

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

Priscilla Bento Matos Cruz Derogis

Atividade antioxidante das benzofenonas e extrato
hexânico do pericarpo dos frutos de *Rheedia*
brasiliensis

Alfenas/MG

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

Priscilla Bento Matos Cruz Derogis

Atividade antioxidante das benzofenonas e extrato
hexânico do pericarpo dos frutos de *Rheedia*
brasiliensis

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa em ciências farmacêuticas Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos

Alfenas/MG

2008

Derogis, Priscilla Bento Matos Cruz.

Atividade antioxidante das benzofenonas e extrato do pericarpo dos frutos de *Rheedia brasiliensis* / Priscilla Bento Matos Cruz Derogis. – Alfenas, 2008.

103 f. : il. –

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas.
Bibliografia.

1. Benzofenonas – isolamento & purificação. 2. Antioxidantes. I. Título

CDD: 572

PRISCILLA BENTO MATOS CRUZ DEROGIS

Atividade antioxidante das benzofenonas e extrato hexânico do pericarpo dos frutos de *Rheedia brasiliensis*

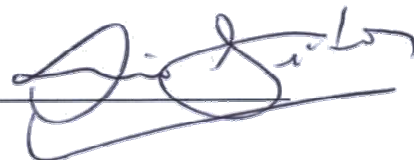
A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em:

Prof.º: Pio Colepicolo Neto

Instituição: Universidade de São Paulo

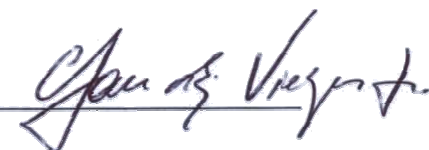
Assinatura:



Prof.º: Cláudio Viegas Junior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

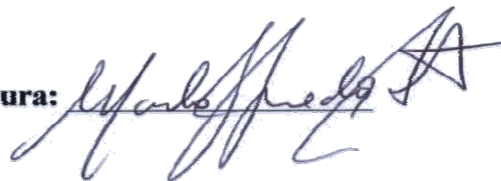
Assinatura:



Prof.º: Marcelo Henrique dos Santos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



***Esta dissertação é dedicada à minha
família pelo amor e apoio incondicional
em todas as horas.***

AGRADECIMENTOS

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho em especial...

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos pela orientação dedicada, conhecimentos transmitidos, ajudas constantes e confiança depositada.

À professora Máisa Lima Ribeiro Pereira Brigagão, pela colaboração imprescindível em todas as etapas no presente trabalho.

Aos professores, alunos e funcionários dos Laboratórios de Cristalografia, Bioquímica e Bioquímica Clínica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pelo auxílio científico e disponibilização de sua infra-estrutura e amizade.

Aos professores e alunos que compõem o grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG, pela amizade dedicada, convívio prazeroso e pelo crescimento acadêmico.

Especificamente a todos os alunos orientados pelo professor Marcelo Henrique dos Santos, pela equipe que formamos baseada em trabalho em conjunto e amizade verdadeira. Em especial à Kamila Rezende Dázio por tudo, sua ajuda foi mais que fundamental.

Aos mestrandos Ivan de Oliveira Pereira e Heleneide Cristina Campos pelo auxílio na análise da função hepática, apoio e amizade.

À mestranda Maurette dos Reis Viera Fernandes pela amizade, atenção e carinho em todas as horas.

Ao bibliotecário Ronan Lazaro Gondim pelo auxílio imprescindível.

À coordenação do Curso de Pós-graduação pela política de incentivo à produção acadêmica.

Aos órgãos de incentivo à pesquisa e desenvolvimento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelos auxílios.

A todos, amigos e familiares, por serem amigos, incentivadores e compreensivos nos momentos difíceis ou de ausência.

RESUMO

Plantas medicinais são utilizadas no tratamento e na cura de enfermidades desde a antiguidade. Pela sua riqueza química e farmacológica, têm sido alvo de crescentes estudos no intuito de comprovar atividades atribuídas pela crença popular ou mesmo obter novos compostos ativos. A família Clusiaceae compreende quarenta e nove gêneros de ampla distribuição. Entre eles está o gênero *Rheedia*, também conhecido como *Garcinia*, que é rico em uma considerável diversidade de compostos, tais como benzofenonas polipreniladas, flavonóides, proantocianinas e xantonas. A partir do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* foi possível o isolamento de 3 benzofenonas, garciniafenona, guttiferona-A e 7-*epi*-clusianona. Tais compostos foram então avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto a atividade antioxidante, utilizando diferentes técnicas. A determinação da atividade antioxidante dos compostos justifica-se pela comprovada relação entre os EROs/ERNs em várias doenças, incluindo câncer, arteriosclerose, artrite reumatóide, doenças inflamatórias. *In vitro*, foram avaliadas a atividade sequestrante de radicais DPPH, o poder redutor, a atividade quelante de íons ferro e *in vivo* a lipoperoxidação através da medida espectrofotométrica de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. *In vitro*, a guttiferona foi o composto mais ativo, seguida da 7-*epi*-clusianona e por fim a garciniafenona, demonstrando que o grupo catecol é importante para a atividade antioxidante. Além disso, a atividade do extrato apresentou uma correlação positiva com a da 7-*epi*-clusianona, o que era esperado por ser o seu principal componente. Já no teste *in vivo*, os diferentes compostos, inclusive o extrato, em duas ou mais concentrações foram efetivos demonstrando inclusive um efeito hepatoprotetor comprovado pela diminuição da peroxidação lipídica e dos níveis das transaminases.

Palavras-chave: Isolamento. Benzofenonas. Antioxidante.

ABSTRACT

Medicinal plants have been used in the treatment and cure of illnesses for many, many years. Due to their chemical and pharmaceutical characteristics, an increasing number of studies have been conducted to prove their theoretical medicinal capabilities or to obtain new active components. The Clusiaceae family is made up of forty nine species that are widely distributed. One of these species is *Rheedia*, also known as *Garcinia*, which is rich in a wide range of components, such as polyisoprenylated benzophenones, flavonoids, proantocianenes and xanthones. Using the hexanic extract of *Rheedia brasiliensis* pericarp, it was possible to isolate three benzophenones, garciniaphenone, guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone. These components were then evaluated for their antioxidant properties using different technical methods both *in vitro* and *in vivo*. The antioxidant properties of these compounds are justified by the relationship between the EROs and ERNs in various illnesses, including cancer, arteriosclerosis, rheumatic arthritis and inflammatory diseases. Tests were conducted *in vitro* to determine the scavenging capability of DPPH radicals, reducing power, iron-chelating ability and, *in vivo*, lipoperoxidation through the spectrophotometric measurement of thiobarbituric acid reactive species. *In vitro* the guttiferone-A was the most active component, followed by the 7-*epi*-clusianone and, lastly, garciniafenone, demonstrating that the catechol group is important for their antioxidant properties. Furthermore, the activity of the extract presented a positive correlation with the 7-*epi*-clusianone, which was expected to be the main component. The *in vivo* test, the different components, including the extract, in two or more concentrations, were effective, demonstrating a hepatoprotector effect proven by the reduction of lipid peroxidation and the transaminases levels.

Key words: Isolation. Benzophenones. Antioxidant

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Frutos de <i>Rheedia brasiliensis</i>	5
Figura 2 -	Frutos cortados transversalmente, em detalhe o látex amarelo.....	5
Figura 3 -	Anel difenilmetanona.....	6
Figura 4 -	Em negrito, o anel biciclo [3.3.1] noneno como resultado da oxigenação tripla e ciclização do anel difenilmetanona.....	6
Figura 5 -	Exemplos de acilfloroglucinóis proliprenilados.....	6
Figura 6 -	Tautomerismo proposto para as 3 benzofenonas isoladas (garciniafenona (1), guttiferona-A (2) e 7- <i>epi</i> -clusianona(3)).....	7
Figura 7 -	Condensação da benzoil-CoA com 3 malonil-CoA que resulta na formação da florobenzofenona.....	8
Figura 8 -	Formação da 7- <i>epi</i> -clusianona (3) através da adição de grupamentos prenila à florobenzofenona.....	8
Figura 9 -	Proposta da seqüência biosintética de incorporação de prenilas com formação de carbocátions precursores do biciclo [3.3.1] noneno.....	9
Figura 10 -	Formação do anel biciclo[3.3.1]noneno.....	10
Figura 11 -	Seqüência final para a formação das benzofenonas: clusianona, hiperibona L e 7- <i>epi</i> -clusianona.....	11
Figura 12 -	Cadeia respiratória mitocondrial.....	13
Figura 13 -	Formação e reações em que estão envolvidas as espécie reativas de oxigênio.....	15
Figura 14 -	Possíveis reações com o radical DPPH'	17
Figura 15 -	Estrutura do radical DPPH e de sua hidrazina correspondente.....	18
Figura 16 -	Reação de Haber-Weiss.....	20
Figura 17 -	Resumo da formação do complexo azul da Prússia.....	21
Figura 18 -	Representação esquemática do poder redutor relativo e absoluto para uma amostra e um padrão hipotéticos.....	21
Figura 19 -	Fases da lipoperoxidação.....	22
Figura 20 -	Lipoperoxidação catalisada por íons ferro.....	22
Figura 21 -	Reação entre o MDA e o TBA formando um composto colorido (MDA-TBA).....	23
Figura 22 -	Reações de formação de radicais hidroxila induzida pelo sistema ferro-ascorbato.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS^{•+} - radical catiônico de 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina 6-sulfonada)	GSH – glutatona reduzida
AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida	GSSG - glutatona oxidada
ALT – alanina aminotransferase	GST - glutatona S-transferase
Asc^{••} - radical ascorbila	IC₁₀₀ – concentração inibitória para 100%
AscH⁻ - ânion ascorbato	IC₅₀ – concentração inibitória para 50%
AST - aspartato aminotransferase	L[•] - radical centrado no carbono do lipídio
BHT – butil-hidroxitolueno	LO[•] - radical alcóxila
Cit c – citocromo c	LOO[•] - radicais peróxila
CoA – coenzima A	LOOH - hidroperóxidos lipídicos
CS - capacidade sequestrante	LPO - lipoperoxidação
CYP2E1 - citocromo P450 2E1	MDA - malondialdeído
DHLA - ácido dihidrolipóico	NAD(P)H oxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato oxidase
DNA – ácido desoxirribonucleico	NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato
DPPH[•] - radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (ou 2,2-difenil-1-picrilidrazil)	OPP - pirofosfato de dimetilalila
DPPHH – difenil-picrilidrazina	Q[•] - radical semiquinona
EDTA - ácido etilenodiamina tetracético	ROOH - peróxidos orgânicos
ERNs - espécies reativas de nitrogênio	SAM - S-adenosil-metionina
EROs – espécies reativas de oxigênio	

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	01
1.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	01
1.1.1	Plantas medicinais: pesquisa e indústria farmacêutica.....	02
1.2	FAMÍLIA GUTTIFERAE.....	03
1.2.1	O Gênero <i>Rheedia</i>	04
1.2.1.1	<u><i>Rheedia brasiliensis</i></u>	04
1.2.1.2	<u>Estudos fitoquímicos</u>	05
1.3	PLANTAS MEDICINAIS E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	11
1.3.1	Radicais livres: conceito.....	12
1.3.2	Radicais livres: formação.....	13
1.3.3	Sistemas de defesa antioxidante.....	16
1.3.4	Testes para a determinação da atividade antioxidante.....	17
1.3.4.1	<u>Atividade sequestrante de radicais DPPH</u>	17
1.3.4.2	<u>Ferro – metal de transição importante em processos oxidativos</u>	19
1.3.4.2.1	<i>Atividade quelante de íons ferro</i>	20
1.3.4.2.2	<i>Poder redutor</i>	21
1.3.4.3	<u>Lipoperoxidação</u>	22
1.3.4.3.1	<i>Lipoperoxidação in vitro</i>	23
1.3.4.3.2	<i>Lipoperoxidação in vivo</i>	24
2	RESULTADOS	26
2.1	ARTIGO I.....	27
2.2	ARTIGO II	37
2.3	ARTIGO III	53
2.4	ARTIGO IV.....	78
3	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Segundo Ferreira (1998), plantas medicinais são aquelas que possuem uma determinada atividade biológica, contendo um ou mais princípios ativos úteis à saúde humana.

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. E, ainda nos dias de hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

Existem relatos do uso de plantas medicinais inclusive nas mais antigas fontes escritas médico-científicas, como as provenientes da Mesopotâmia e Egito, ou mesmo da medicina tradicional chinesa. A exemplo, pode-se citar o Papiro de Ebers, datado de 1550 a.C., com mais de 20 metros de comprimento, que relaciona mais de 7000 substâncias medicinais presentes em mais de 800 fórmulas quantitativas (DIAS, 2005).

Os manipulados vegetais consistem no ponto forte da farmácia chinesa, principalmente em razão da diversidade dos climas na China que proporciona uma flora diversificada. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se, ao longo dos tempos, com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O uso popular de plantas medicinais contribui de forma relevante para a obtenção de informações terapêuticas importantes, que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal despertou o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares sobre a flora mundial (MACIEL et al., 2002), em especial a flora brasileira (PINTO et al., 2002).

1.1.1 Plantas medicinais: pesquisa e indústria farmacêutica

A partir da publicação, em 1673, da “Histoire général des Drogues” pelo farmacêutico Pierre Pomet, o estudo das plantas entrou no período científico ao adotar a classificação e a descrição taxonômica, o que se traduziu numa identificação mais precisa das plantas utilizadas na medicina. No final do século XVIII começou, então, o isolamento e a determinação da estrutura dos constituintes ativos dos produtos de origem natural dotados de propriedades medicinais (DA CUNHA, 2008).

Até então a pesquisa de novos medicamentos era realizada através do *screening* de extratos e plantas. Este consistia no rastreamento de compostos ou extratos frente a diferentes atividades.

O rápido desenvolvimento da biotecnologia e da biologia molecular a partir da década de 70 parecia tornar obsoleto o método tradicional de pesquisa, o *screening*. Essa percepção revelou-se como precipitada. Hoje em dia, as pesquisas apontam para a tendência de busca de novas moléculas aliando os diferentes métodos, uma vez que, mesmo usando as técnicas mais elaboradas ainda não é possível competir com a natureza na formulação de moléculas com atividade terapêutica. De tal forma que, empresas internacionais buscam na natureza modelos estruturais para o desenho de novos compostos biologicamente ativos (FERREIRA, 1998).

Além da herança cultural e da riqueza molecular, outros fatores foram e são responsáveis pelo incremento na pesquisa sobre plantas medicinais, tais como: insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos medicamentos alopáticos (CZEPULA, 2006).

Apesar do interesse sobre os produtos naturais, as indústrias farmacêuticas brasileiras ainda enfrentam alguns problemas em tal área, tais como: a necessidade de grandes esforços da indústria nacional para atender às diretrizes impostas pela política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos; os diminutos investimentos em pesquisa e desenvolvimento; a baixa qualificação de recursos humanos; e, a dificuldade no suprimento, armazenamento e padronização de matérias-primas. Como resultado a Universidade Brasileira é o centro de pesquisas e eventualmente do desenvolvimento de medicamentos de plantas medicinais (FERREIRA, 1998). No ano de 2007, pesquisadores da UFRJ conseguiram a 1ª licença do país para um projeto no qual irão estudar plantas medicinais usadas por comunidades

quilombolas de Oriximiná, oeste do Pará, em busca de substâncias que possam servir de base para novos fitoterápicos (PORTO, 2007). Este projeto comprova a importância das plantas medicinais na obtenção de fármacos (FARNSWORTH, 1980; CORDELL, 1995; TESKE, 1995 apud FILHO; YUNES, 1998). Por este motivo, determinou-se a atividade antioxidante do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*, da família Guttiferae, e de benzofenonas isoladas a partir do mesmo.

1.2 FAMÍLIA GUTTIFERAE

A família Guttiferae, também conhecida como Clusiaceae, pertence à classe das angiospermas e é caracterizada pela presença significativa de látex na maioria de suas espécies. A família Guttiferae possui 49 gêneros (por exemplo: *Vismia* (NGUEMEVINGA et al., 2006), *Garcinia* (DEACHATHAI et al., 2006), *Clusia* (DIASA et al., 2006), *Cratoxylum* (BOONSRIA et al., 2006) *Harungana* (TIH et al., 2006), *Mesua* (UAWONGGUL et al., 2006), *Hypericum* (MÁRTONFI; REPČÁK; ZANVIT, 2006), *Kielmeyera* (ZAGOTOA et al., 2006) e mais de 1000 espécies distribuídas em 6 subfamílias, todas com representantes no Brasil (JOLY, 1993).

As plantas desta família são lenhosas, arbóreas ou arbustivas, com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas, sem estípulas, com flores geralmente vistosas isoladas, ou reunidas em inflorescência. Flores cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado, de simetria radial (JOLY, 1993).

A família Clusiaceae é dotada de uma ampla variedade de metabólitos biologicamente ativos como: antraquinonas, flavonóides, xantonas, floroglucinóis (BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2001) e benzofenonas (OLIVEIRA et al., 1999). Graças a essa gama de constituintes, às espécies desta família têm sido relatadas atividades como antidepressiva (ZAGOTOA et al., 2006; MEDINA et al., 2006), antibacteriana, citotóxica (BOONSRIA et al., 2006), antimicrobiana, antimalárica (LEE et al., 2003), antioxidante (RAO et al., 2004) e antiaflatoxinogênica (JOSEPH et al., 2005).

1.2.1 O Gênero *Rheedia*

O gênero *Rheedia*, também denominado como *Garcinia*, é constituído por diversas espécies, podendo-se citar: *Garcinia cowa*, *Garcinia gardneriana*, e *Garcinia mangostan*. Estudos de tais espécies têm demonstrado uma considerável diversidade de atividades e constituintes químicos (BRAZ-FILHO et al., 1970; DELLE MONACHE et al., 1983; DELLE MONACHE et al., 1988).

Extratos de *Garcinia pedunculata* demonstraram atividade antioxidante e antimutagênica (JAYAPRAKASHA; NEGI; JENA, 2006); a *Garcinia cambogia* vem sendo utilizada no tratamento de obesidade (HAYAMIZU et al., 2003); o extrato aquoso de *Garcinia mangostana* demonstrou *in vitro* atividade antileucêmica (CHIANG et al., 2004) e o extrato de *Garcinia pedicillata* apresentou atividade contra a forma intracelular de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (BILLO et al., 2005).

Dos frutos de *Garcinia cowa*, Panthong e colaboradores (2006), isolaram as cowaxantonas A-E, e a elas foi atribuída a atividade antibacteriana. Guttiferonas isoladas de diferentes gêneros e espécies da família Guttiferae, demonstraram *in vitro* efeitos citopáticos contra o HIV (GUSTAFSON et al., 1992). O ácido gambógico, isolado da resina extraída da árvore de *Garcinia hanburyi*, apresentou, segundo Guo et al. (2006), atividade anticâncer; sementes de *Garcinia Kola* contêm uma complexa mistura de biflavonóides, benzofenonas preniladas e xantonas (IWU et al., 2002). Estudos químicos de frutos de *Rheedia gardneriana* demonstraram a presença de alguns constituintes com considerável poder antioxidante, como os biflavonóides (fukugetina), xantonas, benzofenonas poliisopreniladas, triterpenos e cumarinas (SANTOS et al., 1996).

1.2.1.1 *Rheedia brasiliensis*

A espécie *Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch e Triana, ou *Garcinia brasiliensis* Mart., é nativa da região Amazônica e é cultivada em todo o território brasileiro. É conhecida

popularmente como bacuri, bacupari, porocó e bacuripari, no Brasil e como guapomo na Bolívia. É uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (MORTON, 1987).

O bacuparizeiro é uma árvore em forma de pirâmide rica em um látex amarelo. As folhas são em formato de lança. As flores são abundantes e poligamas. Os frutos são comestíveis (POTT; POTT; SOBRINHO, 2004) (FIGURA 1), ovais com a casca (pericarpo) elástica e amarela que pode ser facilmente removida, a polpa é branca, suave, saborosa e possui 2 a 3 sementes (MORTON, 1987). Como descrito por Villagómez Rojas (1990), as sementes apresentam forma elipsoidal, com coloração externa castanha e com linhas claras, longitudinalmente, bem visíveis, semelhantes a nervuras. Internamente, são de coloração branco-amarelada e exsudam látex amarelo (NASCIMENTO; CARVALHO; MÜLLER, 2002) (FIGURA 2). Cerca de 8 a 9% do peso das sementes é referente ao óleo que é utilizado em cataplasmas para o tratamento de feridas e panarício (espécie de furúnculo). A infusão da polpa possui ação narcótica semelhante à nicotina (MORTON, 1987). Os frutos são ainda utilizados no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (CORRÊA, 1926; CORRÊA; PENNA, 1984).



Figura 1 - Frutos de *Rheedia brasiliensis*.

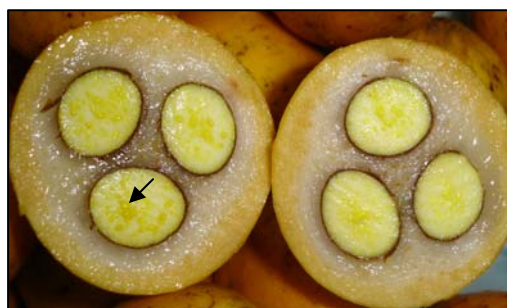


Figura 2 - Frutos cortados transversalmente, em detalhe o látex amarelo.

1.2.1.2 Estudos fitoquímicos

Estudos fitoquímicos têm demonstrado que o gênero *Rheedia* ou *Garcinia*, é rico em compostos fenólicos, nomeadamente as benzofenonas, xantonas e flavonóides (DELLE MONACHE et al., 1983; DELLE MONACHE et al., 1984).

As benzofenonas poliisopreniladas caracterizam-se pela presença do núcleo difenilmetanona (FIGURA 3) substituído por grupo(s) isoprenila(s) (3-metil-2-butenila). Muitos dos representantes desta classe apresentam um padrão de oxigenação triplíce em um dos anéis aromáticos do cerne difenilmetanona e uma ciclização intramolecular, que juntos são responsáveis pela formação do anel biciclo[3.3.1]noneno (FIGURA 4) (MARTINS, 2008).

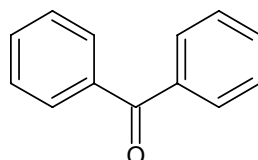


Figura 3 - Anel difenilmetanona.

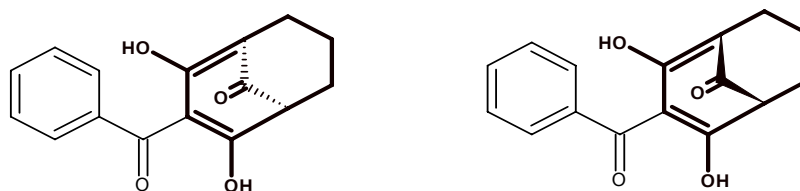


Figura 4 – Em negrito, o anel biciclo [3.3.1] noneno como resultado da oxigenação tripla e ciclização do anel difenilmetanona.

Pela presença desse anel biciclo [3.3.1] noneno, as benzofenonas poliisopreniladas são também classificadas como acilfloroglucinois poliprenilados policíclicos do tipo B. Como exemplos, podem-se citar o garcinol, as guttiferonas A, C, D, E, F, e I, a 7-*epi*-clusianona, e as hiperibonas H, I e L (CIOCHINA; GROSSMAN, 2006).

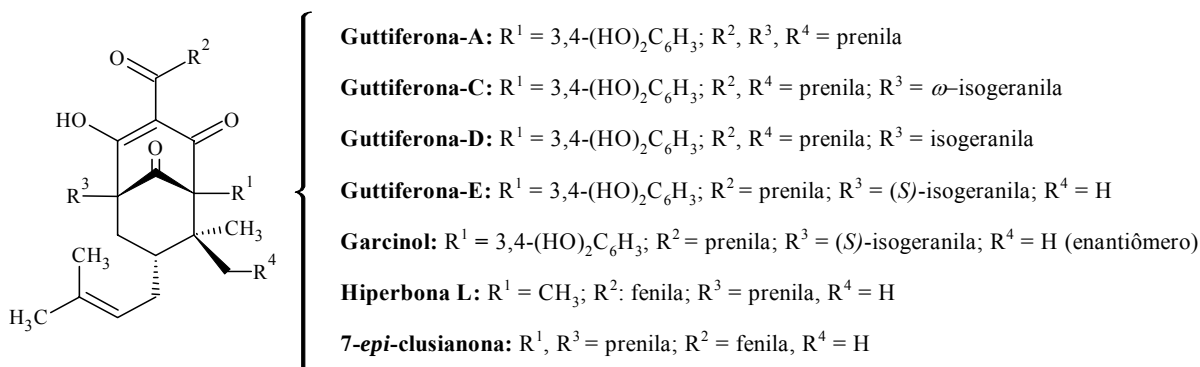


Figura 5 – Exemplos de acilfloroglucinois proliprenilados.

Fonte: CIOCHINA; GROSSMAN (2006, p. 3971)

No presente trabalho foram estudadas 3 benzofenonas: a 7-*epi*-clusianona, a guttiferona-A e a garciniafenona, todas isoladas do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*.

A garciniafenona (**1**) (FIGURA 6) substância inédita, cujo isolamento e elucidação estrutural foram descritos por Derogis et al., 2008. É muito semelhante à 7-*epi*-clusianona, diferindo apenas na ausência de um grupamento prenila.

A guttiferona-A (**2**) (FIGURA 6) foi primeiramente isolada de *Symphonia globulifera* e descrita com atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al., 1992). Trabalhos posteriores demonstraram as atividades tripanocida (ABE, et al., 2004), sequestrante de radicais (NGOUELA et al., 2006), leishmanicida *in vitro* e anticolinesterásica (LENTA et al., 2007); e antiproteolítica (MARTINS et al., 2008 em fase de submissão). A estrutura foi elucidada por difração de raios-X (MARTINS et al., 2007).

A 7-*epi*-clusianona (**3**) (FIGURA 6) foi primeiramente isolada dos frutos de *Rheedia gardneriana* (SANTOS et al., 1999), apresenta atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi in vitro* (ALVES et al., 1999); em baixas concentrações, é vasodilatadora e, em altas concentrações, vasocronstritora (CRUZ et al., 2006); e, no estudo de Neves et al. (2007) mostrou-se antianafilática. Esta benzofenona poliisoprenilada foi também testada quanto à sua atividade antidiabética, mas não apresentou ação (OLIVEIRA et al., 2005).

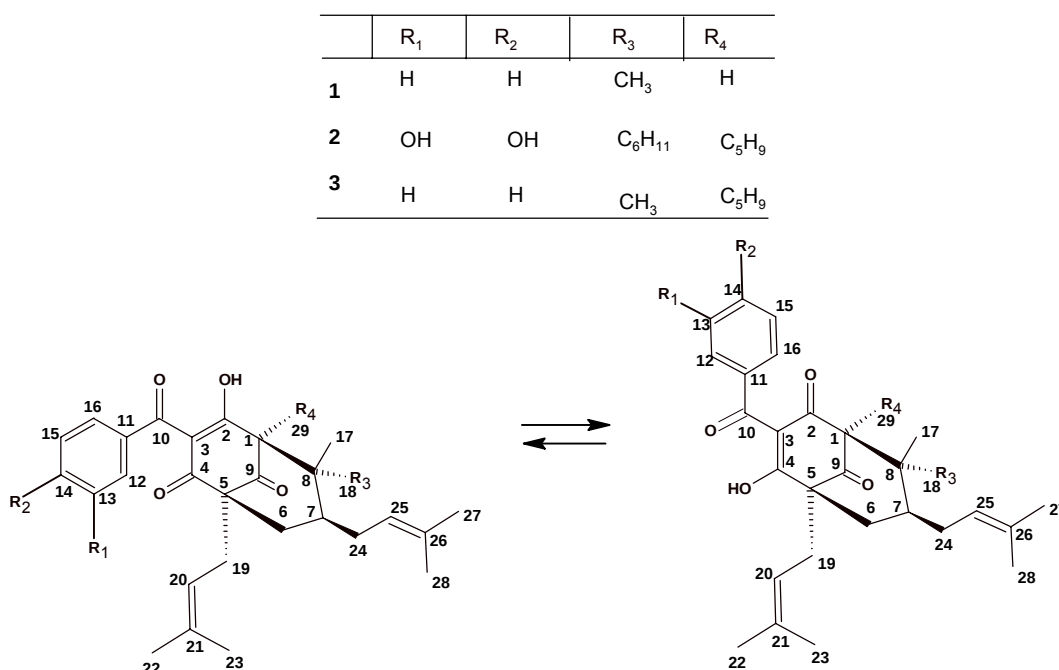


Figura 6 - Tautomerismo proposto para as 3 benzofenonas isoladas (garciniafenona (**1**), guttiferona-A (**2**) e 7-*epi*-clusianona (**3**)).

As benzofenonas são descritas na rota biossintética como precursores imediatos das xantonas (BEERHUES, 1996). Klingauf e colaboradores, 2005, afirmaram que a biossíntese das benzofenonas envolve a condensação entre a benzoil-CoA e a malonil-CoA, mas também pode envolver a condensação de malonil-CoA com acil-CoA como descrito por (CIOCHINA; GROSSMAN, 2006). Ambos os mecanismos resultam na formação de uma florobenzofenona (FIGURA 7).

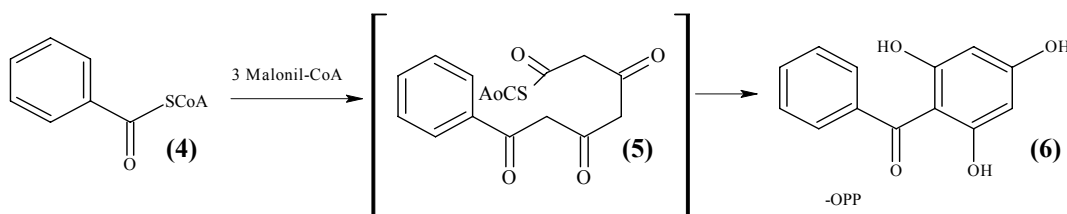


Figura 7 - Condensação da benzoil-coA com 3 malonil-coA que resulta na formação da florobenzofenona.
Fonte: KLINGAUF et al. (2005, p. 141)

Assim como descrito por Santos e colaboradores (1999), a unidade floroglucinol é mais facilmente prenilada, demonstrando claramente a influência dos grupos hidroxílicos no aumento da densidade eletrônica e favorecendo energeticamente as reações enzimáticas de substituição eletrofílica com o biorreagente pirofosfato de dimetilalila (FIGURA 8).

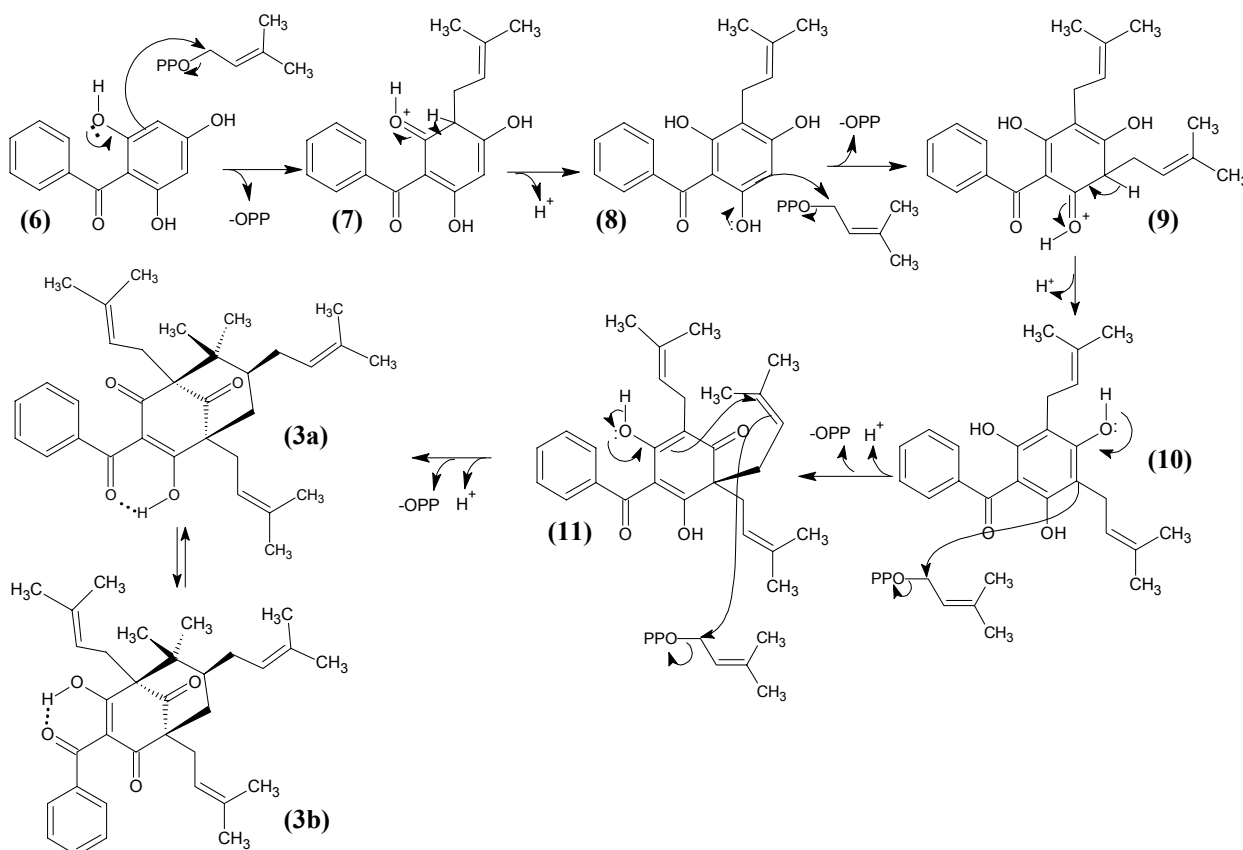


Figura 8 - Formação da 7-*epi*-clusianona (3) a través da adição de grupamentos prenila à florobenzofenona, proposta por Santos et al. (1999)

Analisando a estrutura das benzofenonas obtidas a partir do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*, propôs-se uma rota biossintética alternativa, descrita passo a passo nas Figuras de 9 a 11. Proposta esta baseada na biossíntese dos acilfloroglucinois (CIOCHINA; GROSSMAN, 2006). Diferentemente da proposta de Santos e colaboradores (1999), poderia ocorrer primeiro a adição de grupamentos prenila geminais. Em seguida, o ataque de um dos grupamentos prenila geminais a um pirofosfato de dimetilalila formaria um carbocátion terciário. A adição do terceiro grupo prenila responsável pela sua formação poderia ser acima ou abaixo no plano da dupla como mostra a Figura 9.

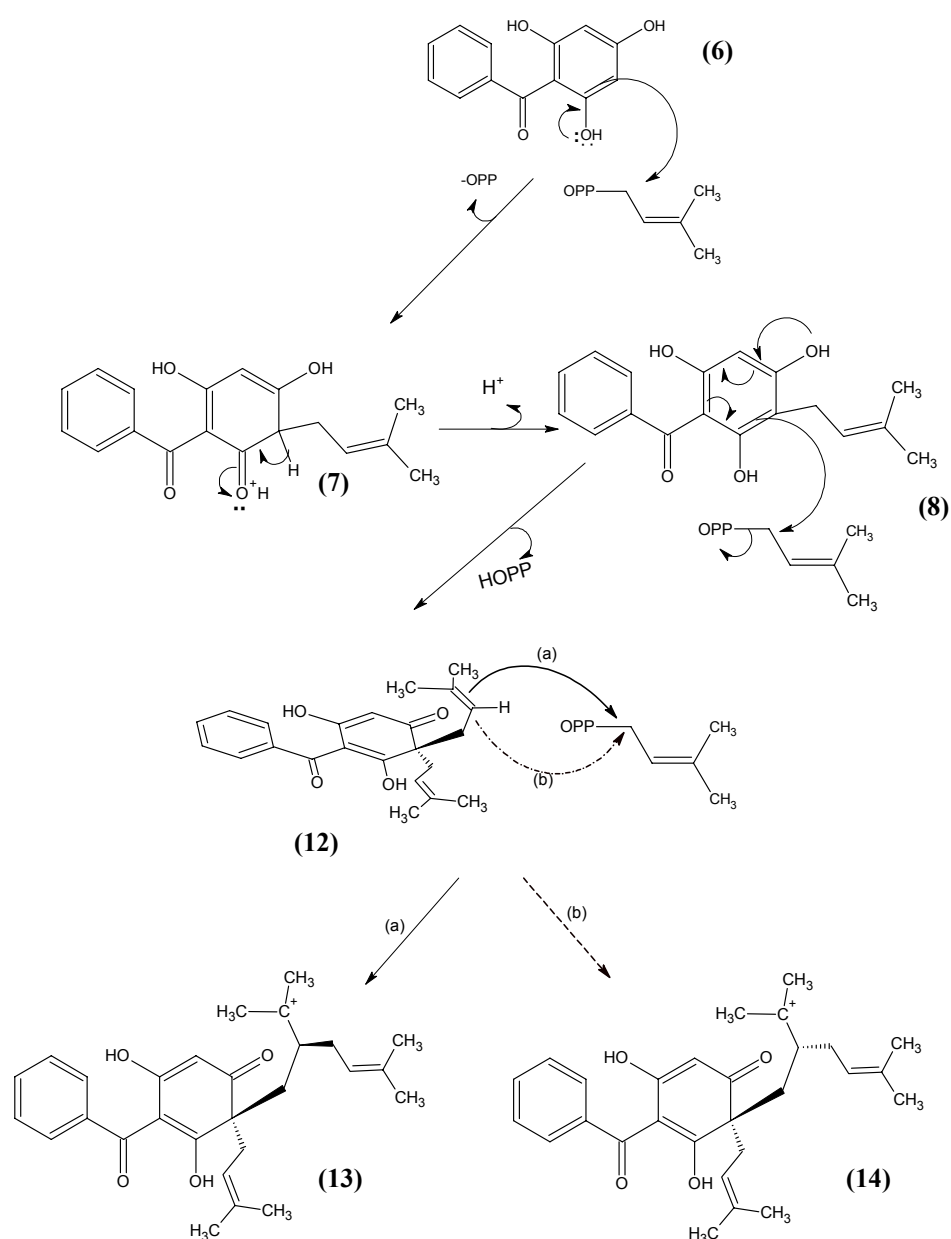


Figura 9 – Proposta da sequência biossintética de incorporação de prenilas com formação de carbocátions precursores do biciclo [3.3.1] noneno.

O carbocátion ao ser atacado geraria então o fechamento do anel e, consequentemente, a formação de garciniafenona e do precursor da clusianona (FIGURA 10).

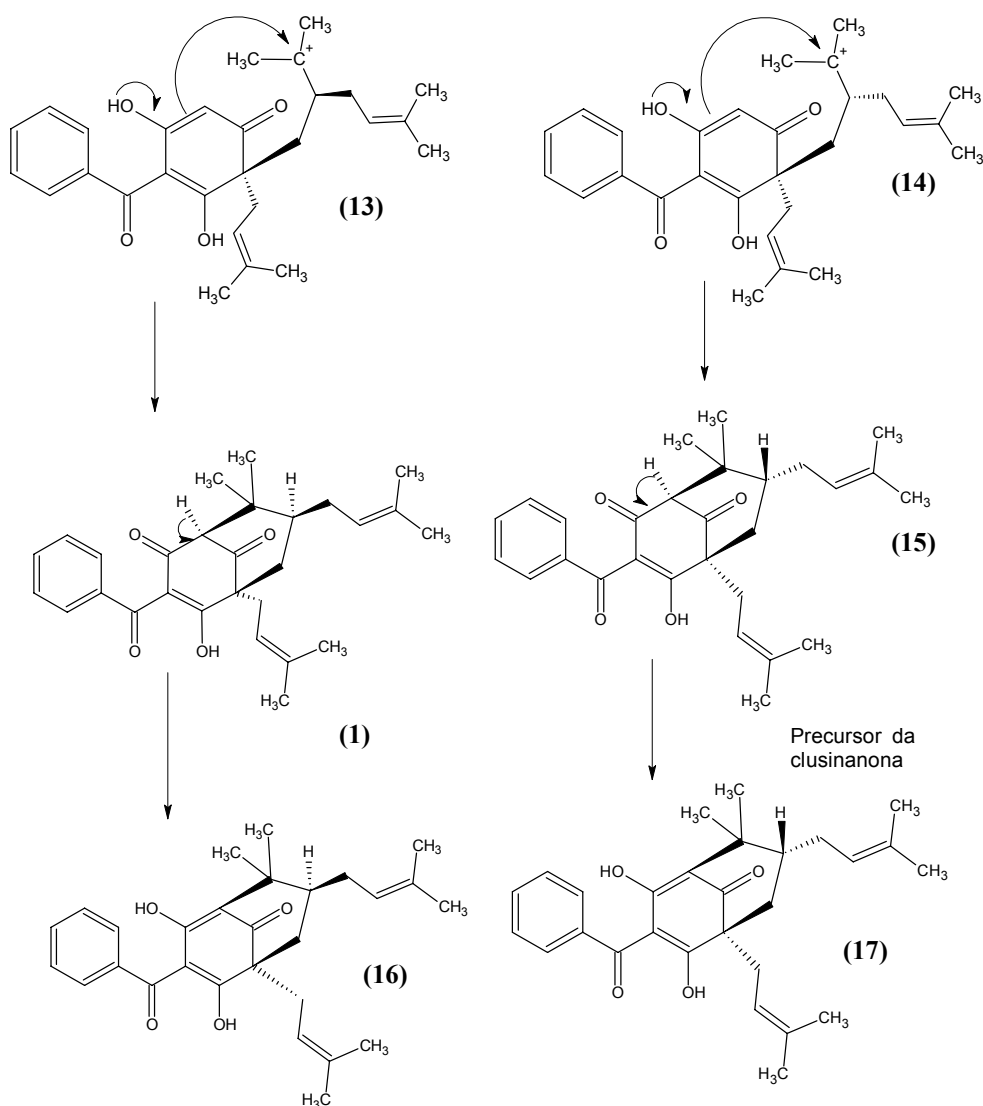


Figura 10 - Formação do anel biciclo[3.3.1]noneno.

A garciniafenona poderia ser metilada formando a hiperibona L, descrita por Tanaka et al. (2004). A mesma estrutura poderia ser prenilada formando a 7-*epi*-clusianona (FIGURA 11).

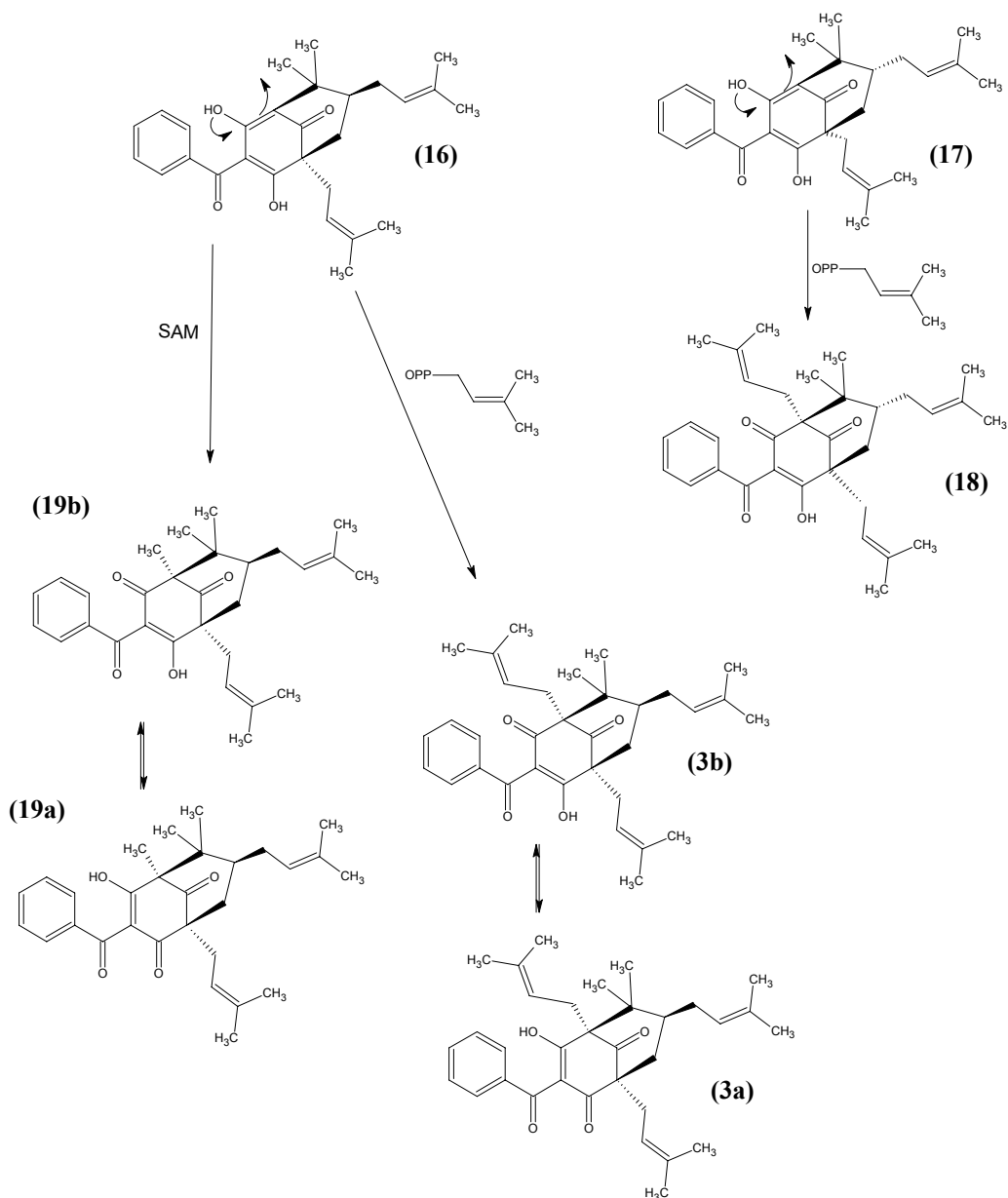


Figura 11 – Sequência final para a formação das benzofenonas: clusianona (18), hiperibona L (19) e 7-*epi*-clusianona (3).

1.3 PLANTAS MEDICINAIS E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Processos oxidativos são parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes.

No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Como resultado, relacionam-se a várias patologias, tais como diabetes, câncer, artrite reumatóide, algumas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, como mal de Alzheimer e Parkinson, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006).

Desta forma, dietas específicas, suplementos alimentares à base de fitoterápicos e alimentos funcionais com atividade antioxidante poderiam ser administrados para a atenuação de tais quadros patológicos. Embora alguns produtos vegetais sejam popularmente associados à boa saúde, muitos dos seus princípios ativos ainda não foram isolados nem tiveram suas propriedades farmacológicas comprovadas (BARROS; BRIGAGAO; MATTEI, 2006).

1.3.1 Radicais livres: conceito

Um radical livre é definido como qualquer espécie que possua um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWEEL; CHIRICO, 1993). Assim, os radicais podem ser formados pela adição ou perda de um elétron de uma espécie não-radicalar (FIGHERA, 2006). Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$), carbonato ($CO_2^{\cdot-}$), óxido nítrico ($^{\cdot}NO$), peroxila ($LOO^{\cdot}$), alcóxila ($LO^{\cdot}$) e radical semiquinona ($Q^{\cdot}$), são exemplos de radicais livres. Contudo, é importante salientar que existem compostos igualmente reativos e que não possuem elétron desemparelhado na última camada, por este motivo, adotaram-se conceitos mais amplos tais como espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). São exemplos de ERO e ERNs: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipobromoso ($HOBr$), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozono (O_3), oxigênio singlete (1O_2), peróxidos orgânicos ($ROOH$), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), peroxinitrato ($O_2NOO^{\cdot}$), ácido peroxinitroso ($ONOOH$), ácido nitroso (HNO_2), cátion nitrosila (NO^+), ânion nitroxila ($NO^{\cdot-}$), tetróxido dinitrogênio (N_2O_4) e peroxinitrato ($O_2NOO^{\cdot}$).

Os ERNs/EROs geralmente possuem uma vida de curta duração, e tendem a estabilizar a sua camada de valência captando um elétron de outro átomo ou molécula (RICE-EVANS; BOURDON, 1993).

1.3.2 Radicais livres: formação

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. A produção nas células pode ser acidental ou intencional. Como exemplo, pode-se citar a produção de radical superóxido por fagócitos ativados como parte importante no seu papel bactericida. Embora os radicais livres sejam gerados somente na interface na membrana do fagócito e bactéria, a fuga de superóxido, peróxido de hidrogênio e outras EROs é inevitável (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Sob circunstâncias normais, a principal fonte de radicais livres nas células é o “vazamento” de elétrons das cadeias de transporte de elétrons, tais como aqueles que ocorrem na mitocôndria na redução incompleta do oxigênio molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A cadeia respiratória mitocondrial consiste em uma série de carreadores de elétrons capazes de aceitar ou doar um ou 2 elétrons. Os complexos I e II dessa cadeia catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona através de 2 diferentes doadores de elétrons o NADH (complexo I) e succinato (complexo II). O complexo III carrega os elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo c; por fim, o complexo IV completa a sequência através da transferência dos elétrons do citocromo c para o O_2 . A cada 4 elétrons que passam por este complexo a enzima consome 4 H^+ da matriz convertendo o O_2 em H_2O (LEHNINGER, 2004) (FIGURA 12).

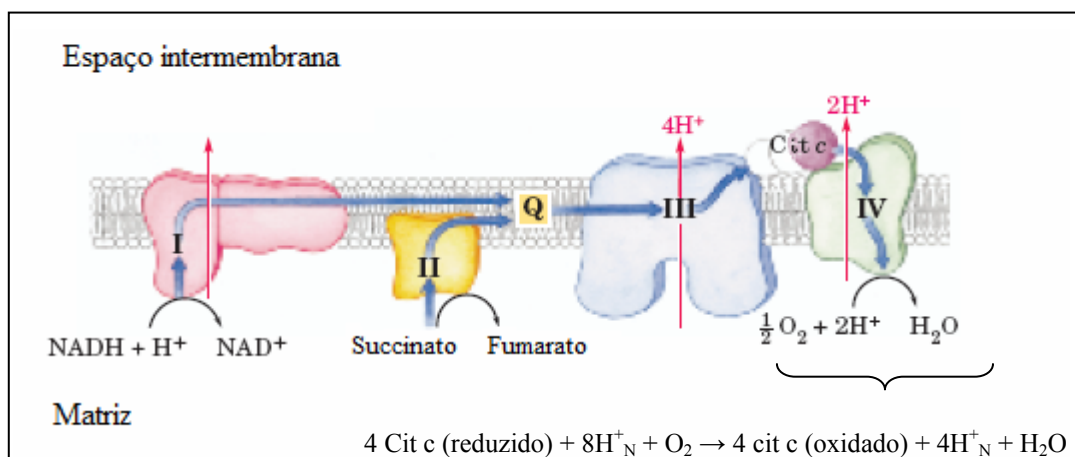


Figura 12 – Cadeia respiratória mitocondrial.
Fonte: LEHNINGER (2004, p.702-703)

Em diferentes etapas da redução do oxigênio na mitocôndria pode ocorrer a produção de radicais livres altamente reativos, capazes de causar danos celulares. Estima-se que em condições normais, cerca de 1 a 3% do oxigênio absorvido pela mitocôndria sejam parcialmente reduzidos a radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006).

O radical superóxido, além dessa fonte mitocondrial, pode ser formado pela redução do oxigênio molecular mediada pela NAD(P)H oxidase ou pela xantina oxidase (FIGURA 13 – reação 1) (VALKO et al., 2007). O radical $O_2^{\cdot-}$ pode ser espontaneamente decomposto a O_2 e H_2O_2 ou, preferencialmente no meio celular, através da catálise enzimática pela superóxido dismutase (BARROS, BRIGAGÃO, MATTEI, 2006) (FIGURA 13 – reação 2).

O peróxido de hidrogênio é uma molécula termodinamicamente estável, pequena, sem carga e, portanto, plenamente difusível através da maioria das membranas biológicas. O H_2O_2 pode ser reduzido tanto pela ação da glutathione peroxidase, quanto pela ação de metais de transição. O sistema glutathione peroxidase é mais eficiente e exige a glutathione como doador de elétrons (FIGURA 13 – reação 3). A glutathione oxidada (GSSG) é reduzida pela glutathione reductase que usa NADPH como doador de elétrons (FIGURA 13 – reação 4). Na presença dos metais de transição (Fe^{2+} , Cu^+ e outros) o peróxido gera a formação do radical hidroxila (reação de Fenton) (FIGURA 13 – reação 5), umas das EROs mais reativas e instáveis (VALKO et al., 2007; BARROS, BRIGAGÃO, MATTEI, 2006).

O radical hidroxila reage com biomoléculas como o DNA, proteínas, cadeias polissacarídicas e lipídios. Grupos fosfato presentes na porção polar das bicamadas lipídicas de membranas representam sítios estáveis para a quelação de íons metálicos tornando-as importantes alvos da ação lesiva das EROs/ERNs (BARROS, BRIGAGÃO, MATTEI, 2006). O radical hidroxila pode abstrair um elétron de um ácido graxo poliinsaturado (LH) gerando um radical centrado no carbono do lipídio ($L^{\cdot}$), o que caracteriza a etapa de iniciação do processo de lipoperoxidação (FIGURA 13 – reação 6). O radical $L^{\cdot}$ pode interagir com um oxigênio molecular gerando o radical peroxila ($LOO^{\cdot}$) (FIGURA 13 – reação 7), se este não for reduzido prosseguem as reações de lipoperoxidação. O radical peroxila pode ser reduzido pela forma reduzida da vitamina E (T-OH) resultando em um hidroperóxido do lipídio e por um radical da vitamina E (T-O $^{\cdot}$) (FIGURA 13 – reação 8). Este radical pode ser regenerado através da vitamina C ou mesmo da glutathione (FIGURA 13 – reações 9 e 10). A glutathione oxidada (GSSG) e o radical ascorbil ($Asc^{\cdot-}$) são reduzidos a glutathione e ânion ascorbato ($AscH^-$), respectivamente, pelo ácido diidrolipóico (DHLA) (FIGURA 13 – reação 11) que é

convertido ao ácido lipóico, através do NADPH (FIGURA 13 – reação 12). O hidroperóxido de lipídio, resultante da redução do radical peroxila, pode ser reduzido a álcool e oxigênio pela glutathione peroxidase (FIGURA 13 – reação 13). Dando seqüência às reações de lipoperoxidação, os hidroperóxidos podem reagir com os metais de transição Fe^{2+} formando radicais alcoxila ($\text{LO}^\bullet$), ou mesmo, de uma forma mais lenta com os Fe^{3+} formando radicais peroxila ($\text{LOO}^\bullet$). O radical alcoxila pode derivar, por exemplo, do ácido araquidônico, pode sofrer ciclização formando hidroperóxidos com um anel de 6 membros, que sofre uma seqüência de reações resultado na formação do 4-hidroxi-nonenal (FIGURA 13 – reação 15 e 16). Tal composto é estabilizado em um aduto glutatila (GST, glutathione S-transferase) (FIGURA 13 – reação 17). O radical peroxila localizado na parte interna do ácido graxo pode ciclizar formando um peróxido cíclico adjacente a um radical centrado no carbono (FIGURA 13 – reação 18). Tal radical pode ser reduzido formando um hidroperóxido, ou, ainda, sofrer uma segunda ciclização formando um peróxido bicíclico que após complexar com o oxigênio e sofrer redução origina um composto intermediário para a produção de malondialdeído (FIGURA 13 – reação 19) (VALKO et al., 2007).

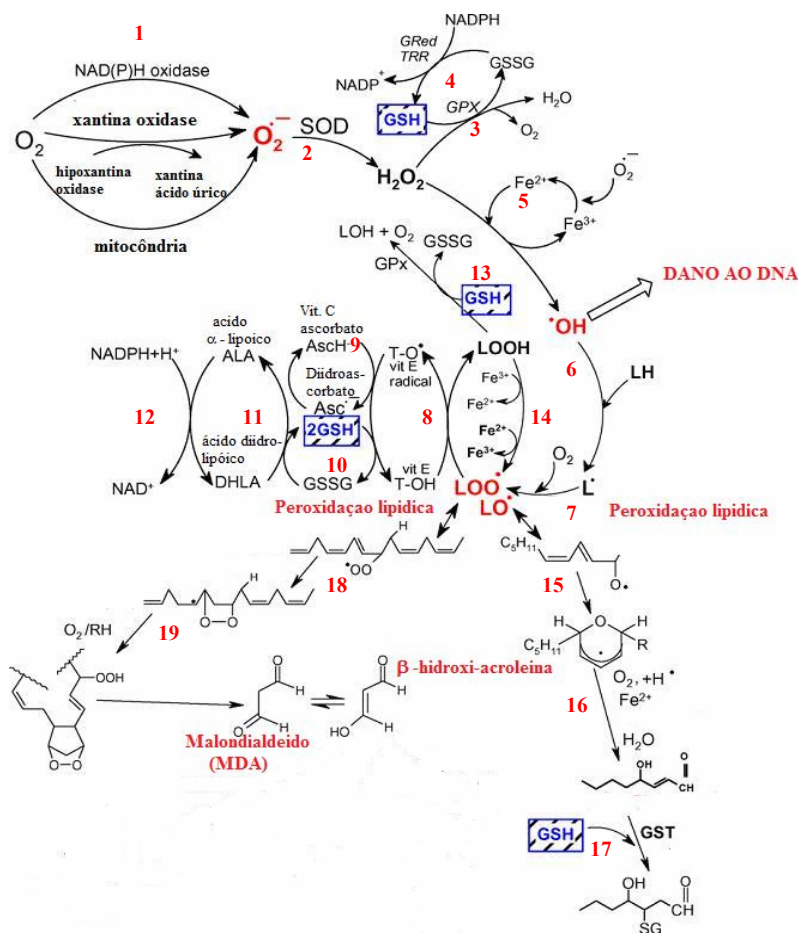


Figura 13 – Formação e reações em que estão envolvidas as espécies reativas de oxigênio.
Fonte: VALKO et al. (2007, p.46)

1.3.3 Sistemas de defesa antioxidante

O estresse oxidativo caracteriza-se pelo distúrbio no balanço entre moléculas oxidantes e antioxidantes. Esse desequilíbrio se deve a um aumento da concentração dos radicais devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes e resulta na indução de danos celulares (CERUTTI, 1991, 1994 apud BIANCHII; ANTUNES, 1999). Tais danos celulares podem se traduzir em diversas doenças tais como artrite, aterosclerose, diabetes, catarata, esclerose múltipla, inflamações crônicas, disfunção cerebral, cardiopatias, enfisema, envelhecimento, câncer e doenças do sistema imune (BIANCHII; ANTUNES, 1999).

Um antioxidante é qualquer substância que, quando em baixa concentração em relação a um extrato oxidado, é capaz de reduzir ou prevenir a oxidação desse extrato. Defesas antioxidantes foram desenvolvidas pelos seres aeróbicos no intuito de sobreviver aos efeitos tóxicos do oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os sistemas de defesa antioxidante podem ser endógenos ou exógenos. Os endógenos, tais como superóxido dismutase, catalase, bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico e glutathione são insuficientes para prevenir completamente o dano oxidativo. Desta forma, antioxidantes exógenos, obtidos da dieta, são importantes para a manutenção da saúde. Diversos compostos da nossa dieta têm sido citados como importantes agentes antioxidantes, a exemplo podem ser citadas as vitaminas E e C (HALLIWELL, 1996), β -caroteno (precursor de vitamina A) e substâncias fenólicas de plantas (ex: flavonóides).

Um antioxidante, independente da sua natureza pode atuar de diferentes formas: inibindo ou retardando a formação de EROs/ERNs através do seqüestro de radicais de iniciação, ou mesmo da ligação a íons metálicos; interceptação dos radicais formados, convertendo-os a espécies menos reativas através do aprisionamento de radicais peroxila, ou do seqüestro de radicais; e pela remoção de biomoléculas danificadas pela oxidação (BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006).

1.3.4 Testes para a determinação da atividade antioxidante

De acordo com Halliwell et al. (1995), é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em um determinado sistema, mas que falhe em outro, devido ao seu mecanismo de ação. Portanto para avaliar a atividade antioxidante de um composto é necessário testá-la sob diferentes mecanismos.

Alguns dos testes antioxidantes amplamente descritos na literatura são: atividade sequestrante de radicais DPPH[•], atividade quelante de íons ferro, poder redutor e lipoperoxidação *in vitro* e *in vivo*.

1.3.4.1 Atividade sequestrante de radicais DPPH

A atividade sequestrante de radicais DPPH[•] é considerada um método clássico, simples e rápido de avaliação da atividade antioxidante (GÜLÇİN; ALICI; CESUR, 2005); principalmente de frutas, sucos e extratos vegetais (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). O método baseia-se na redução do radical DPPH[•] (roxo) na sua hidrazina (amarelo) correspondente, através da sua reação com doadores de hidrogênio (RH), ou mesmo outros radicais (A[•]) (FIGURA 14) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995).

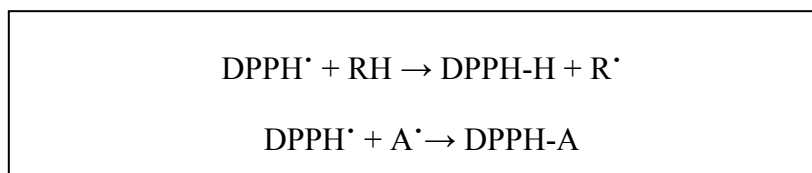


Figura 14 – possíveis reações com o radical DPPH[•].

A redução do radical à sua hidrazina correspondente, é caracterizada pela mudança de cor da solução de roxo para amarelo, o que se traduz no decréscimo na absorbância determinado espectrofotometricamente de 515-528 nm (CONTRERAS-GUZMÁN; STRONG, 1982 apud SANCHEZ-MORENO, 2002) (FIGURA 15).

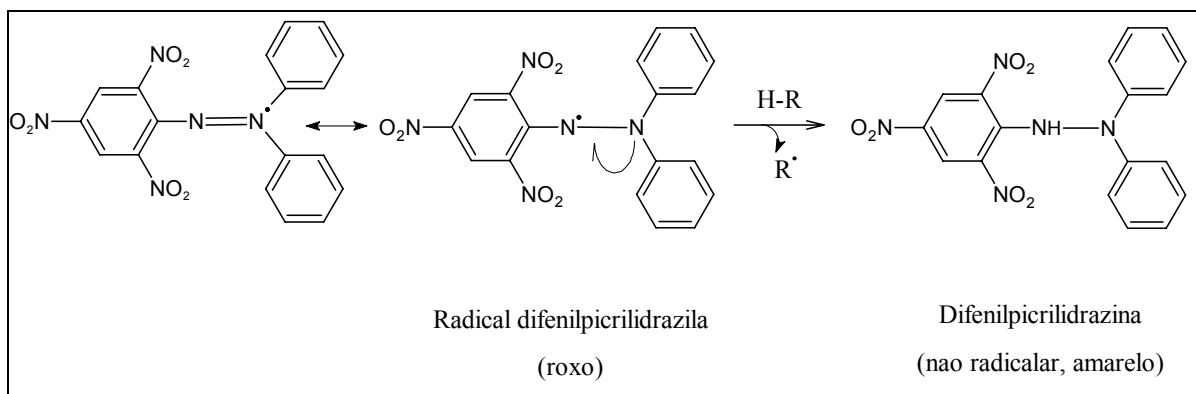


Figura 15 – estrutura do radical DPPH e de sua hidrazina correspondente.

O radical é estável devido à deslocalização de um elétron livre ao longo de toda a molécula. Além disso, é um radical “pronto” para ser dissolvido, não precisa ser gerado assim como o $\text{ABTS}^{+\bullet}$. O DPPH $^{\bullet}$ pode ser apenas dissolvido em meio orgânico, especialmente alcoólico; o que resulta em uma limitação importante quanto ao seu uso para determinar a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos (ARNAO, 2000).

A cinética de reação depende da natureza do composto antioxidante. Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) mostraram que os compostos podem apresentar 3 cinéticas distintas. Compostos como o ácido ascórbico e isoeugenol apresentam cinética rápida; δ -tocoferol e o ácido rosmarínico cinética intermediária; e o guaiacol e BHT, cinética lenta. Assim na determinação da atividade sequestrante alguns parâmetros necessitam ser padronizados como: concentração da amostra e do radical; tempo de reação e comprimento de onda da leitura de absorbância.

O tempo de reação recomendado é de 30 minutos, mas existem trabalhos descrevendo 5 e 10 minutos (MOLINEUX, 2004). Dessa forma o ideal é acompanhar a cinética da reação até que se atinja o *plateau*. O tempo de reação tem sido proposto como um parâmetro importante na caracterização da atividade antioxidante.

A capacidade sequestrante (CS) tem sido expressa sob diferentes parâmetros como IC_{50} , IC_{100} ou porcentagem de DPPH reduzido. Entre eles, o mais recomendado é capacidade sequestrante em porcentagem e o seu cálculo é realizado de acordo com a equação:

$$\text{CS\%} = 100 \times \frac{(A_b - (A_{aa} - A_a))}{A_b}$$

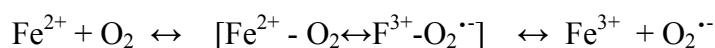
A_b : absorvância da solução de DPPH sem a presença do antioxidante. No lugar do antioxidante é acrescentado o veículo usado na sua preparação para atingir a mesma concentração final.

A_{aa} : absorvância da solução de DPPH com o antioxidante em teste.

A_a : absorvância da solução da amostra na mesma concentração final quando em solução com o radical, mas sem a presença do mesmo. Este item, acrescido à equação, permite retirar a possível interferência da cor da própria amostra.

1.3.4.2 Ferro – metal de transição importante em processos oxidativos

O ferro é o metal de transição mais abundante no corpo humano. As formas mais comuns para este metal de transição são Fe^{2+} e Fe^{3+} . Quando em solução, na presença de ar, o estado de oxidação mais estável é Fe^{3+} , considerando que sais de ferro são fracamente reduzidos e compostos Fe^{4+} são potentes agentes oxidantes. Se uma solução de um sal de Fe^{2+} for exposta ao ar sofrerá lenta oxidação para o Fe^{3+} de acordo com a equação (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007):



Complexos intermediários

A reação de Fenton é o principal exemplo do dano oxidativo catalisado por metais de transição. Nela a formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 depende essencialmente da catálise de íons ferrosos (Fe^{2+}) ou cuprosos (Cu^+). As formas férrica (Fe^{3+}) ou cúprica (Cu^{2+}) não promovem diretamente a decomposição do H_2O_2 a $\cdot OH$, mas podem ser diretamente reduzidas às formas iônicas catalíticas ao reagirem com radicais $O_2^{\cdot-}$. Essas duas reações podem ser acopladas à reação de Fenton, compondo a chamada reação de Haber-Weiss (FIGURA 16)

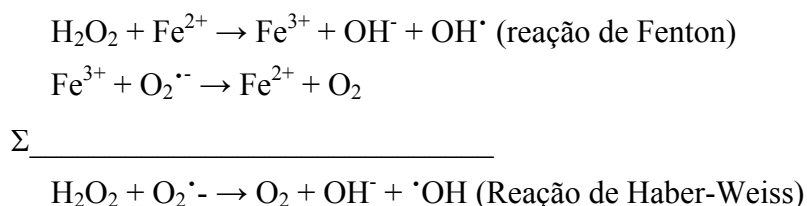


Figura 16 - Reação de Haber-Weiss.

Fonte: BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI (2006, p. 239)

O ferro é importante no estímulo da lipoperoxidação via reação de Fenton e/ou via decomposição de hidroperóxidos em radicais peroxila e alcoxila que podem abstrair o hidrogênio e perpetuar a reação em cadeia de peroxidação lipídica (GÜLÇİN; ALICI; CESUR, 2005).

Um bom antioxidante, considerando a relação ferro-dano oxidativo, seria um potente agente quelante, reduzindo assim a disponibilidade do ferro; ou compostos redutores capazes de inibir a autooxidação do Fe^{2+} e lipoperoxidação mediada pelo Fe^{+3} , uma vez que mantêm o ferro no seu estado reduzido, inibindo assim a formação do íon perferrila ou do complexo ferro-oxigênio (CHENG; LI, 2007).

1.3.4.2.1 Atividade quelante de íons ferro

A atividade quelante de íons ferro das amostras e padrões foi determinada de acordo com Tang et al. (2002). O ferrozine é um composto amplamente usado na determinação de Fe^{2+} , chegando a ser utilizado até na determinação de ferro sérico. Na presença de Fe^{2+} o ferrozine forma um complexo vermelho, cuja absorbância é determinada em espectrofotômetro a 562 nm. Na presença de um agente quelante, menos íon Fe^{2+} estarão disponíveis para a formação do complexo com o ferrozine o que resulta em um decréscimo da absorbância. No presente teste utilizou-se o EDTA (ácido etilenodiamina tetracético) como agente quelante padrão. A molécula é uma diamina substituída, altamente estável e com uma potente ação complexante de metais (OVIEDO; RODRÍGUEZ, 2003).

1.3.4.2.2 Poder redutor

O método de poder redutor é baseado na redução de Fe^{3+} do ferricianeto de potássio a Fe^{2+} . A espécie resultante da redução na presença de Fe^{3+} , acrescentado posteriormente através da adição de FeCl_3 , forma um complexo azul conhecido como azul da Prússia (FIGURA 17). Quanto maior o poder redutor, maior a formação do complexo azul e consequentemente maior será a absorbância determinada espectrofotometricamente a 700nm.

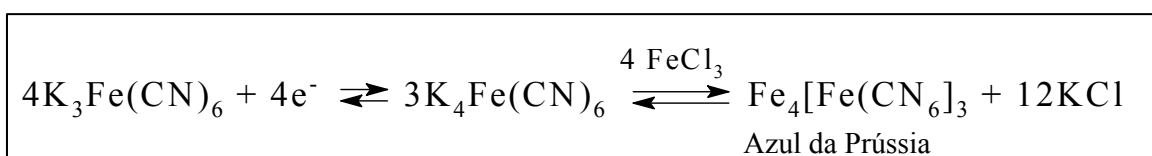


Figura 17 – Resumo da formação do complexo azul da Prússia.

Duas formas de apresentação dos dados são observadas na literatura: poder redutor relativo ao padrão ou poder redutor absoluto.

O poder redutor relativo considera a atividade do padrão como 100% e as amostras são calculadas relativamente ao padrão. Já o poder redutor absoluto expressa os resultados em valores de absorbância (FIGURA 18).

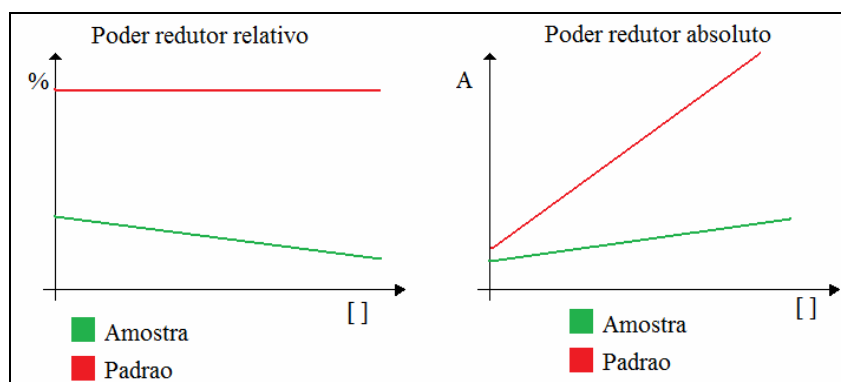


Figura 18 – Representação esquemática do poder redutor relativo e absoluto para uma amostra e um padrão hipotéticos.

Analisando a Figura 17, é possível verificar que o poder redutor absoluto é o método de representação mais precisa. Considerando que, com o aumento da concentração, tenha ocorrido uma resposta dose-dependente, esta relação é facilmente interpretada no método do poder redutor absoluto. Contudo ao representar os mesmos resultados de forma relativa, pode ocorrer uma interpretação errônea de perda de atividade com o aumento da concentração.

1.3.4.3 Lipoperoxidação

Quimicamente, como proposto por Boland e Ten-have (1947), o processo de lipoperoxidação (LPO) consiste em reações em cadeia, que classicamente são divididas em três fases: reação de iniciação, reação de propagação e reação de terminação (FIGURA 19).

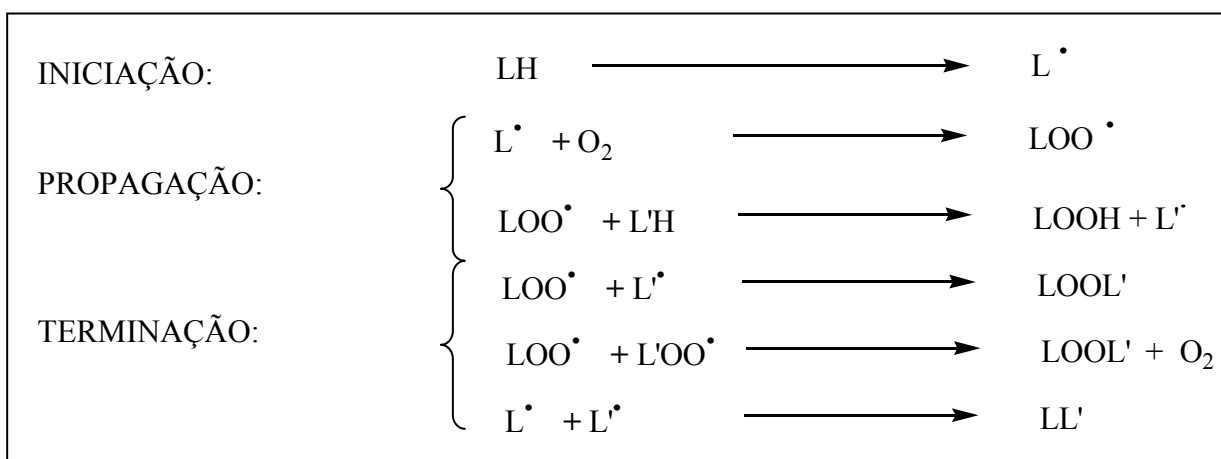


Figura 19 – fases da lipoperoxidação.

A reação entre o substrato, ou uma substância qualquer e o oxigênio (O_2) é termodinamicamente desfavorável e para isso é necessária uma primeira reação que gere um radical ($L^{\bullet}$). O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante na lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1988). Entretanto, estudos recentes indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessário uma relação equimolar $Fe^{+++} : Fe^{++}$ no meio, para que ocorra a lipoperoxidação (MINOTTI; AUST, 1987; HORTON et al., 1989). Pela indução dos íons ferro ocorre a conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcoxila, $LO^{\bullet}$ e peroxila, $LOO^{\bullet}$) que, por sua vez, iniciam novas cadeias de reações. Essas reações, que podem ser rápidas ou lentas, dependem da valência do ferro (BORG; SCHAICH, 1987), conforme Figura 20.

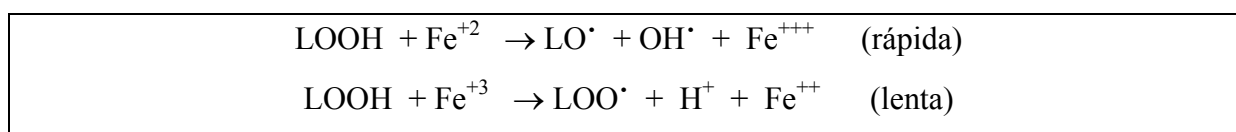


Figura 20 – Lipoperoxidação catalisada por íons ferro.

As reações de propagação acontecem em cadeia, até que haja a estabilização do radical representada pela etapa de terminação. Neste esquema os antioxidantes podem agir como a molécula L'H doando um radical H; o que leva posteriormente à formação de produtos estáveis além da redução das formas ativas do oxigênio.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs/ERNs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO FILHO et al., 1983). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído, culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

1.3.4.3.1 Lipoperoxidação *in vitro*

Durante a peroxidação lipídica é gerado malondialdeído (MDA), que representa cerca de 80% dos produtos oxidados produzidos por ataque de EROs a lipídeos celulares. Esse aldeído é capaz de reagir com o ácido tiobarbitúrico, formando um composto colorido que pode ser determinado espectrofotometricamente como descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990) (FIGURA 21).

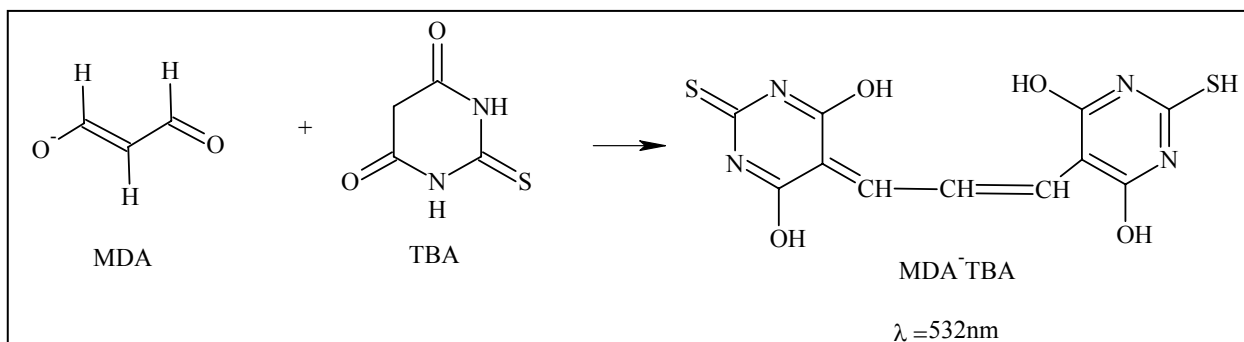


Figura 21 – reação entre o MDA e o TBA formando um composto colorido (MDA-TBA).

Uma das formas de estimular a lipoperoxidação *in vitro* é o uso de um hidroperóxido orgânico como o *terc*-butilidroperóxido. Ele se decompõe em um radical alcóxila e, conseqüentemente, as reações em cadeia de peroxidação lipídica são aceleradas. O *terc*-

butilidroperóxido é amplamente usado como modelo de indução de estresse oxidativo, uma vez que é facilmente obtido na forma pura (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O ascorbato, apesar de ser amplamente descrito como antioxidante, apresenta também a atividade *in vitro* pró-oxidante (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Como pode ser visto na Figura 22 o ascorbato, na presença de ferro (III) complexado ao EDTA e de peróxido de hidrogênio, gerou o radical hidroxila importante catalisador das reações de lipoperoxidação.

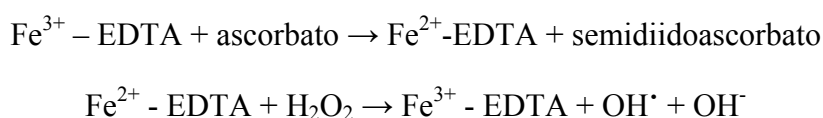


Figura 22 – Reações de formação de radicais hidroxila induzida pelo sistema ferro-ascorbato
Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE (2007, p. 164)

1.3.4.3.2 Lipoperoxidação *in vivo*

O fígado é o principal órgão de metabolização de xenobióticos, uma vez que são substratos para o citocromo P450 (COON et al., 1992). O tetracloreto de carbono foi o primeiro xenobiótico a ter comprovada como causa da sua injúria a produção de espécies reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O tetracloreto de carbono (CCl_4) foi primeiramente introduzido na prática médica em 1847 como anestésico, rapidamente foi abandonada devido às mortes relacionadas aos danos hepáticos induzidos pelo CCl_4 . O tetracloreto de carbono é extensamente utilizado em modelos animais de dano hepático (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O CCl_4 é metabolizado pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1) formando o radical triclorometila ($\text{CCl}_3^\bullet$), que é um radical de iniciação da peroxidação lipídica. A ação do $\text{CCl}_3^\bullet$ sobre os lipídeos gera produtos de oxidação que são responsáveis pelos danos hepáticos; entre eles cirrose, necrose e esteatose hepática (RECKNAGEL et al., 1989). Um grande número de pesquisadores demonstrou a relação entre o uso de antioxidantes e a diminuição, ou mesmo, prevenção do dano hepático induzido por tetracloreto de carbono, através da inibição da peroxidação lipídica (TESELKIN et al., 2000 apud JEON et al., 2003; LEE et al., 2007) e da

atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (OHTA et al., 1998; LIN, HUANG, 2000 apud JEON et al., 2003).

2 RESULTADOS

Como descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão e discussão ampla da literatura, seguida de artigos científicos referentes aos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa. Para tanto foram redigidos 4 artigos, um já publicado e os demais em fase de submissão (GOYATÁ, et al., 2006)

2.1 ARTIGO I

O artigo I mostra os resultados do isolamento e identificação de benzofenonas preniladas do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*.

O artigo foi publicado na Magnetic Resonance in Chemistry, Qualis A internacional e fator de impacto 1,610.

Referência: DEROGIS, P. B. M. C.; MARTINS, F. T.; DE SOUZA, T. C.; DE C. MOREIRA, M. E.; SOUZA FILHO, J. D.; DORIGUETTO, A. C.; DE SOUZA, K. R. D.; VELOSO, M. P.; DOS SANTOS, M. H. Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magn. Reson. Chem.**, v.46, p.278–282, 2008;

COMPLETE ASSIGNMENT OF THE ^1H AND ^{13}C NMR SPECTRA OF GARCINIAPHENONE AND KETO-ENOL EQUILIBRIUM STATEMENTS FOR PRENYLATED BENZOPHENONES

Priscilla B. M. C. Derogis,^a Felipe T. Martins,^b Thiago C. de Souza,^a Maria E. de C. Moreira,^c José D. Souza Filho,^d Antonio C. Doriguetto,^b Kamila R. D. de Souza,^a Marcia P. Veloso^a and Marcelo H. Dos Santos^a

This article reports the structural elucidation by IR, UV and MS spectroscopic data along with ^1H and ^{13}C NMR chemical shift assignments of two benzophenones isolated from the fruit pericarp of *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae): garciniaphenone, (1*R*,5*S*,7*S*)-3-benzoyl-4-hydroxy-6,6-dimethyl-5,7-di (3-methyl-2-butenyl) bicyclo [3.3.1] non-3-ene-2,9-dione, a novel triprenylated benzophenone; and 7-*epi*-clusianone, a tetraprenylated benzophenone that has already been extracted from another species of the same family. Furthermore, the keto-enol tautomeric equilibrium at solution-state was described for these compounds by 1D and 2D NMR spectral methods and one attempt to rationalize the different ratios between the noted tautomers was based on stereochemical features.

Keywords: ^1H NMR; ^{13}C NMR; *Garcinia brasiliensis*; polyprenylated benzophenones; garciniaphenone; 7-*epi*-clusianone; keto-enol tautomerism

Introduction

The Guttiferae family, also known as Clusiaceae, belongs to the angiosperm phylogeny group and it is characterized by the high lighted presence of latex in most of its species. This family possesses 47 genera (for instance: *Vismia*, *Garcinia*, *Clusia*, *Cratogeomys*, *Harungana*, *Mesua*, *Hypericum*, *Kielmeyera*) and more than 1000 species that are grouped in six subfamilies, which are widely spread all over Brazil.^[1] *Garcinia* or *Rheedea* is the most numerous genus of the Guttiferae family and it presents a marked diversity of metabolites, as for instance the oxygenated and prenylated phenol derivatives,^[2] including xanthenes,^[3] flavonoids,^[4-6] phenolic acids,^[7] and benzophenones.^[8] There is a great number of researchers dealing with compounds extracted from *Garcinia* species concerning biological properties, and the anti-inflammatory potentials of such substances are already known, which contribute to the antiphlogistic activity of resins from *Garcinia* species and explain the rational use of these plants in folk medicine.^[9,10]

Polyprenylated benzophenones are substances biologically active from Guttiferae family. Some of them were isolated from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea* as HIV-inhibitory compounds.^[11] Since then, these substances become a target of extensive studies, which are mainly focused in the screening for further pharmacological properties on various biological systems. In this way, polyprenylated benzophenones are also known to possess free radical scavenging,^[12] inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) expression inhibiting in colon carcinoma,^[13] apoptosis induction,^[14] antiulcer,^[12] antioxidant,^[15] trypanocidal,^[16,17] cytotoxic,^[18] antimicrobial, antifungal,^[19] and antitumoral^[20] properties. Furthermore, these compounds act as cancer chemopreventive,^[21] antiproliferative to the A2780 human ovarian cancer cell line^[22] and microtubule disassembly inhibitors.^[23] One of the benzophenones reported in this

study, 7-*epi*-clusianone, presents vascular effects on the rat aorta,^[15] anti-HIV property^[11] and *in vitro* activities against *Artemia salina* and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*.^[17]

Garcinia brasiliensis (syn. *Rheedia brasiliensis*), commonly known as ‘bacupari’, is used in folk medicine as a wound healing agent and for peptic ulcer, urinary, and tumor diseases treatments.^[24] Previous works have reported the presence of the biflavonoids, volkensiflavone, fukugetin,^[25] and prenylated xanthenes^[2] in methanolic extracts of *G. brasiliensis* roots. As part of our ongoing study on the chemical constituents of Brazilian medicinal plants, we have featured *G. brasiliensis*.

As a result of repeated column chromatography and repeated preparative thin layer chromatography, a new compound, named garciniaphenone (**1**), and 7-*epi*-clusianone (**2**) were isolated from the hexanic extract of *G. brasiliensis* fruit pericarp. In this article, we reported the structure elucidation by NMR, MS, UV, and IR techniques. These compounds are formed by a 2,4-dione enolizable system, which originates a keto-enol equilibrium in solution-state that was also reported and discussed in the present work.

a Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, Rua Gabriel Monteiro da Silva 714, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

b Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas – UNIFALMG, Rua Gabriel Monteiro da Silva 714, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

c Universidade José Rosário Vellano – UNIFENAS, Laboratório de Fitofármacos, Rod, MG-179, Km-0, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

d Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

Results and Discussion

The *G. brasiliensis* fruits pericarp were extracted with *n*-hexane. The two benzophenones were isolated from the hexanic extract, and then their structures were elucidated by several spectroscopic techniques.

Structure elucidation and conformational studies of garciniaphenone (**1**) and 7-*epi*-clusianone (**2**)

The molecular structures of compounds **1** and **2** were deduced using MS, ¹³C NMR and ¹³C DEPT NMR analyses, which were afterwards confirmed by comparison with data from literature.

The molecular formula of C₂₈H₃₄O₄ was assigned to garciniaphenone (**1**), a yellow crystalline solid presenting melting point of 105–107 °C, taking into account its mass spectrum (EIMS, *m/z* 434 [M]⁺) and elemental analysis. Its IR spectrum showed a hydroxyl band (3452 cm⁻¹), an aromatic one (3080 cm⁻¹), and two carbonyl bands [(1732 (nonconjugated) and 1681 cm⁻¹ (conjugated))]. Bands concerning aliphatic hydrogens (2966, 2919 and 2871 cm⁻¹) were also viewed in the IR spectrum. The UV spectrum of **1** has exhibited two absorption bands (248 and 281 nm) typical of an aromatic 1,3-diketone chromophore system.^[1,26,27]

¹H and ¹³C NMR chemical shift assignments of **1a** and **1b** tautomers (Fig. 1) were carried out in CDCl₃ solution by 2D shift correlated NMR methods, homonuclear ¹H, ¹H COSY and ¹H, ¹H NOESY, and heteronuclear ¹H, ¹³C HMQC (¹J_{CH}; coupling via one bond) and ¹H, ¹³C HMBC (*n*J_{CH}; *n* = 2 and 3, long-range coupling via two, ²J_{CH}, and three, ³J_{CH}, bonds) spectra. In addition, the results obtained by application of 1D and 2D NMR spectral methods

were compared with data previously reported in the literature for the 7-*epi*-clusianone (**2**) and hyperibone L^[27, 28]. Other possible tautomeric forms have not been observed in the spectra.

The ¹H NMR spectral data of **1** (Table 1) indicated the presence of signal set corresponding to two hydroxyl groups from the **1a** and **1b** forms [$\delta = 17.90$ and 17.35 ppm (¹H each, s, chelated, respectively)]. This relatively large difference between the δ H-values of hydroxyl groups from **1a** and **1b** forms ($\Delta\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{H-OH}}(\mathbf{1a}) - \delta_{\text{H-OH}}(\mathbf{1b}) = 0.55$ ppm) is expected, as compound **1** is an asymmetric molecule and the 2-OH group should experience more shielding than OH-4 in response to an electronic withdrawal by the isopentenyl group at C-5; such effect has been reported for hyperibone L., too.^[27] Once the number of signal set is correlated to the tautomeric forms of compounds containing enolizable systems, the occurrence of the keto-enol equilibrium at CDCl₃ solution is proved through identification of two tautomers, where each one of them assigns a signal set. The signals of hydrogen atom bonded to C-1 carbon, which had the highest spectral resolution among all hydrogen chemical shifts [$\delta = 2.95$ and 3.09 ppm (¹H each, s)], were integrated for quantification of tautomeric forms of **1a** and **1b**; the ratio of **1a**: **1b** was *ca* 1:5. Other prenylated benzophenones with a 1,3-diketone system present a similar behavior in solution, such as guttiferones A-E,^[11] clusianone, and 7-*epi*-clusianone.^[1,26] Furthermore, the ¹H NMR spectra showed that a benzene ring [$\delta_{\text{H}} = 7.52$ (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.47 and 7.42 ppm (2H each, d, $J = 7.6$ Hz)], two vinyl protons [$\delta_{\text{H}} = 5.12$ and 5.00 ppm (1H each, t, like m)], two methine [$\delta_{\text{H}} = 2.95$ (1H, s) and 1.49 ppm (1H, m)], three methylene [$\delta_{\text{H}} = 2.60$ (2H, m), 2.33 (1H, dd, $J = 14.8, 3.6$ Hz), 2.22 (1H, overlapped), 2.13 and 1.84 ppm (1H each, m)], and six methyl ones [$\delta_{\text{H}} = 1.71$ (6H, s), 1.67 , 1.53 , 1.28 and 1.21 ppm (3H each, s)] exist in the major tautomer **1b**. A similar signal set was discerned for the minor tautomer **1a** by its δ_{H} positions (Table 1) and signal intensities, highlighting that differences can be mainly seen at the chemical shifts of hydrogens bonded to C-1, C-6, C-17, C-18, C-19 and C-20, which are neighbors of enolizable system.

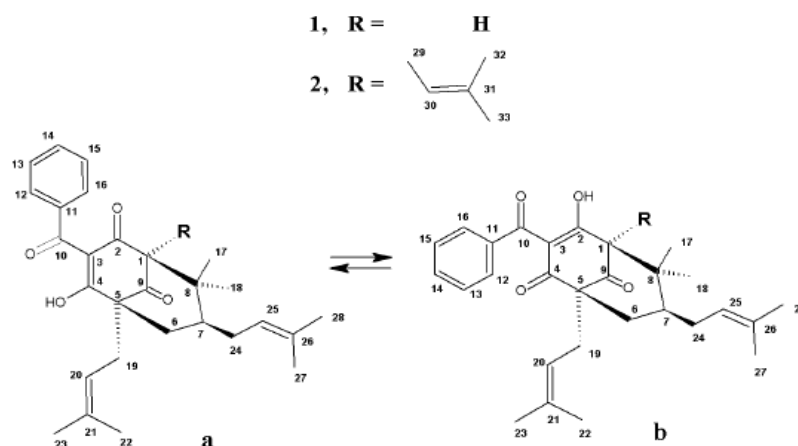


Figure 1. Possible tautomeric forms of compounds **1** and **2** at CDCl₃ solution

Position	1a		1b	
	¹ H (δ _H)	HMBC (¹³ C No.)	¹ H (δ _H)	HMBC (¹³ C No.)
1	2.95	[1H, s]	3.09	[1H, s]
2	—	—	17.35	[1H, brs, OH]
4	17.90	[1H, brs, OH]	—	—
6	2.222.33	[1H, overlap] [1H, dd (14.8; 3.6)]	2.002.12	[1H, dd, (14.0; 5.6)] [1H, dd (14.0; 4.8)]
7	1.49	[1H, m]	1.49	[1H, m]
12,14	7.47	[2H, d (7.6)]	7.57	[2H, d (7.6)]
13,15	7.42	[2H, d (7.6)]	7.38	[2H, d (7.6)]
14	7.52	[1H, t (7.6)]	7.52	t, J = 7.6
17	1.13	[3H, s]	1.28	[3H, s]
18	1.12	[3H, s]	1.21	[3H, s]
19	2.60	[2H, m]	2.532.40	[1H, dd, (14.0; 8.4)] [1H, dd, (4.0; 6.4)]
20	5.12	[1H, t, like m]	5.24	[1H, t, like m]
22	1.71	[3H, s]	1.66	[3H, s]
23	1.67	[3H, s]	1.76	[3H, s]
24	2.131.84	[1H, m] [1H, m]	2.131.84	[1H, m] [1H, m]
25	5.00	[1H, t, like m]	4.88	[1H, t, like m]
27	1.53	[3H, s]	1.45	[3H, s]
28	1.71	[3H, s]	1.63	[3H, s]

^a Measured in CDCl₃. Coupling constants J (in Hz) are given in parenthesis.

Comparative analyses of the ¹³CNMR and DEPT₁₃₅ NMR spectra of **1** (a mixture of the tautomers **1a** and **1b**) were used to identify the signals corresponding to quaternary (8 sp²-hybridized carbon atoms and 2 sp³-hybridized ones), methine (7 sp²-hybridized carbon atoms and 2 sp³-hybridized ones), methylene (3 sp³-hybridized carbon atoms) and methyl (6 carbons, where four of them are attached at sp²-hybridized carbon atoms and two are bonded to sp³-hybridized ones) carbon atoms in each tautomer (Table 2). HMQC and HMBC analysis allowed to assign the basic bicyclo[3.3.1]nonane-2,4,9-trione moiety^[8,29] with one benzoyl group attached to C-3 and two isopentenyl attached to C-5 and C-7. The tautomers **1a** and **1b** were assigned to be the 4-hydroxy and 2-hydroxy forms, respectively, using HMBC spectra (Table 1). Cross-peaks were observed between the OH-4 hydrogen and enol C-4 (δ = 200.2 and 197.0 ppm in **1a** and **2a**, respectively), C-5 and C-3 atoms. The carbon C-4 (in **1a** and **2a**) was clearly differentiated from C-2 in the spectra since it showed cross-peaks with the two protons H-6 and two H-19 whereas the C-2 carbonyl group (δ = 190.0 and 193.7 ppm in **1a** and **2a**, respectively) showed only correlations with the proton attached to C-1 (for **1a**). On the other hand, the hydrogen OH-2 in the tautomer **1b** showed correlations with C-1, C-2 and C-3 atoms. The discrimination of the enol carbons C-2 (δ = 193.4 and 197.3 ppm in **1b** and **2b**, respectively) from those of C-4 (δ = 194.1 and 193.6 ppm in **1b** and **2b**, respectively) was performed analogously. The H-1 hydrogen interactions in **1a** and **1b** with C-2, C-3, C-5, C-7, C-8 and C-9 allowed locating this atom precisely. Concerning the spectral assignment for compound **2**, it is important to emphasize that this compound has been previously extracted from another species of the same vegetal genus, *Garcinia gardneriana*, and it was already accurately characterized by NMR studies.^[26,28] ¹H,¹HCOSY and coupling constants of garciniaphenone confirm the proposed stereochemistry and conformational structure of the tautomers **1a** and **1b**, as can be noted from the correlations between H-6ax and H-6eq (J_H = 14–14.8 Hz), H-6ax and H-7 (J_H = 3.6–4.8 Hz), and H-6eq and H-7 (J_H = 5.6 Hz). The ¹H,¹HNOESY spectrum of the tautomers **1a** and **1b** revealed information concerning the spatial proximity (homonuclear dipolar coupling) between the hydrogen atoms, allowing to determine the configuration and conformation in CDCl₃. NOE effects (H-6ax/Me-18ax and H-6eq/H-7/Me-17eq) indicated an axial orientation of the isopentenyl group at C-7, as it is shown in Fig. 2.

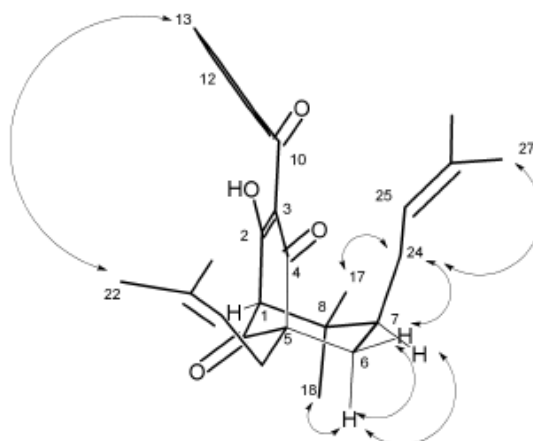


Figure 2. Selected ^1H , $^1\text{HNOESY}$ contacts in **1b**.

Similar results have been observed in 7-*epi*-clusianone (**2**).^[28] This configurational feature can be the reason for the higher proportion of the 2-hydroxy tautomeric relative to the 4-hydroxy form. In its axial position, the isopentenyl group forces the double bond at C-25 carbon to be close in space to the C-4 carbonyl, favoring an intramolecular contact between those groups.^[30] In view of that, the C-4 carbonyl group acting as electron donor to C-25 and C-26 carbons has a decreased electron density, which influences the covalent hydrogen bond to C-2-linked oxygen atom. Therefore, the intramolecular stabilization occurs by a quite strong H-bond between the hydroxyl group at C-2 and C-10 carbonyl moiety. This influence of the C-7 stereochemistry is strengthened when we look at clusianone,^[31,32] the epimer of **2**. In this case, the equatorial orientation of the isopentenyl group at C-7 keeps the double bond at C-25 carbon far away from the C-4 carbonyl.

Table 2. ^{13}C chemical shifts of the enolic tautomers of **1** (**1a** and **1b**)^a

Position	1a	1b
1	72.2	66.9
2	190.0	193.3
3	113.8	113.8
4	200.2	194.1
5	58.9	62.9
6	40.1	40.1
7	43.9	44.3
8	45.6	45.9
9	206.9	207.1
10	196.4	197.4
11	136.4	136.9
12,16	128.9	128.5
13,15	127.8	127.8
14	132.7	132.5
17	24.6	24.3
18	31.2	31.1
19	30.0	30.5
20	118.5	119.4
21	135.2	135.0
22	17.9	18.1
23	26.0	26.1
24	29.3	28.9
25	123.3	122.9
26	133.6	133.3
27	17.9	17.8
28	25.9	25.8

^a Measured in CDCl_3 .

In contrast to compounds **1** and **2**, the intramolecular interaction is hindered, and as a result, the nucleophilic character of the C4-bonded oxygen atom is enhanced allowing the covalent O–H bond to occur at this last oxygen atom. In this way, the prevalent tautomer of clusianone is that with a C-2 carbonyl.

Experimental

Instrumentation general methods

Melting points were determined on Mettler melting point apparatus FP 80 HT. UV spectra were determined on Shimadzu U- 2000 spectrophotometer. Infrared spectra were determined using KBr discs in a Shimadzu/IR-408 spectrophotometer. Mass spectra were obtained from a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a Shimadzu GCMS-QP5050A equipment connected to an ion trap detector operating in electron impact mode at 70 eV. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer-241 spectrophotometer; elemental analysis: PE 2400 Series II CHNS/O Analyzer Perkin Elmer Instruments.

NMR spectra

^1H and ^{13}C NMR spectra were obtained on a Bruker AVANCE DRX400 spectrometer operating at 400.1 MHz for ^1H and 100.6 MHz for ^{13}C . Compounds **1** and **2** were dissolved in either C_6D_6 (benzene-*d*₆) or CDCl_3 (chloroform-*d*) at 40 mg ml⁻¹ and transferred into a 5 mm NMR tube. Internal lock and TMS were used as internal reference. The one-dimensional ^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired under standard conditions on a 5 mm DUAL- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ direct probe. The 2D experiments were acquired and processed with XWIN-NMR software provided by Bruker on an Aspect X32 computer. Standard pulse sequences were used for ^1H , ^1H COSY spectra: P045°, SW8000 Hz, 1 K×128 acquisition and 1 K×512 processed. For homonuclear ^1H , ^1H -NOESY experiments, the NOESYTP program was used, after degassing the solution by bubbling N_2 . Two-dimensional hydrogen-detected heteronuclear shift correlation ^1H , ^{13}C HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) spectra were obtained by INVBTP program: $^1J_{\text{CH}} = 145$ Hz, f_2 32 000 Hz and f_1 8000 Hz, relaxation delay 2.0 s. Two-dimensional hydrogen-detected heteronuclear long-range correlation ^1H , ^{13}C HMBC (nJ_{CH} , $n = 2$ and 3) experiments were carried out with INV4LPLRND program: delay for evolution 70 ms (*d*₆), $nJ_{\text{CH}} = 7$ Hz, f_2 32 000 Hz and f_1 8000 Hz, relaxation delay 2.0 s. All pulse sequences are standard in the Bruker XWIN-NMR software. For all experiments, the temperature was maintained at 300 K.

Plant material and extract preparation

The fruits of *G. brasiliensis* were collected in the Campus of Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais State, Brazil and were identified by a botanist of UFV. The voucher specimen is deposited in Horto Botânico of UFV (number VIC2604). Dried and powdered *G. brasiliensis* fruit pericarps (1000 g) were extracted by maceration with 3.0 L of *n*-hexane at room temperature, filtered and then dried, using a rotary evaporator under reduced pressure at 45 °C. This procedure was repeated five times yielding an amount of 80 g of fruit pericarp hexanic extract (FPHE).

Isolation of benzophenones

FPHE was chromatographed on silica gel (230–400 mesh) column (8 × 100 cm) eluted with crescent polarity mixtures of *n*-hexane/ethyl-acetate and ethyl-acetate/ethanol to give 50

fractions. These fractions were then pooled in three groups according to their similarities in thin layer chromatography (TLC): FPHE-1 (10 g, a mixture of sesquiterpenes), FPHE-2 (20 g, resinous orange material) and FPHE-3 (30 g, a complex mixture). FPHE-2 was then washed with acetone leading to two distinct subfractions: an insoluble portion (FPHE-2I) containing 5 g of a mixture of hydrocarbons, and a soluble one (FPHE-2S), which has afforded a yellow resinous material after solvent evaporation. FPHE-2S was rechromatographed on a silica gel column as reported above to give 26 fractions, which were pooled in 5 groups [FPHE-2S(1–5)] according to similarities in TLC. FPHE-2S3 (1.8 g) was recrystallized several times using methanol solutions in order to yield 1.0 g of 7-*epi*-clusianone (**2**). FPHE-2S4 (8.0 g) was rechromatographed on a silica gel column as reported above to give 20 fractions, which were pooled in 7 groups [FPHE-2S4(A–F)]. Additional amount of the 7-*epi*-clusianone (1.0 g) was obtained from the groups FPHE-2S4A–B through recrystallization in methanol solution. FPHE-2S4C was recrystallized several times using methanol solutions to afford a yellow crystal (0.65 g), which was identified as the new prenylated benzophenone garciniaphenone (**1**). The other groups were identified as complex mixtures and substance isolation could not be achieved.

All groups were analyzed in TLC and revealed by vanillin-sulfuric acid reagent or FeCl_3 ethanolic solution. The purity of the compounds **1** and **2** (98.6 and 99.85%, respectively) and retention times (16.05 and 17.95 min, respectively) were determined by HPLC (Shimadzu LC-10A), using a C18 column (150–4.6 mm) with 5 μm particle size. The suitable gradient was achieved using MeOH: acetic acid 5% pH 3.84 (40 : 60 v/v) to MeOH 100% in 10 min with a solvent flow rate of 1.2 ml/min at 30 °C. The UV detector was set at 254 nm. Class VP-LC10 software was used for data collection and acquisition.

Garciniaphenone (**1**)

Yellow needles (CHCl_3); mp 105–107 °C (MeOH); $[\alpha]_{25}^D -52.8$ (*c* 0.1, CHCl_3); UV (MeOH, 0.1%) λ_{max} (log ϵ) 247 (4.18), 281 (4.12) nm; IR (KBr) ν_{max} 3085, 2966, 2919, 2871, 1732, 1681, 1600, 1540, 1373 cm^{-1} ; *anal.* C 77.42%, H 7.83%, calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_4$, C 77.35%, H 7.86%; EIMS m/z 434 $[\text{M}]^+$ (14), 375 (16), 191 (4), 105 (84), 69 (100). ^1H and ^{13}C NMR data are in Tables 1 and 2.

7-*epi*-clusianone (**2**)

Yellow needles (CHCl_3); mp 92–93 °C (MeOH); $[\alpha]_{25}^D +60$ (*c* 0.1, CHCl_3); UV (MeOH, 0.1%) λ_{max} (log ϵ) 249 (4.12), 284 (4.12) nm; IR (KBr) ν_{max} 3080, 2970, 2900, 2860, 1725, 1670, 1600, 1470, 1385 cm^{-1} ; elemental analysis: C 78.88%, H 8.37%, calc for $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_4$, C 78.80%, H 8.37%; EIMS m/z (%) 502 $[\text{M}]^+$ (5), 433 (100), 309 (53), 105 (21), 69 (15); ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ = 18.24 (1H, brs, OH), 18.36 (1H, brs, OH), 1.24 (1H, m, H-7a), 1.2 (1H, m, H-7b), 7.60 (3H, m, H-12, H-16a, H-16b), 7.00 (m), 7.0 (m), 7.07 (m), 7.1 (m), 5.58 (t, like m), 5.28 (t, like m), 4.81 (t, like m), 4.79 (t, like m), 5.57 (t, like m), 5.69 (t, like m), 2.09 (dd, 14.4, 7.2), 2.29 (dd, 14.4, 1.2), 1.86 (dd, 14.0, 6.7), 2.18 (dd, 14.0, 2.3), 2.89 (m), 2.65(m), 2.19 (m), 2.19 (m), 2.75 (m), 2.62 (m), 0.81 (s), 0.86 (s), 1.07 (s), 1.14 (s), 1.70 (s), 1.71 (s), 1.56 (s), 1.45 (s), 1.50 (s), 1.40 (s), 1.60 (s), 1.53 (s), 1.71 (s), 1.67 (s), 1.71 (s), 1.67 ppm (s). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 116.6 (C-3a), 115.7 (C-3b), 197.0 (C-4a), 193.6 (C-4b), 58.6 (C-5a), 63.3 (C-5b), 48.4 (C-8a), 48.9 (C-8b), 208.3 (C-9a), 208.2 (C-9b), 68.7 (C-1a), 65.7 (C-1b), 193.7 (C-2a), 197.3 (C-2b), 197.3 (C-10a), 196.6 (C-10b), 136.9 (C-11), 134.7 (C-21), 133.7 (C-26a), 132.8 (C-26b), 134.9 (C-31), 46.4 (CH-7a), 46.6 (CH-7b), 129.0 (CH-12a,16a), 128.0 (CH-13a,15a), 127.9 (CH-12b,13b,15b,16b), 132.3 (CH-14a), 132.8 (CH-14b), 119.8 (CH-20a), 120.2 (CH-20b), 124.1 (CH-25a), 122.9 (CH-25b), 119.0

(CH-30a), 118.6 (CH-30b), 39.1 (CH₂-6a), 40.3 (CH₂-6b), 30.5 (CH₂-19a), 30.7 (CH₂-19b), 28.9 (CH₂-24), 27.2 (CH₂-29a), 26.8 (CH₂-29b), 26.9 (CH₃-18a), 27.0 (CH₃-18b), 22.5 (CH₃-17a), 22.8 (CH₃-17b), 26.1 (CH₃-23a), 26.2 (CH₃-23b), 25.9 (CH₃-28a), 25.7 (CH₃-28b), 17.9 (CH₃-27a), 17.8 (CH₃-27b), 18.1 (CH₃-32), 26.0 (CH₃-33a), 26.1 (CH₃-33b), 18.2 (CH₃-22a), 18.1 ppm (CH₃-22b). Both ¹H and ¹³C NMR data exist in the literature^[26,28].

Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto do Milênio – Inovação e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos (IM-INOVAR, 420015/05-1) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support.

References

- [1] Piccinelli AL, Rubio OC, Chica MB, Mahmood N, Pagano B, Pavone M, Barone V, Rastrelli L. *Tetrahedron* 2005; **61**: 8206.
- [2] Monache GD, Botta B, Mello JF, Coelho JSB, Menichini F. *J. Nat. Prod.* 1984; **47**: 620.
- [3] Bennett GJ, Lee HH. *Phytochemistry* 1989; **28**: 967.
- [4] Crichton EG, Waterman PG. *Phytochemistry* 1979; **18**: 1553.
- [5] Cotterill PJ, Scheinmann F, Stenhouse IA. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1978; **1**: 532.
- [6] Warren PA, Chexal KK, Handa BK, Rahman W. *Tetrahedron* 1971; **27**: 1625.
- [7] Gunatilaka AAL, Sotheeswaran S, Sriyan HTB, Waight ES. *Tetrahedron Lett.* 1982; **23**: 2987.
- [8] Rubio OC, Padron A, Castro HV, Pizza C, Rastrelli L. *J. Nat. Prod.* 2001; **64**: 973.
- [9] Weng JR, Tsao LT, Wang JP, Wu RR, Lin CN. *J. Nat. Prod.* 2004; **67**: 1796.
- [10] Dharmaratne HRW, Piyasena KGNP, Tennakoon SB. *Nat. Prod. Res.* 2005; **19**: 239.
- [11] Gustafson KR, Blunt JW, Munro HGM, Fuller RW, McKee CT, Cardellina JH, McMahon JB, Cragg GM, Boyd MR. *Tetrahedron* 1992; **48**: 10093.
- [12] Yamaguchi F, Saito M, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. *J. Agric. Food Chem.* 2000; **48**: 2320.
- [13] Tanaka T, Kohno H, Shimada R, Kagami S, Yamaguchi F, Kataoka S, Ariga T, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 1183.
- [14] Pan MH, Chang WL, Shiao SYL, Ho CT, Lin JK. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1464.
- [15] Cruz AJ, Lemos VS, Santos MH, Nagem TJ, Cortes SF. *Phytomedicine* 2006; **13**: 442.
- [16] Abe F, Nagafuji S, Okabe H, Akahane H, Muñiz EE, Reyes MH, Chilpa RR. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; **27**: 141.
- [17] Alves TMA, Alves RO, Romanha AJ, Santos MH, Nagem TJ, Zani CL. *J. Nat. Prod.* 1999; **62**: 369.
- [18] Chaturvedula VSP, Schilling JK, Kingston DGI. *J. Nat. Prod.* 2002; **65**: 965.
- [19] Rubio OC, Cuellar AC, Rojas N, Castro HV, Rastrelli L, Aquino R. *J. Nat. Prod.* 1999; **62**: 1013.
- [20] Carballo DD, Seeber S, Strumberg D, Hilger RA. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2003; **41**: 622.
- [21] Ito C, Itoigawa M, Miyamoto Y, Onoda S, Rao KS, Mukainaka T, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H. *J. Nat. Prod.* 2003; **66**: 206.
- [22] Cao S, Brodie PJ, Miller JS, Ratovoson F, Birkinshaw C, Randrianasolo S, Rakotobe E, Rasamison VE, Kingston DGI. *J. Nat. Prod.* 2007; **70**: 686.

- [23] Roux D, Hadi HA, Thoret S, Guenard D, Thoison O, Paies M, Sevenet T. *J. Nat. Prod.* 2000; **63**: 1070.
- [24] Corrêa MP. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1926–1978.
- [25] Botta B, McQuhae MM, Monache GD, Monache FD, Mello JF. *J. Nat. Prod.* 1984; **47**: 1053.
- [26] Santos MH, Queiroz MEL, Nagem TJ, Oliveira TT, Braz-Filho R. *Quím Nova* 1999; **22**: 654.
- [27] Tanaka N, Takaishi Y, Shikishima Y, Nakanishi Y, Bastow K, Lee K, Honda G, Ito M, Takeda Y, Kodzhimatov OK, Ashurmetov O. *J. Nat Prod.* 2004; **67**: 1870.
- [28] Santos MH, Nagem TJ, Braz-Filho R, Lula IS, Speziali NL. *Magn. Reson Chem.* 2001; **39**: 155.
- [29] Santos MH, Speziali NL, Nagem TJ, Oliveira TT. *Acta Crystallogr.* 1998; **C54**: 1990.
- [30] Ettlinger MG, Watson KJ, Jaroszewski JW. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; **116**: 1557.
- [31] Rodeschini V, Ahmad NM, Simpkins NS. *Org. Lett.* 2006; **8**: 5283.
- [32] Nuhant P, David M, Pouplin T, Delpech B, Marazano C. *Org. Lett.* 2007; **9**: 287.

2.2 ARTIGO II

O artigo II descreve os resultados da avaliação da atividade antioxidante *in vitro* benzofenonas preniladas isoladas a partir do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*.

O artigo será submetido à publicação na Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Qualis A internacional.

Determinação da atividade antioxidante *in vitro* de benzofenonas

Priscilla Bento Matos Cruz Derogis^{1*}, Kamila Rezende Dazio¹, Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão², Marcelo Henrique dos Santos¹

¹ Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas-MG, CEP:37130-000, Brasil.

² Departamento de Ciências Exatas, Laboratório de Bioquímica, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas-MG, CEP:37130-000, Brasil.

* P. B. M. C. Derogis, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas-MG, CEP:37130-000, Brasil. E-mail: priscillabmcruz@hotmail.com

Resumo

As benzofenonas poliisopreniladas 7-epi-clusianona e garciniafenona foram isoladas do extrato hexânico do pericarpo de Rheedea brasiliensis. No presente estudo, foi determinada a atividade antioxidante in vitro através de diferentes testes tais como, poder redutor, atividade sequestrante de radicais DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil) e quelante de metais. Os resultados obtidos mostram uma correlação positiva entre a ação do extrato hexânico e de suas benzofenonas. A 7-epi-clusianona mostrou-se mais ativa no sistema de seqüestro de radicais livres, já a garciniafenona foi mais ativa como agente quelante de íons Fe^{2+} . Por sua atividade antioxidante, extrato e benzofenonas poderão futuramente ser usadas como agentes profiláticos importantes no combate a doenças relacionadas a radicais livres.

Palavras- chave: 7-epi-clusianona, garciniafenona, guttiferona-A, antioxidante.

INTRODUÇÃO

A família Guttiferae, também conhecida como Clusiaceae, pertence à classe das angiospermas e é caracterizada pela presença significativa de látex na maioria de suas espécies. Um grande número de benzofenonas poliisopreniladas ou seus derivados têm sido isolados desta família (PICCINELLI et al., 2005). 7-*epi*-clusianone e garciniafenona são duas benzofenonas poliisopreniladas com o anel biciclo[3.3.1]noneno, cuja única diferença é a presença de um grupamento prenila em C5. Santos et al., em 1999, isolaram pela primeira vez a 7-*epi*-clusianona dos frutos de *Rheedia gardneriana*, identificando-a através de diferentes métodos como RMN, IV, EM e raio-X. A esta substância foram atribuídas as atividades antianafilática (NEVES et al., 2007), vasodilatadora (CRUZ et al., 2006), anti-HIV (PICCINELLI et al., 2005), *in vitro* contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Artemia salina* (ALVES et al., 1999). A garciniafenona foi recentemente isolada dos frutos de *Rheedia brasiliensis* e sua estrutura foi elucidada por diferentes métodos de análise orgânica.

Recentemente, a função dos radicais livres e das espécies reativas de oxigênio em várias doenças, incluindo câncer, arteriosclerose, artrite reumática, doenças inflamatórias, tem se tornado conhecida. Há também evidências de que a oxidação pode induzir o envelhecimento celular. Assim, pesquisas sobre a possível contribuição que os antioxidantes presentes na dieta podem ter na prevenção de doenças têm sido levadas a cabo, uma vez que estas substâncias são capazes de remover ou prevenir a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Embora a geração dessas espécies seja importante mecanismo de defesa, em concentrações excessivas elas podem causar danos aos tecidos (MATIUCCI, 1998). Diante disso é importante o estudo da atividade antioxidante de plantas pertencentes à flora brasileira; como uma forma de conhecer melhor o vasto conjunto de compostos que estão presentes nas plantas brasileiras e como forma de buscar novos constituintes ativos

farmacologicamente. Por este motivo, o presente estudo visa a avaliação da atividade antioxidante do extrato do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* e das duas benzofenonas isoladas a partir dele.

Materiais e Métodos

Reagentes.

Butil-hidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico, radical 1,1- difenil-2-picrilidrazila (DPPH[•]), 3-(2-Piridil)-5,6-bis(ácido 4-fenil-sulfônico)-1,2,4-triazino (Ferrozine), e ácido tricloroacético (TCA). Todos os reagentes utilizados estavam em grau PA e foram obtidos da Sigma-Aldrich, Merck ou VETEC.

Material vegetal, preparo do extrato e isolamento dos compostos.

O processo de extração, isolamento e identificação dos compostos foi realizado como descrito por Derogis et al., 2008. Obtendo-se assim o extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*, a garciniafenona (FIGURA 1, composto 1) e 7-*epi*-clusianona (FIGURA 1, composto 2).

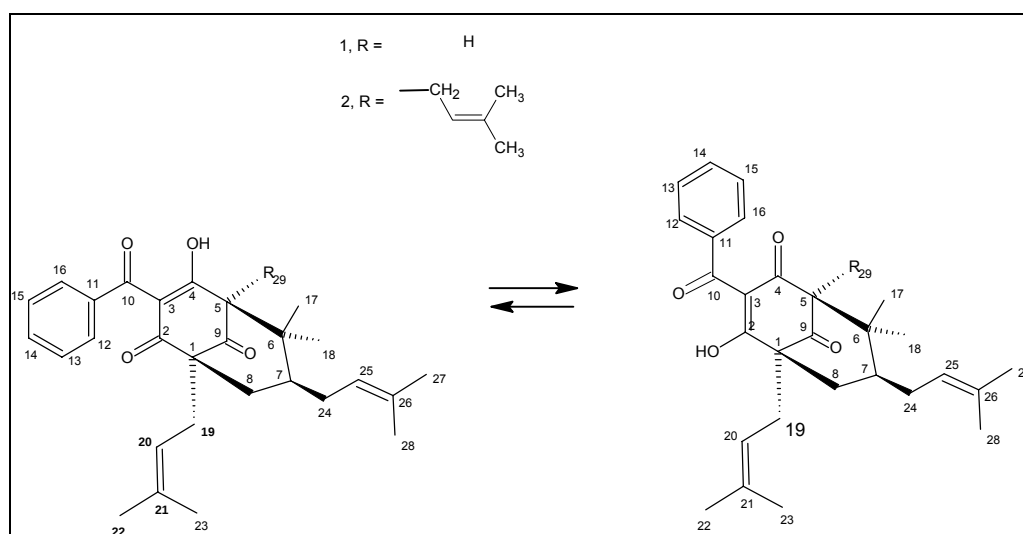


Figura 1: Possível tautomerismo para os compostos garciniafenona (1) e 7-*epi*-clusianona (2).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atividade sequestrante de radicais DPPH

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen et al. (2005) com modificações. Adicionaram-se 4,0 mL da solução das amostras a serem testadas a 1,0 mL de solução do radical DPPH (0,5 mM) . A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção de luz, por 30 minutos. Logo após, foram lidas as absorbâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Quanto menor a absorbância maior será a capacidade sequestrante. O cálculo da capacidade sequestrante (CS) seguiu a equação

$$\% \text{ CS} = \frac{\text{A controle negativo} - \text{A amostra}}{\text{A controle negativo}} \times 100$$

A controle negativo

Controle negativo: 4.0 mL etanol e 1.0 mL da solução de DPPH

Atividade quelante de íons ferro II

A atividade quelante de íons Fe^{2+} foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tang et al., 2002, com modificações. Uma alíquota de 1 mL das amostras foi transferida para tubos de ensaio âmbar de 25 mL. A esta alíquota foram adicionados 3,7mL solução hidroalcoolica; 0,1 mL de FeSO_4 2 mM e 0,2 mL de ferrozina 5 mM (3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenil-sulfônico)-1,2,4-triazina). A mistura foi agitada e após 20min foi feita a leitura a 562 nm. A baixa absorbância indica atividade quelante. O padrão utilizado foi o EDTA. A atividade quelate (%AQ) das amostras foi calculada segundo a equação:

$$\% \text{ AQ} = \frac{\text{Ab} - \text{Aa}}{\text{Ab}} \times 100$$

Onde Ab é absorvância do branco (solução FeCl₂, ferrozine e solução hidroalcoólica) e Aa é absorvância da solução contendo o padrão ou os compostos testados

Poder redutor

Uma alíquota de 1,0 mL de amostra foi transferida para tubos de ensaio de 25,0 mL. A esta alíquota foi adicionado: 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6); 2,5 mL de K₃[Fe(CN)₆] (1%). A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Uma porção de 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) foi adicionada à solução no tubo de ensaio, com posterior agitação. Em seguida, centrifugar-se-á a solução a 3000 por 10 min. Uma quantidade de 2,5 mL da mistura foi pipetada e transferida para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl₃ (0,1%). A leitura da absorvância foi realizada a 700 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Uma elevada absorvância indica grande poder redutor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade sequestrante de radicais DPPH

Existem diversos métodos para avaliar a capacidade antioxidante de um composto, entre eles estão a determinação da atividade seqüestrante do radical DPPH[•], quelante de metais e o poder redutor. Devido à complexidade do processo oxidativo, um antioxidante pode ser protetor em um sistema e falhar ou mesmo aumentar o processo de dano em outro sistema (ARUOMA; HALLIWELL; WILLIAMSON, 1997). Por este motivo, é aconselhável sempre o uso de diferentes metodologias a fim de avaliar a capacidade antioxidante do composto teste. Assim, o extrato hexânico, a garciniafenona e a 7-*epi*-clusianona foram avaliadas quanto à atividade antioxidante em 3 testes *in vitro*.

A atividade sequestrante de radicais DPPH[•] é considerado um método válido e simples de avaliação da atividade antioxidante, uma vez que se trata de um radical estável e que não precisa ser gerado assim como em outros testes de avaliação da atividade sequestrante, além disso é considerado o teste rápido (SANCHEZ-MORENO, 2002; GÜLÇİN, ALICI, CESUR, 2005). O método baseia-se na redução do radical DPPH[•] na sua hidrazina correspondente, através da sua reação com doadores de hidrogênio (CONTRERAS-GUZMÁN; STRONG, 1982 apud SANCHEZ-MORENO, 2002). Em solução metanólica, ou etanólica, ao se reduzir, o radical, que era roxo, transforma-se em uma hidrazina de cor amarela e tal transformação é caracterizada pelo decréscimo na absorbância que é acompanhado espectrofotometricamente a 517 nm.

Diferentes autores usam concentrações e tempo de reação diferentes, por este motivo foram realizadas 2 curvas a 25 ppm e 400 ppm para o comportamento cinético dos compostos e assim determinar o melhor tempo de leitura (Figura 2). Tais curvas foram realizadas a fim de determinar o tempo necessário para atingir o plateau da ação sequestrante para todos os compostos. Como pode ser observado na Figura 2 o ácido ascórbico atinge o plateau praticamente no primeiro minuto assim como descrito por Aruoma, Halliwell e Williamson (1997) que o considera o composto de cinética rápida. Já o BHT, descrito como sendo de cinética lenta, dependendo da concentração em uso ele varia sua ação de 40 min a 25 ppm para 30 min a 400 ppm. As amostras a 25 ppm não apresentaram diferença significativa nos diferentes tempos; já a 400 ppm parecem não ter atingido um plateau de reação. Considerando-se o comportamento dos padrões e das amostras determinou-se um tempo ideal de 30 minutos para a determinação da atividade sequestrante dos diferentes compostos nas diferentes concentrações.

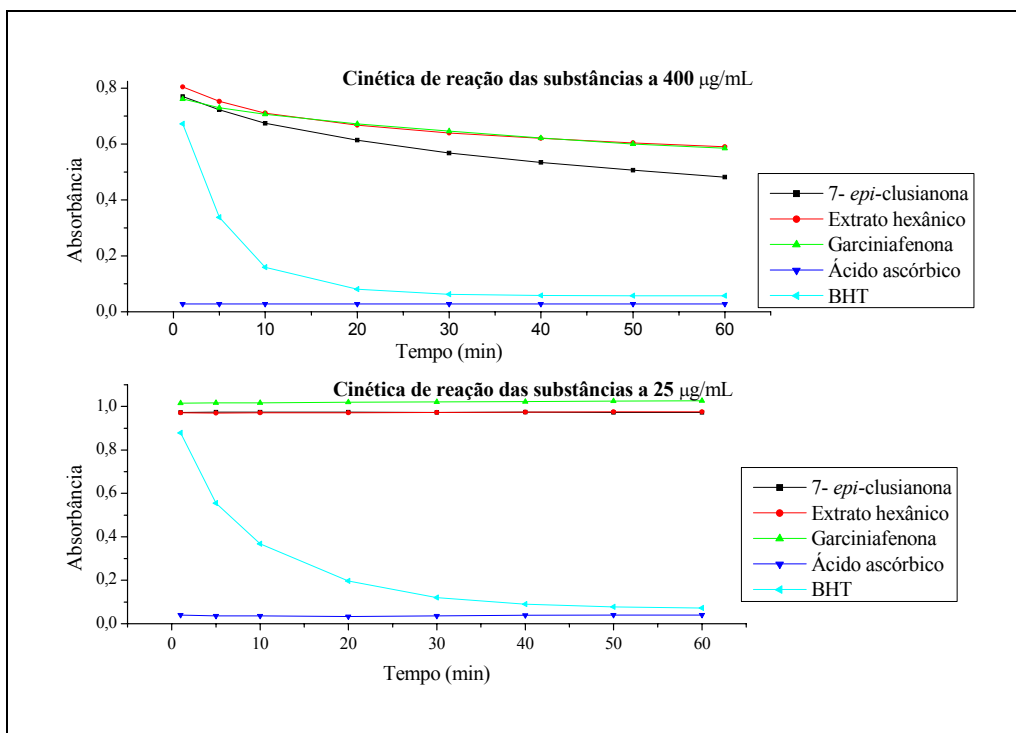


Figura 2 - Comportamento cinético do extrato hexânico, das benzofenonas e dos padrões frente ao DPPH.

Como pode ser observado na Figura 3, nas concentrações testadas não houve diferença na atividade sequestrante para o ácido ascórbico. A 25 ppm a 7-epi-clusianona ($4.04 \pm 0.55\%$) foi significativamente ($p < 0.01$) mais ativa que o extrato e a garciniafenona, não existindo diferença significativa entre os mesmos. Em tal concentração o BHT e o ácido ascórbico foram 4,88 e 23,8 x, respectivamente, mais ativos que a 7-epi-clusianona. O extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*, as benzofenonas e o BHT apresentaram uma atividade antioxidante tipo dose-dependência. Os valores de IC_{50} para a 7-epi-clusianona, o extrato hexânico e a garciniafenona foram iguais a 827,25, 988,23 e 1333,09 µg/mL, respectivamente. Através destes valores podemos sugerir que a atividade sequestrante do extrato se deve provavelmente à presença da 7-epi-clusianona. É importante acrescentar que a 7-epi-clusianona é o principal componente do extrato. A única diferença estrutural entre 7-

epi-clusianona e a garcinafenona é grupamento prenila na posição 1, o que nos leva a concluir que este é essencial para a atividade das benzofenonas poliisopreniladas.

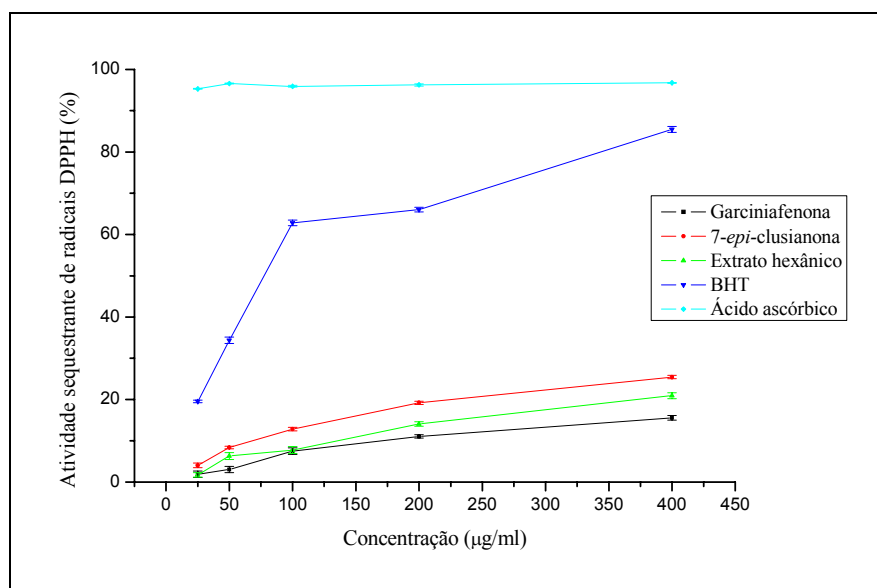


Figura 3 - Atividade sequestrante das benzofenonas, do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* e dos padrões (ácido ascórbico e BHT) frente ao radical DPPH*.

O número e configuração dos grupos hidroxil doadores de H em compostos fenólicos é importante para a atividade sequestrante de radicais livres (SOBRATTE et al., 2005). Já foi descrito para os flavonóides a presença do grupamento 3-OH no anel C e do grupamento catecol no anel B como essencial para a atividade sequestrante, assim como descrito para a quercetina (RICE-EVANS, 1995) e os biflavonóides isoladas de pinheiro, *Araucaria angustifolia* (YAMAGUCHI, et al., 2005). A nemorosona, uma poliisoprenilada benzofenona isolada de própolis, no estudo realizado por Cuesta-Rubio, et al., 2002, apresentou um IC₅₀ relativo à atividade sequestrante de radicais DPPH igual a $22,2 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$. A 7-*epi*-clusianona apresentou capacidade sequestrante 37,26 x menor que a nemorosona, a possível justificativa para tal diferença é a presença de 2 grupamentos hidroxila no anel B na estrutura da nemorosone, que assim como para a estrutura dos flavonoides é essencial para a atividade antioxidante. Derogis et al., em submissão, mostraram a importância das hidroxilas na

estrutura das benzofenonas para atividade sequestrante uma vez que a guttiferona-A, que possui as hidroxilas, apresentou IC₅₀ 10 x menor que a 7-*epi*-clusianona.

Atividade quelante de íons ferro II

O ferro é um metal importante que pode estimular a lipoperoxidação via reação de Fenton e acelerar a peroxidação via decomposição lipídica de hidroperóxidos em radicais peroxila e alcóxila que podem abstrair o hidrogênio e perpetuar a reação em cadeia de lipoperoxidação (GÜLÇİN; ALICI; CESUR, 2005). A atividade quelante de íons ferro das amostras e padrões foi determinada de acordo com Tang et al., 2002. O ferrozine é um composto amplamente usado na determinação de Fe²⁺, chegando a ser utilizado até na determinação de ferro sérico. Na presença de Fe²⁺ o ferrozine forma um complexo vermelho, cuja absorbância é determinada em espectrofotômetro a 562nm. Na presença de um agente quelante, menos íon Fe²⁺ estarão disponíveis para a formação do complexo com o ferrozine o que resulta em um decréscimo na absorbância. No presente teste usou-se o EDTA como agente quelante padrão. No presente estudo, observou-se que todas as amostras e o padrão interferiram na formação do complexo ferrozine-Fe²⁺, através da complexação com íons ferro que se traduz na diminuição da absorbância (FIGURA 4). Tal ação é variável de acordo com a concentração da amostra. O IC₅₀ da capacidade quelante de metais do EDTA, garciniafenona, do extrato hexânico e 7-*epi*-clusianona foi de 33,02, 410,68, 941,00 e 1003,14, respectivamente. No estudo realizado por Gülçin, Alici e Cesur, 2005, o propofol, um composto fenólico usado como agente hipnótico intravenoso demonstrou uma atividade de 77% a 50µg/ml, na mesma concentração a amostra mais ativa foi a garciniafenona (17,96%). Contudo, diferentemente do propofol a garciniafenona não apresentou plateau de ação, pelo contrário chegou a uma capacidade quelante igual a 52,38 ± 0,39% a 400µg/ml.

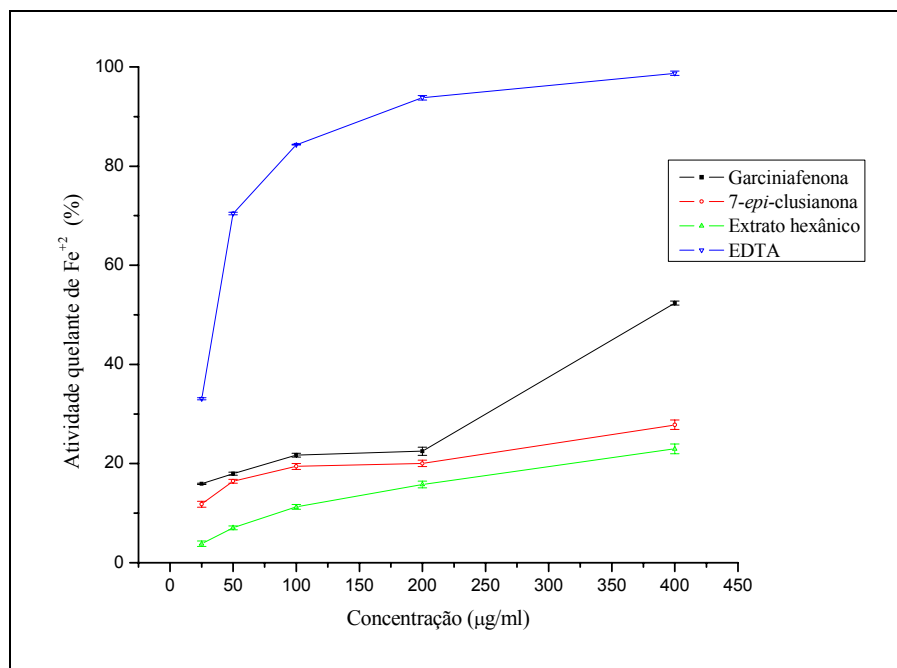


Figura 4 - Atividade quelante de ions Fe^{2+} do extrato, benzofenonas e EDTA em diferentes concentrações.

É importante notar, que o comportamento dos compostos frente a atividade quelante foi diferente da atividade sequestrante de radicais $\text{DPPH}^{\bullet}$. No teste da atividade sequestrante a garciniafenona foi o composto menos ativo, já no teste da atividade quelante foi o mais ativo. Esta variação de atividade mostra o que foi anteriormente citado que um antioxidante pode ser mais ou menos ativo dependendo do sistema/modelo utilizado.

Os resultados sugerem que a garciniafenona pode exercer uma maior ação protetora em sistemas de peroxidação lipídica induzida por íons Fe^{2+} .

Poder redutor

O método de poder redutor é baseado na redução de Fe^{3+} do ferricianeto de potássio a Fe^{2+} . A espécie resultante da redução na presença de Fe^{3+} , acrescentado posteriormente através da adição de FeCl_3 , forma uma complexo azul conhecido como azul da Prússia.

Quanto maior o poder redutor, maior a formação do complexo azul e consequentemente maior será a absorbância determinada espectrofotometricamente a 700 nm. O extrato e as benzofenonas, nas concentrações testadas, não apresentaram uma formação do complexo muito significativa (FIGURA 5). Apesar da baixa atividade, o aumento de concentração resultou em um incremento do poder redutor. Contudo, a amostra mais ativa foi a 7-*epi*-clusianona que apresentou uma formação de complexo cerca de 11 x menor que o BHT e 19 x que o ácido ascórbico.

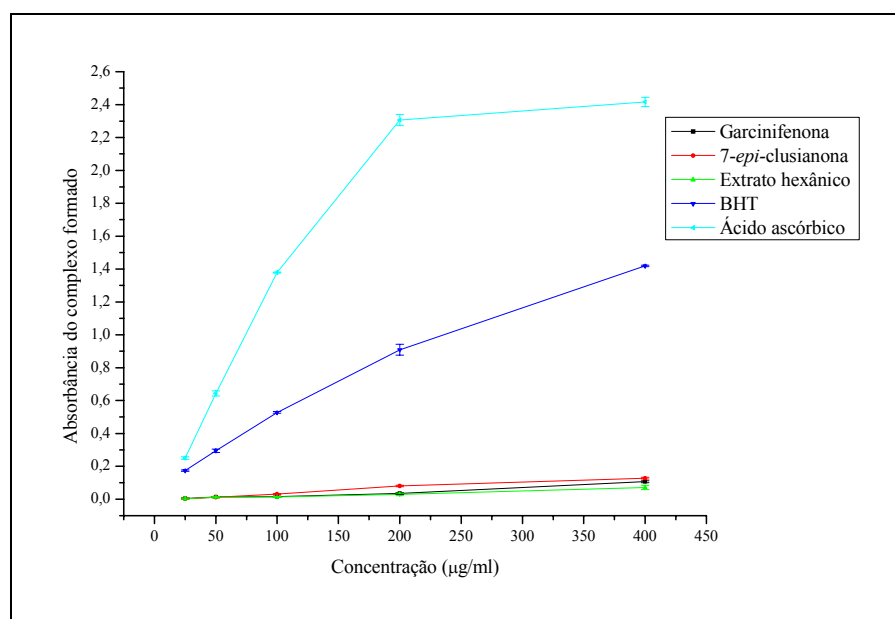


Figura 5 - Formação do complexo azul da Prússia das benzofenonas, o extrato e os padrões (BHT e ácido ascórbico). Quanto maior a absorbância, maior é a formação do complexo e consequentemente maior é o poder redutor.

Blázovics et al., 2003, demonstraram que o extrato de *Sempervivum tectorum* a 500 µg/ml apresenta um poder redutor semelhante a 50 µg/ml do ácido ascórbico. Considerando a mesma concentração do ácido ascórbico, por regressão linear, mostra-se que seriam necessários cerca de 1900 µg/ml de 7-*epi*-clusianona. Assim como no estudo de Derogis et

al., em submissão, verificou-se uma resposta tipo dose-dependência nas concentrações testadas, apesar de com o incremento das concentrações existir uma redução de poder redutor relativamente aos padrões.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante mostram uma correlação positiva entre a ação do extrato hexânico e de suas benzofenonas. A 7-*epi*-clusianona mostrou-se mais ativa no sistema de seqüestro de radicais livres, já a garciniafenona foi mais ativa como agente quelante de íons Fe^{2+} . Por apresentarem tais ações, as benzofenonas testadas poderão ser úteis no combate de doenças relacionadas a processos oxidativos. Contudo, testes adicionais precisam ser realizados.

Evaluation of in vitro antioxidant activity of benzophenones

ABSTRACT

The polyisoprenilated benzophenones 7-epi-clusianone and garciniaphenone had been isolated from hexanic extract of Rheedea brasiliensis pericarp. In the present study, it was investigated the in vitro antioxidant activity by different methods, like reducing power, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil) radical scavenging and metal quelating activity. The results shows a positive correlation between hexanic extract activity and its benzophenones. 7-epi-clusianone presented more action in the free radicals scavenging system.. The garciniaphenone was more active as chelating agent of Fe^{2+} . Because of its antioxidant activity, the extract and benzophenones could be used, in the future, as important prophylactic agents in the combat of free radicals related illnesses.

Key-words: 7-*epi*-clusianone, garciniaphenone, guttiferone-A, antioxidant

REFERÊNCIAS

- ALVES, T. M. A. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal of natural products**. Washington, v.62, n.2, p.369-371, fev. 1999.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; WILLIAMSON, G. *In vitro* methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of nonnutritive substance in plant foods. IN: ARUOMA, O. I.; CUPPETT, S. L. **Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro concepts**. Urbana: AOCS Press, 1997.
- BLÁZOVICS, A. et al. Reducing power of the natural polyphenols of *Sempervivum tectorum* in vitro and in vivo. **Acta Biologica Szegediensis**. v.47, n.1-4, p.99-102, 2003.
- CONTRERAS-GUZMÁN, E. S.; STRONG, F. C. Determination oftocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.65, p.1215–1222, 1982 apud SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8; p.121-137, 2002
- CRUZ, A. J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, Inglaterra, v.13, n.6, p.442–445, 2006.
- CUESTA RUBIO, O. et al. A Polyisoprenylated Benzophenone from Cuban Própolis. **J. Nat. Prod.** v.62, n.7, p.1013 -1015, 1999
- DEROGIS, P. B. M. C. et al. Antioxidant activities of *Rheedia* polyprenylated benzophenones. Em fase de submissao.

- DEROGIS, P. B. M. C. et al. Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance Chemistry**, v.46, p.278–282, jan. 2008.
- GÜLÇİN, İ.; ALICI, H. A; CESUR, M. Determination of *in vitro* Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. **Chemical & Pharmaceutical bulletin**, v.53, n.3281, p.281-285, 2005
- MATIUCCI, C. A. R. **Atividade antioxidante *in vitro* em plantas com propriedades medicinais**. 1998. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998
- NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic Properties of 7-Epiclusianone, a Tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, Alemanha, v.73, p.644-649, jun. 2007.
- OVIDO, C.; RODRÍGUEZ, J. EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.6, p.901-905, 2003.
- PICCINELLI, A. L. et al. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, v.61, p.8206–8211, 2005
- RICE-EVANS, C. **Plant polyphenols: free radical scavenger or chain-breaking antioxidants? Free radicals and oxidative stress: environment, drugs and food additives**. London, England: Portland Press, 1995, p.103-116
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8; p.121-137, 2002
- SANTOS, M. H. et al. 7-epi-clusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.5, p.654-660, 1999

SOBRATTE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, v.579, p.200-213, 2005

TANG, S. Z. et al. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v.76, n.1, p.45-51, 2002

YAMAGUCHI, L. F. et al. Biflavonoids from brazilian pine *Araucária angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v.66, p.2238-2247, 2005

YEN. W.J.; CHANG, L.W.; DUH, P.D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Science and Technology**, v.38, n.3, p.193-200, 2005

YILDIRIM, A.; OKTAY, M.; BILALOGLU, V. The antioxidant activities of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk., J. Med. Sci.*, v.31, p.23-27, 2001. apud YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.4083-4089, 2001

2.3 ARTIGO III

O artigo III descreve os resultados da avaliação da atividade antioxidante segundo diferentes modelos de benzofenonas preniladas isoladas a partir de diferentes espécies do gênero *Rheedia*.

O artigo foi submetido à Food Chemistry, Qualis A internacional e fator de impacto 2,433, no dia 11 de abril de 2008.

Antioxidant activities of *Rheedia* polyprenylated benzophenones

Priscilla B. M. C. Derogis^{1*}, Tainá M. S. Castro², Thiago C. de Souza¹, Tanus J. Nagem³,
Paulo C. Stringheta⁴, Máisa R. P. L. Brigagão², Marcelo H. dos Santos¹

¹ Departamento de Farmácia, Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal, UNIFAL-MG, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas-MG, CEP:37130-000, Brazil.

² Departamento de Ciências Exatas, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil.

³ Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, MG, Brazil

⁴ Departamento de Química, UFOP, Ouro Preto, MG, Brazil.

Corresponding author

Priscilla B. M. C. Derogis. e-mail: priscillabmcruz@yahoo.com.br; phone: (+55)-35-32991109; Fax: (+55)-35-32991067

Abstract

The antioxidant properties of two polyisoprenilated benzophenones (guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone), isolated from fruits of genus *Rheedia*, were evaluated in different *in vitro* and *ex vivo* models. 7-*epi*-clusianone presented a lower capacity to scavenging the DPPH radical and a lower reducing power than guttiferone-A. Both natural compounds were able to inhibit linoleate peroxidation and presented action close to butylated hydroxytoluene. The ability of benzophenones to counteract oxidative tissue damage was measured by the production of thiobarbituric acid-reactive substances. The antioxidant effectiveness of the benzophenones was better in the Fe^{3+} -ascorbate than in the tert-butylhydroperoxide-induced system, which suggests that the antioxidant action mechanism is associated with the chelating property of iron in Fenton-type reactions. Finally, the higher efficacy of guttiferone-A can be related to the presence of hydroxyl groups on the structural ring, which are absent in the chemical structure of the 7-*epi*-clusianone.

Keywords: guttiferone-A; 7-*epi*-clusianone; *Rheedia*: benzophenone; antioxidant

INTRODUCTION

Despite oxygen having a vital function for aerobic organisms, it has been known for some time that it can be harmful to plants, animals or bacteria, mainly when it is supplied at high concentrations. This detrimental potential is associated to its intermediates, known as reactive oxygen species (ROS), because some ROS are able to induce powerful cellular effects. Thus, ROS damage plant tissues and consequently inhibit chloroplast development, seed viability and root growth. In animal cells, ROS overproduction is associated with several diseases such as neurodegeneration, among others (Halliwell & Gutteridge, 1999; Finkel & Holbrook, 2000).

Tissue damage can result from ROS-mediated oxidative alteration of fatty acids, known as lipoperoxidation. This process initiates redox chain reactions from polyunsaturated fatty acids (PUFAs) because allylic hydrogen is abstracted by a free radical. When carbon-centred lipoperoxidation occurs, it forms conjugated dienes, lipid hydroperoxides and other degradation products such as alkanes, isoprostanes and aldehydes (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Antioxidants prevent oxidative damage in lipid molecules in different ways. They can decrease oxygen concentration, intercept ROS, prevent first-chain initiation by scavenging initial radicals such as hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), catalyze metal ions, decompose primary products to non-radical products, and prevent hydrogen abstraction from substrates. In general, the production and scavenging of ROS are balanced in a healthy body. If there is some alteration in the regular mechanism of some enzymes, such as superoxide dismutase or catalase, or even depletion of low molecular mass endogenous antioxidants, (e.g. glutathione, ascorbate and tocopherol), the quantity of ROS activity in the body can increase too much (Valco, Rhodes, Moncol, Izkovic & Zura, 2006).

It is possible that exogenous scavengers of ROS might be beneficial for human health and the prevention of several diseases. The beneficial effects of plant food consumption have been associated, in part, to the presence of antioxidants in plants, which can reduce the risk of cardiovascular diseases, cancer and cataracts, among other degenerative diseases (Shahidi, 1996).

Rheedia (*R.*) or *Garcinia* is the most numerous genus of the Clusiaceae family which includes about 400 species widely distributed in Asia, Africa, New Caledonia, Polynesia and Brazil. *Garcinia* species are known to be rich in oxygenated and prenylated phenol derivatives (Bennett & Lee, 1988), like isoprenylated benzophenones (Cuesta-Rubio, Padron, Castro, Pizza & Rastrelli, 2001). Some of them exhibit various biological attributes such as antifungal, anti-inflammatory (Gopalakrishnan, Banumathi & Suresh, 1997), antitumoral (Díaz-Carbalho, Seeber, Strumberg & Hilger, 2003) antioxidant (Ngouela et al., 2006) and antianaphylactic properties (Neves et al., 2007).

In this paper we describe the isolation and identification of two isoprenylated benzophenones from *R.* genus fruit, as well as their antioxidant capability, which was tested using different models.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Chemicals. H₂O₂ (35%), iron (III) chloride and trichloroacetic acid (TCA), ascorbic acid, 2-thiobarbituric acid (TBA), EDTA, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), linoleic acid, 1,1',3,3'-tetramethoxypropane, tert-butylhydroperoxide, butylated hydroxytoluene (BHT) from Sigma (St, Luis, MO) and sodium ascorbate from VETEC (Rio de Janeiro, Brazil). Column chromatography was carried out over silica gel using AR grade

solvents. The studies were carried out using compounds that we isolated from the extracts of the *Garcinia* species.

General Instrumentation Methods. Melting points were determined on a Mettler melting point apparatus FP 80 HT. UV spectra were determined on a Shimadzu U-2000 spectrophotometer; infrared spectra were determined using KBr discs in a Shimadzu/IR-408 spectrophotometer; ^1H and ^{13}C NMR spectra were run on a Bruker spectrometer equipped with a 5mL ^1H and ^{13}C probe operating at 400.1 and 100.6 MHz, respectively, with TMS as the internal standard. Mass spectra were obtained from a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), using Shimadzu GCMS-QP5050A equipment connected to an ion detector operating in Electron Impact mode at 70eV. Optical rotation: Perkin-Elmer-241 spectrophotometer.

Plant material and preparation of extracts. *Rheedia gardneriana* and *Rheedia brasiliensis* fruits were collected in the *Campus* of Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais State, Brazil and identified by a botanist of UFV. The voucher specimens were deposited in Horto Botânico at UFV. The dried and powdered seeds (600g) of *R. gardneriana* fruit and the powdered pericarp of *R. brasiliensis* (1000g) fruit were extracted with *n*-hexane at room temperature. The extracts were evaporated under reduced pressure and 84g of hexanic extract of *R. gardneriana* fruits (EHG) and 80g of hexanic extract of *R. brasiliensis* fruits (EHB) were obtained.

Isolation of benzophenones. The EHG was chromatographed on a silica gel column eluted with *n*-hexane, ethyl-acetate and ethanol in order to result fifty fractions that were rejoined in three groups for similarity in TLC (thin layer chromatography): EHG-1 (10.02g, a

mixture of sesquiterpenes), EHG-2 (20.0g resinous orange material). EHG-2 was washed with acetone and two portions were obtained. The insoluble portion was constituted by 5.0g of a mixture of hydrocarbons. The soluble portion, after solvent evaporation, was purified from a methanol solution in order to isolate the guttiferone-A (Figure 1) (11.0g) as a yellow crystalline solid.

As described by Neves et al. (2007), 7-*epi*-clusianone was isolated using EHB chromatography (Figure 2). (The structures were identified by spectroscopy analysis and by comparison with literature data.

Antioxidant activity

Radical scavenging activity. Hydrogen donating activity was quantified in the presence of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) stable radical on the basis of Blois method (1958). The degree of discoloration of DPPH indicates the scavenging efficacy of the extracts. Total antioxidant capacity was measured according to the spectrophotometric method (Govindaranjan et al., 2003). 4.0 mL solution of samples (1-200 ppm in ethanol) or equivalent ascorbated concentrations were added to 1.0mL of ethanolic solution of DPPH (0.5mM). After vigorous shaking, the reaction was kept at room temperature for 30 minutes. The absorbance at 517nm was measured with the corresponding blanks. The scavenging activity was calculated using the expression:

$$\% \text{ scavenging activity} = \frac{A_{\text{negative control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{negative control}}} \times 100$$

A negative control

Negative control: 4.0 mL ethanol and 1.0 mL DPPH

Reducing power. The reducing power test was based on the Yen and Chen method. The formation of the complex “Prussian blue” indicates the reducing power of the extract. Extracts (1-200 ppm) in 1 mL of ethanol were mixed with 2.5mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL potassium ferricyanide [$K_3(CN)_6$] (1%), then the mixture was incubated at 50°C for 30 minutes. Afterwards, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 3.000 rpm for 10 minutes. Finally, 2.5 mL of the upper layer solution was mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of $FeCl_3$ (0.1%) and the absorbance was measured at 700nm (Yen & Chen, 1995). Increased absorbance of the reaction mixture indicated an increase of the reducing power.

Linoleic acid system-thiocyanate method. In the thiocyanate method, the amount of peroxides formed in emulsion during incubation is determined spectrophotometrically by absorbance measurement at 500 nm. Higher absorbance indicates higher concentration of formed peroxides. 1 mL of 0.02 M linoleic acid in ethanol and 2.0 mL of phosphate buffer solution (pH 7.0) were added to a wide range of concentrations (1-200ppm) of BHT, 7-*epi*-clausianone and guttiferone-A. Then the vials were incubated in an oven at 45°C where the reactions were taking place. At regular time incubations (24h), a 0.1 mL aliquot was added to 0.1 mL of 30% NH_4SCN and 0.1 mL $FeCl_2$ mM. After precisely 3 minutes of vigorous shaking, the absorbance at 500 nm was measured (Kikuzaki & Nakatani, 1993).

Tert-butylhydroperoxide- and Fe^{3+} -ascorbate-induced tissue lipid peroxidation test. The protocol for this study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG, Alfenas, MG, Brazil, and the procedures were conducted according to the Guide for Use and Care of Laboratory Animals (NIH, 1985). Wistar male rats (250-300g) were obtained from local breeding colonies at the UNIFAL-MG, and were

housed with free access to standard laboratory food and water. Animals were killed by cervical dislocation and, after cardiac perfusion, livers were dissected out and immediately used for whole homogenate preparation in 150mM KCl-Tris HCl buffer, pH 7.2, to determine thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels (Esterbauer & Cheeseman, 1990). The homogenates were centrifuged (2.400 xg, 2 min, 4°C) and aliquots from supernatants (2-5 mg protein/mL) were separated. The aliquots were added to the benzophenones and to the standard chemical antioxidant BHT at the concentrations of (0-200 µg/mL). Lipid peroxidation was induced by the addition of 4mM tert-butylhydroxide or 100 µM FeCl₃, 100mM EDTA, 1mM H₂O₂ and 50 mM ascorbate. Solutions of FeCl₃, H₂O₂ and ascorbate were made immediately before use (Caillet, Yu, Lessard, Lamoureux, Ajdukovic & Lacroix, 2007). The samples were incubated at 37°C for 30 minutes. At the end of this incubation period, 0.01 mL of 5% (w/v) butylated hydroxytoluene (BHT) in ethanol was added to each reaction to prevent any posterior artifactual oxidation. The reaction mixtures received the addition of 20% (w/v) trichloroacetic acid and 0.7% (w/v) TBA in HCl 0.25N and heated to 100°C for 30 minutes. The chromogen was extracted into 2 mL of *n*-buthanol and the extent of peroxidation was measured in the organic layer in a Milton Roy spectrophotometer, model Spectronic Genesys 5, (535 nm, $\epsilon=153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using 1,1',3,3'tetramethoxy propane as the standard (Brown & Kelly, 1996). Appropriate blanks with or without *tert*-butylhydroperoxide or Fe³⁺-ascorbate mixture were simultaneously processed. Protein concentrations were determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard. Results were expressed as µmol/TBARS/mg protein.

Statistical analysis. All of the data was expressed as a mean $\pm$ s.d. from at least three separated experiments (repetitions) performed in triplicate. The ANOVA test for unpaired observation between controls and experimental samples and Tukey's test for multiple

comparisons were conducted to evaluate statistical differences; p values of 0.05 or less were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification of the benzophenones. The two substances found in this study were identified by infrared-ultraviolet, mass spectra data and the NMR spectra data. The ^1H and ^{13}C NMR spectra, together with one and two-dimensional correlations and interactions (HMQC, HMBC e NOESY), allowed us to assign the structure of the poliprenylated benzophenone guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone at tautomeric equilibrium (Figure 1 and 2) that soon after was confirmed by comparison with data from literature (Gustafson, 1992, Santos, 1999).

Guttiferone-A (Figure 1): yellow crystalline solid. M.P.: 120-123°C (MeOH). $[\alpha]_{\text{D}} = +47.6^\circ$ (c1.00, CHCl_3); IR (KBr) ν_{max} : 3450, 1730, 1670, 1600 cm^{-1} . UV (MeOH, 0.1%) λ_{max} (ϵ): 228 (9960), 280 (15615), e 354 (4142) nm. IE/MS m/z (%) 602 (1), 533 (22), 341 (42), 231 (34), 189 (9), 137 (26), 109 (11), 69 (100). The NMR data are as follows: ^1H NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ_{H} 7.87 (1H, *d*, $J=2.1$ Hz, H-12), 7.61 (1H, *dd*, $J=2.1$ and 8.3 Hz, H-16), 7.41 (1H, *d*, $J=8.3$ Hz, H-15), 5.76 (1H, *m*, H-20), 5.56 (1H, *m*, H-30), 5.20 (1H, *m*, H-25 and H-35), 3.04 (2H, *m*, H₂-24), 2.92 (2H, *m*, H₂-19 and H₂-29), 2.60 (2H, *m*, $J=14.2$ Hz, H₂-8a; *m*, H₂-8b), 2.33 (2H, *dd*, $J=2.3$ and 14.2 Hz, H₂-8a) 2.06 (1H, *m*, H-7), 2.06 (2H, *m*, H₂-34), 2.00 (2H, *m*, H₂-18), 1.79-1.59 (3H, *m*, H₃-22, H₃-23, H₃-27, H₃-28, H₃-32, H₃-37 and H₃-38), 1.52 (3H, *s*, H₃-17a), 1.01 (3H, *s*, H₃-17b); ^{13}C NMR (100MHz, pyridine- d_5) δ_{C} 210.08 (C-9a), 201.73 (C-9b), 196.32 (C-10b), 195.95 (C-10a), 191.67 (C-2), 191.19 (C-4a), 191.10 (C-4b), 153.46 (C-14a), 147.24 (C-13b), 147.17 (C-13a), 143.14 (C-14b), 134.05 (C-31a), 133.85 (C-21a), 133.28(C-21b), 133.39 (C-31b), 132.67 (C-26a), 132.08 (C-36a), 131.50 (C-26b),

131.17 (C-36b), 130.46 (C-11), 126.26 (CH-35a), 125.85 (CH-35b), 125.07 (CH-25a), 124.45 (CH-16a), 124.06 (CH-16b), 123.74 (CH-25b), 122.06 (CH-30), 121.80 (CH-20b), 121.00 (CH-20a), 119.03 (C-3), 117.46 (CH-12), 115.78 (CH-15a), 115.66 (CH-15b), 69.25 (C-5b), 62.90 (C-1b), 68.15 (C-5a), 61.25 (C-1a), 50.53 (C-6a), 49.83 (C-6b), 41.83 (CH₂-8b), 40.83 (CH-7b), 40.70 (CH-7a), 38.75 (CH₂-8a), 37.00 (CH₂-18b), 36.60 (CH₂-18a), 31.68 (CH₂-29a), 31.48 (CH₂-29b), 29.86 (CH₂-19), 26.54 (CH₂-24b), 26.42 (CH₂-24a), 26.29 (CH₃-27a), 26.26 (CH₃-27b), 26.15 (CH₃-23 and CH₃-33), 26.00 (CH₃-38a), 25.96 (CH₃-38b), 24.81 (CH₂-34b), 23.28 (CH₂-34a), 19.00 (CH₃-17a), 18.68 (CH₃-32), 18.56 (CH₃-28b), 18.48 (CH₃-28a), 18.46 (CH₃-22a), 18.38 (CH₃-37b), 17.95 (CH₃-37a), and 16.52 (CH₃-17b).

7-*epi*-clusianone (Figure 2): yellow crystalline solid. M.P. 92–93 °C (MeOH); [α]₂₅ D + 60 (c 0.1, CHCl₃); UV (MeOH, 0.1%) λ_{max} (log ϵ) 249 (4.12), 284 (4.12) nm; IR (KBr) ν_{max} 3080, 2970, 2900, 2860, 1725, 1670, 1600, 1470, 1385 cm⁻¹; elemental analysis: C 78.88%, H 8.37%, calc for C₃₃H₄₂O₄, C 78.80%, H 8.37%; EIMS m/z (%) 502 [M]⁺ (5), 433 (100), 309 (53), 105 (21), 69 (15); ¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) δ = 18.24 (1H, brs, OH), 18.36 (1H, brs, OH), 1.24 (1H, m, H-7a), 1.2 (1H, m, H-7b), 7.60 (3H, m, H-12, H-16a, H-16b), 7.00 (m), 7.0 (m), 7.07 (m), 7.1 (m), 5.58 (t, like m), 5.28 (t, like m), 4.81 (t, like m), 4.79 (t, like m), 5.57 (t, like m), 5.69 (t, like m), 2.09 (dd, 14.4, 7.2), 2.29 (dd, 14.4, 1.2), 1.86 (dd, 14.0, 6.7), 2.18 (dd, 14.0, 2.3), 2.89 (m), 2.65(m), 2.19 (m), 2.19 (m), 2.75 (m), 2.62 (m), 0.81 (s), 0.86 (s), 1.07 (s), 1.14 (s), 1.70 (s), 1.71 (s), 1.56 (s), 1.45 (s), 1.50 (s), 1.40 (s), 1.60 (s), 1.53 (s), 1.71 (s), 1.67 (s), 1.71 (s), 1.67 ppm (s). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 116.6 (C-3a), 115.7 (C-3b), 197.0 (C-4a), 193.6 (C-4b), 58.6 (C-5a), 63.3 (C-5b), 48.4 (C-8a), 48.9 (C-8b), 208.3 (C-9a), 208.2 (C-9b), 68.7 (C-1a), 65.7 (C-1b), 193.7 (C-2a), 197.3 (C-2b), 197.3 (C-10a), 196.6 (C-10b), 136.9 (C-11), 134.7 (C-21), 133.7 (C-26a), 132.8 (C-26b), 134.9 (C-31), 46.4 (CH-7a), 46.6 (CH-7b), 129.0 (CH-12a,16a), 128.0 (CH-13a,15a), 127.9 (CH-12b,13b,15b,16b), 132.3 (CH-14a), 132.8 (CH-14b), 119.8 (CH-20a), 120.2 (CH-20b),

124.1 (CH-25a), 122.9 (CH-25b), 119.0 (CH-30a), 118.6 (CH-30b), 39.1 (CH₂-6a), 40.3 (CH₂-6b), 30.5 (CH₂-19a), 30.7 (CH₂-19b), 28.9 (CH₂-24), 27.2 (CH₂-29a), 26.8 (CH₂-29b), 26.9 (CH₃-18a), 27.0 (CH₃-18b), 22.5 (CH₃-17a), 22.8 (CH₃-17b), 26.1 (CH₃-23a), 26.2 (CH₃-23b), 25.9 (CH₃-28a), 25.7 (CH₃-28b), 17.9 (CH₃-27a), 17.8 (CH₃-27b), 18.1 (CH₃-32), 26.0 (CH₃-33a), 26.1 (CH₃-33b), 18.2 (CH₃-22a), 18.1 ppm (CH₃-22b).

Antioxidant activity. During the last decade, natural antioxidants, particularly phenolics, have been under a circumstantial study as potential therapeutic agents against a wide range of diseases including neurodegenerative diseases, cancer, diabetes, cardiovascular dysfunctions, inflammatory diseases and also aging. The medicinal actions of phenolics is mostly ascribed to their antioxidant capacity, free radical scavenging, chelation of redox active metal ions, modulation of gene expression and interaction with cell signaling pathways.

The free radical scavenging and antioxidant activities of phenolics depend on the arrangement of functional groups about the nuclear structure. The number and configuration of H-donating hydroxyl groups are the main structural features influencing the antioxidant capacity of phenolics (Sobratte, Neergheen, Luximon-Ramma, Aruoma & Bahorun, 2005). Flavonoids have the ability to act as antioxidants by a free radical scavenging mechanism with the formation of less reactive flavonoid phenoxyl radicals (Hanasaki, Ogawa & Fukui, 1994). Alternatively, these compounds may inactivate metal ions by complexation, thereby suppressing the superoxide-driven Fenton reaction. Among the flavonoids, the presence of 3-OH in the ring structure, as well as the catechol moiety in the ring, increase their capacity to scavenge $\cdot\text{OH}$, such as quercetin (Rice-Evans, 1995) and biflavonoids from brazilian pine *Araucaria angustifolia* (Yamaguchi, Vassão, Kato & Mascio, 2005).

The antioxidant activity of the two compounds was evaluated using different tests.

Radical scavenging activity. The compounds presented free radical scavenging activity by the DPPH assay with value ranging between 2% and 26% at 1 ppm, 13.4% and 96.4% at 50 ppm, and 12% and 98.2% at 200 ppm. The concentration of the antioxidant needed to decrease 50% of the initial substrate concentration (IC_{50}) is a parameter widely used in order to measure antioxidant power. The lowest IC_{50} values for BHT, ascorbate, guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone were 37.2, 6.9, 41.8 and 446.3 μ M, respectively (Table 1). As can be seen in Table 1, the ascorbate was the most efficient compound in the discoloration of the DPPH solution. It is important to emphasize that the guttiferone-A was significantly ($p < 0.001$) 10 times more active than 7-*epi*-clusianone. The former benzophenone showed scavenging capability near BHT values.

Just for ascorbate and guttiferone-A, at higher concentrations, the bleaching ability of the DPPH solution was nearly complete. Ascorbic acid is a well known antioxidant, and the guttiferone-A showed reasonably good free radical scavenging activity, which depends on the concentration used, as described by Ngouela et al. (2006).

Reducing power. The reducing power was detected *in vitro* applying BHT as a standard control substance. In this test, the most effective compound is able to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , by donation of H. Benzophenone's reducing capability was expressed as a percentage of action, where BHT reducing power was considered 100%; such results are expressed in Table 2. At lowest concentration (1 ppm), guttiferone-A displayed similar to BHT action ($97.1 \pm 2.6\%$), while 7-*epi*-clusianone was less efficient ($86.2 \pm 6.5\%$). However, at higher concentrations, both benzophenones displayed a significant decrease in relative reducing power when compared to BHT ($p < 0.01$). It is interesting to note that guttiferone-A showed similar action

on reducing power action at 50 and 200 ppm concentrations, indicating that its reductive capability is achieved with the maximum value 50 ppm in this chemical system.

Linoleic acid system-thiocyanate method. In the thiocyanate method, higher absorbance indicates higher concentrations of formed peroxides and therefore low activity on inhibition of linoleate peroxidation. Among the three concentrations, BHT showed the lowest absorbance (Figure 3). The benzophenones tested were able to reduce the formation of peroxides. However, guttiferone-A presented higher activity ($p < 0.001$, compared to the control) than 7-*epi*-clusianone ($p < 0.01$ compared to the control). It has been shown that linoleic acid yields only two autoxidation products in equal amounts: these isomers can change from *cis*, *trans* to *trans*, *trans* structure with the exchange of the hydroperoxide group from C9 to C13 or *vice versa*, while keeping the conjugated diene structure. They are also able to produce cyclic peroxides by the addition of singlet oxygen to their conjugated dienes. Although there is not as yet a wide and unequivocal biomarker to oxidative damage, it is believed that the aldehyde levels are strongly associated to lipoperoxidation in cells and tissues (Halliwell & Whiteman, 2004).

Tert-buthylhydroperoxide and Fe^{3+} -ascorbate-induced tissue lipid peroxidation test. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are well-known targets of ROS attack since their allylic hydrogens can be easily abstracted by a radical, initiating lipid peroxidation. PUFAs also generate a wide range of by-products including malondialdehyde, which damage membranes by facilitating the formation of protein cross-links and other end products. TBA reacts with the molecules of malondialdehyde forming a colored compound that can be determined by spectrophotometry. Thus, the TBARS levels were determined with approximately 80% being attributed to malondialdehyde production (Rice-Evans, Diplock & Symons, 1991). Liver

homogenates submitted to Fe^{3+} -ascorbate or *tert*-buthylhydroperoxide treatment demonstrated a TBARS index significantly higher than untreated samples. Guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone inhibited Fe^{3+} -ascorbate-induced TBARS in a dose-dependent manner, as shown in Figure 4 (Panel A), with efficacy near to BHT, a well-known lipid peroxidation chain breaker. However, it is clear that 7-*epi*-clusianone displays smaller action than guttiferone-A. Despite the liver lipoperoxidation induced by *tert*-buthylhydroperoxide, which was inhibited efficiently by both benzophenones, the effect on TBARS formation was significantly lower than BHT (Figure 4, Panel B). Under that condition, a similar effect was detected for guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone. These results showed that guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone are more effective in preventing iron-induced lipid peroxidation than that which is peroxy-induced. This suggests that their iron-chelating ability is a primary mechanism in the prevention of lipid damage, which was confirmed by the reducing power assay.

We studied an *ex vivo* model that is dependent of $\cdot\text{OH}$ generated by a Fenton-type Haber-Weiss reaction, where the combination of ascorbate and redox active (non-protein-bound) iron can promote lipoperoxidation (Laudicinia & Marnett, 1990). In biological systems, however, iron is bound to proteins such as transferrin and ferritin and therefore is not normally available for such catalytic functions. Nevertheless, the strong pro-oxidant nature of the iron-ascorbate complex *in vitro* raises concern that consumption of ascorbate supplements by individuals with high iron stores may contribute to oxidative damage *in vivo*. In addition, dietary ascorbic acid can enhance the intestinal absorption of nonheme iron (Dumoulin, Chahine, Atanasiu & Mattescu, 1996). Thus, the Fenton reaction can occur *in vivo*, and exogenous antioxidants can have an essential role in stress-derived oxidative prevention.

It is interesting to note that the inhibitory effects of both compounds on the TBARS formation at the highest tested dose (200 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) were similar to that achieved with

50 µg/mg protein, indicating that the latter concentration exerts a possible total action. Isolated prenylated hydroquinones scavenged DPPH and inhibited the Fe^{3+} -ascorbate-induced lipoperoxidation in liposomes of phosphatidylcholine, with IC_{50} closely related to guttiferone-A (Yamaguchi, Lago, Tanizaki, Mascio & Kato 2006). In the referred study, a broad evaluation in the structure-activity relationship between the different tested compounds pointed to the efficiency of the hydroxyl group at C-4 in performed free radical scavenging action, and of the lipophylic prenylated group that could be inserted into the liposome, which is responsible for the efficiency of prenylated hydroquinones to inhibit lipoperoxidation.

The *tert*-butylhydroperoxide-induced lipoperoxidation was less sensitive to guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone than iron-induced lipid damage (Figure 4). Thus, the high antioxidant activity of guttiferone-A, through primarily free radical scavenging, is attributed to its hydroxyl functions as potent hydrogen donators. Furthermore, the conjugated double bonds allow electron delocalization across the molecule and, as a result, stabilize the phenoxyl radical. Different leaf extracts displayed DPPH scavenging activity and inhibitory action of the *tert*-butylhydroperoxide-induced lipoperoxidation in microsomal liver and mitochondrial membranes, without full suppression of oxidative damage, even when tested in elevated concentrations (Valentová, Sersen & Urichová, 2005).

Like garcinol (Esterbauer & Cheeseman, 1990), we can propose a reaction of guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone with peroxy radicals by single electron transfer followed by deprotonation from the hydroxyl group, enolized 1,3-diketone to form a resonance pair. In addition, guttiferone-A has two hydroxyl groups in ring A, so we can propose that it has presented a higher antioxidant power because it reacts with the peroxy radical by donating phenolic hydrogen, like vitamin E (Niki, Saito, Kawakami & Kamiya, 1984).

Among the compounds studied, guttiferone-A presented the highest antioxidant activity in the four tests. Its high antioxidant activity can be attributed to the function of its hydroxyl

groups which are potent hydrogen donators (Sobratte et al., 2005). Many attempts to explain the structure-activity relationship of some polyphenols have been reported by Hagerman et al. (1998). It is known that monophenols are less efficient than polyphenols, as the 7-*epi*-clusianone has a smaller number of phenolic radicals, and consequently less power.

7-*epi*-clusianone was not very effective in all of the tests, probably because it does not have the two hydroxyl groups in ring A. Also, it does not present intramolecular H-bonds between neighbor hydroxyl groups, which according to Sobratte et al. (2005), increases aromatic ring conjugation, raising hydrogen donation power and delocalizing radicals formed on the structure. Once again, the guttiferone-A has those groups.

The study of the structure-activity relationship in polyprenylated benzophenones can help explain many other biological properties of such compounds. Thus, further investigations need to be made in order to evaluate the bioavailability of these compounds and to elucidate their action mechanism in several physiological processes.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank CNPq, CAPES, FINEP and FAPEMIG for their financial support, as well as LAREMAR (UFMG) and LASA (UFV) for the spectral analyses.

LITERATURE CITED

- Bennett, G. J. & Lee, H. H. (1988). Xanthones from Guttiferae. *Phytochemistry*, 28(4), 967-998
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248–254
- Brown, R. K. & Kelly F. J. (1996). Measurement of free radical products. In: *Free radicals: a practical approach*. PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. Oxford university Press: New York, 119-131
- Caillet, S., Yu, H., Lessard, S., Lamoureux, G., Ajdukovic, D. & Lacroix, M. (2007). Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry*, 100(2), 542-552
- Cuesta-rubio, O., Padron, A., Castro, H. V., Pizza, C. & Rastrelli, L. (2001). Aristophenones A and B: a new tautomeric pair of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia aristata*. *Journal of Natural Products*, 64, 973-975
- Díaz-carballo, D., Seeber, S., Strumberg, D. & Hilger, R. A. (2003). Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 41(12), 622-623
- Dumoulin, M. J., Chahine, R., Atanasiu, R. & Mateescu, M. A. (1996). Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin. *Arzneimittelforschung*, 46(9), 855-861
- Esterbauer, H. & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-421
- Finkel, T. & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*, 408, 239-247
- Gopalakrishnan, G., Banumathi, B. & Suresh, G. (1997). Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. *Journal of Natural Products*, 60(5), 519-524

- Govindaranjan, R. Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S. & Pushpangadan, P. (2003). Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 26(10), 1424-1427
- Gustafson, K. R. (1992). The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovali folia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron*, 48, 10093-10102
- Hagerman, A. E.; Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W. & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887-1892
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford Univ. Press: Oxford, 936
- Halliwell, B. & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255
- Hanasaki, Y., Ogawa, S. & Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 845-850
- Kikuzaki, H. & Nakatani, N. (1993). Antioxidant effects of some ginger constituents. *Journal of Food Science*, 58, 1407-1410
- Laudicinia, D. C. & Marnett, L. J. (1990). Enhancement of hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes by ascorbic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278(1), 73-80
- Neves, J. S., Coelho, L. P., Cordeiro, R. S. B., Veloso, M. P., Rodrigues e Silva, P. M., Santos, M. H. & Martins, M. A. (2007). Antianaphylactic Properties of 7-Epiclusianone, a

- Tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. *Planta Medica*, 73, 644-649
- Ngouela, S., Lenta, B. N., NOUNGUE, D. T., Ngoupayo, J., Boyom, F. F., Tsamo, E., Gut, J., Rosenthal, P. J. & Connolly, J. D. (2006). Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globlifera* Linn F. *Phytochemistry*, 67(3), 302-306
- Niki, E., Saito, T., Kawakami, A. & Kamiya, Y. (1984). Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(7), 4177-4182
- Rice-Evans, C. (1995). *Plant polyphenols: free radical scavenger or chain-breaking antioxidants? Free radicals and oxidative stress: environment, drugs and food additives*. Portland Press: London, England., 103-116
- Rice-Evans, C. A., Diplock, A. T. & Symons, M. C. R. (1991). Techniques in free radicals research. In: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Burdon, R. H. Van Knippenberg, P. H. editors. Amsterdam: Elsevier.
- Santos, M. H. et al. (1999). 7-epiclusianone, the new tetraprenylated benzophenone and other chemical constituents from the fruits of *Rheedia gardneriana*. *Química Nova*, 22(5)
- Shahidi, F. (ed).(1996). Natural antioxidants: an overview. In: *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications*. Fereidon Shahidi: AOCS PRESS: Champaign, Illinois, 414
- Sobratte, M. A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I. & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200-213

- Valco, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Zura, M. (2006). Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress induced câncer. *Chemico-biological Interactions*, 160, 1-40
- Valentová, K., Sersen, F. & Urichová, J. (2005). Radical scavenging and antilipoperoxidative activities of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5577-5582
- Yamaguchi, L. F., Lago, J. H. G., Tanizaki, T. M., Mascio, P. D. & Kato, M. J. (2006). Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, 67(16), 1838-1843
- Yamaguchi, L. F., Vassão, D. G., Kato, M. J. & Mascio P. D. (2005). Biflavonoids from brazilian pine *Araucária angustifolia* as potential protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry*, 66, 2238-2247
- Yen, G.H. & Chen, H. Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32

Figure captions

Figure 1: Tautomeric equilibrium of guttiferone-A in solution

Figure 2: Tautomeric equilibrium of 7-*epi*-clusianone in solution

Figure 3. Inhibitory effects on linoleate peroxidation. Different benzophenones or BHT concentrations were added to linoleate samples and peroxidation was determined spectrophotometrically (500 nm) after NH_4SCN and FeCl_2 additions. Results were expressed as a mean $\pm$ sd, comparing negative control to antioxidant activity *vs* experimental samples. * $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$.

Figure 4. Effect of benzophenones on the Fe^{3+} -ascorbate- or *tert*-butylhydroperoxide-induced liver lipid peroxidation. Fe^{3+} -ascorbate (A) or *tert*-butylhydroperoxide (B) were used to induce oxidative lipid damage detected as TBARS levels (mean $\pm$ sd, n:4). BHT was used as the standard antioxidant compound. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ *vs* respective induced control; *** $p < 0.01$ *vs* basal control.

Table 1. DPPH scavenging relative capability of natural benzophenones. The DPPH stable free radical was used to test the hydrogen donating potential of guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone. BHT and ascorbate were used as standard antioxidant agents for comparative purposes. Results are expressed as a mean of three experiments performed in triplicate, analysed by linear regression.

Compound	Decoloration of DPPH (IC ₅₀ µM)
BHT	37.2
Ascorbate	6,9 ^a
Guttiferone-A	41.8 ^b
7- <i>epi</i> -clusianone	446.3 ^a

^a $p < 0.001$ vs BHT; ^b $p < 0.001$ vs ascorbate and vs 7-*epi*-clusianone.

Table 2. Percent of relative reducing power of guttiferone-A and 7-*epi*-clusianone. Both benzophenones were assayed to reducing capability in the ferricnate system. The results are expressed as a percentage of the corresponding paired BHT concentrations tested, which were assumed to have 100% reducing power (mean $\pm$ sd from three independent experiments).

Concentration(ppm)	Benzophenones	
	Guttiferone-A	7- <i>epi</i> -clusianone
1	97.1 $\pm$ 2.6	86.2 $\pm$ 6.5 ^a
50	62.1 $\pm$ 1.7 ^b	42.0 $\pm$ 4.7 ^{b,c}
200	64.4 $\pm$ 1.8 ^b	27.9 $\pm$ 1.5 ^{b,c}

^a $p < 0.05$ and ^b $p < 0.01$ vs corresponding BHT doses; ^c $p < 0.01$ vs corresponding guttiferone-A doses.

Figure 1

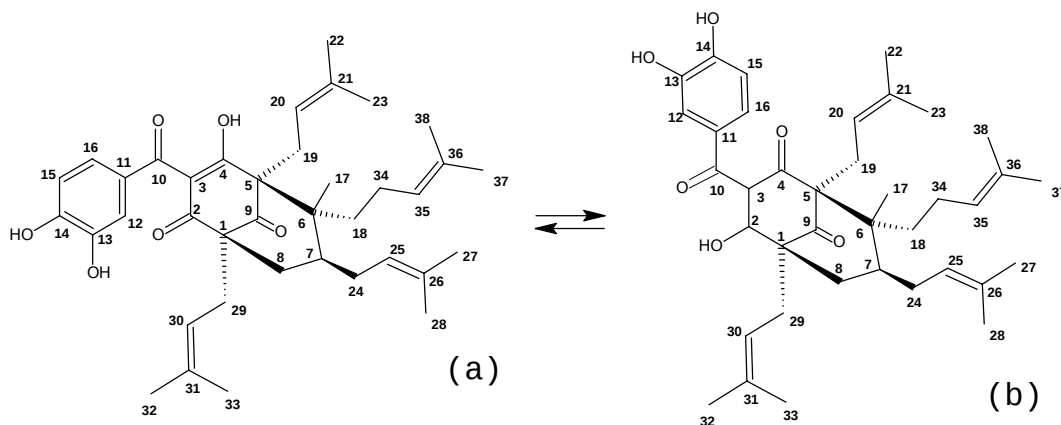


Figure 2

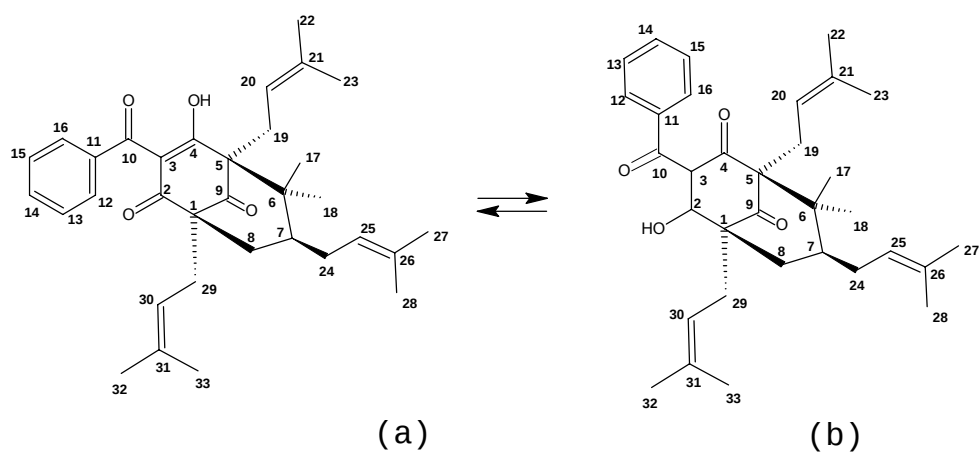


Figure 3

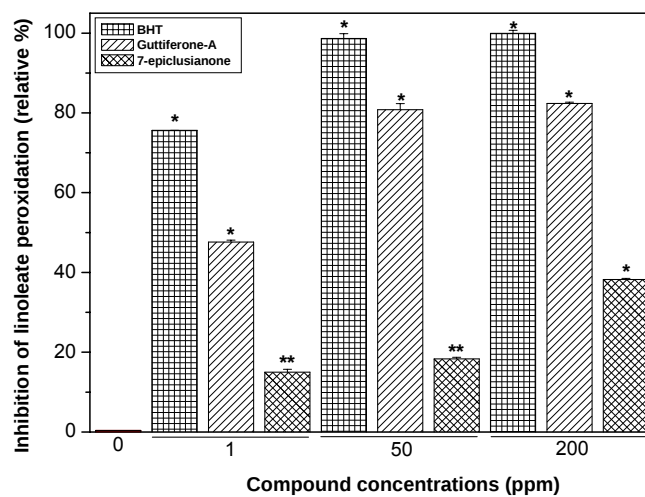
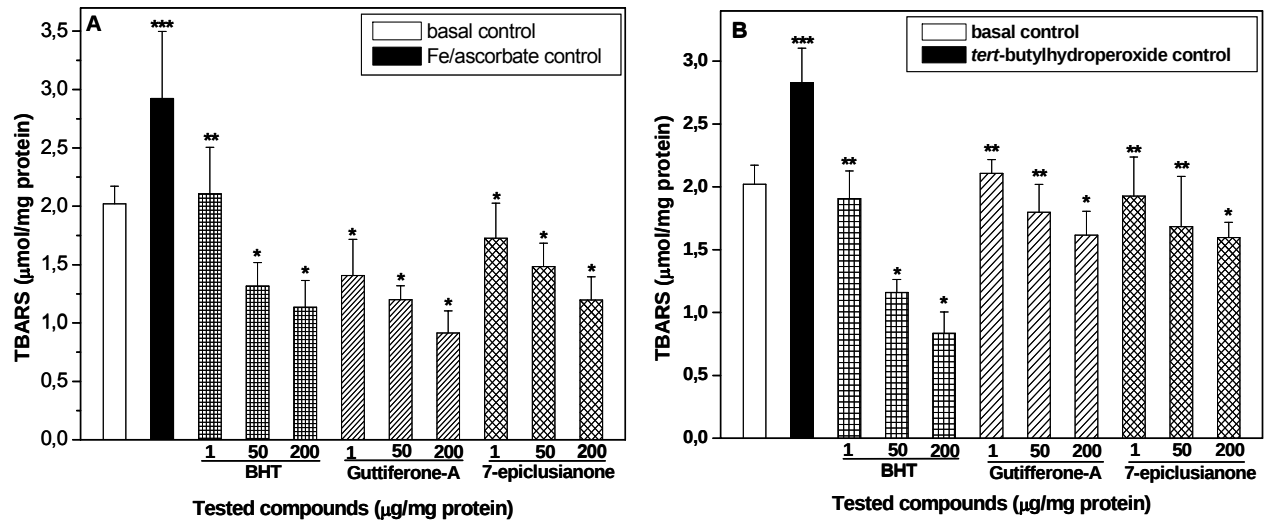


Figure 4



2.4 ARTIGO IV

O artigo IV teve como objetivo específico: avaliar a atividade antioxidante *in vivo* das 3 benzofenonas estudadas, isoladas do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*.

O artigo será submetido a publicação na Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Qualis A internacional.

Efeito das benzofenonas isoladas de *Rheedia brasiliensis* sobre os danos hepáticos agudos induzidos por tetracloreto de carbono

Priscilla Bento Matos Cruz Derogis¹, Kamila Rezende Dazio¹, Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão², Marcelo Henrique dos Santos¹

¹ Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas-MG, CEP 37130-000, Brazil.

² Departamento de Ciências Exatas, Laboratório de Bioquímica, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas-MG, CEP 37130-000, Brazil.

* P. B. M. C. Derogis, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas-MG, CEP:37130-000, Brasil. E-mail: priscillabmcruz@hotmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antioxidante do extrato de Rheedia brasiliensis (família: Guttiferae) e suas benzofenonas em ratos Wistar submetidos ao estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono. A administração de CCl₄ induz o estresse oxidativo através de um aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. O tratamento prévio com o extrato hexânico, a 7-epi-clusianona, a guttiferona-A e a garciniafenona, em diferentes doses, resultou em uma redução significativa dos danos hepáticos.

Palavras-chave: TBARS, tetracloreto de carbono, benzofenonas, antioxidante

INTRODUÇÃO

O fígado é o principal órgão de metabolização de xenobióticos, uma vez que são substratos para o citocromo P450 (COON et al., 1992). São exemplos de xenobióticos: medicamentos, antioxidantes, solventes orgânico, anestésicos, pesticidas e álcool. O tetracloreto de carbono é extensamente utilizado em modelos animais de dano hepático. Ele é metabolizado pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1) formando o radical triclorometila ($\text{CCl}_3^{\bullet}$), que é um radical de iniciação da peroxidação lipídica. A ação do $\text{CCl}_3^{\bullet}$ sobre os lipídeos gera produtos de oxidação que são responsáveis pelos danos hepáticos; entre eles cirrose, necrose e esteatose hepática (RECKNAGEL et al., 1989). Um grande número de pesquisadores demonstrou a relação entre o uso de antioxidantes e a diminuição, ou mesmo, prevenção do dano hepático induzido por tetracloreto de carbono, através da inibição da peroxidação lipídica (TESELKIN et al., 2000 apud JEON et al., 2003; LEE et al., 2007) e da atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (OHTA et al., 1998; LIN; HUANG, 2000 apud JEON et al., 2003).

O gênero *Rheedia*, ou *Garcinia*, é constituído por diversas espécies. Os estudos de tais espécies têm demonstrado que este gênero é rico em uma diversidade considerável de metabólitos, tais como benzofenonas, flavonóides, e xantonas (BRAZ-FILHO et al., 1970; DELLE MONACHE et al., 1983; DELLE MONACHE et al., 1988; PERES et al., 2000; BENNETT; LEE, 1989). As benzofenonas poliisopreniladas estão relacionadas às atividades: sequestrante de radicais livres, antiúlcera (YAMAGUCHI et al., 2002), inibidora da óxido nítrico sintase (iNOS) (CRUZ et al., 2006), indutora de apoptose (PAN et al., 2001), anti-HIV (PICCINELLI et al., 2005), tripanocida (ABE et al., 2004; ALVES et al., 1999), antimicrobiana e antifúngica (CUESTA RUBIO et al., 1999), antiinflamatória (GOPALAKRISHNAN; BANUMATHI; SURESH, 1997), antitumoral (DÍAZ-CARBALHO et al., 2003) antioxidante (NGOUELA et al., 2006) e antianafilática (NEVES et al., 2007).

Considerando a riqueza de atividades atribuída às benzofenonas, o presente estudo teve como objetivo avaliar as atividade da ALT e AST e os níveis de TBARS no intuito de avaliar o efeito do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* e das 3 benzofenonas isoladas a partir deste contra a toxicidade do CCl₄.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e extração

Os frutos de *Rheedia brasiliensis* foram colhidos no *Campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil. A exsicata foi depositada no Horto Botânico da UFV. O pericarpo dos frutos foi separado e extraído com *n*-hexano.

Isolamento

O isolamento foi realizado por HPLC (Shimadzu LC-10A), equipado com detector arranjo de diodos (λ de 254 nm). Utilizou-se uma coluna C18 (150–4.6 mm, 5 μ m. Optou-se pelo gradiente de eluição de MeOH:ácido acético 5%, pH 3.84, (40:60 v/v) a MeOH 100% por 10 min, com fluxo de 1.2 ml/min, a 30°C. Os dados foram adquiridos utilizando o software ClassVP-LC10 (Martins et al., 2007b). A identificação das benzofenonas foi realizada com técnicas de análise orgânica de acordo com Martins et al., 2007a e Derogis et al., 2008.

Preparo das amostras

O extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* e benzofenonas foram solubilizados em óleo de soja de forma a atingir uma concentração final de aplicação de 5, 10 e 25 mg/Kg de peso do animal.

Atividade antioxidante

O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Alfenas, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brasil (nº 157/2007) e os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Guia para o uso e cuidado com os animais de laboratório (NIH, 1985). Os ratos wistar machos (250-300g) foram obtidos de colônias de criação do biotério da instituição e distribuídos em grupos de 6 animais. Os ratos foram tratados, uma vez ao dia, via oral de acordo com a tabela 1, durante 3 dias. Três animais de cada grupo foram tratados no segundo dia com 1 mL de tetracloreto de carbono diluído 1:1 em óleo de soja.

Tabela 1 - Divisão dos grupos de animais de acordo com o tratamento e dose aplicada.

Amostra	DOSE		
	5 mg/Kg	10 mg/Kg	25 mg/Kg
7- <i>epi</i> -clusianona	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Garciniafenona	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Guttiferona-A	Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9
Veículo	Grupo 10	Grupo 11	Grupo 12
Branco	Grupo 13	Grupo 14	Grupo 15
Extrato hexânico do pericarpo de <i>Rheedia brasiliensis</i>	Grupo 16	Grupo 17	Grupo 18

Todos os animais beberam água e foram alimentados *ad libitum*. No terceiro dia, os animais foram sacrificados através da deslocação cervical, após perfusão cardíaca, e foram imediatamente dissecados e transferidos para solução salina. Para a determinação dos níveis de TBARS (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990), 2g de fígado foram homogeneizados em 5mL de tampão Tris-HCl 150mM, pH 7,2. 1 mL de sobrenadante foi separado para a determinação da concentração de proteínas. A 0,5 mL do sobrenadante foram acrescentados 0,5 mL de ácido tricloroacético (20% m/v em HCl 0,25N) e 0,05 mL BHT 4% m/v. As amostras foram submetidas a banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, centrifugadas. A 0,5mL do sobrenadante foram acrescentados 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,7% m/v. A mistura foi submetida a banho-maria a 100°C por minutos. O cromogênio foi extraído em

2mL de n-butanol e a extensão da peroxidação foi determinada espectrofotometricamente a 532nm (BROWN; KELLY, 1990).

A concentração protéica dos homogeneizados foi determinada de acordo com Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/TBARS/mg}$ proteínas.

Determinação da função hepática

Para a determinação da função hepática, a colheita de sangue por meio de punção cardíaca utilizando o sistema Vacuette de sorologia, da IMPRINT DO BRASIL (Campinas, SP, Brasil). Os soros foram submetidos aos testes de função hepática usando-se o aparelho HUMANSTAR 80 e os Kits para a determinação das enzimas da In Vitro Diagnóstica (Itabira, MG, Brasil).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ s.d. relativa ao experimentos conduzidos em triplicata. O teste ANOVA para os controles e as amostras e o teste Tukey para múltiplas comparações foram realizados para determinar o nível de significância estatística; sendo que valores menores ou iguais a 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento

Na análise por HPLC do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*, observaram-se 3 picos ordenados por tempo de retenção garciniafenona (**1**), guttiferona-A (**2**) e 7-*epi*-clusianona(**3**) (FIGURA 1).

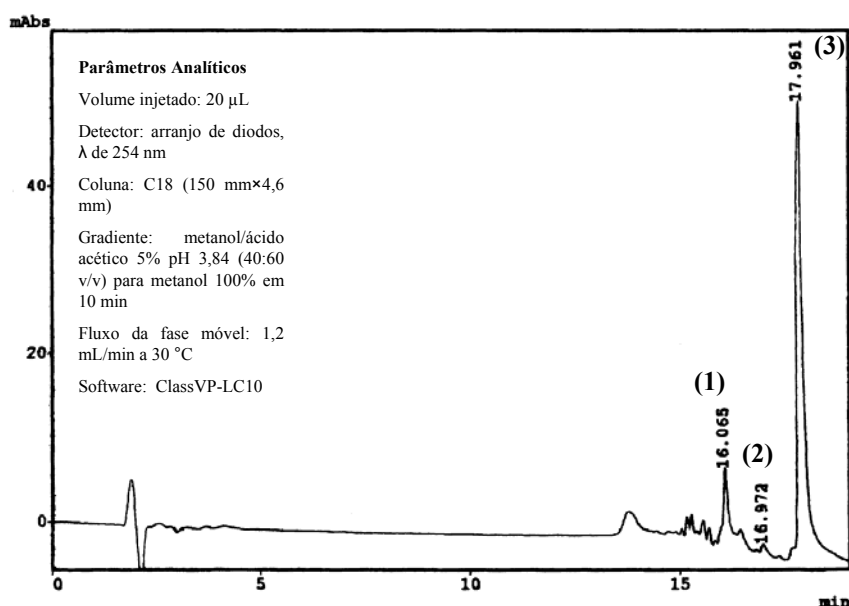


FIGURA 1 - Cromatograma do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*.

A garciniafenona é uma benzofenona inédita (DEROGIS et al., 2008).

A guttiferona-a foi primeiramente isolada de *Symphonia globulifera* e descrita com atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al., 1992). Trabalhos posteriores demonstraram as atividades tripanocida (ABE, et al., 2004), potente sequestrante de radicais (NGOUELA et al., 2006) e leishmanicida in vitro (LENTA et al., 2007); antiproteolítica (MARTINS et al., 2007).

A 7-*epi*-clusianona foi primeiramente isolada dos frutos de *Rheedia gardneriana* (SANTOS et al., 1999), apresenta atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* in vitro (ALVES et al., 1999); em baixas concentrações, efeito vasodilatador e em altas concentrações da vasocronstritora (CRUZ et al., 2006), antianafilática (NEVES et al., 2007).

Como é possível notar na Figura 2 as 3 benzofenonas possuem estruturas semelhantes, diferenciando apenas na presença ou ausência de duas hidroxilas nas posições 13 e 14, e nos grupos de C18 e C29. Estudos anteriores da atividade antioxidante in vitro e ex vivo

demonstraram que a guttiferona-A, provavelmente por possuir um grupamento catecol, apresentava maior atividade que a 7-*epi*-clusianona.

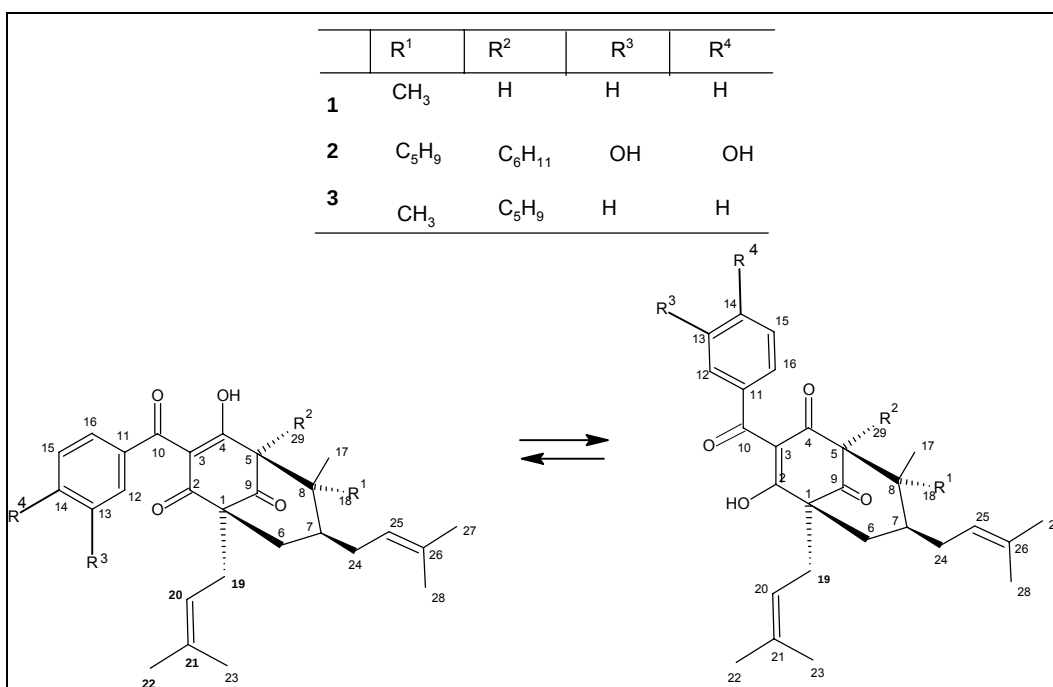


FIGURA 2 - Tautomerismo proposto para as 3 benzofenonas isoladas (garciniafenona (**1**), guttiferona-A (**2**) e 7-*epi*-clusianona (**3**)).

Ao realizarmos a análise *in vivo* da atividade das 3 benzofenonas, objetivamos elucidar a relação estrutura-atividade a fim de determinar os requisitos estruturais que possam, por exemplo, orientar o planejamento de novos candidatos antioxidantes mais ativos e de interesse potencial no combate a doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Atividade antioxidante

Os radicais livres são produtos naturais do metabolismo celular e atuam de forma bivalente, como benéficos com maléficos ao próprio organismo. Um grande número de processos fisiológicos são regulados por reações tipo redox tais como: regulação do tônus asacular, monitoramento da tensão de oxigênio no controle da ventilação e na produção de eritropoietina, defesa contra a invasão de microorganismos, etc (DROGE, 2002;

BUONOCORE; GROENENDAAL, 2007). Contudo, radicais livres estão também relacionados a doenças.

Um exemplo de radical com tais efeitos maléficos é o radical $\text{CCl}_3\cdot$ responsável pelo dano hepático atribuído à administração do tetracloreto de carbono. No presente estudo observou-se que uma única dose de CCl_4 foi suficiente para a indução do estresse oxidativo, através do incremento da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. O grupo controle tratado teve uma produção de $5,6 \cdot 10^{-7} \pm 8,4 \cdot 10^{-8}$ μmol de TBARS/ μg de proteínas, já o que não recebeu o tetracloreto (branco n.t.) apenas $2,3 \cdot 10^{-7} \pm 6,5 \cdot 10^{-8}$ (FIGURA 3).

As enzimas ALT e AST são usadas para avaliar distúrbios hepáticos. Um aumento de tais enzimas é sinônimo de dano hepático ativo (SHEWEITA; EL-GABAR; BASTAWAY, 2001). Assim, o presente estudo demonstrou que a administração do CCl_4 foi eficiente na indução do dano hepático (Grupo tratado com tetracloreto $464,5 \pm 62,1$ e $104,1 \pm 21,0$; grupo não tratado $47,2 \pm 11,5$ e $63,1 \pm 11,6$, respectivamente).

Para eliminar a interferência da ação do veículo realizou-se a mesma análise para tal grupo. O grupo que recebeu o óleo de soja (veículo) sem receber o tetracloreto teve um peroxidação lipídica maior que o controle (branco) sem tetracloreto ($p < 0.05$). Já entre os dois grupos que receberam óleo de soja não houve diferença entre os que receberam tetracloreto e os que não receberam. O óleo de soja também não foi eficiente na hepatoproteção, uma vez que apresentou as enzimas AST e ALT elevadas quando submetido ao CCl_4 (ALT= $350,4 \pm 42,0\text{U/L}$ e AST= $37,5 \pm 41,4\text{U/L}$) (FIGURA 4).

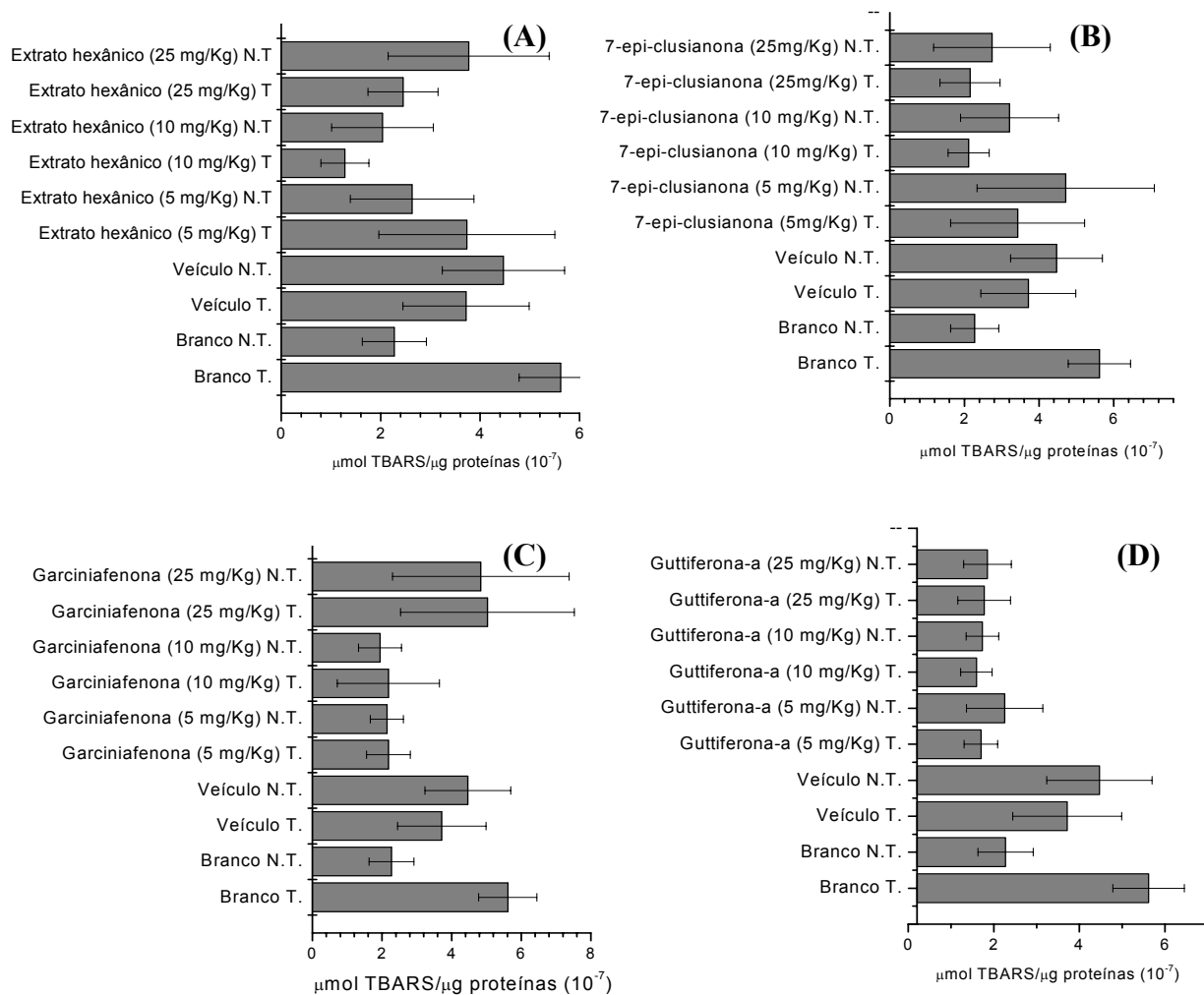


FIGURA 3 – Efeito das benzofenonas e do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* sobre os níveis hepáticos de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (média $\pm$ SD, $n=3$ para cada grupo). (T) grupo que recebeu a indução ao dano oxidativo hepático com tetracloreto de carbono. (N.T.) grupo não tratado com tetracloreto.

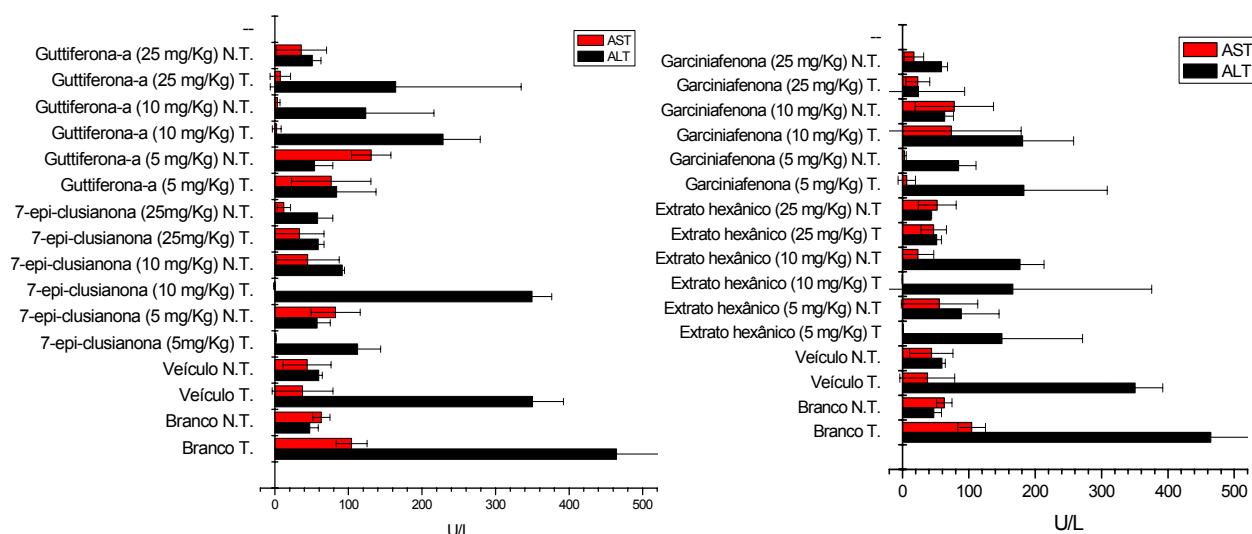


FIGURA 4 – Efeito das benzofenonas e do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* sobre os níveis sorológicos das transaminases (media $\pm$ S.D., n = 3). (T) grupo que recebeu a indução ao dano oxidativo hepático com tetracloreto de carbono; (N.T.) grupo não tratado com tetracloreto.

Diferentes estudos têm demonstrado atividade protetora de compostos e extratos contra os danos induzidos por CCl_4 . Sheweita e colaboradores (2001), demonstraram ação inibidora do ácido ascórbico sobre a hepatotoxicidade induzida por CCl_4 , especialmente após tratamentos com doses repetitivas.

Entre os grupos testados, a guttiferona-A reduziu significativamente a peroxidação lipídica em todas as concentrações e também foi eficaz na redução do dano hepático, reduzindo os valores de AST e ALT. Foram ainda ativos contra a peroxidação lipídica o extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* a 10 e 25 mg/Kg, a 7-epi-clusianona a 10 e 25 mg/Kg e garciniafenona a 5 a 10 mg/Kg, não existindo diferença significativa entre os grupos ativos.

CONCLUSÕES

Em conclusão, o tratamento prévio com o extrato e benzofenonas foi capaz de reduzir o dano oxidativo do CCl_4 através da inibição da peroxidação lipídica e das transaminases, que são parâmetros biológicos na recuperação e integridade do tecido.

Effect of *Rheedia brasiliensis* benzophenones against induced hepatic damages

ABSTRACT

*The present study had as objective to investigate the antioxidant activity of hexanic extract of pericarp *Rheedia brasiliensis* (Guttiferae) and its benzophenones, in Wistar rats submitted to an oxidative stress induced with carbon tetrachloride. The administration of CCl₄ induces the oxidative stress through an increase of the thiobarbituric acid reactive substances. The previous treatment with the hexanic extract, 7-epi-clusianone, guttiferone-A and garciniafenone, in different doses, resulted in a significant reduction of the liver damages.*

Key-words: TBARS, carbon tetrachloride, benzophenones, antioxidant

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F. et al. Trypanocidal constituents in plants: 3.1) leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**.Tokio, v.27, n.1, p.141—143, jan. 2004.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal of natural products**. Washington, v.62, n.2, p.369-371, fev. 1999.
- BENNETT, G. J.; LEE, H. H. Xanthones from Guttiferae. *Phytochemistry*, v.28, n.4, p.967-998, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. v.72, p.248–254, 1976.

- BRAZ-FILHO, R.; MAGALHÃES, G. C.; GOTTLIEB O. R. Xanthones of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v.9, n.3, p.673,1970
- BROWN, R. K.; KELLY, F. J. Measurement of free radical products. In: PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. **Free radicals: a practical approach**. Oxford university Press: New York, 1996, p.119-131
- BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v.12, p.287-295, 2007
- COON, M. J. et al. Cytochrome P450: progress and prediction. **FASEB Journal**, v.6, p.669-673, jan. 1992.
- CRUZ, A. J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, Inglaterra, v.13, n.6, p.442–445, 2006.
- CUESTA RUBIO, O. et al. A Polyisoprenylated Benzophenone from Cuban Própolis. **Journal Natural Products**. v.62, n.7, p.1013 -1015, 1999
- DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; PINHEIRO, R.M.; Nemorosonol, a derivate of tricyclo-[4.3.1.0]-decane-7-hidroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, Amsterdan, v.27, n.7, p.2305-2308, 1988.
- DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthones from *Rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n.5, p. 655 – 659, set.1983.
- DEROGIS, P. B. M. C. et al. Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance Chemistry**, v.46, p.278–282, jan. 2008.
- DÍAZ-CARBALHO, D. et al. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.41, p.622-623, 2003.

- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiologic Review**, v.82, p.47-95, 2002
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxy-nonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, p.407-421, 1990.
- GOPALAKRISHNAN, G.; BANUMATHI, B.; SURESH, G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. **Journal of Natural Products**, v.60, n.5, 519-524, 1997
- GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, n. 46, p. 10093-10102, 1992
- HUERTA-REYES, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal Constituents in Plants 3.1) Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biol. Pharm. Bull**, v.27, n.1, p.141—143, 2004
- LEE, C. et al. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl₄-induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v.45, n.6, p.888-895, 2007.
- LENTA, B. N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548-1557, 2007.
- LIN, C.C., HUANG, P.C. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acatopanax senticosus*. **Phytother. Res.** v.14, p.489-494, 2000 apud JEON, T. I. et al. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. **Toxicology**. v.187, p. 67- 73, 2003.
- MARTINS, F. T. et al. Garciniafenona, a novel natural polyprenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Molecular Structure**, submitted, 2007 (a)

- MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Submitted, 2007
- MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones: keto-enol tautomerism and stereochemistry. **Journal Brazilian Chemical Society**, 2007, 18, 8, 1515-1523 (b)
- NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic Properties of 7-Epiclusianone, a Tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, Alemanha, v.73, p.644-649, jun. 2007.
- NGOUELA, S. et al. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. **Phytochemistry**, v.67, n.3, p.302-306, 2006.
- OHTA, Y. et al. Contribution of the antilipid peroxidative action of dai-saiko-to extract to its preventive effect on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Phytotherapy Research**, v.12, n.1, p.5-8, 1998.
- PAN, M. et al. Induction of Apoptosis by Garcinol and Curcumin through Cytochrome *c* Release and Activation of Caspases in Human Leukemia HL-60 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.3, p.1464 -1474, 2001.
- PERES, V., NAGEM, T. J., OLIVEIRA, F. F. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v.55, p.683–710, 2000.
- PICCINELLI, A. L. et al. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, v.61, p.8206–8211, 2005
- RECKNAGEL, R. O. et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v.43, n.1, p.139-54, 1989
- SANTOS, M. H. et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.5, p.654-660, set./out. 1999

SHEWEITA, S.A.; ABD EL-GABAR, M.; BASTAWY, M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. **Toxicology**. v.165, p.217–224, 2001

TESELKIN, Y.O. et al. Dihydroquercetin as a means of antioxidative defence in rats with tetrachloromethane hepatitis. **Phytother. Res.** v.14, p.160-162, 2000 apud JEON, T. I. et al. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. **Toxicology**. v.187, p. 67- 73, 2003.

YAMAGUCHI, F. et al. Free Radical Scavenging Activity and Antiulcer Activity of Garcinol from *Garcinia indica* Fruit Rind. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.6, p.2320 -2325, 2000

3 CONCLUSÕES

O uso popular de plantas medicinais sem atividade comprovada e a riqueza da flora brasileira impulsionam o crescente interesse em pesquisas científicas. Por este motivo, o presente trabalho objetivou a pesquisa fitoquímica do pericarpo de uma espécie brasileira, a *Rheedia brasiliensis*.

O estudo do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis*, permitiu a obtenção de diferentes compostos. Há que se destacar as benzofenonas poliisopreniladas a 7-*epi*-clusianona, a garciniafenona e a guttiferona-A.

O isolamento e identificação estrutural resultaram na publicação do primeiro artigo que compõe a presente dissertação.

Entre as atividades estudadas de plantas medicinais há que se salientar a atividade antioxidante; uma vez que é conhecida a ação de radicais livres como causa ou fator agravante de doenças.

A atividade antioxidante de um composto tem sido atribuída a diversos mecanismos, entre eles evitar a iniciação da reação em cadeia da lipoperoxidação, ligar-se a metais de transição, decompondo peróxidos, evitar a abstração de hidrogênios, apresentar atividade redutora e sequestrante de radicais. Um mesmo antioxidante pode ser ativo segundo um mecanismo e inativo em outro. Assim, o extrato hexânico e as benzofenonas foram submetidos a diferentes métodos de análise da atividade antioxidante.

Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato hexânico, da 7-*epi*-clusianona e da garciniafenona, os resultados obtidos mostraram uma correlação positiva entre as benzofenonas e o extrato. A 7-*epi*-clusianona foi mais ativa como sequestrante de radicais DPPH[•], já a garciniafenona foi mais ativa como agente quelante de íons Fe²⁺. Nenhum dos compostos testados apresentou um poder redutor significativo.

Comparando a atividade antioxidante *in vitro* das benzofenonas, 7-*epi*-clusianona e guttiferona-A, observou-se que nos quatro testes a guttiferona-A foi mais ativa. Esta maior atividade acredita-se que seja devida: à presença dos grupamentos hidroxila potentes doadores de hidrogênio; às pontes de hidrogênio intramoleculares entre os grupos hidroxila vizinhos que aumentam a conjugação do anel aromático, o poder doador de hidrogênio e a deslocação de radicais formados na estrutura; ao maior número de grupamentos fenóis; e, à presença do grupamento catecol, que é um importante requisito para a atividade de compostos fenólicos com os flavonóides.

Todas as características atribuídas à guttiferona-A como responsáveis pela atividade antioxidante *in vitro* não são observadas na estrutura das benzofenonas 7-*epi*-clusianona e garciniafenona.

Para avaliar a atividade antioxidante *in vivo* das três benzofenonas e do extrato hexânico do pericarpo de *Rheedia brasiliensis* usou-se o método de lipoperoxidação induzida pela administração de tetracloreto de carbono via oral. Este teste subsidia também a análise da atividade hepatoprotetora contra CCl₄. O tratamento prévio com o extrato e benzofenonas foi capaz de reduzir o dano hepático oxidativo do CCl₄ através da inibição da peroxidação lipídica e das transaminases, que são parâmetros biológicos na recuperação e integridade do tecido.

O estudo da relação estrutura atividade das três benzofenonas poliisopreniladas pode ajudar na explicação de diferentes propriedades biológicas atribuídas a tais compostos. Para tanto, investigações posteriores são necessárias no intuito de explicar o seu mecanismo de ação em diversos processos fisiopatológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F. et al. Trypanocidal constituents in plants 3.1) leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**.Tokio, v.27, n.1, p.141—143, jan. 2004.

ALVES, T. M. A. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal of natural products**, Washington, v.62, n.2, p.369-371, fev. 1999.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**. Oxford, v.11, p.419—421, nov. 2000.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v.53, n.5, p.583-600, maio 2001.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, jan./fev. 2006.

BARROS, M. P.; BRIGAGAO, R. P. L.; MATTEI, R. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante de princípios ativos aplicados na profilaxia de doenças neurodegenerativas In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 21, p.237-261.

BEERHUES, L. Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaureum erythraea*. **FEBS Letters**, Oxford, v.383, p.264-266, abr. 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, maio-ago.1999.

BILLO, M. et al. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 96, n.3, p. 569-575, jan. 2005.

BOLAND, J. L.; TEN-HAVE, P. Kinetics in the chemistry of rubber and related materials, the inhibitory effect of hydroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate. **Transactions of the Faraday Society**, v.43, p.201-210, 1947.

BOONSRIA, S. et al. Antibacterial and cytotoxic xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 723-727, abr. 2006

BORG, D. C.; SCHAICH, K. M. Iron and iron-derived radicals. *In*: Halliwell B (Editor), Oxygen Radicals and Tissue Injury. **Proceedings of a Brook Lodge Symposium**, Michigan, p.20-26. ago. 1987.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRAZ-FILHO, R.; MAGALHÃES, G. C.; GOTTLIEB O. R. Xanthenes of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v.9, n.3, p. 673, 1970.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994 apud BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, maio-ago.1999.

_____. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v.21, n.1, p.1-5, 1991 BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, maio-ago.1999.

CHENG, Z.; LI, Y. What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. **Chemical Reviews**, Washington, v.107, n.3, p.748-766, mar. 2007.

CHIANG, L. et al. *In vitro* evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, n. 5, p. 539-544, ago. 2004.

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. **Chemical Reviews**, Washington, v.106, n.9, p.3963-3986, set. 2006.

COON, M. J. et al. Cytochrome P450: progress and prediction. **FASEB Journal**, v.6, p.669-673, jan. 1992.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S.; STRONG, F. C. Determination oftocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.65, p.1215–1222, 1982 apud SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8; p.121-137, 2002

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v.40, n.6, p.1585-1612, dez.1995.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, p. 232-234, 1926.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984.

CRUZ, A. J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, Inglaterra, v.13, n.6, p.442–445, 2006.

CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. Disponível em <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf>, Acesso em: 07 abr. 2008

CZEPULA, A. I. S. **Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Sphagneticola drilobata* (L.) Pruski (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia padulosa*) (ASTERACEAE) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica *in vivo***. 2006. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2006.

DEACHATHAI, S. et al. Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 464-469, mar. 2006.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; PINHEIRO, R.M.; Nemorosonol, a derivate of tricyclo-[4.3.1.0]-decane-7-hidroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.27, n.7, p.2305-2308, 1988.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n.5, p. 655 – 659, set. 1983.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; WATERMAN, P. G.; CRICHTON, E. G.; ALVES DE LIMA, R. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23, n.8, p.1757 – 1759, 1984.

DEROGIS, P. B. M. C. et al. Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance Chemistry**, v.46, p.278–282, jan. 2008

DIAS, J. P. S. **A farmácia e a história: uma introdução à história da farmácia, da farmacologia e da terapêutica.** Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 2005

DIASA, A. T. C. et al. Aboveground biomass stock of native woodland on a Brazilian sandy coastal plain: estimates based on the dominant tree species. **Forest Ecology and Management**, v. 226, n.1-3, p. 364-367, mai. 2006

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxy-nonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, p.407-421, 1990.

FARNSWORTH, N. R. The development of pharmacological and chemical research for application to traditional medicine in developing countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v.2, p.173-181, 1980.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da assistência médica brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, jan./mar. 1997.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.** Academia Brasileira de Ciências. 1998

FIGHERA, M. R. **Efeito do monossialogangliosideo GM1 sobre as alterações comportamentais, neuroquímicas e eletrográficas induzidas pelo ácido glutárico e nas defesas antioxidantes no SNC de ratos.** 2006. 110 f. Tese (Doutorado em bioquímica toxicológica) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2006.

GOYATÁ, S. L. T. et al. **Manual de normalização para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da UNIFAL-MG.** Alfenas: UNIFAL-MG, 2006

GÜLÇİN, İ.; ALICI, H. A; CESUR, M. Determination of *in vitro* Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. **Chemical & Pharmaceutical bulletin**, v.53, n.3281, p.281-285, 2005

GUO, Q. et al. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. **Life Sciences**, v.78, n.11, p.1238-1245, fev. 2006

GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, n. 46, p. 10093-10102, 1992

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review Nutrition**, v.16, p. 33-50, 1996

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.7, p.601-617, jul. 1995.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, n. 5, p. 715S-724S, mai. 1993

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4ed. Oxford University Press Inc. New York. 2007

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Iron as a biological pro-oxidant. **ISI Atlas of Science: Biochemistry**, v.1, p.48-52, 1988

HAYAMIZU, K.; et al. Effects of *Garcinia cambogia* (Hydroxycitric Acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Current Therapeutic Research**. v. 64, n. 8, p. 551-567, set.-out. 2003.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v.26, n.4, p.277-85, out. 1989.

HORTON, R.; RICE-EVANS, C.; FULLER, B. J. The effects of iron-mediated oxidative stress in isolated renal cortical brush border membrane vesicles at normothermic and hypothermic temperatures. **Free Radical Research Communications**, v.5, p.267-275, 1989.

IWU, M.M. et al. *Garcinia Kola*: a new look at an old adaptogenic agent. **Advances in Phytomedicine**, p.191-199, 2002.

JAYAPRAKASHA, G. K.; NEGI, P. S.; JENA, B. S. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.7, n.3, p.246-250, set. 2006.

JEON, T. I. et al. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. **Toxicology**. v.187, p. 67- 73, 2003.

JOLY, A.B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 6 ed. São Paulo: Editora Nacional. 1993, p. 332-334.

JOSEPH, G. S. et al. Antiaflatoxigenic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. **International Journal of Food Microbiology**, 2005, v.101, n.2, p.153-160

KLINGAUF, P. et al. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. **Phytochemistry**, v.66, p.139–145, 2005.

LEE, C. et al. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl₄-induced oxidative damage in rats. **Food and chemical toxicology**. v.45, n.6, p.888-895, 2007.

LEE, K. et al. Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica*. **Phytochemistry**. v. 64, n. 2, p. 535-541, set. 2003.

LEHNINGER, A. L. **Principles of biochemistry**. 4 ed, Worth publisher. 2004.

LENTA, B. N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548-1557, 2007.

LIN, C.C., HUANG, P.C. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acatopanax senticosus*. **Phytother. Res.** v.14, p.489-494, 2000 apud JEON, T. I. et al. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. **Toxicology**. v.187, p. 67- 73, 2003.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002

MARTINS, F. T. **Estudo cristalográfico de benzofenonas preniladas extraídas de sementes e frutos de *Rheedia brasiliensis*: estrutura cristalina e relação estrutura-atividade**. 2008. 137f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2008

MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2008, em submissão.

MARTINS, F. T. et al. Natural Polyprenylated Benzophenones: Keto-Enol Tautomerism and Stereochemistry. **Journal of. Brazilian Chemical Society**, v.18, n.8, p.1515-1523, 2007.

MÁRTONFI, P.; REPČÁK, M.; ZANVIT, P. Secondary metabolites variation in *Hypericum maculatum* and its relatives. **Biochemical systematics and ecology**, v.34, n.1, p.56-59, 2006

MEDINA, M. A. et al. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? **Life Science**, v.79, n.2, p.105-111, jun. 2006

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v.218, p.273-275, fev. 1983

MINOTTI, G.; AUST, S. D: The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. **Chemistry and physics of lipids**, v.44, p.191-208, jul./set.1987

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **The Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004

MORTON, J. **Fruits of warm climate**. Miami: Julia F. Morton, 1987, p.309-310.

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. Caracterização morfológica da semente e da plântula de bacurizinho (*Rheedia acuminata* (Ruiz et Pav.) Plachon et Triana - CLUSIACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 555-558, ago. 2002

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic Properties of 7-Epiclusianone, a Tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, Alemanha, v.73, p.644-649, jun. 2007.

NGOUELA, S. et al. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. **Phytochemistry**, v.67, n.3, p.302-306, 2006.

NGUEMEVINGA, J.R.; et al. Laurentixanthones A and B, antimicrobial xanthones from *Vismia laurentii*. **Phytochemistry**, v.67, n.13, p.1341-1346, 2006

OHTA, Y. et al. Contribution of the antilipid peroxidative action of dai-saiko-to extract to its preventive effect on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Phytotherapy. Research**, v.12, n.1, p.5-8, 1998.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Two polyisoprenylated benzophenones from floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v.50, p.1073-1079, 1999.

OLIVEIRA, T. T. et al. Atividade antidiabética de *Bauhinia sacra*, corantes naturais, ácido cinâmico e 7-epiclusianona. **NewsLab**, v.72, p.172-190. 2005.

OVIEDO, C.; RODRÍGUEZ, J. EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.6, p.901-905, nov./dez. 2003.

PANTHONG, K. et al. Tetraoxygenated xanthones from the fruits of *Garcinia cowa*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 999-1004, mai. 2006.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.1, p.45-61, jan./fev. 2002.

PORTO, J. Estudante da UFRJ pesquisa medicamentos em comunidades quilombolas no Pará. Agência Brasil, Brasil, 16 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/12/13/materia.2007-12-13.1091749447/view>> . Acesso em: 05 mar. 2008

POTT, A.; POTT, V. J.; SOBRINHO, A. A. B. Plantas úteis à sobrevivência no Pantanal. **IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal**, Corumbá. 2004

RAO, L. J. M. et al. Occurrence of antioxidant and radical scavenging proanthocyanidins from the Indian minor spice nagkesar (*Mammea longifolia* planch and triana syn). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 31-36, jan. 2004

RECKNAGEL, R. O. et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v.43, n.1, p.139-54, 1989

RICE-EVANS, C; BURDON, R. Free radical lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in lipids research**, v.32, p.71-110, 1993

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8; p.121-137, 2002

SANTOS, M. H. et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.5, p.654-660, set./out. 1999

SANTOS, M.H. **Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* Pl. e Tr. e aplicações biológicas dos seus constituintes**. 1996. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996

TANAKA N, et al. Prenylated benzophenones and xanthones from *Hypericum scabrum*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 11, p.1870-1875, 2004.

TANG, S. Z. et al. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v.76, n.1, p.45-51, 2002

TESELKIN, Y.O. et al. Dihydroquercetin as a means of antioxidative defence in rats with tetrachloromethane hepatitis. **Phytother. Res.** v.14, p.160-162, 2000 apud JEON, T. I. et al. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. **Toxicology.** v.187, p. 67- 73, 2003.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de Fitoterapia.** 2. ed. Curitiba: Herbarium Lab. Botânico, 1995 apud FILHO, V. C.;YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, São Paulo, v.21, n.1, p.99-105, jan./fev. 1998

TIH, A. E. et al. Minor constituents of *Harungana madagascariensis* stem bark. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, n.3, p.267-269, mar. 2006

UAWONGGUL, N. et al. Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p.201-207, jan. 2006.

VALKO, M. et al. Review: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VIEGAS, J. R.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar./abr. 2006.

VILLAGÓMEZ ROJAS, A. **Estudio preliminar de la densidad morfologica distribuicion, produccion y comercializacion del achachairu (*Rheedia* spp.) en Santa Cruz de la Sierra.** Santa Cruz de la Sierra: Universidad Autonoma "Gabriel Rene Moreno", Faculdade de Ciencias Agrícolas, 1990. p.32-37.

ZAGOTOA, J. N. et al. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy -metabolism in the rat liver. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n.1-2, p. 47-54, abr. 2006