

## IDENTIFICAÇÃO DE ALGUNS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Indigofera hirsuta* LINN. (FABACEAE) POR CLAE-IES-EM (TOF) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR

Adriana Candido da Silva Moura\*, Wagner Vilegas e Lourdes Campaner dos Santos

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14800-900 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 14/7/10; aceito em 21/2/11; publicado na web em 15/4/11

IDENTIFICATION OF SOME CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Indigofera hirsuta* Linn. (FABACEAE) BY HPLC-ESI-MS (TOF) AND EVALUATION OF THE ANTIRRADICAL ACTIVITY. A rapid analytical approach, suitable to characterize the compounds present in the aqueous and methanol extracts prepared from the aerial parts of *Indigofera hirsuta*, was developed. The method based on high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry, electrospray positive ionization and detection by time of flight (HPLC-ESI-MS-TOF) identified, tryptophan, uracil, rutin, kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, gallic acid and methyl gallate. The antiradical activity of this extract was evaluated using DPPH assay, with gallic acid as antiradical pattern. The study revealed the antiradical activity of methyl galatte ( $EC_{50} = 5 \pm 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) galic acid ( $EC_{50} = 5 \pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and rutin ( $EC_{50} = 21.6 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), isolated from methanol extract ( $EC_{50} = 67.7 \pm 0.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), which showed strong antiradical activity.

Keywords: *Indigofera hirsuta*; mass spectrometry; antiradical activity.

### INTRODUÇÃO

Muitos dos benefícios proporcionados pelas plantas medicinais são atribuídos a substâncias com propriedade antirradicalar, principalmente substâncias fenólicas encontrados em inúmeras plantas.<sup>1</sup> Essas substâncias protegem o organismo de reações oxidativas que podem desencadear uma série de doenças no organismo humano.<sup>2</sup>

A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, possui ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais. É subdividida em 3 subfamílias muito distintas: *Faboideae*, *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae*.<sup>3</sup>

Para a subfamília *Faboideae* estão descritos aproximadamente 482 gêneros e cerca de 12000 espécies de ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais, sendo que algumas dessas espécies tem grande importância medicinal, como as pertencentes ao gênero *Indigofera*.<sup>4</sup>

O gênero *Indigofera* apresenta cerca de 700 espécies herbáceas e arbustivas que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na África, ocorrendo na Austrália, Argentina, China, Índia, Panamá, sudeste asiático e Tailândia. No Brasil foram identificadas 11 espécies, sendo algumas delas amplamente distribuídas no estado de São Paulo.<sup>5,6</sup>

Espécies de *Indigofera* apresentam uma diversidade de classes de substâncias, sendo encontrados flavonoides derivados do kaempferol em *I. hebeptala*<sup>7,8</sup> e rotenoides em *I. tictoria*.<sup>9</sup> Ácidos fenólicos e flavonoides foram encontrados em *I. mysorensis*<sup>10</sup> e em *I. heterantha*.<sup>11-13</sup> De *I. microcarpa* foram isolados dois arilbenzofuranos.<sup>14</sup> Nitrocompostos alifáticos ocorrem em mais de 60 espécies de *Indigofera*.<sup>15</sup> São também encontrados glicosídeos do ácido 3-nitropropanoico (NPA),<sup>16</sup> bem como seus ésteres mono-, di-, tri- e tetrassubstituídos.<sup>17-19</sup> De *Indigofera hirsuta* foi isolado o kaempferol 3,5-digalactosídeo,<sup>20</sup> com atividade antiparasitária.<sup>21</sup>

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a composição química do extrato aquoso e do extrato metanólico

das partes aéreas de *Indigofera hirsuta* por CLAE-IES-EM (TOF), bem como avaliar a atividade antirradicalar do precipitado (obtido da centrifugação do extrato aquoso), dos extratos aquoso e metanólico e das substâncias isoladas.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Procedimentos cromatográficos

Para os procedimentos cromatográficos foram utilizados: placas preparadas de sílica gel 60 (Merck®) (20 x 20 cm x 0,2 mm); coluna de vidro preenchida com Sephadex LH-20 (70 cm x 3,0 cm d.i.), acoplada a uma bomba peristáltica modelo P1 18-1110-91 (Pharmacia®) e a um coletor automático Redifrac (Pharmacia®); cromatógrafo líquido de média pressão Büchi Pump Manager C-615; cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-20140 (Jasco®), com coluna de fase reversa RP<sub>18</sub> imobilizadas com octadecilsilano, modelo Luna 2 (Phenomenex®) (250 x 4,6 mm d.i.) com partículas de tamanho médio de 5  $\mu\text{m}$  e softwares *Star Chromatography Workstation* versão 5.31 (Varian®) e *EZChrom Elite Client/Server* versão 3.1.7 (Chromatec®) para o processamento dos dados cromatográficos; cromatógrafo líquido de alta eficiência (semipreparativo) modelo ProStar 210/330 (Varian®) acoplado a detector de arranjo de foto diodos, com coluna de fase reversa RP<sub>18</sub> imobilizadas com octadecilsilano, modelo Luna 2 (Phenomenex®) (250 x 10,0 mm d.i.) com partículas de tamanho médio de 10  $\mu\text{m}$ .

#### Determinação estrutural

Para obtenção dos dados espectroscópicos e espectrométricos foram utilizados: espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 11,7 T (Varian Inova), operando a 500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C, TMS foi usado como padrão interno para determinação dos deslocamentos químicos; espectrofotômetro de infravermelho

\*e-mail: adrianaesmoura@yahoo.com.br

Jasco®, modelo FT/IR – 4100; espectrofotômetro de ultravioleta/visível (Hach®), modelo DR/4000 U; espectrômetro de massas de alta resolução (EM-IES-QTOF) (FCF-USP-RP) ultrOTOFOQ-ESI-TOF Bruker Daltonics® (Billerica, MA – USA) acoplado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® equipado com detector de arranjo de foto diodos e coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Shimadzu® (250 x 4,6 mm d.i.) com partículas de tamanho médio de 5 µm.

## Material vegetal

As partes aéreas de *Indigofera hirsuta* Linn. foram coletadas em dezembro de 2007 no Estado do Tocantins, Brasil, pelo botânico E. R. dos Santos. Uma exsiccata, de número 389, foi depositada no herbário da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

## Extração e isolamento

Após a coleta, o material vegetal foi seco em estufa a 40 °C e triturado em moinho de facas. O extrato aquoso foi preparado utilizando-se 400 g desse material e 4 L de água a 80 °C em erlenmeyer durante 24 h. A solução foi filtrada e armazenada a 10 °C, ocorrendo formação de precipitado, o qual foi separado por centrifugação (1 g). O sobrenadante foi em seguida concentrado e liofilizado, resultando em 99 g de extrato aquoso. O extrato metanólico (40 g) foi obtido a partir de 200 g do material vegetal por percolação com metanol seguido de destilação do solvente sob pressão reduzida.

O extrato aquoso (3 g, 4 x) foi solubilizado em metanol e fracionado por cromatografia de permeação em gel (CPG) em coluna de Sephadex LH-20 eluída com MeOH. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) [placas de sílica gel, eluídas em CHCl<sub>3</sub>/MeOH/*n*-PrOH/H<sub>2</sub>O, (5:6:1:4, fase orgânica), reveladas com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]<sup>22</sup> e agrupadas, resultando em 7 frações.

A fração 3 (241 mg) foi purificada por cromatografia líquida média pressão (CLMP) (C<sub>18</sub>, 15 x 1,5 cm, gradiente: H<sub>2</sub>O/MeOH; 2,5 mL min<sup>-1</sup>), resultando nas substâncias: triptofano (**1**, 18 mg) e uracila (**2**, 12 mg).

O extrato metanólico (1,5 g) foi fracionado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (coluna Luna 2 (Phenomenex®) 10 µm (250 x 10,0 mm), 254 nm, 4 mL min<sup>-1</sup>, gradiente: solvente A: H<sub>2</sub>O acidificado com 0,05% de TFA, solvente B: MeOH acidificado com 0,05% de TFA, 10% B – 40% B (10 min), 40% B – 60% B (30 min), 60% B – 100% B (35 min); 100 mg mL<sup>-1</sup>; injeções de 80 µL). Este fracionamento resultou no isolamento dos flavonoides rutina (**3**, 12 mg) e kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo (**4**, 9 mg), além de ácido gálico (**5**, 15 mg) e galato de metila (**6**, 10 mg).

O precipitado (1 g) foi fracionado por CPG, fornecendo 10 frações, que foram analisadas por CCDC (eluídas e reveladas nas mesmas condições que o extrato aquoso), resultando no isolamento do flavonoide kaempferol (**7**, 100 mg). A purificação por CLAE da fração 9 permitiu o isolamento do ácido protocatecuico (**8**, 7 mg) [coluna Luna 2 (Phenomenex®) 10 µm (250 x 10 mm), 254 nm, 4,8 mL min<sup>-1</sup>, gradiente: solvente A: H<sub>2</sub>O acidificado com 0,05% de TFA, solvente B: ACN acidificado com 0,05% de TFA, 5% B – 10% B (30 min), 10% B – 100% B (50 min); 80 mg mL<sup>-1</sup>; injeções de 80 µL].

## Análise dos extratos por CLAE-DAD-IES-EM (TOF)

Os extratos metanólico e aquoso foram, separadamente, solubilizados em MeOH/H<sub>2</sub>O (5:95, v/v) (20 mg mL<sup>-1</sup>), filtrados em membrana de PTFE (politetrafluoretileno) e submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e espectrômetro de massas - ionização por *electrospray* e

deteção de íons por tempo de voo [CLAE-DAD-IES-EM (TOF)]. Foi utilizado sistema CLAE-DAD (Shimadzu®) (Coluna Shimadzu® NST<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,60 mm), 254 nm, 1 mL min<sup>-1</sup>, gradiente: solvente A: H<sub>2</sub>O acidificado com 0,05% de TFA, solvente B: MeOH acidificado com 0,05% de TFA, 5% B – 100% B (60 min). Os extratos foram analisados no modo positivo de ionização.

## Atividade antirradicalar

A atividade sequestradora de radicais livres dos extratos e das substâncias isoladas foi determinada utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila).<sup>23-25</sup>

Para avaliar a atividade sequestradora de radicais livres foi utilizada uma solução 0,04 mg mL<sup>-1</sup> de DPPH em metanol. Foram adicionados 2 mL desta solução a 1 mL da solução de cada amostra em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 80 e 160 µg mL<sup>-1</sup>). Após 30 min foram medidas as absorvâncias das soluções resultantes em 517 nm. O teste foi realizado em triplicata. O ácido gálico comercial (Sigma®) foi utilizado como padrão<sup>26</sup> (CE<sub>50</sub> = 5 ± 0,2 µg mL<sup>-1</sup>). As porcentagens de absorvância foram medidas pela equação (%Δ<sub>0</sub>) = 100 x (A<sub>0</sub> – A)/A<sub>0</sub>. A capacidade de doar um hidrogênio radicalar das amostras foi estabelecida por análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% (P<0,05) pelo programa Excel 2007, expressando a concentração eficiente (CE<sub>50</sub>) das amostras capaz de reduzir o DPPH em 50% em 30 min.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Composição química

As estruturas das substâncias **1** a **8** isoladas das partes aéreas de *Indigofera hirsuta* foram identificadas a partir de dados espectroscópicos obtidos por RMN (mono- e bi-dimensionais) e comparadas com dados da literatura.<sup>27,28</sup> Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e os dados de UV e IV estão apresentados no material suplementar. Para confirmar a presença das substâncias nos respectivos ext. MeOH e extrato aquoso, as substâncias isoladas (**1-6**) e os extratos foram analisadas por CLAE-DAD-IES-EM (TOF). Esta análise permitiu combinar o tempo de retenção das substâncias com os dados de absorção no UV<sup>29,30</sup> (Figuras 1a e 1b).

A técnica forneceu, também, informações sobre o íon molecular e fragmentos característicos que possibilitaram confirmar as estruturas das substâncias analisadas (Figura 2, Tabela 1). Os espectros de massas das substâncias **1** a **6** estão apresentados no material suplementar.

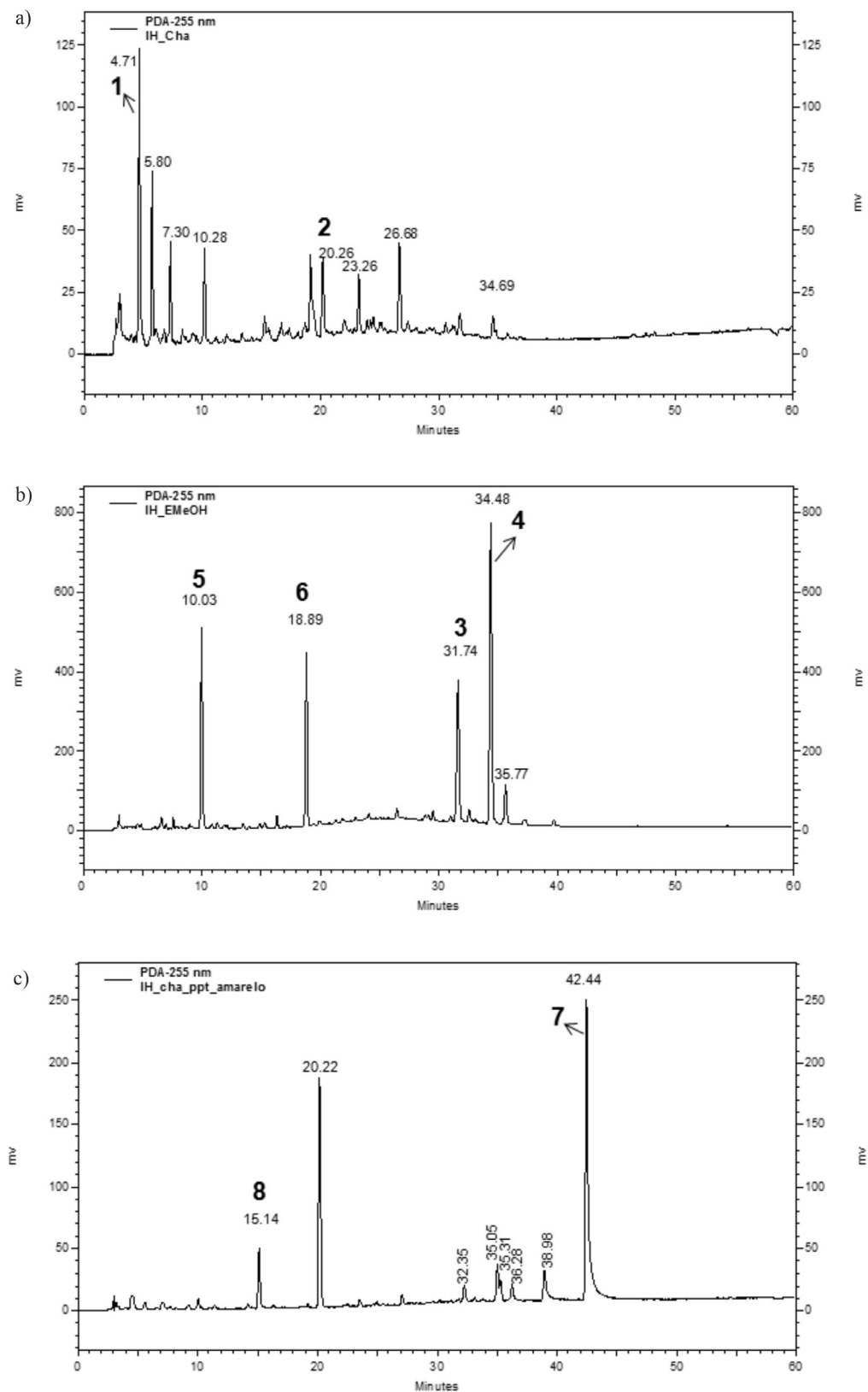
O extrato MeOH é constituído por flavonoides (**3** e **4**) e substâncias fenólicas (**5** e **6**), enquanto que o extrato aquoso contém as substâncias nitrogenadas triptofano (**1**) e uracila (**2**). (Tabela 1, Figura 2).

O aminoácido triptofano (**1**) com t<sub>r</sub> de 20 min, exibiu o íon molecular protonado [M+H]<sup>+</sup> em m/z 205 (C<sub>11</sub>O<sub>2</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>). A fragmentação de segunda ordem (EM/EM) de m/z 205 gerou os íons em m/z 188, referente à perda de NH<sub>3</sub> (fragmento C<sub>11</sub>O<sub>2</sub>H<sub>10</sub>N), e m/z 146, referente ao fragmento C<sub>9</sub>O<sub>8</sub>N.

A uracila (**2**) com t<sub>r</sub> de 4 min apresentou íon molecular protonado [M+H]<sup>+</sup> em m/z 113, de fórmula molecular (C<sub>4</sub>O<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>).

A rutina (**3**) (t<sub>r</sub> = 31 min) apresentou o íon molecular protonado [M+H]<sup>+</sup> em m/z 611, indicando fórmula molecular C<sub>27</sub>O<sub>16</sub>H<sub>31</sub>. A fragmentação EM/EM gerou fragmentos representativos de m/z 465 [M-146+H]<sup>+</sup> e de m/z 303 [M-146-162+H]<sup>+</sup>, indicando as perdas de ramnose (146) e glicose (162), respectivamente.

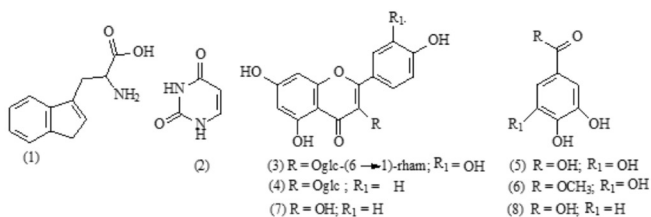
O kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo (**4**) (t<sub>r</sub> = 34 min) apresentou o íon molecular protonado [M+H]<sup>+</sup> em m/z 449. A perda de uma unidade de glicose [M-162+H]<sup>+</sup> levou à formação do fragmento referente à aglicona protonada (m/z 287).



**Figura 1.** a) Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato aquoso [CLAE-DAD (Jasco®), coluna Luna 2 (Phenomenex®) 5 µm (250 x 4,60 mm d.i), 254 nm, 1 mL min<sup>-1</sup>, gradiente: solvente A: H<sub>2</sub>O acidificado com 0,05% de TFA, solvente B: MeOH acidificado com 0,05% de TFA, 5% B – 100% B (60 min)]; b) cromatograma obtido por CLAE-DAD do ext. MeOH [CLAE-DAD (Jasco®), coluna Luna 2 (Phenomenex®) 5 µm (250 x 4,60 mm d.i), 254 nm, 1 mL min<sup>-1</sup>, gradiente: solvente A: H<sub>2</sub>O acidificado com 0,05% de TFA, solvente B: MeOH acidificado com 0,05% de TFA, 5% B – 100% B (60 min)]; c) cromatograma obtido por CLAE-DAD do precipitado [CLAE-DAD (Jasco®), coluna Luna 2 (Phenomenex®) 5 µm (250 x 4,60 mm d.i), 254 nm, 1 mL min<sup>-1</sup>, gradiente: solvente A: H<sub>2</sub>O acidificado com 0,05% de TFA, solvente B: MeOH acidificado com 0,05% de TFA, 5% B – 100% B (60 min)]

**Tabela 1.** Dados das substâncias identificadas em *Indigofera hirsuta*

| Substância                              | Extrato | t <sub>r</sub><br>(min) | UV<br>λ <sub>max</sub> (nm) | Íon precursor<br>([M+H] <sup>+</sup> ) m/z | Íons produtos<br>(EM/EM) m/z |
|---|---------|-------------------------|-----------------------------|--|------------------------------|
| Triptofano (1)                          | aquoso  | 20                      | 278                         | 205  | 188; 146                     |
| Uracila (2)                             | aquoso  | 4                       | 259                         | 113  | -                            |
| Rutina (3)                              | MeOH    | 31                      | 257; 356                    | 611  | 465; 303                     |
| Kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo (4) | MeOH    | 34                      | 265; 347                    | 449  | 287                          |
| Ácido gálico (5)                        | MeOH    | 9                       | 273                         | 171  | 153; 127; 109                |
| Galato de metila (6)                    | MeOH    | 18                      | 274                         | 185  | 153; 126                     |

**Figura 2.** Substâncias identificadas nos ext. MeOH, no extrato aquoso e no precipitado de *Indigofera hirsuta*

O espectro de massas do ácido gálico (5) (t<sub>r</sub> = 9 min) exibiu o íon molecular protonado [M+H]<sup>+</sup> em m/z 171, indicando a fórmula molecular C<sub>7</sub>O<sub>3</sub>H<sub>7</sub>. A fragmentação de segunda ordem desse íon precursor levou aos fragmentos de m/z 153 (perda de H<sub>2</sub>O [M-18+H]<sup>+</sup> (C<sub>7</sub>O<sub>4</sub>H<sub>5</sub>)), m/z 127 (perda de CO<sub>2</sub> [M-44+H]<sup>+</sup> (C<sub>6</sub>O<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)) e em m/z 109 [C<sub>6</sub>O<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

O galato de metila (6) (t<sub>r</sub> = 18 min) exibiu o íon molecular protonado [M+H]<sup>+</sup> em m/z 185 (C<sub>8</sub>O<sub>5</sub>H<sub>9</sub>). A fragmentação de segunda ordem gerou os íons de m/z 153 (C<sub>7</sub>O<sub>4</sub>H<sub>5</sub>, perda da metoxila [M-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) e m/z 126 (C<sub>6</sub>O<sub>3</sub>H<sub>6</sub>, perda de COOCH<sub>3</sub>).

A literatura reporta a existência de flavonoides em *Indigofera hirsuta*,<sup>20</sup> enquanto que as substâncias nitrogenadas triptofano (1) e uracila (2) bem como a rutina (3), o kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo (4), o ácido gálico (5), o galato de metila (6) o kaempferol (7) e o ácido protocatecuico (8) estão sendo descritos pela primeira vez nesta espécie.

A identificação do triptofano tem grande importância, uma vez que está relacionado à via biossintética de alcaloides bis-indólicos como, por exemplo, o índigo e a indirubina.<sup>31,32</sup> Estes alcaloides já foram identificados em algumas espécies do gênero *Indigofera* (*I. suffruticosa* e *I. truxilensis*), sendo obtidos dos extratos metanólicos dessas espécies.<sup>33</sup>

### Atividade antirradicalar

As porcentagens de absorvância medidas pela equação (%Δ<sub>0</sub>) = 100 x (A<sub>0</sub> - A)/A<sub>0</sub> estão representadas na Figura 3 e os valores da CE<sub>50</sub> na Tabela 2.

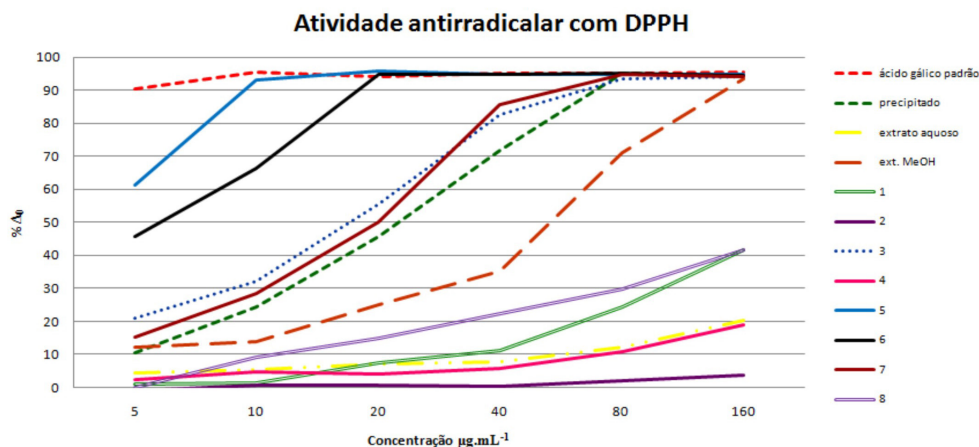
Os resultados obtidos para o precipitado (CE<sub>50</sub> = 38,8 ± 0,7), proveniente da centrifugação do extrato aquoso, e para o ext. MeOH (CE<sub>50</sub> = 67,7 ± 0,9) contêm flavonoides e outras substâncias fenólicas e evidenciaram a atividade antirradicalar desses extratos.

O extrato aquoso (CE<sub>50</sub> = 462,7 ± 1,0), que contém as substâncias nitrogenadas triptofano (1) e uracila (2), não apresentou atividade antirradicalar quando comparado aos demais extratos e ao padrão

**Tabela 2.** Concentração eficiente (CE<sub>50</sub>) dos extratos e substâncias de *Indigofera hirsuta*

| Amostras                                | CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) |
|---|---|
| Ácido gálico comercial (Sigma®)         | 5 ± 0,2*                                |
| Precipitado                             | 38,8 ± 0,7                              |
| Ext.MeOH                                | 67,7 ± 0,9                              |
| Extrato aquoso                          | 462,7 ± 1,0                             |
| Triptofano (1)                          | 186,1 ± 1,0                             |
| Uracila (2)                             | 1958,0 ± 0,9                            |
| Rutina (3)                              | 21,6 ± 0,6                              |
| Kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo (4) | 457,8 ± 1,0                             |
| Ácido gálico (5)                        | 5 ± 0,2*                                |
| Galato de metila (6)                    | 5 ± 0,3*                                |
| Kaempferol (7)                          | 27,9 ± 0,6                              |
| Ácido protocatecuico (8)                | 192,2 ± 0,9                             |

\*O ácido gálico padrão e as substâncias 5 e 6 reduziram o DPPH em mais de 50% na menor concentração analisada (5 µg mL<sup>-1</sup>).

**Figura 3.** Ensaio antirradicalar do ácido gálico padrão, precipitado, extrato aquoso, ext. MeOH e das substâncias isoladas (1-8) de *Indigofera hirsuta*

do ácido gálico comercial ( $CE_{50} = 5 \pm 0,2$ ).

O ácido gálico (**5**) ( $CE_{50} = 5 \pm 0,2$ ) isolado do ext. MeOH e o galato de metila (**6**) ( $CE_{50} = 5 \pm 0,3$ ) foram as substâncias que, na menor concentração, reduziram o DPPH em mais de 50%, enquanto que o ácido protocatecuico (**8**) apresentou  $CE_{50} = 192,2 \pm 0,9$ . Esse fato pode ser explicado pela presença de duas hidroxilas fenólicas em **8** e três em **5** e **6**.<sup>26,34</sup>

A rutina (**3**) apresentou  $CE_{50} = 21,6 \pm 0,6$ , enquanto que o kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (**4**) exibiu  $CE_{50} = 457,8 \pm 1,0$ . A menor atividade antirradicalar de **4** em comparação à rutina (**3**) é justificada devido à existência do sistema *orto*-di-hidroxi no anel B de **3**.<sup>34</sup>

O kaempferol (**7**) ( $CE_{50} = 27,9 \pm 0,6$ ) não possui o sistema *orto*-di-hidroxi no anel B sendo, portanto, sua atividade antirradicalar menos pronunciada que em **3**. A menor atividade antirradicalar da substância **4**, um derivado do kaempferol, ( $CE_{50} = 457,8 \pm 1,0$ ), em comparação com **7**, é justificada pela presença da glicose na posição 3 de **4**.<sup>34</sup>

Comparadas aos flavonoides as substâncias **1** e **2** não têm a propriedade de estabilizar o radical formado, pois não apresentam em suas estruturas hidroxilas fenólicas (Figura 2), sendo, portanto, pouco efetiva a ação de sequestrar o hidrogênio radicalar para formar a difenilpicril-hidrazina.<sup>35,36</sup>

Os flavonoides já são considerados substâncias com potentes propriedades antirradicalares.<sup>35,36</sup> A presença de flavonoides (**3**, **4** e **7**) e outros fenólicos (**5**, **6** e **8**) no precipitado e no ext. MeOH das partes aéreas de *Indigofera hirsuta* justifica a propriedade antirradicalar da espécie.

## CONCLUSÃO

A técnica CLAE-IES-EM (TOF) mostrou-se adequada para identificar os constituintes químicos dos ext. MeOH e aquoso das partes aéreas de *Indigofera hirsuta*. Através da análise dos íons moleculares protonados e dos fragmentos nos espectros de massa foi possível identificar as substâncias isoladas dos extratos como sendo: triptofano (**1**), uracila (**2**), rutina (**3**), kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (**4**), ácido gálico (**5**) e galato de metila (**6**). As substâncias kaempferol (**7**) e ácido protocatecuico (**8**) foram isolados do precipitado (Figura 1c).

Comparando-se os extratos de *Indigofera hirsuta*, a melhor atividade sequestradora de radicais livres foi obtida para o precipitado, seguido do extrato metanólico e do extrato aquoso. Esta atividade é justificada pela presença do kaempferol no precipitado, da rutina, ácido gálico e galato de metila, no ext. MeOH. Essas são substâncias capazes de melhor sequestrar um hidrogênio radicalar do DPPH e formar um radical estável.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de massas, os espectros de RMN <sup>1</sup>H, os dados de RMN de <sup>13</sup>C, UV e IV encontram-se disponíveis gratuitamente em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro. À Prof. Dra. V. da S. Bolzani (NUBBE, IQ-UNESP-Araraquara), ao Prof. Dr. N. P. Lopes (USP-RP) pela colaboração na realização dos experimentos de HPLC-ESI-MS (TOF) e ao técnico J. C. Tomaz (USP-RP) pelo registro dos espectros de massas.

## REFERÊNCIAS

- Sultana, B.; Anwar, F.; *Food Chem.* **2008**, *108*, 879.
- Li, H. B.; Wong, C.; Cheng, K.; Chen, F.; *Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 385.
- Barroso, G. M.; *Sistemática de angiospermas do Brasil*, 2ª ed., Edusp: São Paulo, 1978.
- Di Stasi, L. C.; Hiruma-Lima, C. A.; *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*, 2ª ed., Ed. UNESP: São Paulo, 2002.
- Moreira, J. L. A.; Azevedo-Tozzi, A. N. G.; *Rev. Bras. Bot.* **1997**, *20*, 97.
- Barros, G. M. C. C.; Teixeira, S. P.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 287.
- Hasan, A.; Farman, M.; Ahmad, I.; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 275.
- Hasan, A.; Ahmad, I.; Khan, M. A.; Chudhary, M. I.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1115.
- Kamal, R.; Mangla, M.; *Biol. Plant.* **1984**, *263*, 202.
- Adinarayana, D.; Sarada, M. J.; *Indian Chem. Soc.* **1987**, *64*, 648.
- Anila, T.; Nancy, R.; Ahmed, S. R. J.; *Indian Chem. Soc.* **1982**, *59*, 1007.
- Hasan, A.; Khan, M. A.; Iftikhar, N.; *Fitoterapia* **1991**, *52*, 183.
- Hasan, A.; Waterman, P.; Iftikhar, N.; *J. Chromatogr.* **1989**, *466*, 399.
- Moraes e Souza, M. A.; Bieber, L. W.; Chiappeta, A. A.; Maciel, G. M.; Mello, J. F.; Monache, F. D.; Messana, I.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1817.
- Williams, M. C.; *Agron. J.* **1981**, *73*, 434.
- Aylward, J. H.; Court, R. D.; Haydock, K. P.; Strickland, R. W.; Hegarty, M. P.; *Aust. J. Agric. Res.* **1987**, *38*, 177.
- Dominguez, X. A.; Martinez, C.; Calero, A.; Dominguez-Jr, X. A.; Hinojosa, M.; Samudio, A.; Watson, W. H.; Zabel, U.; *Planta Med.* **1978**, *34*, 172.
- Dominguez, X. A.; Martinez, C.; Calero, A.; Dominguez-Jr, X. A.; Hinojosa, M.; Zamudio, A.; Zabel, U.; Smith, W. B.; Watson, W. H.; *Tetrahedron Lett.* **1978**, *5*, 429.
- Garcez, W. S.; Garcez, F. R.; Honda, N. K.; *Ciência Cult. (Suppl.)* **1985**, *37*, 312.
- Rao, J. U. M.; Hanumiah, T.; Rao, B. K.; Rao, K. V. J.; *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1984**, *23*, 91.
- Morris, J. B.; Walker, J. T.; *J. Nemat.* **2002**, *34*, 358.
- Wagner, H.; Blatt, S.; Zgainski, E. M.; *Plant Drug Analysis*, Springer Verlag: Berlin, 1984.
- Molyneux, P.; *Songklanakarín J. Sci. Technol.* **2004**, *26*, 211.
- Silva, M. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2008.
- Jang, H. D.; Chang, K. S.; Chang, T. C.; Hsu, C. L.; *Food Chem.* **2010**, *118*, 554.
- Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Viera-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351.
- Agrawal, P. K.; *Carbon 13 NMR of flavonoids*, Elsevier: Amsterdam, 1989.
- Harborne, J. B.; *The flavonoids: advances in research since 1986*, Chapman and Hall: London, 1996.
- Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B.; *The systematic identification of flavonoids*, Springer-Verlag: New York, 1970.
- Rinaldo, D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2007.
- Salvini, M.; Boccardi, T. M.; Sani, E.; Bernardi, R.; Tozzi, S.; Pugliesi, C.; Durante, M.; *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, *46*, 715.
- Berry, A.; Dodge, T. C.; Pepsin, M.; Weyler, W.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *28*, 127.
- Calvo, T. R.; Cardoso, C. R. P.; Moura, A. C. S.; Santos, L. C.; Colus, I. M. S.; Vilegas, W.; Varanda, E. A.; *Evid. Based Complement. Altern. Med.* (2009), doi: doi:10.1093/ecam/nep123.
- Ayres, M. C. C.; Chaves, M. H.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Vieira-Jr., G. M.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1509.
- van den Ber, R.; Haenen, G. R. M. M.; van den Berg, H.; Vander, V. W.; Bast, A.; *Food Chem.* **2000**, *703*, 391.
- Saija, A.; Scalse, M.; Lanza, M.; Marzullo, D.; Bonina, F.; Castelli, F.; *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *4*, 481.