

CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FLORES DE *Pterogyne nitens* (CAESALPINIOIDEAE)#

Luis Octávio Regasini, Daniara Cristina Fernandes, Ian Castro-Gamboa, Dulce Helena Siqueira Silva, Maysa Furlan e Vanderlan da Silva Bolzani*

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Rua Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara - SP, Brasil

Eliezer Jesus Barreiro

Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CP 68006, 21944-190 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Elaine Monteiro Cardoso-Lopes, Maria Cláudia Marx Young e Luce Brandão Torres

Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, Av. Miguel Stéfano, 3687, 04301-012 São Paulo - SP, Brasil

José Carlos Rebuglio Velloso e Olga Maria Mascarenhas de Oliveira

Departamento de Bioquímica e Tecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Rua Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 15/1/08, aceito em 17/3/08, publicado na web em 23/4/08

CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE FLOWERS OF *Pterogyne nitens* (CAESALPINIOIDEAE). The phytochemical investigation of the flowers of *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae) resulted in the isolation and identification of nine phenolic derivatives, quercetin 3-*O*-sophoroside, taxifolin, astilbin, ouratecatechin, caffeic, ferulic, sinapic, chlorogenic and gallic acid, besides two guanidine alkaloids, pterogynine, pterogynidine. This is the first time these compounds have been reported in *P. nitens* flowers. As this is a monospecific genus, these secondary metabolites may have taxonomical significance. Their structures were assigned on the basis of spectroscopic analyses, including two-dimensional NMR techniques.

Keywords: *Pterogyne nitens*; flavonoids; guanidine alkaloids.

INTRODUÇÃO

Pterogyne nitens Tulasne (Fabaceae – Caesalpinioideae), uma espécie pertencente a um gênero monoespecífico, é popularmente conhecida como “amendoim-do-campo”, “amendoim-bravo”, “bál-samo”, “yvi-raró”, “cocal”, “tipa” etc. Na América Latina essa espécie arbórea ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil. No território brasileiro ocorre com frequência na região de Mata Atlântica e Cerrado compreendida entre o Ceará até o Paraná.¹

“Amendoim-bravo”, como é popularmente conhecida no estado de São Paulo, é amplamente empregada na construção civil devido às características da sua madeira moderadamente densa e resistente.² *P. nitens* também conhecida pela beleza e odor de suas flores, bem como pela intensidade de suas folhagens e frutificação possui grande valor ornamental sendo, portanto, recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias e na reposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas. Esta espécie habita os remanescentes de vegetação paulista e encontra-se sob risco de extinção, fazendo parte da lista de espécies recomendadas para a conservação genética no estado de São Paulo.³

A literatura apresenta poucos dados das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. Estudos etnofarmacológicos em comunidades guaranis do nordeste da Argentina revelam o uso das cascas do caule no tratamento de infestações parasitárias, principalmente no combate ao “tacho”, nome popular de *Ascaris lumbricoides*.⁴ Em trabalhos fitoquímicos anteriores, foram isolados cinco alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, os quais mostraram atividade citotóxica sobre linhagens mutantes

de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo atividade antitumoral potencial desses alcalóides.⁵

Dada a emergência de preservação da espécie ameaçada de extinção, o estudo sobre a composição micromolecular das flores de *P. nitens* foi bastante significativo para o registro do perfil metabólico da espécie. Desse estudo foram isolados e identificados onze constituintes: quatro flavonóides, quatro derivados do ácido cinâmico, dois alcalóides guanidínicos e o ácido gálico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação de todas as substâncias foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, gCOSY, gHMBC, gHMBC, NOESY 1D e comparação desses dados com aqueles disponíveis na literatura.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiu caracterizar as substâncias **1-4** como derivados do ácido cinâmico, com uma feição comum caracterizada por um par de dubletos entre δ_{H} 7,58-7,49 ($J = 16,0$ Hz; 1H) e δ_{H} 6,40-6,13 ($J = 16,0$ Hz; 1H), típicos do sistema *trans*-alceno de derivados aromáticos C₆-C₃. Os demais valores atribuídos aos sinais correspondentes ao anel aromático demonstram sutis diferenças na série **1-4**. Os sinais em δ_{H} 7,12 (d, $J = 2,5$ Hz), δ_{H} 7,04 (dd, $J = 2,5$ e 8,5 Hz) e δ_{H} 6,85 (d, $J = 8,5$ Hz) observados no espectro de RMN de ¹H de **1** foram atribuídos aos hidrogênios H-2, H-6 e H-5, respectivamente. Esses dados sugerem a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, permitindo concluir que o derivado de ácido cinâmico em análise é o ácido cafeico.⁶

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C da substância **2** apresentaram o mesmo perfil de sinais daqueles observados para **1**, exceto pela presença do singlete em δ_{H} 3,90 (3H), atribuído a uma metoxila. A

#Em homenagem à Profa. Helena Maria C. Ferraz

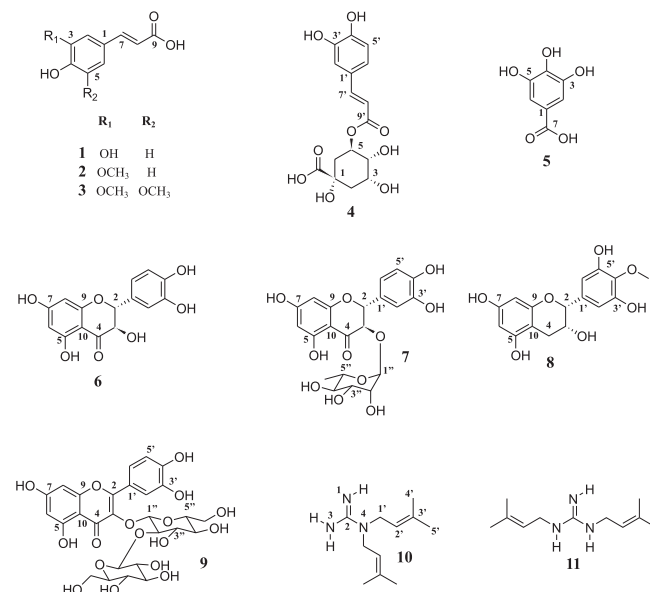
*e-mail: bolzaniv@iq.unesp.br

ligação do grupo metoxílico ao anel aromático foi estabelecida pela correlação observada entre os sinais em δ_H 3,90 (OCH₃) e 147,9 (C-3), no mapa de contornos gHMBC. Assim, a substância **2** pôde ser caracterizada como sendo ácido ferúlico.⁷ Os espectros de RMN de ¹H da substância **3** apresentaram dois singletos δ_H 6,98 (2H) e δ_H 3,80 (6H), os quais foram atribuídos aos hidrogênios metínicos H-2 e H-6 e aos dois grupos metoxílicos, respectivamente. Os demais dados espectrais confirmaram a posição dos dois grupos metoxílicos nos carbonos C-3 e C-5 e permitiram identificar a estrutura molecular de **3** como sendo ácido sinápico.⁸ Os dados dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C de **4** foram quase similares àqueles observados para o ácido cafeico **1**. Na estrutura de **4**, além dos sinais de uma unidade de ácido cafeico analisados a partir dos espectros de RMN de ¹³C, foram diagnosticados um conjunto de sinais compatíveis com uma unidade de ácido quínico. O espectro de RMN de ¹H apresentou sinais para três hidrogênios metínicos em δ_H 3,56 (dd, $J = 3,5$ e 10,0 Hz, H-4), 3,92 (d, $J = 3,5$ Hz, H-4) e 5,06 (td, $J = 3,5$ e 10,0 Hz, H-5) e para hidrogênios metilênicos na região compreendida entre δ_H 1,08 e 1,99 (H-2 e H-6), os quais confirmaram a presença de uma unidade derivada do ácido quínico. A ligação do grupo cafeoila à unidade de ácido quínico foi estabelecida pela correlação observada entre os sinais em δ_H 5,06 (H-5) e δ_C 165,7 (C-9'), no mapa de contornos gHMBC. Os valores observados para os acoplamentos de H-4 com H-3 e H-5 indicaram uma relação axial-equatorial entre H-4 e H-3 ($J = 3,5$ Hz) e axial-axial entre H-4 e H-5 ($J = 10,0$ Hz) confirmando as posições diequatoriais para os grupos cafeoila e a hidroxila (4-OH). Os experimentos de NOESY 1D mostraram um aumento na intensidade do sinal em δ_H 3,92 (H-3) pela irradiação do sinal atribuído ao hidrogênio H-4 (3,56) e ausência de NOE quando da irradiação do sinal em δ_H 5,06 (H-5), consolidando a configuração relativa proposta. Tais informações foram confirmadas com dados da literatura, indicando que a estrutura de **4** corresponde ao ácido 5-*O*-cafeoilquínico.⁹ Os dados obtidos dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiram caracterizar a substância **5** como sendo ácido gálico.¹⁰

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiram inferir que a substância **6** pertence à classe dos flavonóides. Entre outras feições destacam-se o conjunto de sinais do espectro de ¹³C em δ_C 73,6, 85,0 e 198,3 atribuídos aos carbonos C-3, C-2 e C-4, respectivamente, indicando que **6** possui a estrutura de um diidroflavonol. Um par de dubletos em δ_H 5,91 ($J = 2,0$ Hz, 1H) e δ_H 5,88 ($J = 2,0$ Hz, 1H) foram atribuídos ao anel A 5,7,9,10-tetrassubstituído. Os sinais em δ_H 6,96 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), δ_H 6,80 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H) e δ_H 6,84 (dd, $J = 2,0$ e 8,0 Hz, 1H) corroboram o padrão 1,3,4-trissubstituído para o anel B. Ainda o espectro de RMN de ¹H de **6** apresentou um par de dubletos em δ_H 4,90 ($J = 12,0$ Hz, 1H) e 4,49 ($J = 12,0$ Hz, 1H), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente. A constante de acoplamento apresentada por estes dois dubletos ($J = 12$ Hz) sugere um acoplamento do tipo axial-axial, conduzindo à proposição de que o anel B e o grupo hidroxila 3-OH mantém uma relação *anti*. Estes dados analisados em consonância com os de RMN de ¹³C permitiram caracterizar **6** como sendo taxifolina.¹¹ Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C de **7** indicaram uma estreita similaridade entre **6** e **7**. A única diferença notada entre os espectros das duas substâncias refere-se aos sinais característicos de uma unidade glicosídica em **7**. O sinal em δ_C 17,8, atribuído ao carbono metílico C-6'' e o conjunto de sinais em δ_C 100,1 (C-1''), 71,7 (C-4''), 70,4 (C-3''), 70,1 (C-2'') e 69,0 (C-5'') permitiram caracterizar a unidade monossídica como sendo uma ramnose. O espectro de RMN de ¹H demonstrou a presença de um dubleto em δ_H 4,04 que foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'', cuja constante de acoplamento de 1,5 Hz inferiu a configura-

ção α para a unidade de ramnose. A correlação deste dubleto e o sinal em δ_C 75,7 atribuído ao carbono C-3, observada no mapa de contornos gHMBC, sugeriu que a unidade de ramnose se encontra ligada ao carbono C-3. Os dados espectroscópicos analisados para **7** indicaram tratar-se da estrutura da astilbina.¹² A análise polarimétrica dos diidroflavonóides **6** e **7** indicou valores de rotação óptica específica de +17° ($c = 1,02$ MeOH, 27 °C) e -22° ($c = 0,82$, MeOH, 27 °C), respectivamente. Esses dados sugerem as configurações absolutas *R,R* dos carbonos C-2 e C-3 presentes nas estruturas moleculares de **6** e **7**, os quais se mostraram compatíveis com os valores descritos na literatura.¹³

O espectro de RMN de ¹H da substância **8** apresentou três sinais característicos de hidrogênios aromáticos: δ_H 6,53 (s, 2H), 5,93 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H) e 5,95 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H) indicando tratar-se também de um flavonóide. Os sinais correspondentes a dois hidrogênios metilênicos em δ_H 2,72 (dd, $J = 3,0$ e 17,0 Hz) e δ_H 2,86 (dd, $J = 5,0$ e 17,0 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-4a e H-4b, respectivamente e permitiram atribuir a estrutura de uma catequina para **8**. Os sinais relativos aos carbonos entre δ_C 100,1 e 157,9 e 29,1 analisados em conjunção com as correlações observadas no mapa de contornos gCOSY para os hidrogênios H-4a, H-4b e H-3 ajudaram a confirmar a proposição de uma catequina para **8**. Os experimentos de NOESY 1D foram empregados visando confirmar a estereoquímica relativa de C-2 e C-3. A irradiação em δ_H 2,73 (H-4a) causou aumento na intensidade do sinal em δ_H 4,19 (m, H-3). A irradiação do sinal em δ_H 2,86 (H-4b) também levou ao aumento de intensidade em δ_H 4,19 (H-3), indicando a proximidade destes hidrogênios. No entanto, pela intensidade dos NOE observados os sinais em δ_H 2,86 (H-4b) e δ_H 4,19 (H-3) estão posicionados na mesma face do plano do anel ao qual estão ligados. A irradiação do sinal em δ_H 2,73 (H-4a) também causou um incremento em δ_H 4,78 (sl, H-2), indicando uma correlação 1,3-diaxial entre H-4a e H-2. Ao irradiar-se o sinal em δ_H 4,19 (H-3), houve um ganho de intensidade em δ_H 4,78 (H-2) e δ_H 2,73 (H-4a) coerente com uma relação *syn* entre H-2, H-3 e H-4a. Estes dados analisados em consonância com as constantes de acoplamento destes sinais permitiram atribuir a configuração relativa proposta. O mapa de contornos gHMBC demonstrou uma intensa correlação entre o sinal em δ_H 3,80 (s, 3H), atribuído a um hidrogênio metoxílico e o sinal em δ_C 136,0, o qual está relacionado ao carbono C-4', sugerindo que o grupo metoxila se encontra ligado ao carbono C-4'. A medida da rotação óptica específica de **8** [α]_D²⁷ = -58° ($c = 1,22$, acetona) indicou as



configurações *R* e *R* dos carbonos C-2 e C-3, similares aos valores encontrados para a epigallocatequina.¹⁴ Os dados apresentados são compatíveis com estrutura da ourateacatequina,¹⁵ confirmando sua identidade com **8**.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiu caracterizar a substância **9** também como um flavonóide. O espectro de RMN de ¹³C apresentou os sinais em δ_c 177,3, 155,4 e 132,9 atribuídos aos carbonos C-4, C-2 e C-3, respectivamente, evidenciando a subclasse dos flavonóis. Os sinais em δ_c 144,7 e 148,7 atribuídos aos carbonos C-3' e C-4', respectivamente, evidenciaram um flavonol cujo anel B encontra-se 1',3',4'-trissubstituído. Adicionalmente, os sinais de RMN de ¹³C compreendidos entre δ_c 60,6 e δ_c 82,6 analisados com os sinais de RMN de ¹H em δ_H 5,66 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H) e δ_H 4,58 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H) correspondentes a dois hidrogênios anoméricos indicaram duas subunidades de glicose e, com base no valor da constante de acoplamento (*J* = 7,5 Hz) para estes dois dubletos, verificou-se tratar de duas subunidades de β -glicose. Os experimentos de gHMBC demonstraram duas correlações entre os dubletos em δ_H 5,66 e δ_H 4,58 atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1'' e H-1''', respectivamente, e o sinal em δ_H 82,6 sugerindo que a ligação interglicosídica seja do tipo 2''→1'''. O mapa de contornos gHMBC de **9** também apresentou uma correlação entre o sinal em δ_c 132,9 atribuído ao carbono C-3 e o dubleto em δ_c 5,66, levando à conclusão que a posição de *O*-glicosilação se encontra em C-3. Pelos dados obtidos pode-se caracterizar **9** como sendo quercetina 3-*O*-soforosídeo.¹⁶

Análise dos dados de RMN de ¹³C das substâncias **10** e **11** indicou tratar-se de alcalóides de estruturas bastante similares. Entre outras características destacam-se a presença de sinais em torno de δ_c 155,7 e 156,9 (C-2) típico de carbono guanidínico e um conjunto de cinco sinais relacionados às subunidades isoprenílicas em torno de δ_c 17,8/17,7; δ_c 25,2/25,1; δ_c 39,0/38,7; δ_c 119,2/119,0 e δ_c 135,8/136,0. A análise desses dados indicou que **10** e **11** contêm um núcleo guanidínico substituído por unidades hemiterpenoídicas. Dado evidenciado por dois singletos em δ_H 1,62 (H-4') e δ_H 1,68 (H-5') atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos; um dubleto em δ_H 3,72 (d, *J* = 6,5, H-1') e um tripleto em δ_H 5,16 (t, *J* = 6,5, H-2') relacionados aos hidrogênios metilênicos e metínico, respectivamente, para **10**. Da mesma forma, dados similares caracterizaram a estrutura de **11**, indicando que as estruturas em questão se tratam de alcalóides guanidino-prenilados. A única diferença entre os alcalóides **10** e **11** deve-se ao padrão de substituição do núcleo guanidínico. No alcalóide **10** o sinal δ_H 3,72 (*J* = 6,5 Hz), atribuído aos hidrogênios H-1', apresenta-se como um dubleto devido ao acoplamento com H-2'. Adicionalmente, a ausência do hidrogênio azometínico na estrutura alcaloídica indicou o padrão *N,N*-dissubstituído para **10**, que foi caracterizado como sendo a pteroginina.¹⁷ No alcalóide **11**, a presença de um tripleto em δ_H 7,72 (t, *J* = 6,5, 1H) devido ao acoplamento do hidrogênio azometínico do núcleo guanidínico com H-1' da unidade hemiterpênica indicou que a substituição terpênica ocorre nos nitrogênios vicinais da estrutura guanidínica. Análise de todos os dados indica que **11** possui padrão *N,N'* de substituição isoprenílica. Fundamentado nestas análises, a substância **11** foi caracterizada como a pteroginidina,⁵ um isômero constitucional do alcalóide **10**.

As substâncias **1-11** foram avaliadas quanto à sua capacidade de inibição sobre mieloperoxidase (MPO), uma heme-enzima abundante em polimorfonucleares (PMNs), e considerada uma macromolécula-chave na resposta imunológica inespecífica a vários agentes invasores, principalmente bactérias. A MPO é responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânions cloreto em água e ácido hipocloroso (HOCl) que, por sua vez, atua como um potente agente antimicrobiano. Além disso, o excesso da

atividade de MPO e subsequente produção exagerada de HOCl culmina em um intenso estresse oxidativo para os PMNs. A literatura correlaciona essa injúria oxidativa promovida por MPO e HOCl com inúmeros processos inflamatórios, tais como artrite reumatóide, fibrose cística, doença inflamatória intestinal (IBD), injúria pulmonar neonatal, etc. Dessa forma, a busca por inibidores de MPO a partir de fontes naturais torna-se de grande valia na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios.¹⁸

Dentre as substâncias ensaiadas com MPO, apenas as substâncias **5** e **9** mostraram-se ativas, exibindo CI₅₀ de 17,5 e 3,72 nM, quando comparadas à quercetina, utilizada como controle positivo, que apresentou uma CI₅₀ de 1,22 nM. O valor de CI₅₀ da quercetina apresenta-se inferior àquele observado para o seu glicosídeo **9**, sugerindo a importância de uma hidroxila livre na posição 3 para atividade de inibição de MPO. As demais substâncias mostraram-se inativas (CI₅₀ > 100 nM), incluindo a substância **6**, um análogo hidrogenado da quercetina. Essa observação sugere que uma insaturação situada entre os carbonos C-2 e C-3 no núcleo flavonóidico para uma ação inibitória sobre MPO.

Os extratos e frações obtidas das flores de *P. nitens* tiveram sua capacidade antioxidante avaliada no ensaio em cromatoplasmas reveladas com β -caroteno, mostrando-se ativos, uma vez que mantiveram a coloração laranja nos pontos de aplicação. As substâncias fenólicas isoladas neste estudo são provavelmente as responsáveis pela atividade antioxidante dessas frações detectadas pelo teste preliminar com β -caroteno e que foi anteriormente relatado por Cai e colaboradores, que demonstraram a capacidade sequestradora de radicais livres das substâncias **1-9** nos ensaios com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e ABTS [2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)].¹⁹ A atividade sequestradora de radicais exibida pelos derivados fenólicos vem sendo amplamente discutida na literatura e está correlacionada a fatores mesoméricos que conferem a esse grupo funcional uma alta reatividade como doadores de elétrons.²⁰ Os alcalóides guanidínicos **10** e **11** tiveram seu poder antioxidante avaliado sobre os radicais DPPH e ABTS. Os resultados indicaram que os alcalóides são inativos no teste com DPPH (CI₅₀ > 200 μ M) e mostraram atividade baixa sobre o radical ABTS, apresentando CI₅₀ de 87,7 e 190,0 μ M, tendo a quercetina como controle positivo (CI₅₀ de 7,64 e 3,12 μ M para os radicais DPPH e ABTS, respectivamente).

O estudo químico das flores de *P. nitens* culminou no isolamento de onze substâncias de três classes químicas distintas: flavonóides (flavonóis, diidroflavonóis e catequinas), derivados do ácido cinâmico e alcalóides. Dentre esses, somente as substâncias **10** e **11** já haviam sido relatadas como pertencentes ao metaboloma de *P. nitens*. Este trabalho permitiu concluir ainda que os metabólitos secundários acumulados nas flores desta espécie são predominantemente de natureza fenólica. A descrição dos constituintes acumulados em *P. nitens* é também de grande valia tendo em conta que sua madeira vem sendo empregada indiscriminadamente pela construção civil e, por tratar-se de um gênero monoespecífico, esta leguminosa está seriamente ameaçada de extinção.²

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C e experimentos bidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-500[®] operando a 500 MHz para o núcleo de ¹H e 125 MHz para o núcleo de ¹³C, TMS foi utilizado como referência interna. Os dados de rotação óptica foram obtidos em polarímetro Polamat A Carl Zeiss Jena[®]. As análises por CLAE no modo analítico foram realizadas em equi-

pamento ProStar/Varian[®] acoplado ao detector ProStar 330[®] de arranjos de diodos, utilizando coluna analítica Phenomenex[®] Fenil-Hexila (250 x 4,60 mm; 5 µm). No modo preparativo, as análises por CLAE foram realizadas em equipamento ProStar/Varian[®] acoplado ao detector ProStar-UV[®], utilizando-se coluna Phenomenex Fenil-Hexila (250 x 21,2 mm; 10 µm). Nas separações em coluna aberta foram utilizadas gel de sílica derivatizado C-18 (40-63 µm, Merck[®]), gel de sílica para cromatografia *flash* (35-70 µm) e para cromatografia de exclusão molecular (Sephadex,[®] LH-20). As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas com cromatoplas de gel de sílica G60 (0,25 mm). Após o desenvolvimento das cromatoplas estas foram visualizadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm) e reveladas com solução de anisaldeído em ácido sulfúrico seguido de aquecimento.

Material vegetal

As flores de *P. nitens* foram coletadas no Instituto de Botânica, São Paulo – SP, no mês de abril de 2003, pela Dra. M. C. M. Young. O material botânico foi identificado como sendo *Pterogyne nitens* (Fabaceae – Caesalpinioideae) pela Dra. I. Cordeiro, do mesmo Instituto. Uma exsicata (SP204319) encontra-se depositada no herbário “Maria Eneida P. Kaufmann” do Instituto de Botânica, São Paulo - SP.

Extração e isolamento

As flores (1,8 kg) foram secas à temperatura ambiente por 15 dias e, posteriormente, submetidas à moagem empregando moinho de facas. O pó obtido (1,5 kg) foi levado à maceração empregando hexano e posteriormente maceração em etanol. Após evaporação, o extrato hexânico (3,8 g) foi analisado por RMN de ¹H e CCDC mostrando tratar-se de uma mistura complexa de terpenos. O extrato etanólico (15,0 g) foi dissolvido em uma mistura de metanol:água (7:3) e posteriormente submetido à partição líquido-líquido empregando acetato de etila e *n*-butanol.

A fração AcOEt (3,8 g) foi submetida à cromatografia em coluna de permeação em gel (Sephadex[®], LH-20, 180 x 5 cm), eluída em MeOH, obtendo-se 25 subfrações de 75 mL. A subfração AcOEt-17 (143,0 mg) foi submetida à cromatografia *flash* em coluna de gel de sílica (28 x 3 cm), eluída em modo gradiente (CHCl₃:MeOH, 100 a 50%), obtendo-se os ácidos cafeico (**1**; 12, 0 mg), ferúlico (**2**; 14,0 mg) e sinápico (**3**, 7,0 mg). A subfração AcOEt-20 (79 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de fase reversa (8 x 3 cm) empregando misturas de MeOH:H₂O (30 a 80%), resultando no isolamento de dois flavonóides, taxifolina (**6**, 14 mg) e ourateacatequina (**8**, 15 mg).

A fração *n*-butanólica (3,0 g) foi submetida à cromatografia por exclusão molecular (LH-20, Sephadex, 180 x 5 cm) eluída em MeOH, resultando em 22 subfrações de 70 mL. A subfração BuOH-7 (280 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (28 x 4 cm), eluída em misturas de CHCl₃:MeOH (10 a 30%), obtendo-se dois alcalóides guanidínicos, pteroginina (**10**, 98 mg) e pteroginidina (**11**, 90 mg). A subfração BuOH-12 (120 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de fase reversa (10 x 3 cm), eluída em MeOH:H₂O (1:1), obtendo-se astilbina (**7**, 27 mg). A subfração BuOH-18 (97 mg) foi submetida à CLAE-UV preparativo [MeOH:H₂O (56:44), $\lambda = 254$ nm, fluxo = 11,0 mL/min], culminando no isolamento do flavonol glicosilado (**9**, 18 mg).

A fração hidroalcoólica (1,7 g) foi inicialmente submetida à cromatografia de permeação em gel (Sephadex[®], LH-20, 120 x 8 cm), eluída em MeOH, obtendo-se 13 subfrações de 35 mL. A subfração HA-5 foi identificada como ácido gálico (**5**, 11 mg) e a subfração HA-12, como sendo o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**4**, 22 mg).

Atividades antioxidante e inibitória sobre mieloperoxidase (MPO)

Para os ensaios em CCD reveladas com β -caroteno, as amostras foram eluídas e reveladas com uma solução diclorometânica de β -caroteno a 0,02%. Após revelação, a cromatoplasa foi mantida à exposição de luz solar até total perda de coloração. Os pontos que mantiveram a coloração laranja indicaram a presença de substâncias antioxidantes.²¹ Os ensaios de capacidade seqüestradora de radicais livres realizados para as substâncias **10** e **11** seguiram protocolos relatados na literatura com pequenas modificações.²²

A atividade inibitória sobre MPO das substâncias **1-11** foi avaliada segundo o método de oxidação do guaiacol. O meio reacional constituído de uma mistura de MPO (8,0 nM), peróxido de hidrogênio (0,3 mM) e guaiacol (70 mM) foi utilizado para a avaliação da ação de MPO na presença das substâncias em estudo e do controle positivo quercetina. As substâncias foram dissolvidas em DMSO nas concentrações 0,50; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100 nM. Após o tempo de reação (4 h), o meio reacional foi lido em espectrofotômetro (470 nm). A atividade inibitória foi expressa em CI₅₀, valor calculado a partir da plotagem de um gráfico correlacionando velocidade inicial *versus* absorvância, obtendo-se, assim, as curvas concentração-resposta.²³

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Programa BIOTA-FAPESP (Instituto Virtual da Biodiversidade, www.biota.org.br), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). L. O. Regasini e D. C. Fernandes agradecem à FAPESP pelas bolsas, respectivamente, de Doutorado e Iniciação Científica concedidas.

REFERÊNCIAS

- Bukart, A; *Las Leguminosas Argentinas*, Aemé Agency: Buenos Aires, 1952.
- Carvalho, P. E. R.; *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*, EMBRAPA-CNPQ: Colombo, 1994.
- Lorenzi, H.; *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, Plantarum: Nova Odessa, 1992.
- Crivos, M.; Martinez, M. R.; Pochettino, M. L.; Remorini, C.; Sy, A.; Teves, L.; *J. Ethnobiology Ethnomedicine* **2007**, *2*, 1.
- Bolzani, V. S.; Gunatilaka, A. A. L.; Kingston, D. G. I.; *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1683.
- Noldin, V. F.; Filho, V. C.; Delle Monache, F.; Benassi, J. C.; Christmann, I. L.; Oedrosa, R. C.; Yunes, R. A.; *Quim Nova* **2003**, *26*, 331.
- Young, H. S.; Kim, M. S.; Park, H. J.; Chung, H. Y.; Choi, J. S.; *Arch. Pharm. Res.* **1992**, *15*, 322.
- Duan, L-X.; Feng, B-M.; Chen, F.; Liu, J-Y.; Li, F.; Wang, Y-Q.; Pei, Y-H.; *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2007**, *9*, 557.
- Cheminat, A.; Zawatsky, R.; Becher, H.; Brouillard, T.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2787; Corthout, J.; Pieters, L.; Claeys, M.; Berghe, D. V.; Vlietinck, A.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1979.
- Ma, X.; Wu, L.; Ito, Y.; Tian, W.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1076*, 212.
- Markhan, K. R.; Ternai, B.; *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2608; Agrawal, P. K.; Bansal, M. C.; Porter L. J.; Foo, L. Y. *Em Carbon-13 NMR of Flavonoids – Studies in Organic Chemistry* 39; Agrawal, P. K., ed.; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, 1989, vol 39; Harborne, J. B.; *The flavonoids: advances in research since 1986*, Chapman & Hall: Londres, 1993.
- Moulari, B.; Pellequer, Y.; Lboutounne, H.; Girard, C.; Chaumont, J.-P.; Millet, J.; Muiyard, F.; *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 272.
- Min, B.; Lee, S.; Kim, J.; Lee, J.; Kim, T.; Kim, D.; Kim, Y.; Joung, H.; Lee, H.; Nakamura, N.; Miyashiro, H.; Hattori, M.; *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 1042; Han, L.; Ninomiya, H.; Taniguchi, M.; Baba, K.; Kimura, Y.; Okuda, H.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1006.
- Yoshiki, K.; Masafuni, M.; Genichiro, N.; Istuo, N.; *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 856.

15. Corsino, J.; Silva, D. H. S.; Zanoni, M. V. B.; Bolzani, V. S.; França, S. C.; Pereira, A. M. S.; Furlan, M.; *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 913.
16. Manguro, L. O. A.; Willians, L. A. D.; *Phytochemistry* **1996**, *44*, 1397; Manguro, A.; Midiwo, J. O.; Kraus, W.; *Nat. Prod. Sci.* **1997**, *3*, 8.
17. Corral, R. A.; Orazi, O. O.; Petrucci, M. F.; *Experientia* **1969**, *25*, 1020.
18. Winterbourn, C. C.; Vissers, M. C. M.; Kettle, A. J.; *Curr. Opin. Hematol.* **2000**, *7*, 53; Edwards, S. W.; Hallet, M. B.; *Immunol. Today* **1997**, *18*, 320; Regelman, W. E.; Siefferman, C. M.; Herron, J. M.; Elliot, G. R.; Clawson, C. C.; Gray, B. H.; *Pediatr. Pulmonol.* **1995**, *19*, 1; Dhaneshwar, S. S.; Kandpal, M.; Vadnerkar, G.; Rathi, B.; Kadam, S. S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 885; Buss, I. H.; Darlow, B. A.; Winterbourn, C. C.; *Pediatr. Res.* **2000**, *47*, 640; Chabot, F.; Mitchell, J. A.; Gutteridge, J. M.; Evans, T. W.; *Eur. Respir. J.* **1998**, *11*, 745.
19. Cai, C.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H.; *Life Sci.* **2004**, *74*, 2157; Cai, C.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q.; Corke, H.; *Life Sci.* **2006**, *78*, 2872.
20. Blokina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V.; *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 179; Cotellet, N.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1*, 569; Knekt, P.; Kumpaleinen, J.; Jarvinen, R.; Rissanen, H.; Heliovaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinem, T.; Aromaa, A.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 560; Yang, B.; Kotani, A.; Arai, K.; Kusu, F.; *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 599.
21. Pratt, D. E.; Miller, E. E.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1064.
22. Soares, J. R.; Dinis, T. C.; Cunha, A. P.; Almeida, L. M.; *Free Radical Res.* **1997**, *26*, 469; Pellegrini, N.; Re, R.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 379.
23. Kato, Y.; Nagao, A.; Terao, J.; Osawa, T.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 1136; Capeillère-Blandin, C.; *Biochem. J.* **1998**, *336*, 395.