 113,3 (C-2'), 145,8 (C-3'), 149,8 (C-4'), 116,1 (C-5'), 119,0 (C-6'), 73,1 (C-1'').

Orientina (6): Sólido amarelo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ _H (mult.; *J* em Hz; H): 6,64 (*s*; H-3), 13,18 (*s*; OH-5), 6,26 (*s*; H-6), 7,48 (*st*; H-2'), 6,92 (*d*; *J* = 8,0; H-5'), 7,53 (*dd*; *J* = 2,0 e 8,0; H-6'), 4,68 (*d*; *J* = 9,0; H-1'').

Mistura de α -amirina (7) e β -amirina (8): Cristais brancos. RMN ¹H e ¹³C e massas em acordo com dados da literatura.¹⁰

Mistura de β -sitosterol (9) e estigmasterol (10): Cristais brancos. RMN ¹H e ¹³C em acordo com dados da literatura.¹¹

Mistura de 13²-hidroxi-(13²-*S*)-feofitina (11) e 13²-hidroxi-(13²-*R*)-feofitina (12): Sólido verde. UV, IR, RMN ¹H e ¹³C em acordo com dados da literatura.¹²

Mistura de sitosterona (13) e estigmasterona (14): Sólido amarelo. RMN ¹H e ¹³C e massas em acordo com dados da literatura.¹³

Determinação da atividade antioxidante *in vivo*

Linhagens de Saccharomyces cerevisiae e condições de crescimento

A cepa BY4741 (*MATa; his3; leu2; met15; ura3*) foi adquirida da empresa Euroscarf (Frankfurt, Alemanha). Seus estoques foram mantidos em meio de cultura sólido YPD 2% (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar). Para todos os experimentos, as células foram cultivadas em meio YPD 2% líquido usando um agitador orbital a 28 °C e 160 rpm com a relação de volume/meio no frasco de 5:1. Componentes do meio de cultura foram adquiridos da Difco. A concentração celular foi determinada medindo a absorbância a 570 nm. O fator de conversão da absorbância em peso seco foi calculado por meio de filtração de 10 mL da suspensão de células através de um filtro Milipore (0,45 μ m) e desidratado a 80 °C até peso constante.

Estresse oxidativo, viabilidade celular e disfunção mitocondrial

As células de levedura foram recolhidas na 1ª fase exponencial de crescimento (1,0 mg de peso seco/mL), e em seguida incubadas com as substâncias na concentração de 25 μ g/mL durante 120 min a 28 °C e 160 rpm. As células foram recolhidas por centrifugação e lavadas duas vezes com tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Em seguida, as células livres do meio foram ressuspensas no mesmo tampão fosfato contendo H₂O₂ na concentração de 1,0 mM, e mantidas por 60 min a 28 °C e 160 rpm. A viabilidade celular foi determinada por plaqueamento em meio YPD sólido, após diluição apropriada, antes e depois das condições de estresse oxidativo, e foi expressa como percentagem de sobrevivência. As placas foram incubadas a 28 °C durante 72 horas e as colônias contadas. Já para detectar a disfunção mitocondrial as células passaram pelo mesmo tratamento anterior, porém o plaqueamento foi realizado em meio sólido YPGly 4% (1% de extrato de levedura, 4% de glicerol, 2% de peptona e 2% de ágar), usado para testar a incapacidade das células de crescer sob meio estritamente aeróbio (glicerol). A viabilidade foi medida como percentagem de células viáveis, cultivadas em YPD 2% que sobreviveram após incubação com vitexina (1) e a mistura de isovitexina-2''-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo (3) e vitexina-2''-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo (4) após o estresse com peróxido de hidrogênio. Já a taxa de danos nas mitocôndrias foi determinada como a diferença entre o número de colônias contadas em placas YPGly 4% e YPD 2% após incubação com as substâncias (1 e 3 + 4) após o estresse com peróxido de hidrogênio.¹⁴

$$\text{n}^\circ \text{ de colônias (\%)} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de colônias YPD}) - (\text{n}^\circ \text{ de colônias YPGly})}{\text{n}^\circ \text{ de colônias em meio YPD}} \times 100$$

Todos os experimentos foram realizados com três repetições. A solução de H₂O₂ (30%) foi obtida da empresa Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico através do teste de Tuckey, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 DEMO.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico de extratos de folhas de *Clusia lanceolata* conduziu ao isolamento da vitexina (**1**), isovitexina (**2**), isovitexina-2''-O- α -L-ramnopiranosídeo (**3**), vitexina-2''-O- α -L-ramnopiranosídeo (**4**), isoorientina (**5**), orientina (**6**), α e β -amirina (**7** e **8**), β -sitosterol (**9**), estigmasterol (**10**), *rel*-13²-hidroxi-(13²-*S*)-feofitina a (**11**), *rel*-13²-hidroxi-(13²-*R*)-feofitina a (**12**), sitosterona (**13**) e estigmasterona (**14**) (Figura 1). A identificação das substâncias baseou-se na análise de espectros e comparação de dados com valores descritos na literatura.^{10-13, 15-19}

As substâncias **1**, **2**, **5** e **6** foram identificadas como flavonas, através da análise dos dados de RMN ¹H e ¹³C (ver parte experimental) e espectros bidimensionais COSY ¹H-¹H, HMQC e HMBC, além da comparação com dados publicados anteriormente. Nos espectros de RMN ¹H as flavonas mostram um singlete entre δ_H 6,0 e 8,0 característico de hidrogênio ligado ao C-3, sendo que no espectro de RMN ¹³C o sinal correspondente a este carbono mostra sinal em torno de δ_C

102. A substância **1** foi identificada como vitexina,¹⁵ e as substâncias **2**, **5** e **6** foram identificadas como isovitexina, isoorientina e orientina, respectivamente.^{15,16,17}

A análise por CLAE-DAD da fração contendo as substâncias **3** e **4** mostrou a presença de dois picos com espectros de UV exibindo duas bandas com máximos de absorção em 270 e 350, característicos de núcleos de flavonas. O espectro de RMN ¹H de **3** apresentou sinais característicos de apigenina 6-*C*-substituída, sendo caracterizado pela presença de dois dupletos em δ_H 7,92 ($J = 8,5$ Hz; H-2'/6') e δ_H 6,93 ($J = 8,5$ Hz; H-3'/5'), sugerindo um sistema do tipo AA'XX', dois singletos em δ_H 6,77 (H-3) e δ_H 6,54 (H-8), e ausência de sinal característico de H-6. Adicionalmente, observou-se sinais em δ_H 4,66 (H-1'') e δ_H 5,08 (H-1''') que permitiram atribuir a presença de duas unidades glicosídicas. Os espectros de RMN ¹³C e HMQC de **3** corroboraram com a sugestão de duas unidades de carboidrato pela presença de sinais para dois carbonos anoméricos em δ_C 71,6 (C-1'') e δ_C 104,4 (C-1'''), além dos sinais para um carbono metilênico em δ_C 61,8 (C-6'') e carbono metílico em δ_C 17,6 (C-6'''). Após comparação com dados da literatura¹⁸ propôs-se a presença de uma unidade de glicose e uma de ramosse. As correlações ³J_{HC} observadas no HMBC entre os picos em δ 4,66/109,0 (H-1''/C-6) e δ 5,08/74,6 (H-1'''/C-2'') confirmaram a conectividade do dissacarídeo na molécula. Por conseguinte, a análise detalhada dos dados de RMN de ¹H e ¹³C, COSY ¹H-¹H, HMQC e HMBC e a comparação com dados descritos na literatura permitiram identificar a substância **3** como isovitexina-2''-O- α -L-ramnopiranosídeo.¹⁸ Esta análise fez perceber que os espectros de RMN ¹H e ¹³C de **3** obtidos em DMSO-*d*₆

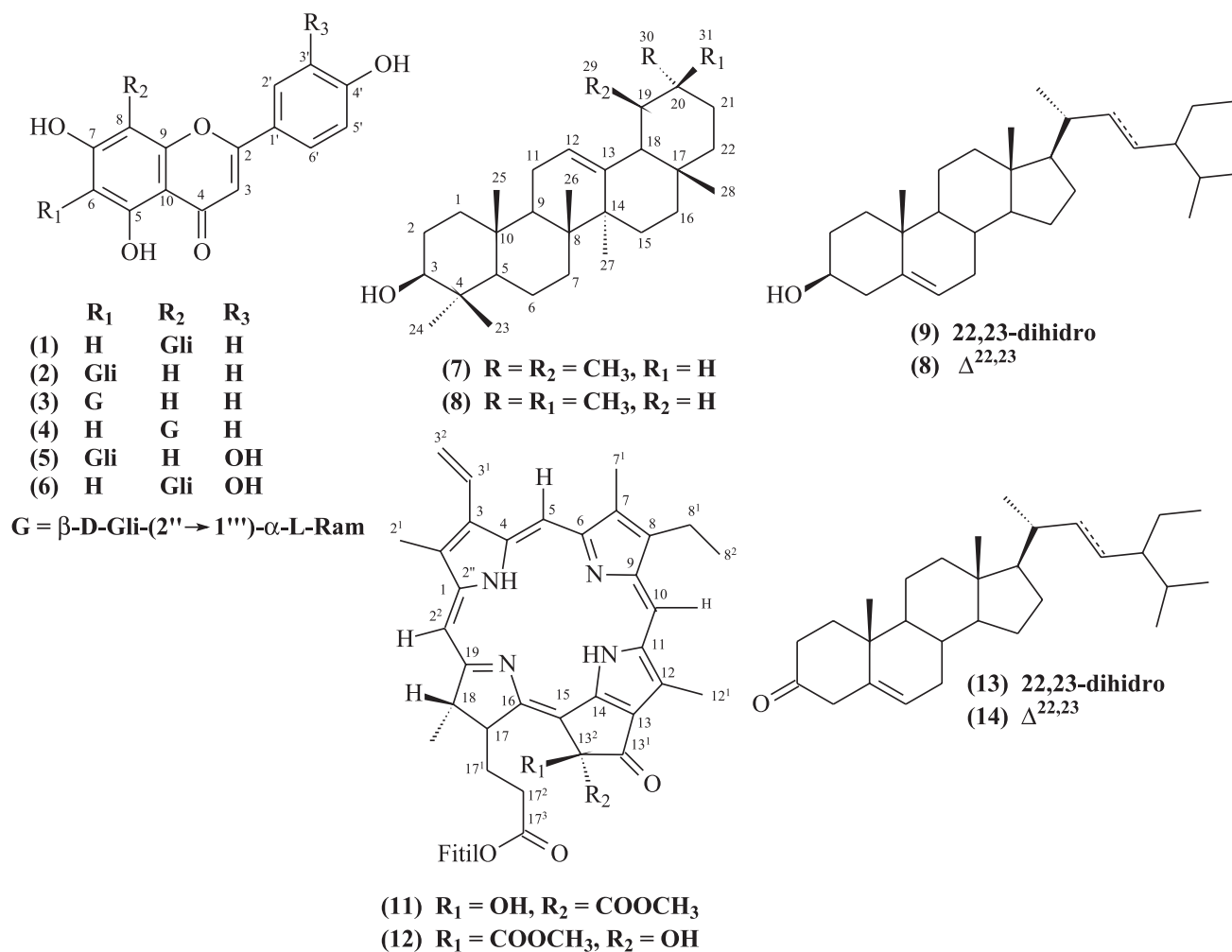


Figura 1. Estrutura das substâncias isoladas de *Clusia lanceolata*

exibiram sinais alargados e/ou duplicados, indicando a presença de dois conformêros rotaméricos, que foram denominados conformêros A e B (Tabela 1; ver material suplementar). No caso de flavonoides, este fenômeno é normalmente observado em 6-C-glicosilflavonoides onde a rotação livre no C(sp³)-C(sp²) da ligação glicose-flavona é impedida por fatores estéricos.¹⁸ Adicionalmente, os valores não usuais de deslocamento químico observados para H-5'' (δ_H 2,11) e H-6'' (δ_H 0,51) da unidade de ramnose do dissacarídeo podem estar relacionados a efeitos anisotrópicos do anel aromático da aglicona, decorrentes da conformação adotada por este tipo de substância.²⁰ Ainda nos espectros de RMN ¹H e ¹³C foram observados sinais de menor intensidade, atribuídos a um componente minoritário da mistura, característicos para apigenina substituída na posição C-8 pela mesma unidade de dissacarídeo de **3**. A substância minoritária (**4**) na mistura foi identificada como vitexina-2''-O-α-L-ramnopiranosídeo com base nos sinais adicionais nos espectros de RMN ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura (Tabela 1).¹⁹

Tabela 1. Dados (mult. e J/Hz, em DMSO-d₆) de RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) para os conformêros A e B* de (**3**) e (**4**)

Posição	3		4	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
2	163,5; 163,6	-	164,1	-
3	102,7; 102,9	6,77 (s)	102,5	6,79 (s)
4	182,2; 181,9	-	182,2	-
5	161,3	13,53 (s, OH)	160,7	13,13 (s, OH)
6	109,0; 108,7	-	98,4	6,28 (s)
7	163,4	-	162,4	-
8	93,1; 94,3	6,54; 6,52 (s)	104,2	-
9	156,3; 156,5	-	155,9	-
10	104,3; 103,8	-	104,5	-
1'	121,1; 121,2	-	121,6	-
2'; 6'	128,5	7,92 (d, J=8,5)	129,1	8,04 (d, J=8,5)
3'; 5'	116,1	6,93 (d, J=8,5)	116,0	6,91 (d, J=8,5)
4'	161,3	-	161,3	-
1''	71,6; 71,4	4,66; 4,62 (d, J=10,0)	71,5	4,76 (d, J=10,0)
2''	74,6; 75,8	4,37; 4,18 (t, J=10,0)	75,1	4,05 (t, J=10,0)
3''	80,1; 79,7	3,08-3,26 (m)	79,9	3,08-3,26 (m)
4''	70,4; 70,5	3,08-3,26 (m)	70,3	3,08-3,26 (m)
5''	81,6; 81,5	3,08-3,26 (m)	81,9	3,08-3,26 (m)
6''	61,8; 61,3	3,70; 3,76 (d, J=10,0)	61,2	3,70 (d, J=10,0)
1'''	100,4; 100,8	5,08; 5,01 (sl)	100,4	4,98 (sl)
2'''	71,0	3,66 (m)	70,5	3,60 (m)
3'''	70,7	3,08-3,18 (m)	70,7	3,08-3,18 (m)
4'''	71,6	2,91 (m)	71,7	2,91 (m)
5'''	68,3	2,29-2,35 (m)	68,3	2,29-2,35 (m)
6'''	17,6; 17,9	0,53; 0,61 (d, J=5,0)	17,8	0,47 (d, J=5,0)

*Os números em itálico são referentes ao conformêro B de **3**.

O estudo fitoquímico de espécies do gênero *Clusia* têm revelado o acúmulo de flavonas C-glicosiladas derivadas da apigenina e luteolina, especialmente nas folhas. As substâncias **1** e **2** foram previamente isoladas em *C. columnaris* e *C. criuva*.^{21,22} A substância **4** foi isolada de *C. sandiense*.²³ Entretanto, este é o primeiro relato do isolamento da substância **3** e das feofitinas **11** e **12** na família Clusiaceae. As feofitinas são consideradas produtos de degradação das clorofilas,

durante o processo de degradação ocorre a substituição do átomo de Mg por dois átomos de H, processo conhecido como feofitinação.²⁴ Apesar da ocorrência relativamente rara na natureza, a diversidade estrutural das feofitinas e as atividades biológicas que apresentam têm despertado muito interesse.

Atividade antioxidante *in vivo* dos flavonoides

Diferentes métodos *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante de substâncias. Os testes químicos *in vitro* apesar de serem mais rápidos e simples não são representativos das condições celulares do homem. Neste contexto, os ensaios microbianos *in vivo* utilizando células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm se mostrado adequados, por fornecerem resultados rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados ao observado no homem.²⁵ Neste trabalho, a análise dos resultados foi realizada comparando-se os valores percentuais da viabilidade celular (Figura 2) e disfunção mitocondrial (Tabela 2) da levedura *S. cerevisiae* tratada somente com H₂O₂ (1,0 mM) e com este agente estressor após pré-incubação das células com a vitexina (**1**) e com a mistura contendo isovitexina-2''-O-α-L-ramnopiranosídeo (**3**) e vitexina-2''-O-α-L-ramnopiranosídeo (**4**), nas concentrações de 25,0 μg mL⁻¹ cada. No ensaio de viabilidade celular foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a levedura tratada somente com H₂O₂ e tratada com H₂O₂ após pré-tratamento com o flavonoide **1** e com a mistura de **3** e **4**. O aumento na viabilidade das células de *S. cerevisiae* na presença das substâncias sugeriu o efeito protetor dos flavonoides aos danos oxidativos causados pelo agente estressor H₂O₂. Além disso, ambas as substâncias também diminuíram ou evitaram os danos causados à mitocôndria pela solução de peróxido de hidrogênio (1,0 mM) (Tabela 2). Como conclusão dos ensaios, observamos que tanto a substância **1** quanto a mistura de **3** e **4** protegeram as células da ação do peróxido de hidrogênio, mantendo os resultados ao nível experimental do controle. Este é o primeiro relato sobre a avaliação da capacidade antioxidante *in vivo* das substâncias **1**, **3** e **4** utilizando-se como modelo de sistema biológico a levedura *S. cerevisiae*.

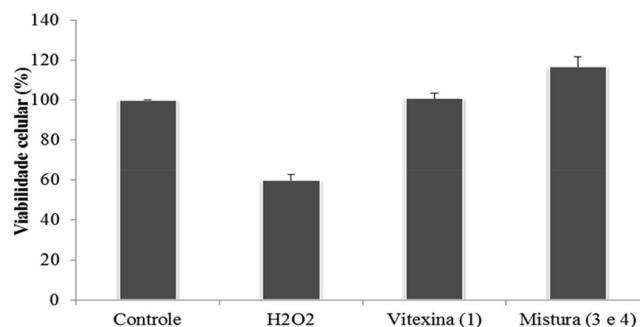


Figura 2. Viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* nos tratamentos com os diferentes flavonoides (25,0 μg mL⁻¹) e H₂O₂ (1,0 mM)

Tabela 2. Dados da disfunção mitocondrial calculado pela diferença entre o número de colônias nos meios YPD 2% e YPGly 4%

Condições	Resultados
Controle	0
H ₂ O ₂ (1,0 mM)	16,9 ± 3,84
Vitexina (1)	0
Mistura (3 e 4)	0

O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, entretanto pode se difundir facilmente pelas membranas celulares e

reagir com metais presentes em seu interior e gerar radicais hidroxila. O radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial.²⁶ Alguns flavonoides são capazes de complexar-se com metais, tais como Fe³⁺ e Cu²⁺, evitando/diminuindo a geração de radicais hidroxila pela reação de Haber-Weiss/Fenton.²⁵ Considerando que a geração de radicais hidroxila pelo H₂O₂ é mediada por metais de transição, é possível que a propriedade quelante dos flavonoides 1 e da mistura 3 e 4 tenha contribuído para sua atividade antioxidante.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo que relata o isolamento dos metabólitos especiais da espécie *C. lanceolata* e resultou na identificação de 14 substâncias, sendo três inéditas na família Clusiaceae, o flavonoide isovitexina-2''-O- α -L-rhamnopiranosídeo (3) e a mistura de feofitinas *rel*-13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina a (11), *rel*-13²-hidroxi-(13²-R)-feofitina a (12).

Adicionalmente, relatamos a promissora atividade antioxidante *in vivo* da vitexina (1) e da mistura de isovitexina-2''-O- α -L-rhamnopiranosídeo (3) e vitexina-2''-O- α -L-rhamnopiranosídeo (4) empregando-se como modelo de sistema biológico a levedura *S. cerevisiae*. Estes resultados sugerem que *C. lanceolata* é uma nova fonte natural de substâncias antioxidantes, que podem vir a atuar futuramente no combate a doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C de algumas das substâncias isoladas, citados no texto, estão disponíveis na forma de material suplementar em <http://quimicanova.sbq.org.br>, em formato PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPq e a FAPERJ pelas bolsas concedidas e pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Anholeti, M. C.; Paiva, S. R.; Figueiredo, M. R.; Kaplan, M. A. C.; *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2015**, *87*, 289.
2. Ferreira, R. O.; Carvalho, M. G.; Silva, T. M. S.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 2271.
3. Oliveira, C. M. A.; Porto, A. M.; Bittrich, I. V.; Marsaioli, A. J.; *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1073.
4. Ferreira, R. O.; Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G.; *Molecules* **2015**, *20*, 14326.
5. Ferreira, R. O.; Camara, C. A.; Agra, M. F.; Silva, T. M. S.; *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 1597.
6. Ribeiro, P. R.; Ferraz, C. G.; Guedes, M. L. S.; Martins, D.; Cruz, F. G.; *Fitoterapia* **2011**, *82*, 1237.
7. Silva, E. M.; Araújo, R. M.; Freire-Lima, L. G.; Silveira, E. R.; Lopes, N. P.; Paula, J. E.; Braz-Filho, R.; Espindola, L. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 1314.
8. Farias, J. A.; Ferro, J. N.; Silva, J. P.; Agra, I. K.; Oliveira, F. M.; Candea, A. L.; Conte, F. P.; Ferraris, F. K.; Henriques, M.; Conserva, L. M.; Barreto, E.; *Inflammation.* **2012**, *35*, 764.
9. Ferreira, R. O.; Carvalho Junior, A. R.; Silva, T. M. G.; Nora, R. N.; Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G.; *Braz. J. Pharmacog.* **2014**, *24*, 617.
10. Dias, M. M.; Hamerski, L.; Pinto, A.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 704.
11. Lima, A. C. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2000.
12. Matsuo, A.; Ono, K.; Nozari, H.; *Phytochemistry* **1996**, *47*, 427.
13. Della Greca, M.; Monaco, P.; Previtera, L.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1430.
14. Soares, D. G.; Andrezza, A. C.; Salvador, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1077.
15. Zhou, X.; Peng, J.; Fan, G.; Wu, Y.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1092*, 216.
16. Peng, X.; Zheng, Z.; Cheng, K.-W.; Shan, F.; Ren, G.-X.; Chen, F.; Wang, M.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 475.
17. Peng, J.; Fan, G.; Hong, Z.; Chai, Y.; Wu, Y.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1074*, 111.
18. Camargo, L. M. M.; Férézou, J.-P.; Tinoco, L. W.; Kaiser, C. R.; Costa, S. S.; *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 427.
19. Doyama, J. T.; Rodrigues, H. G.; Novelli, E. L. B.; Cereda, E.; Vilegas, W.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 371.
20. Larionova, M.; Spengler, I.; Nogueiras, C.; Quijanos, L.; Ramírez-Gualito, K.; Cortés-Guzmán, F.; Cuevas, G.; Calderón, J. S.; *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1623.
21. Compagnone, R. S.; Suarez, A. C.; Leitão, S. G.; Delle Monache, F.; *Braz. J. Pharmacog.* **2008**, *18*, 6.
22. Chedier, L. M.; Paiva, S. R.; Costa, J. L. M.; Figueiredo, M. R.; Kaplan, M. A. C.; *J. High Res. Chrom.* **1999**, *22*, 527.
23. Delle Monache, F.; *Rev. Latinoam. Quim.* **1991**, *22*, 27.
24. Lanfer-Marquez, U. M.; *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2003**, *39*, 227.
25. Soares, D. G.; Andrezza, A. C.; Salvador, M.; *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2005**, *41*, 95.
26. Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 113.