



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA PROF. DELBY
FERNANDES DE MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

DANIELLE SERAFIM PINTO

PRIMEIROS ESTUDOS QUIMIOTAXONÔMICOS DO GÊNERO
***RICHARDIA*: FITOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Richardia brasiliensis* GOMES**
(RUBIACEAE)

JOÃO PESSOA - PB

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELLE SERAFIM PINTO

**PRIMEIROS ESTUDOS QUIMIOTAXONÔMICOS DO GÊNERO
RICHARDIA: FITOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Richardia brasiliensis*
GOMES (RUBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, com vistas a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacoquímica.

ORIENTADOR: PROF. DR. EMÍDIO VASCONCELOS LEITÃO DA CUNHA

CO-ORIENTARORA: PROF^a. DR^a. CELIDARQUE DA SILVA DIAS

JOÃO PESSOA – PB

2008

DANIELLE SERAFIM PINTO

**PRIMEIROS ESTUDOS QUIMIOTAXONÔMICOS DO GÊNERO
RICHARDIA: FITOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Richardia brasiliensis*
GOMES (RUBIACEAE)**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ivana Maria Fechine

Examinadora Externa

Prof^a. Dr^a. Maria Célia de Oliveira Chaves

Examinadora Interna

Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

Orientador

**“Tudo é do Pai toda honra e toda glória é
Dele a vitória alcançada em minha vida”**

Aos meus pais Domilson Costa Pinto e Inêz Serafim de Lima Pinto pela incansável dedicação e empenho na minha educação profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e coragem para superar as dificuldades da vida.

Aos meus irmãos Dailson e Danilo pelo apoio e estímulo à dedicação dos meus propósitos.

Às minhas cunhadas Lisandra e Marcelle que sempre me deram força e incentivo nesta caminhada.

A todos os meus tios e tias que sempre se fizeram presentes em todo momento que precisei de apoio.

Ao Professor Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha pela confiança, amizade e devotamento em sua orientação, contribuindo não apenas para minha formação acadêmica como também humanitária.

À minha co-orientadora Dr^a. Celidarque da Silva Dias pelo companheirismo e imprescindível contribuição para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, todo o tempo disposto a ajudar na produção científica.

Ao Sr. Gilvane pela coleta do material vegetal.

À Professora Maria de Fátima Agra pela identificação do material botânico.

Ao Prof. Dr. Edilberto e ao Dr. Daniel Uchôa, do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM) pela boa vontade em contribuir na realização de alguns espectros.

Aos Professores da graduação e pós-graduação, cujos ensinamentos me acompanharam por toda vida.

Às minhas companheiras de moradia Vanine Gomes, Danielle Oliveira, Anna Cláudia e Adriana Maria pela convivência saudável e inestimável amizade nos momentos difíceis e alegres.

Aos amigos Steno, Viviane, Roosevelt, Rafael, Anna, Gabriela, Narlize, Cibelle e Guedes pela valiosa ajuda e ótima vivência no laboratório, sempre demonstrando o verdadeiro espírito de equipe.

À minhas amigas Aline e Camila Caroline pelo apoio em minha caminhada.

A todos os colegas de pós-graduação que caminharam juntos comigo para concretização de um sonho.

Ao aluno de iniciação científica Fábio Henrique pela grande dedicação, estímulo e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Marcelo Dantas, Roberto Jéferson, Sócrates e Josean Fechine prestativos, solidários e sempre dispostos a contribuir com seus conhecimentos.

À Anna Luiza, Regina e Roberto pela atenção e acolhida em Fortaleza, durante a realização de alguns espectros.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) pela competência e apoio, fundamentais para o bom andamento deste trabalho.

A Raimundo Nonato, grande amigo, por sempre servir a todos com alegria e boa vontade.

A Vicente Carlos pela paciência e competência e por contribuir com o nosso trabalho com muito bom senso e responsabilidade.

À toda família do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, onde, apesar das dificuldades, caminhei para a concretização de grandes realizações.

RESUMO

A família Rubiaceae compreende cerca de 637 gêneros e aproximadamente 10700 espécies, ocorrendo essencialmente nas regiões tropicais do Brasil. *Richardia brasiliensis*, popularmente conhecida por “poaia branca”, é uma planta nativa da região sul do Brasil utilizada na medicina popular como antiemética, antidiabética, vermífuga e contra hemorróida, além de ser empregada na cura de eczema, tratamento de queimaduras e contra a malária avícola. Este trabalho reporta o isolamento e identificação estrutural de dois triterpenos, uma cumarina e um flavonóide glicosilado, através do estudo fitoquímico da espécie *Richardia brasiliensis*. Utilizando-se métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e a comparação dos dados com a literatura foi possível isolar e identificar os constituintes ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-óico; 3 β -hidroxiurs-11-en-28,13 β -olide; 6-metoxi-7-hidroxycumarina e Isorametina 3-*O*-rutinosídeo, todos isolados pela primeira vez no gênero, apresentando, portanto, relevante importância quimiotaxonômica para o mesmo.

ABSTRACT

The family Rubiaceae comprises around 637 genera and approximately 10,700 species, occurring essentially in tropical regions of Brazil. *Richardia brasiliensis*, known popularly as “poaia branca”, is native to Brazil south region, being used in folk medicine as anti-emetic, anti-diabetic, vermifuge and against hemorrhoids, besides being employed to cure eczema, in the treatment of burns and against avian malaria. This work reports the isolation and structural identification of two triterpenes, a coumarin, and a flavonoid glycoside, through the phytochemical study of the species *Richardia brasiliensis*. By means of spectroscopic techniques such as IR, one and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR besides comparison with literature data, the metabolites 3- β -hydroxyolean-12-en-28-óic; 3- β -hydroxyurs-11-en-28,13- β -olid; 6-metoxi-7-hydroxycumarin and isorhamnetin-3-*O*-rutinoside were isolated and identified. All of them were isolated for the first time in the genus, thereby presenting relevant chemotaxonomic importance to it.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica (em vermelho), do gênero <i>Richardia</i>	32
Figura 2. Distribuição geográfica (em vermelho), da espécie <i>Richardia brasiliensis</i>	33
Figura 3. Ramo da espécie <i>Richardia brasiliensis</i>	34
Figura 4. Esqueleto isoprênico.....	45
Figura 5. Espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-1 (CDCl_3 – 50 MHz).....	67
Figura 6. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-1 na região de 182 – 78 ppm (CDCl_3 – 50 MHz).....	68
Figura 7. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-1 na região de 62 – 0 ppm (CDCl_3 – 50 MHz).....	69
Figura 8. Espectro de RMN ^1H de Rb-1 (CDCl_3 – 200 MHz).....	70
Figura 9. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-1 na região de 6,0 – 3,0 ppm (CDCl_3 – 200 MHz).....	71
Figura 10. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-1 na região de 2,2 – 0,6 ppm (CDCl_3 – 200 MHz).....	72
Figura 11. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMQC de Rb-1 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	73
Figura 12. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMQC de Rb-1 na região de 4,5 – 0,5 x 85 – 35 ppm(CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	74
Figura 13. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMQC de Rb-1 na região de 8,2 – 2,2 x 42 – 12 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	75
Figura 14. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-1 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	76
Figura 15. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-1 na região de 6,3 – 1,5 x 182 – 34 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	77
Figura 16. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-1 na região de 1,2 – 0,7 x 64 – 12 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	78
Figura 17. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-1 na região de 2,2 – 0,6 x 142 – 66 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	79
Figura 18. Espectro de correlação ^1H x ^1H - COSY de Rb-1 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	80
Figura 19. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^1H - COSY de Rb-1 na região de 3,0 – 7,5 x 8,0 – 2,7 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	81
Figura 20. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^1H - COSY de Rb-1 na região de 3,4 – 0,4 x 3,5 – 0,3 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	82

Figura 21. Espectro de RMN ^1H de Rb-2 (CDCl_3 – 200 MHz).....	86
Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-2 na região de 7,7 – 6,1 ppm (CDCl_3 – 200 MHz).....	87
Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-2 (CDCl_3 – 50 MHz).....	88
Figura 24. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-2 na região de 164 – 101 ppm (CDCl_3 – 50 MHz).....	89
Figura 25. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMQC de Rb-2 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	90
Figura 26. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMQC de Rb-2 na região de 8,0 – 3,5 x 150- 50 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	91
Figura 27. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMQC de Rb-2 na região de 8,0 – 5,8 x 147- 100 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	92
Figura 28. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-2 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	93
Figura 29. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-2 na região de 8,3 – 3,2 x 170 – 105 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz).....	94
Figura 30. Espectro de RMN ^1H x ^1H - COSY de Rb-2 (CDCl_3 , 200 MHz).....	95
Figura 31. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H - COSY de Rb-2 na região de 8,0 – 5,8 x 8,4 – 5,6 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).....	96
Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H - COSY de Rb-2 na região de 4,2 – 1,0 x 4,5 – 0,7 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).....	97
Figura 33. Espectro de RMN ^1H x ^1H - NOESY de Rb-2 (CDCl_3 , 200 MHz).....	98
Figura 34. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H - NOESY de Rb-2 na região de 8,0 – 5,8 x 8,5 – 5,5 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).....	99
Figura 35. Espectro de IV Rb-3 em pastilhas de KBr.....	103
Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-3 (CDCl_3 – 50 MHz).....	104
Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-3 na região de 184 – 78 ppm (CDCl_3 – 50 MHz).....	105
Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-3 na região de 57 – 14 ppm (CDCl_3 – 50 MHz).....	106
Figura 39. Espectro de RMN ^1H de Rb-3 (CDCl_3 – 200 MHz).....	107
Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-3 na região de 5,4 – 2,6 ppm (CDCl_3 – 200 MHz).....	108
Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-3 na região de 2,2 – 0,4 ppm (CDCl_3 – 200 MHz).....	109

Figura 42. Espectro de IV Rb-4 em pastilha de KBr.....	115
Figura 43. Espectro de RMN ^1H de Rb-4 (CD_3OD – 500 MHz).....	116
Figura 44. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-4 na região de 8,0 – 5,2 ppm (CD_3OD – 500 MHz).....	117
Figura 45. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-4 na região de 4,6 – 3,2 ppm (CD_3OD – 500 MHz).....	118
Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C -BB de Rb-4 (CD_3OD – 125 MHz).....	119
Figura 47. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB de Rb-4 na região de 75 – 55 ppm (CD_3OD – 125 MHz).....	120
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 de Rb-4 (CD_3OD – 125 MHz).....	121
Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 de Rb-4 na região de 75 – 55 ppm (CD_3OD – 125 MHz).....	122
Figura 50. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	123
Figura 51. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 8,1 – 6,1 ppm x 170 – 145 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	124
Figura 52. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 8,1 – 6,1 ppm x 125 – 95 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	125
Figura 53. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 6,5 – 6,2 ppm x 180 – 155 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	126
Figura 54. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 6,5 – 6,1 ppm x 110 – 95 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	127
Figura 55. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 5,3 – 4,0 ppm x 150 – 135 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	128
Figura 56. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 6,0 – 3,3 ppm x 110 – 100 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	129
Figura 57. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 3,9 – 3,2 ppm x 75 – 65 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	130
Figura 58. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 4,7 – 4,4 ppm x 75 – 65 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	131
Figura 59. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 na região de 1,3 – 1,1 ppm x 75 – 65 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados referentes à triagem fitoquímica realizada com o extrato bruto de <i>Richardia brasiliensis</i>	55
Tabela 2. Frações obtidas e eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Richardia brasiliensis</i>	59
Tabela 3. Dados de RMN ^1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Rb-1 registrados em CDCl_3	65
Tabela 4. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Rb-1 com modelo encontrado na literatura.....	66
Tabela 5. Dados de RMN ^1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY e NOESY) de Rb-2 registrados CDCl_3	84
Tabela 6. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Rb-2 com os valores encontrados na literatura.....	85
Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Rb-3 em CDCl_3	101
Tabela 8. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^{13}C de Rb-3 em CDCl_3 com valores encontrados na literatura.....	102
Tabela 9. Dados espectrais de RMN de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 Hz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de Rb-4 registrados em CD_3OD	113
Tabela 10. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Rb-4 com valores encontrados na literatura.....	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de flavonóides e algumas de suas características conhecidas.....	37
--	----

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de <i>Richardia</i> <i>brasiliensis</i>	56
Fluxograma 2. Fracionamento da fase clorofórmica do extrato etanólico bruto de <i>Richardia</i> <i>brasiliensis</i>	58
Fluxograma 3. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de <i>Richardia brasiliensis</i>	61

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides.....	43
Esquema 2. Etapa biossintética da formação das cumarinas.....	45
Esquema 3. Rota biossintética para formação dos triterpenos.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt: acetato de etila

APT: Attached Proton Test

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CD₃OD: Metanol deuterado

CHCl₃: Clorofórmio

CH₃OH: Metanol

COSY: Correlation Spectroscopy

d: Duplete

dd: Duplo duplete

ddd: Duplo duplo duplete

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

dl: Duplete largo

EtOH: Etanol

g: Grama

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

Hz: Hertz

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

KBr: Brometo de Potássio

Kg: Quilograma

L: Litro

LTF: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

m: Multiplete

mg: Miligrama

MHz: Megahertz

Na₂SO₄: Sulfato de Sódio

nm: Nanômetro

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Simpleto

sl: Simpleto largo

t: Tripleto

u.m.a.: Unidade de Massa Atômica

δ: Deslocamento Químico

COMUNICAÇÕES E PUBLICAÇÕES OBTIDAS COM ESTE TRABALHO**✓ Comunicações em Congressos**

Título: Flavonóide glicosilado isolado de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae).

Autores: PINTO, D. S.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DIAS, C.S.; DA CUNHA, E. V. L.

Evento: VI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Belém-PA, 2007.

Título: Constituintes químicos isolados da fase clorofórmica de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae).

Autores: PINTO, D. S.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DIAS, C.S.; DA CUNHA, E. V. L.

Evento: I Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, 2007.

Título: Compostos Fenólicos Isolados de *Richardia brasiliensis* Gomes.

Autores: TENÓRIO-SOUZA, F. H.; PINTO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DIAS, C.S.; DA CUNHA, E. V. L.

Evento: II Nature an Unexploited Source of Bioactive Compounds, João Pessoa-PB, 2007.

Título: Phytochemical study of *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae).

Autores: PINTO, D. S.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; SENA FILHO, J. G.; TAVARES, J. F.; UCHOA, D. E. A.; LIMA, M. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DIAS, C.S.; DA CUNHA, E. V. L.

Evento: Phytochemical study of *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). In: 1ST Brazilian Conference on Natural Products (1ST BCNP), São Pedro-SP, 2007.

✓ Artigo Publicado

Título: Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae).

Autores: PINTO, D. S.; TOMAZ, A. C. A.; TAVARES, J. F.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; BRAZ-FILHO, R.; DIAS, C.S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA CUNHA, E. V. L.

Periódico: Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008.

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO.....	23
2.0 – OBJETIVOS.....	27
2.1 – Objetivo geral.....	28
2.2 – Objetivos específicos.....	28
3.0 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	29
3.1 – Considerações sobre a família Rubiaceae.....	30
3.2 – Considerações sobre o gênero <i>Richardia</i> e a espécie <i>Richardia brasiliensis</i>	31
3.2.1 – Posição sistemática de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes.....	34
3.2.2 – Características botânicas de <i>Richardia brasiliensis</i>	34
3.3 – Considerações gerais sobre os compostos fenólicos.....	35
3.3.1 – Flavonóides.....	35
3.3.1.1 – Aspectos químicos.....	35
3.3.1.2 – Flavonas e flavonóis.....	37
3.3.1.3 – Flavanonas.....	38
3.3.1.4 – Isoflavonas.....	38
3.3.1.5 – Atividades biológicas dos flavonóides.....	39
3.3.1.6 – Outras considerações sobre flavonóides.....	40
3.3.2 – Cumarinas.....	40
3.3.2.1 – Aspectos químicos.....	40
3.3.2.2 – Ocorrência e distribuição das cumarinas.....	41
3.3.2.3 – Usos e propriedades farmacológicas das cumarinas.....	41
3.3.3 – Aspectos biossintéticos dos flavonóides e cumarinas.....	41
3.4 – Considerações sobre terpenóides.....	45

3.4.1 – Aspectos químicos.....	45
3.4.2 – Atividades biológicas dos terpenóides.....	45
3.4.3 – Aspectos gerais da biossíntese dos triterpenos.....	46
4.0 – PARTE EXPERIMENTAL.....	52
4.1 – Material botânico.....	53
4.2 – Métodos de análise.....	53
4.2.1 – Métodos cromatográficos.....	53
4.2.2 – Métodos espectroscópicos.....	53
4.2.3 – Ponto de fusão.....	54
4.2.4 – Pureza da amostra.....	54
4.3 – Processamento do material vegetal de <i>Richardia brasiliensis</i>	54
4.3.1 – Triagem fitoquímica de <i>Richardia brasiliensis</i>	55
4.3.2 – Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de <i>Richardia brasiliensis</i>	55
4.4 – Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica.....	57
4.5 – Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila.....	60
5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
5.1 – Determinação estrutural dos constituintes químicos de <i>Richardia brasiliensis</i>	63
5.1.1 – Determinação estrutural de Rb-1.....	63
5.1.2 – Determinação estrutural de Rb-2.....	83
5.1.3 – Determinação estrutural de Rb-3.....	100
5.1.4 – Determinação estrutural de Rb-4.....	110
5.2 – Constantes físicas e dados espectroscópicos dos constituintes químicos isolados de <i>Richardia brasiliensis</i>	133
5.2.1 – 3 β -hidroxiurs-11-en-28,13 β -olide.....	133
5.2.2 – Escopoletina (6-metoxi-7-hidroxycumarina).....	133

5.2.3 – Ácido oleanólico (ácido 3- β -hidroxiolean-12-en-28-óico).....	134
5.2.4 – Isorametina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (3'-metoxi-3- <i>O</i> -[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-5,7,4'-trihidroxi flavona).....	135
6.0 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	136
REFERÊNCIAS.....	138

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo, há muito tempo, utilizadas pela população mundial como matéria-prima para o tratamento informal, cura e prevenção de seus males. Seu uso remonta o início da civilização, quando o homem tomou consciência da necessidade de combater as doenças que afligiam o corpo e chegou aos tempos atuais, tornando-se, muitas vezes, o único recurso terapêutico eficaz disponível em muitas comunidades (DI STASI, 1996).

No início, os químicos estudavam as plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopéias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas. Dada a importância das plantas para a medicina da época, a química e a medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001).

Muitas das propriedades terapêuticas das plantas relatadas pela população, são confirmadas, em sua maioria, através dos estudos científicos, comprovando, portanto, a importância da pesquisa etnofarmacológica. Tais propriedades propiciaram o desenvolvimento de vários medicamentos, sejam estes obtidos por síntese, a partir do metabólito protótipo, por isolamento ou, algumas vezes, por biomonitoramento (SIMÕES et al., 2003).

Segundo Cechinel-Filho; Yunes (2001) os produtos naturais desempenham um importante papel no processo de descoberta de fármacos. Atualmente, tem-se observado que estes são responsáveis, direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os usados como antibióticos e antitumorais, esta percentagem é de 70%. Aproximadamente 25% dos fármacos empregados, nos últimos anos, nos países industrializados advêm de produtos naturais, especialmente de plantas superiores.

Apesar de sua longínqua história, grande parte da flora mundial é desconhecida, pois das 250.000 a 500.000 espécies vegetais existentes na natureza, não mais que 10% foram examinadas sob os aspectos químicos, biológicos e farmacológicos (VERPOORTE, 1998). O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, uma vez que detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, distribuída em seis biomas distintos (NOLDIN et al., 2006). Esta notável biodiversidade poderá vir a ser aproveitada, de forma racional, para

o desenvolvimento de novos medicamentos, sejam estes fármacos, fitoterápicos ou fitofármacos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001).

Este país apresenta grande diversidade de plantas com potenciais medicinais, ainda não pesquisados, sendo, portanto, promissoras fontes de inovações terapêuticas e farmacológicas para as mais diversas áreas da saúde humana. A importância medicinal, econômica e ecológica de espécies nativas brasileiras, bem com o risco de sua extinção pela ação predatória do homem, tem motivado os estudos destas plantas, visando sua preservação e aproveitamento racional (SOUZA et al., 2003). Todos esses fatores têm redobrado o interesse das indústrias farmacêuticas para o aproveitamento da biodiversidade mundial, atualmente concentrada nos países tropicais, visando o desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente para o tratamento de enfermidades, em que a síntese orgânica não tem mostrado sucesso (CALIXTO, 2000; LAWRENCE, 1999).

Deve-se considerar que a diversidade molecular associada aos produtos naturais é maior que qualquer outra fonte. Cerca de 40% das estruturas contidas no “Dictionary of Natural Products”, publicado pela editora Chapman e Hall, não aparecem na literatura relacionada à química sintética (HENKEL et al., 1999). A diversidade estrutural, essencial na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos, foi indicada como razão fundamental do atual interesse das grandes indústrias pelos produtos naturais (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001).

A Química Medicinal, em suas inúmeras atribuições, engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, a síntese ou a modificação molecular destas; o isolamento de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e propriedades) até suas características estruturais quando da (s) interação (ões) com diferentes sistemas biológicos; e a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos, farmacológicos, farmacocinéticos e toxicológicos (AMARAL; MONTANARI, 2002). Analisando-se todas as fases do desenvolvimento da química medicinal, pode-se evidenciar sua importância, não só como embasamento científico de uma medicina alternativa, mas como fonte de novos e potentes fármacos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigação da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética);

estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos.

O conhecimento cada vez mais aprofundado das espécies vegetais, desenvolvido através de estudos integrados nas áreas da botânica, química, farmacologia, e outras ciências afins é vital para dar suporte e maior longevidade ao uso do potencial florístico ainda existente no planeta. A exploração deve ser racional e sustentada, ainda que o objetivo maior seja a preservação da saúde e da vida humana através da prevenção, controle ou cura das diferentes moléstias que afligem as populações.

Dando continuidade à pesquisa das plantas medicinais, tomou-se como objeto de estudo a espécie *Richardia brasiliensis*, pertencente à família Rubiaceae, considerada uma das maiores famílias das angiospermas e de grande importância para os setores alimentício, ornamental e farmacêutico. Espécies de Rubiaceae são conhecidas como bioprodutoras de alcalóides, taninos, saponinas, esteróides, terpenos e flavonóides, além do relato de algumas espécies mostrar-se importante para medicina tradicional (ADOLPHO et al., 2006; CARBONEZI et al., 2004; HAMERSKI et al., 2005; SILVA et al., 2006).

Dada a riqueza metabólica desta família, o estudo de espécies representantes de seus gêneros, especialmente *Richardia*, cuja química ainda é pouco conhecida, pode conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas. Este é um dos primeiros trabalhos relacionado ao estudo fitoquímico do gênero *Richardia* e o primeiro da espécie *Richardia brasiliensis*.

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o estudo quimiotaxonômico da família Rubiaceae, especialmente do gênero *Richardia*, tendo em vista o potencial etnobotânico e etnofarmacológico desta família.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar fitoquimicamente a espécie *Richardia brasiliensis*, através de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos;
- ✓ Determinar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos isolados de *Richardia brasiliensis*, através de métodos espectroscópicos;
- ✓ Integrar estudos biológicos ao estudo químico de *Richardia brasiliensis*, através da disponibilização de seus extratos e/ou substâncias isoladas para realização de testes farmacológicos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Rubiaceae

A família Rubiaceae é considerada uma das maiores famílias das angiospermas, e a maior da ordem Gentianales, compreendendo cerca de 637 gêneros e aproximadamente 10700 espécies, classificadas em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae) e 39 tribos, ocorrendo essencialmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (PEREIRA; BARBOSA, 2004; PEREIRA; PEREIRA et al., 2006; VIEIRA et al., 2006; MONGRAND, S. et.al, 2005). No Brasil, esta família está representada por 18 tribos, 101 gêneros e 1010 espécies, distribuídas por diversas formações vegetais e apresentando grande ocorrência na Mata Atlântica (PEREIRA et al., 2006). Para a região Nordeste, foram compilados 66 gêneros e 277 espécies. (PEREIRA; BARBOSA, 2004).

Rubiaceae compreende espécies com hábitos bastante variados, incluindo ervas, arbustos, subarbustos, árvores e trepadeiras, facilmente reconhecidas pelas folhas simples, opostas e estípulas interpeciolares (JOLY, 1983; TEIXEIRA; MACHADO, 2004). Exemplos comuns encontram-se nos gêneros *Borreria*, *Diodia* e *Richardia*, este último conhecido por poaia, que são subarbustos ou ervas dos campos e de terrenos baldios (JOLY, 1983).

Representantes da família Rubiaceae são importantes componentes de sub-bosques de florestas neotropicais, onde há alta diversidade de sistemas reprodutivos e de polinização (VIEIRA et al, 2006). Várias de suas espécies são fontes de recursos para animais que se alimentam de pólen, néctar e frutos, sendo essenciais para o equilíbrio dos ecossistemas (LOPES; BUZATO, 2005).

Espécies dessa família apresentam grande importância econômica, sendo exploradas como alimentícias (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Ixora* spp., *Mussaenda* spp., *Gardenia* spp. dentre outras) e na indústria farmacêutica, a *Cinchona pubescens* Vahl, por exemplo, produtora de quinina, é empregada no tratamento da malária. Além disso, várias outras são referidas popularmente como medicinais e/ou tóxicas, dentre as quais destacam-se: *Coutarea hexandra* (Jacq.) K.Schum. e diversas espécies dos gêneros *Borreria*, *Cinchona* e *Richardia*, descritas como medicinais; *Palicourea* e *Psychotria*, popularmente conhecidas como “mata-ratos”, que são consideradas venenosas. Tais particularidades fazem com que a família Rubiaceae seja relativamente bem estudada nos ecossistemas tropicais (COELHO et al., 2006).

Do ponto de vista etnomedicinal e farmacológico diversas propriedades têm sido evidenciadas para algumas espécies de Rubiaceae, tais como *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes cuja presença de dois alcalóides em suas raízes, a emetina e a cefaelina, conferem-lhe propriedades emética, amebicida e expectorante (ASSIS; GIULIETTI, 1999; ROSSI et al., 2005); *Galianthe brasiliensis* (Spreng) E.L. utilizada na medicina popular como emética, além da efetiva atividade antiproliferativa do extrato metanólico bruto de suas partes aéreas, podendo estar relacionada, em parte, ao ácido ursólico e asperulosídeo presentes na espécie (MOURA et al., 2006); *Uncaria sinensis* utilizada secularmente na medicina tradicional chinesa para tratamento de desordens nervosas e febre (CARBONEZI et al., 2004); *Uncaria callophylla* indicada na Tailândia para o tratamento da hipertensão arterial e diversas enfermidades (CARBONEZI et al., 2004); *Uncaria glabata* empregada em Sumatra na medicina tradicional contra intoxicação alimentar (CARBONEZI et al., 2004); *Uncaria gambir* utilizada na Malásia, na forma de pasta e loções, para alívio de queimaduras e afecções epidérmicas (CARBONEZI et al., 2004); *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel e *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. empregadas na medicina popular peruana, como fitoterápico, no tratamento do câncer, gastrite, artrite e certas enfermidades epidérmicas (CARBONEZI et al., 2004); e a *Gonzalagunia rosea* Standl cujo extrato metanólico apresenta bioatividade contra *Candida albicans* e *Fusarium solani* (NIÑO et al., 2006).

Investigações fitoquímicas realizadas sobre Rubiaceae revelaram os alcalóides indólicos como sendo os principais marcadores químicos desta família (CARBONEZI et al., 2004). Além destes compostos também foram evidenciados iridóides glicosilados e não glicosilados, antraquinonas, saponina triterpênica, flavonóides, lignóides, terpenos e derivados fenólicos (HAMERSKI et al., 2005; SILVA et al., 2006).

O conhecimento aprofundado da família Rubiaceae, de grande diversidade metabólica e pronunciado potencial farmacológico pode abrir excitantes perspectivas para a química, farmacologia e quimiotaxonomia.

3.2 Considerações sobre o gênero *Richardia* e a espécie *Richardia brasiliensis*

O gênero *Richardia*, subfamília Rubioideae, tribo Spermacoceae, é constituído de aproximadamente 15 espécies vegetais, compreendendo ervas anuais ou mais comumente perenes, distribuídas desde os Estados Unidos até o centro da América do Sul (LEWIS; OLIVER, 1974) (Figura 1, p. 32).

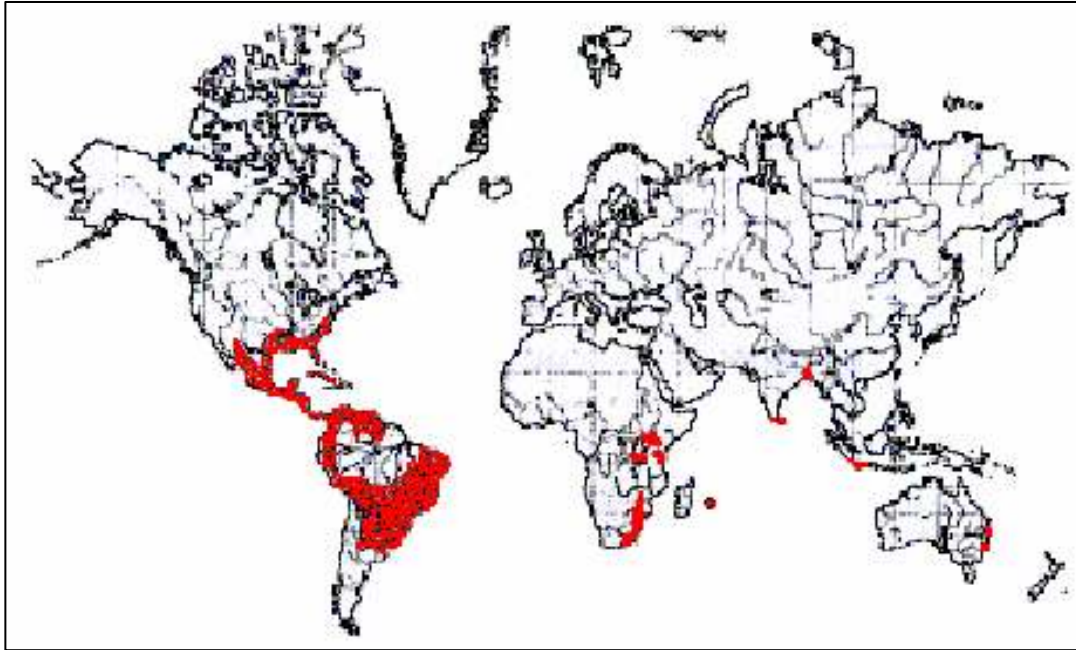


Figura 1. Distribuição geográfica (em vermelho), do gênero *Richardia* (Adaptado de LEWIS; OLIVER, 1974).

Espécies deste gênero são relatadas como “ervas daninhas” e atuam competindo pelo espaço e por recursos de crescimento com diversas culturas (HAUSER; PARHAM, 1969; MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; RONCHI et al., 2003; PEDRINHO JÚNIOR et al., 2004; SAN MARTIN MATHEIS, 2004; MONQUERO et al., 2005). Reconhecê-las, portanto, é importante no sentido de promover um melhor planejamento agrícola.

Richardia brasiliensis é popularmente conhecida como “ervanço”, “poaia branca” e “ipeca” (AGRA et al., 2007; PEDRINHO JÚNIOR et al., 2004), sendo geralmente encontrada à beira das rodovias, córregos e estradas de ferro, e de presença marcante nas regiões agrícolas do Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil (PEDRINHO JÚNIOR et al., 2004).

Esta espécie é comumente encontrada no centro da América do Sul, desde os Andes até o Oceano Atlântico, tendo sido também introduzida em países como os Estados Unidos, México, Jamaica, Brasil, sudeste e leste da África e Havai (LEWIS; OLIVER, 1974) (Figura 2, p. 33).

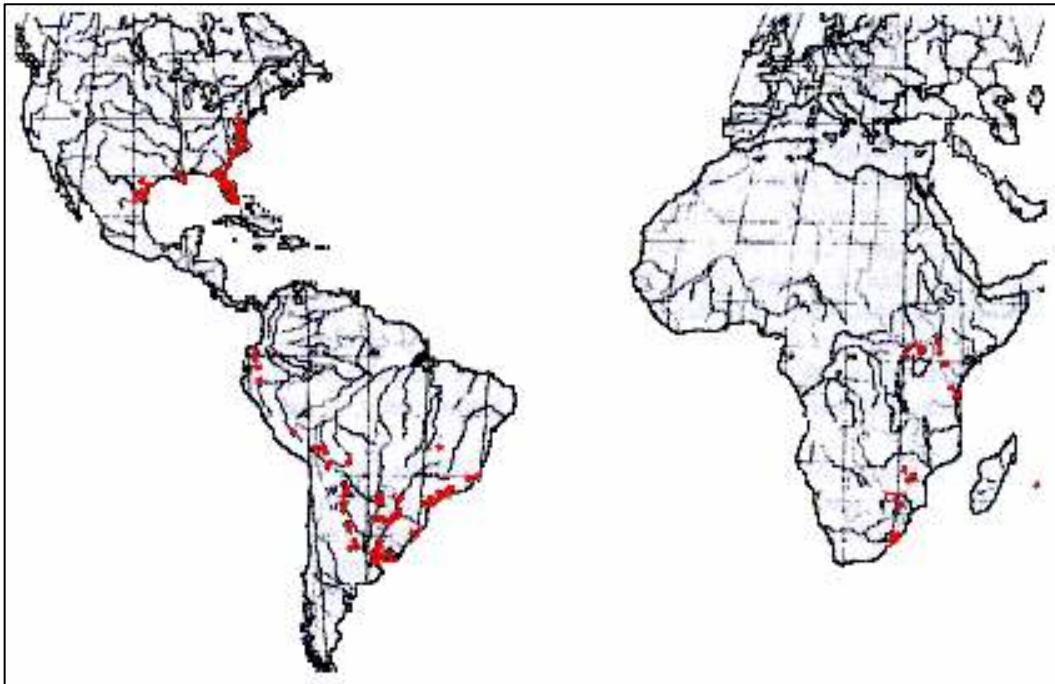


Figura 2. Distribuição geográfica (em vermelho), da espécie *Richardia brasiliensis*. (Adaptado de LEWIS; OLIVER, 1974).

A espécie *Richardia brasiliensis* é uma planta nativa da região sul do Brasil, utilizada na medicina popular como antiemética, antidiabética (ADOLPHO, et al., 2006), vermífuga e contra hemorróida (AGRA et al., 2007), além de ser empregada na cura de eczema, tratamento de queimaduras e contra a malária avícola (EDEOGA et al., 2005). Os extratos aquoso e etanólico desta espécie também apresentaram atividade antifúngica investigada por Adekunle (2000). Estudo realizado por Adolpho et al. (2006) revelou possível atividade antimicrobiana da espécie *Richardia brasiliensis* frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, *Klebsiella pneumoneae*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Investigações fitoquímicas preliminares de *Richardia brasiliensis* evidenciaram a presença de flavonóides, alcalóides, esteróides, triterpenos e compostos fenólicos, todavia nenhum relato existe na literatura sobre o isolamento e identificação destes metabólitos. Estas evidências fundamentaram-se unicamente em uma triagem fitoquímica (ADOLPHO, et al., 2006; EDEOGA et al., 2005).

3.2.1 Posição sistemática de *Richardia brasiliensis* Gomes (STEVENS, 2007).

- **Reino:** Plantae
- **Filo:** Angiospermae
- **Classe:** Magnoliophyta
- **Ordem:** Gentianales
- **Família:** Rubiaceae
- **Gênero:** *Richardia*
- **Espécie:** *Richardia brasiliensis* Gomes

3.2.2 Características botânicas de *Richardia brasiliensis*

A espécie *Richardia brasiliensis* apresenta-se como uma planta herbácea, prostrada, ramificada de 20-50 cm de altura; raiz fibrosa; caule carnoso de cilíndrico a quadrangular; folhas simples, opostas e inteiras, de ovadas a elípticas com 2-4 cm de comprimento por 1-1,5 cm de largura, inflorescência em capítulos multifloros terminais, com flores brancas, pequenas e sésseis; cálice com cinco a seis sépalas (GROTH, 1980).

Planta perene ou anual com ciclo estival, apresentando florescência desde meados do verão até o princípio do outono; vegeta em solos pobres, soltos, secos ou pouco úmidos, argilosos e arenosos (prefere este tipo de solo), ocorrendo na beira das estradas, em terrenos baldios e em canais de irrigação (GROTH, 1980).



Figura 3. Ramo da espécie *Richardia brasiliensis*
(Fonte: http://members.iinet.net.au/~weeds/western_weeds/rub_sal_sap.htm)

3.3 Considerações gerais sobre os compostos fenólicos

A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada pelo fato destes apresentarem atividades farmacológicas e por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (NAGEN et al., 1992; GAMACHE et al., 1993; IVANOVA et al., 1997; AZIZ et al., 1998; FERNANDEZ et al., 1998; HOLLMAN; KATAN, 1998), além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (PELEG et al., 1998).

Diversos pesquisadores têm trabalhado no isolamento, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e lignanas), eles são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas (KING; YOUNG, 1999).

Os compostos fenólicos compreendem desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998).

Na classe dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal. Estes estão divididos em flavonóides, derivados dos ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmicos e seus derivados) e cumarinas (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

3.3.1 Flavonóides

3.3.1.1 Aspectos químicos

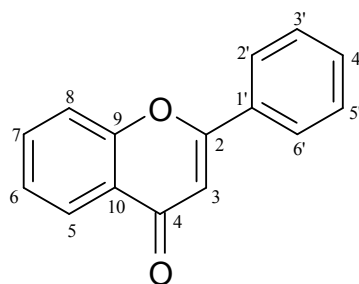
É comum designar os produtos naturais derivados do esqueleto 1,3; 1,2 e 1,1 diarilpropânico em três grandes classes, respectivamente, como flavonóides **(1)**, isoflavonóides **(2)** e neoflavonóides **(3)** (AGRAWAL, 1989).

Flavonóides	Características conhecidas
Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídios	Co-pigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
Antocianos	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	Pigmentação amarela
Auronas	Pigmentação amarela
Dihidroflavonóis	Estão presentes freqüentemente em tecidos de madeira
Flavanonas	Podem apresentar sabor amargo
Dihidrochalconas	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonóides	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Biflavonóides	Propriedades antifúngicas

Quadro 1. Exemplos de flavonóides e algumas de suas características conhecidas (ZUANAZZI, 1999).

Na grande distribuição das diversas classes de flavonóides, as flavonas, flavanonas e isoflavonas são as mais freqüentemente encontradas em espécies da família Rubiaceae. Neste trabalho serão descritas apenas estas classes.

3.3.1.2 Flavonas e flavonóis

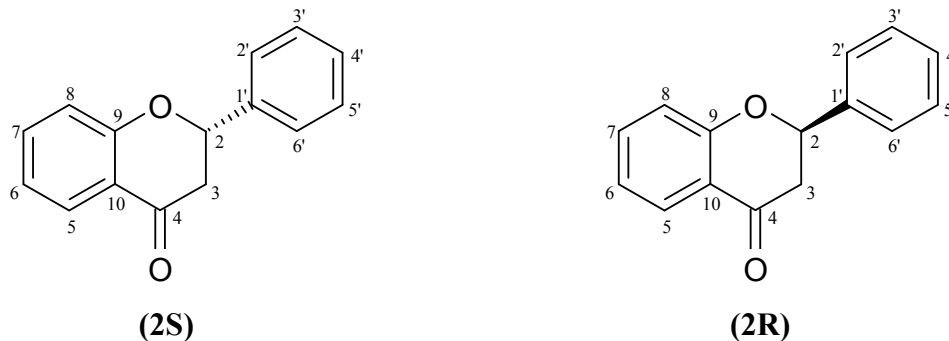


Esses compostos fazem parte de um grande grupo de flavonóides de origens biossintéticas muito próximas, sendo geralmente classificadas juntas. As flavonas são derivados da 2-fenilcromona, enquanto que os flavonóis derivam-se da 3-hidroxi-2-fenilcromona. As flavonas e flavonóis naturais são freqüentemente oxigenados, substituídos

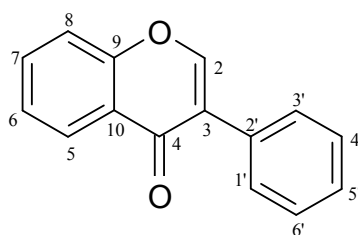
com hidroxilas e/ou metoxilas. Alguns tipos de oxigenação, como as das posições 5, 7, 3' e 4' são geralmente as mesmas para as duas classes. Outros substituintes encontrados com bastante frequência são: acila, C-metila, metilenodioxila, isopreno, prenila, pirano, furano e seus derivados clorados. A maioria destes compostos estão presentes nas plantas sob forma conjugada, isto é, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxila por uma ligação facilmente destruída por hidrólise ácida (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

3.3.1.3 Flavanonas

Estas substâncias diferem das flavonas por possuírem uma ligação simples entre C-2 e C-3, mas são numeradas da mesma forma. Em consequência, as flavanonas possuem centro de assimetria em suas moléculas. Contudo, devido ao fato de serem intermediários biogénéticos da maioria dos grupos flavonoídicos, são isolados normalmente em pequenas quantidades. As flavanonas possuem dois centros assimétricos possíveis: o núcleo B pode apresentar as configurações 2S ou 2R (BOHM, 1994).



3.3.1.4 Isoflavonas



Os isoflavonóides são caracterizados, como os demais flavonóides, por uma cadeia arila-C₃-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano. Ao contrário das outras classes de flavonóides,

sua distribuição taxonômica é restrita. Apesar desta restrição, tal classe apresenta uma diversidade estrutural importante, isto se deve principalmente à modificações em seu esqueleto cíclico. As isoflavonas destacam-se como as mais abundantes, sendo muitas vezes substituídas com grupamento prenila. Nos vegetais, uma grande parte dos isoflavonóides comportam-se como fitoalexinas, ou seja, substâncias produzidas pela planta em resposta à agressão de um agente patogênico (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

3.3.1.5 Atividades biológicas dos flavonóides

A grande prevalência de flavonóides e antocianidinas no reino vegetal não é acidental; eles não somente atuam como pigmentos de flores, mas também como inibidores de enzimas e precursores de substâncias tóxicas, em defesa contra a exposição à radiação ultravioleta, agentes quelantes de metais nocivos para plantas e como agentes redutores. Em adição, os flavonóides estão envolvidos na transferência de energia, morfogênese e determinação do sexo, níveis de respiração e fotossíntese, ação de hormônios de crescimento e reguladores da planta, expressão de genes e comportamento (SMITH; BANK, 1986).

Há muitos dados que apontam para um grande número de atividades destes compostos em humanos como, por exemplo, no tratamento da osteoporose, na proteção da integridade vascular (BERETZ; CAZENAVE, 1988; EVANS, 1994) e por suas propriedades antihepatotóxicas (SOIKE; PESCHLOW, 1987). Alguns flavonóides foram examinados quanto a sua atividade em modelos experimentais de tumores *in vitro* (BRACKE et al., 1988) e *in vivo* (DESCHNER et al., 1991), outros são capazes de inibir a atividade de enzimas tais como a aldose-redutase (IWU et al., 1990) e xantina-oxidase (PATHAK et al., 1991). Os compostos flavonoídicos também têm sido reportados por atuar no trato gastrintestinal como agentes antiúlcera (DI CARLO et al., 1999), antiespasmódico (CAPASSO et al., 1991), anti-secretório e antidiarréico (DI CARLO et al., 1993), além de também serem conhecidos pelos seus efeitos antialérgicos, em parte atribuídos à influência destes sobre a produção de histamina (BERG; DANIEL, 1988).

Estes metabólitos podem ainda prevenir catarata diabética por inibir a aldose-redutase óptica (CHAUDRY et al., 1983). As ações de alguns flavonóides podem estar relacionadas com a sua capacidade de interagir com o óxido nítrico (NO), que é um mediador de várias sistemas biológicos (MONCADA et al., 1991). Outras atividades importantes como agentes antioxidantes e anti-radicais livres (BURDA; OLESZEK, 2001) também são relatadas.

3.3.1.6 Outras considerações sobre flavonóides

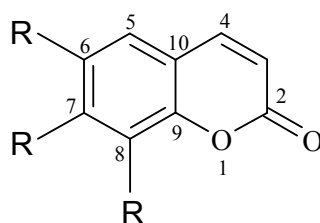
Esta classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal, estando presente em abundância nas angiospermas, em que apresentam uma grande variedade estrutural, quase ausentes em algas e com alguns representantes identificados em briófitas (HARBORNE, 1989).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, dentre elas podem-se citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; agentes antioxidantes e alelopáticos e inibidores enzimáticos (HARBORNE, 1989).

Estes metabólitos também podem ser utilizados como marcadores taxonômicos, ao considerar sua abundância em quase todo reino vegetal, a especificidade destes em algumas espécies e sua relativa facilidade de identificação, estabilidade e acúmulo (VON-POSER; MENTZ, 1999).

3.3.2 Cumarinas

3.3.2.1 Aspectos químicos



As cumarinas pertencem ao grupo de compostos dos fenilpropanóides, com estrutura geral C_6C_3 (STREET; COCKBURN, 1972). Com exceção de alguns casos raros, a maioria das cumarinas encontram-se substituídas em C-7 por uma hidroxila. Esta substituição (R) no anel benzênico pode ser dupla (C-6 e C-7) ou tripla (C-6, C-7 e C-8).

A maioria das cumarinas conhecidas encontram-se livres nas plantas, porém muitas delas foram isoladas como glicosídeos. São substâncias fluorescentes e comumente fotossensíveis. As cumarinas livres, solúveis em álcool, extraem-se com solventes orgânicos como éter. Algumas são parcialmente solúveis em água, outras são arrastáveis por vapor de água (BRUNETON, 1991).

3.3.2.2 Ocorrência e distribuição das cumarinas

As cumarinas são amplamente distribuídas entre os vegetais, ocorrendo predominantemente em angiospermas, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. As famílias mais citadas na literatura pelo conteúdo em cumarinas são: Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Olanaceae, Moraceae e Thymeleaceae (KUSTER; ROCHA, 1999).

3.3.2.3 Usos e propriedades farmacológicas das cumarinas

Muitas cumarinas simples possuem odor característico, sendo amplamente utilizadas como aromatizantes nas indústrias de limpeza e cosméticos. Na área de medicamentos destacam-se os derivados da 4-hidroxi-cumarina, que levou à descoberta da ação anticoagulante do dicumarol, primeiro fármaco com essa ação por via oral e que constituiu o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com o núcleo básico da 4-hidroxi-cumarina, do qual derivam importantes fármacos como a varfarina, entre outros (KUSTER; ROCHA, 1999).

Segundo Kuster; Rocha (1999) a procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico em cumarinas, pelo fato de mostrarem atividades farmacológicas relevantes, tais como imunossupressora, hipolipidêmica, hipotensora, relaxante vascular da musculatura lisa e cardíaca, antiagregante plaquetária, antiespasmódica, antioxidante e anti-HIV.

3.3.3 Aspectos biossintéticos dos flavonóides e cumarinas

Os flavonóides são biossintetizados via uma combinação das rotas do ácido chiquímico e acetato polimalonato (DI CARLO et al., 1999). Na primeira etapa da biossíntese, rota do ácido chiquímico, (Esquema 1. p. 43), o fosfoenolpiruvato (PEP) reage com a D-eritrose-4-fosfato, produzindo um açúcar ceto fosforilado com sete carbonos, ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato (DAHP). Este composto pela perda do grupo fosfato, sofre ciclização e converte-se em ácido 3-desidroquínico, que pela perda de uma molécula de água é então convertido a seus derivados, como por exemplo, o ácido chiquímico. Após fosforilação na posição 3 do ácido chiquímico, origina-se o ácido chiquímico-3-fosfato, que reage com o fosfoenolpiruvato (PEP) formando o ácido 5-enolpiruvil-chiquímico-3-fosfato (EPSF). Este,

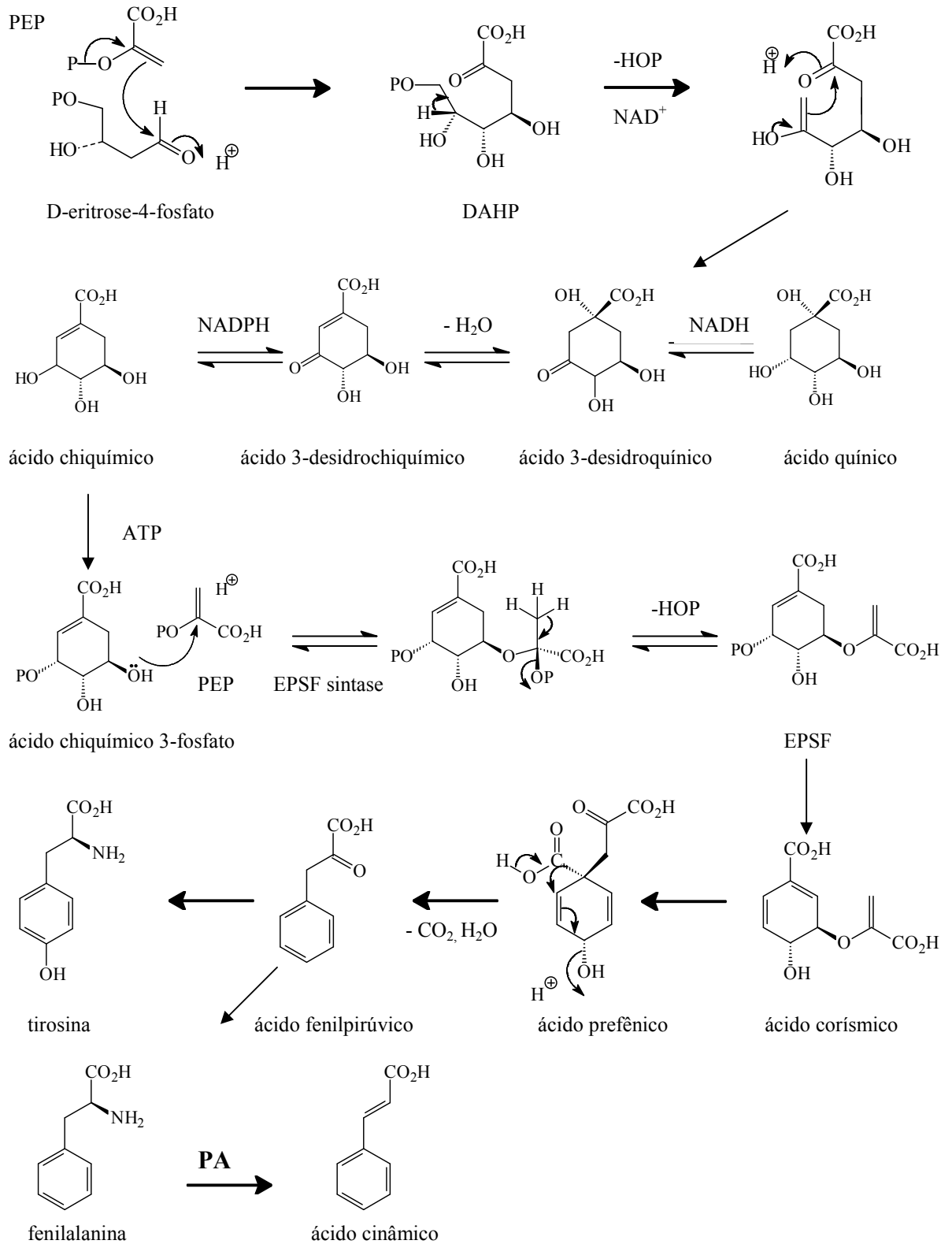
por sua vez, origina o ácido corísmico por eliminação de um grupo fosfato e um próton. O ácido corísmico sofre uma reordenação pericíclica do tipo Claisen levando ao ácido prefênico, que por descarboxilação, origina o ácido fenilpirúvico, precursor da fenilalanina e tirosina. A fenilalanina, pela ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), perde uma molécula de amônia, originando o ácido cinâmico, o precursor da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (DEWICK, 1997) (Esquema 1, p. 43).

Por intervenção da enzima oxigenase, o ácido cinâmico é hidroxilado, formando o ácido p-cumárico (BRUNETON, 1991). Na segunda etapa da biossíntese, rota do acetato polimalonato (Esquema 1-2^a etapa, p. 44), ocorre a condensação de três moléculas de acetato com um derivado do ácido cinâmico (p-cumaroil-CoA). Provavelmente, cada molécula de acetil-CoA é primeiramente convertida em malonil-CoA, enquanto que a do ácido cinâmico é convertida em p-cumaroil-CoA, ambas intermediárias ativas transformadas por uma coenzima-A. Após condensação, forma-se um intermediário de 15 átomos de carbono, que catalisado pela enzima chalcona sintase sofre ciclização originando a chalcona, o intermediário comum de todos os flavonóides (DEWICK, 1997). A adição de substituintes ocorrem posteriormente à ciclização da chalcona (BRUNETON, 1991).

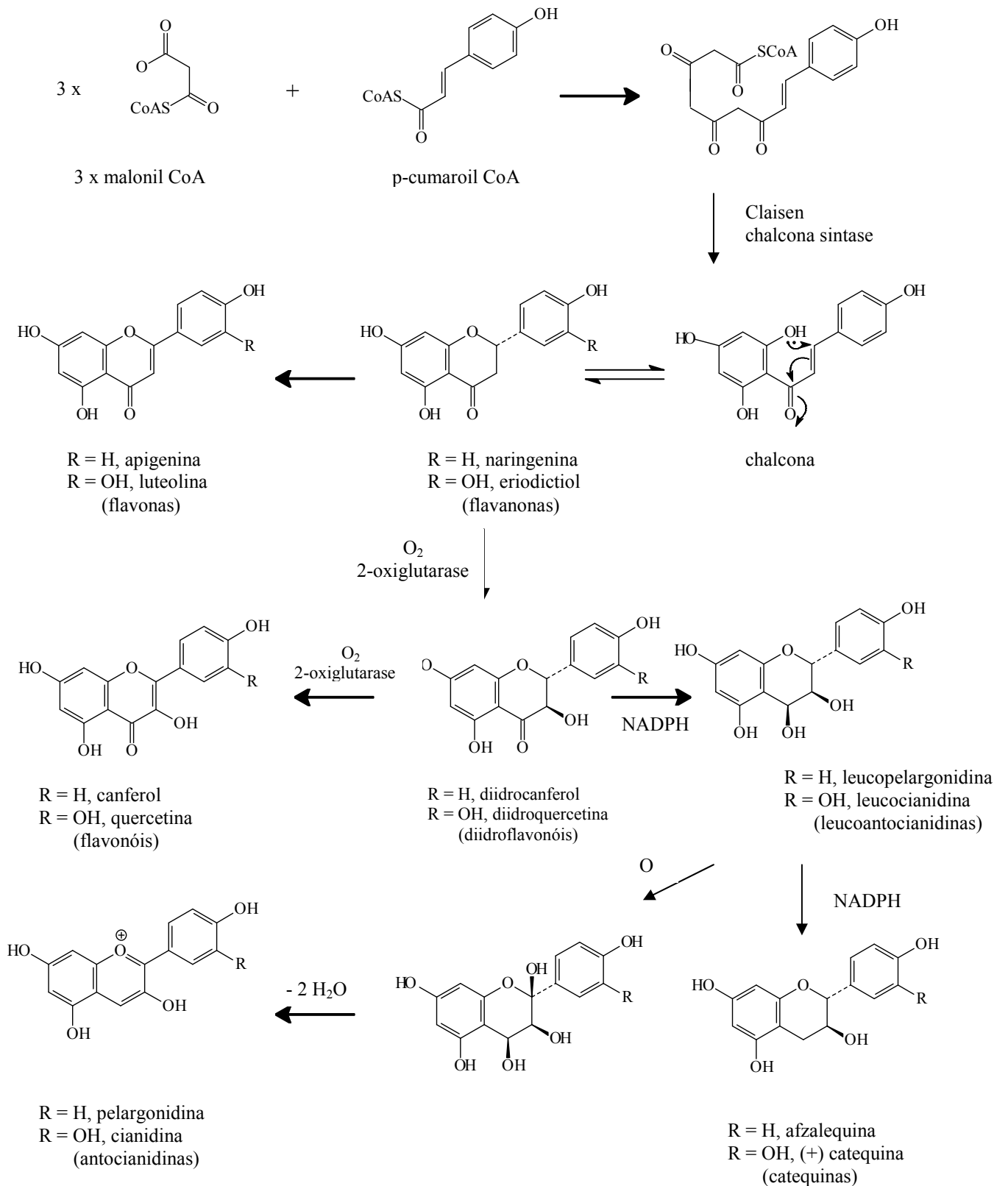
As cumarinas originam-se a partir da lactonização de derivados do ácido hidroxicinâmico com a perda de uma molécula de água (STREET; COCKBURN, 1972) - (Esquema 2, p. 45).

Esquema 1. Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides (DEWICK, 1997).

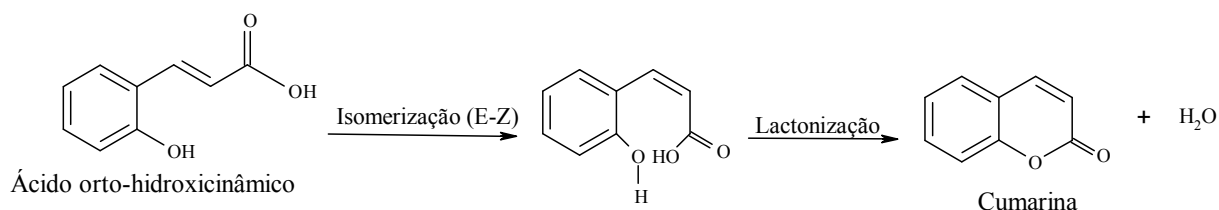
1ª etapa:



2ª etapa:



Esquema 2. Etapa biossintética da formação das cumarinas



3.4 Considerações sobre terpenóides

3.4.1 Aspectos químicos

Os terpenóides constituem uma grande família de metabólitos secundários, compreendendo cerca de 30.000 terpenos, classificados, de acordo com o número de unidades de isopreno (Figura 4), em: hemiterpenóides (C_5), monoterpenóides (C_{10}), sesquiterpenóides, (C_{15}), diterpenóides (C_{20}), triterpenóides (C_{30}) e tetraterpenóides (C_{40}) (NIERO; MALHEIROS, 2007).

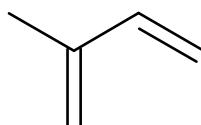


Figura 4. Esqueleto isoprênico

3.4.2 Atividades biológicas dos terpenóides

Segundo Niero; Malheiros (2007) os terpenóides são conhecidos pelas suas importantes funções biológicas e fisiológicas, sendo bastante utilizados na área farmacêutica.

Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos voláteis, importantes comercialmente na fabricação de sabão, detergentes, cosméticos e perfumaria, além de serem atrativos dos polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados esteroidais apresentam uma gama de funções como proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, outros atuam na

germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Os triterpenos constituem talvez o grupo mais importante de terpenóides. Eles apresentam diversas propriedades medicinais, destacando-se os efeitos antiinflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (NIERO; MALHEIROS, 2007).

A betulina, triterpeno mais abundante na natureza, é o precursor na biossíntese do ácido betulínico, sendo este o composto biologicamente mais ativo deste grupo. Estes compostos têm apresentado várias atividades biológicas, entre as quais destaca-se a atividade antiinflamatória. Trabalhos recentes também têm demonstrado que os ácidos ursólico e oleanólico também exercem inúmeras atividades biológicas, dentre as quais destacam-se as atividades antiinflamatória, analgésica, antitumoral, anti-HIV e tripanossomicida, além de serem inibidores da acetilcolinesterase, podendo ser utilizados no tratamento do Mal de Alzheimer. Estes são apenas alguns exemplos da importância desta classe de compostos presentes, principalmente, em plantas superiores, muitas delas, encontradas na flora brasileira (NIERO; MALHEIROS, 2007).

3.4.3 Aspectos gerais da biossíntese dos triterpenos

Os triterpenos são formados a partir de unidades isoprênicas. Inicialmente ocorre formação da acetoacetil CoA através de condensação do tipo cabeça-cauda, sendo catalisada pela enzima tiolase. Uma terceira molécula de acetil CoA adiciona-se ao grupo carbonila na posição três da acetoacetil CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA. Este é, então, reduzido a ácido mevalônico, sendo provavelmente precedido pelo intermediário ácido meváldico. Como a reação é praticamente irreversível o ácido mevalônico deve ser precursor direto para compostos isoprenóides.

A enzima mevaldate redutase transfere um hidrogênio estereoespecificamente do NADH ou NADPH para o substrato. O ácido mevalônico formado é, então, fosforilado no grupo alcoólico primário para formar o ácido mevalônico monofosfato e em uma segunda etapa da reação o ácido pirofosfato. O isopentenil pirofosfato é obtido de um composto posterior por descarboxilação e eliminação de uma molécula de água. A reação requer a presença de ATP.

A polimerização do pirofosfato de isopentila inicia-se com a ligação C-O do pirofosfato de dimetilalila (o qual é formado por isomerização do pirofosfato de isopentenila)

resultando em um centro catiônico que sofre adição de uma molécula de pirofosfato de isopentenila gerando pirofosfato de isopentila produzindo o pirofosfato de farnesila.

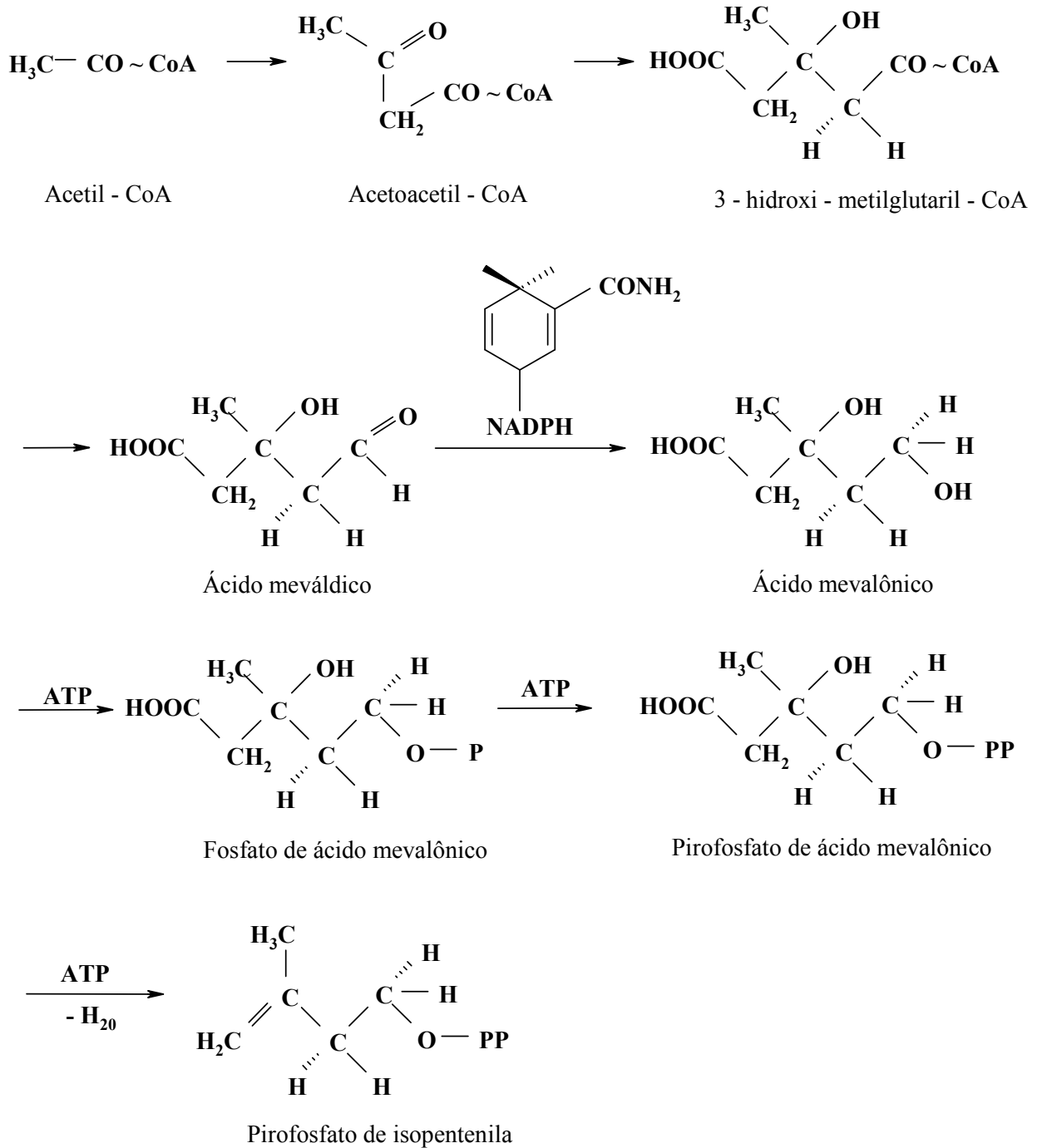
A formação do esqualeno ocorre através da condensação do tipo cabeça-cabeça entre moléculas de pirofosfato de farnesila. Trata-se de uma reação estereoespecífica, em que um átomo de hidrogênio do carbono 1 de um dos dois grupos farnesila é adicionado por um átomo de hidrogênio originado do NADPH.

Inicialmente ocorre substituição de um dos dois grupos farnesila por um grupo carregado negativamente, seguido de eliminação do grupo pirofosfato, o que resulta na formação de um derivado de nerolidol. Este derivado atua na substituição nucleofílica da segunda molécula de pirofosfato de farnesila com a eliminação do grupo difosfato e inversão de configuração no átomo de carbono 1. Como a dupla ligação no derivado de nerolidila é deslocada, uma carga positiva forma-se no carbono 2 desta molécula, a qual é neutralizada pelo substituinte X e, então, removido da molécula o próton do carbono 2 da porção nerolidina, por eliminação. Na seqüência reacional o átomo de hidrogênio do carbono 2 que encontra-se no plano é eliminado. Durante a seqüência de deslocamento da dupla ligação do carbono 2 e 3 para os carbonos 3 e 4 da porção nerolidila associado com a eliminação do grupo X, um átomo de hidrogênio de NADPH é introduzido na molécula e o esqualeno é formado.

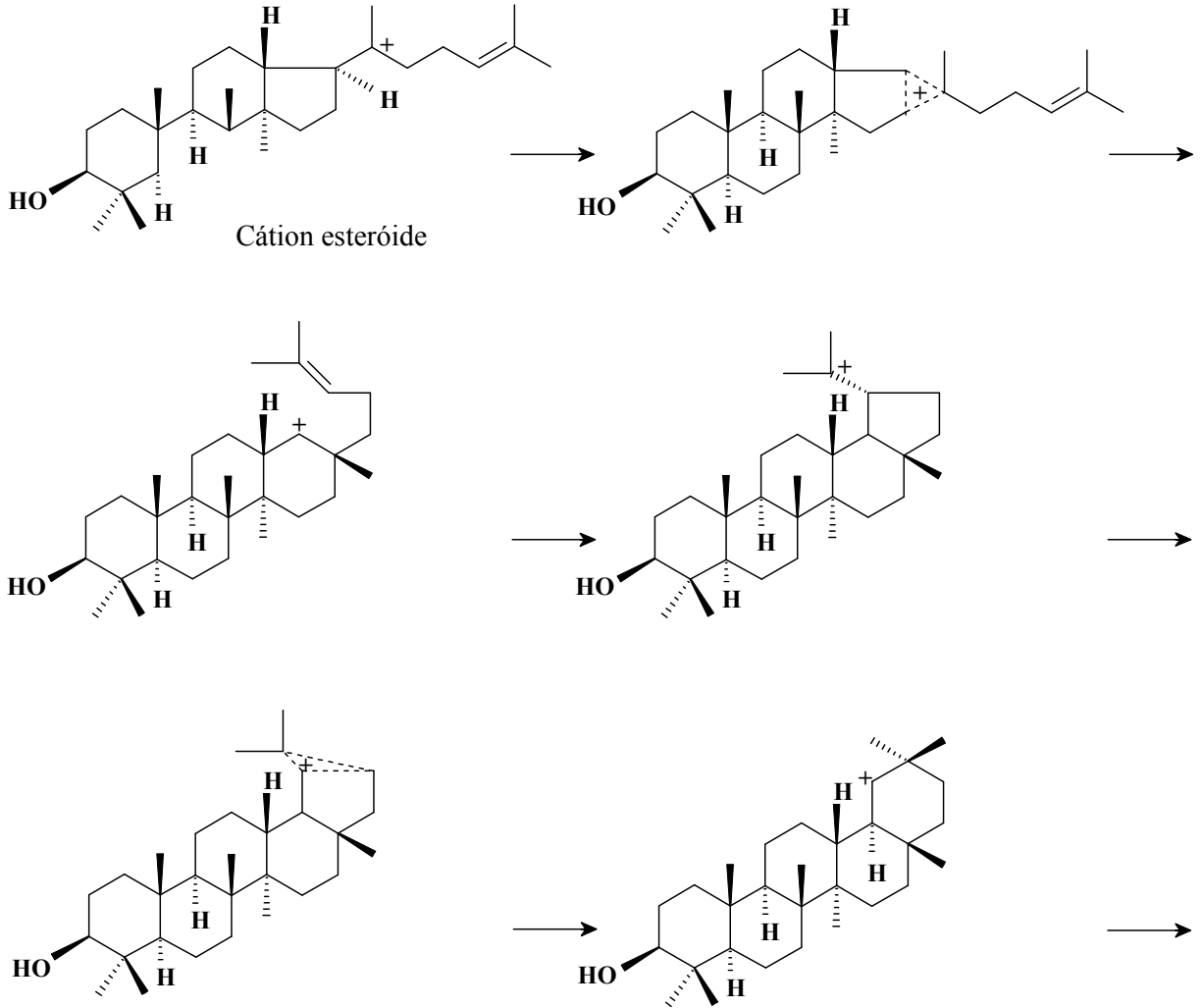
A formação dos sistemas de anéis triterpênicos cíclicos a partir do esqualeno inicia-se com a oxidação do composto isoprenóide a esqualeno-2,3-epóxido. O anel epóxido é removido pela ação de prótons formando o grupo hidroxila no carbono 3 e uma carga positiva na molécula. O 3-hidroxi-esqualeno formado cicliza-se espontaneamente. O número e a configuração dos anéis formados dependem das dobras da cadeia do esqualeno.

O cátion esteróide sofre um rearranjo Wagner-Meerwein alargando o anel D. Depois fecha-se um anel adicional seguido de rearranjo de Wagner-Meerwein, em que novamente ocorre alargamento construindo o anel E. Esta estrutura é o material de partida para a síntese dos triterpenos pentacíclicos das séries fridelano, oleanano e ursano por eliminação de prótons (Esquema 3, p. 48) (LUCKNER, 1969).

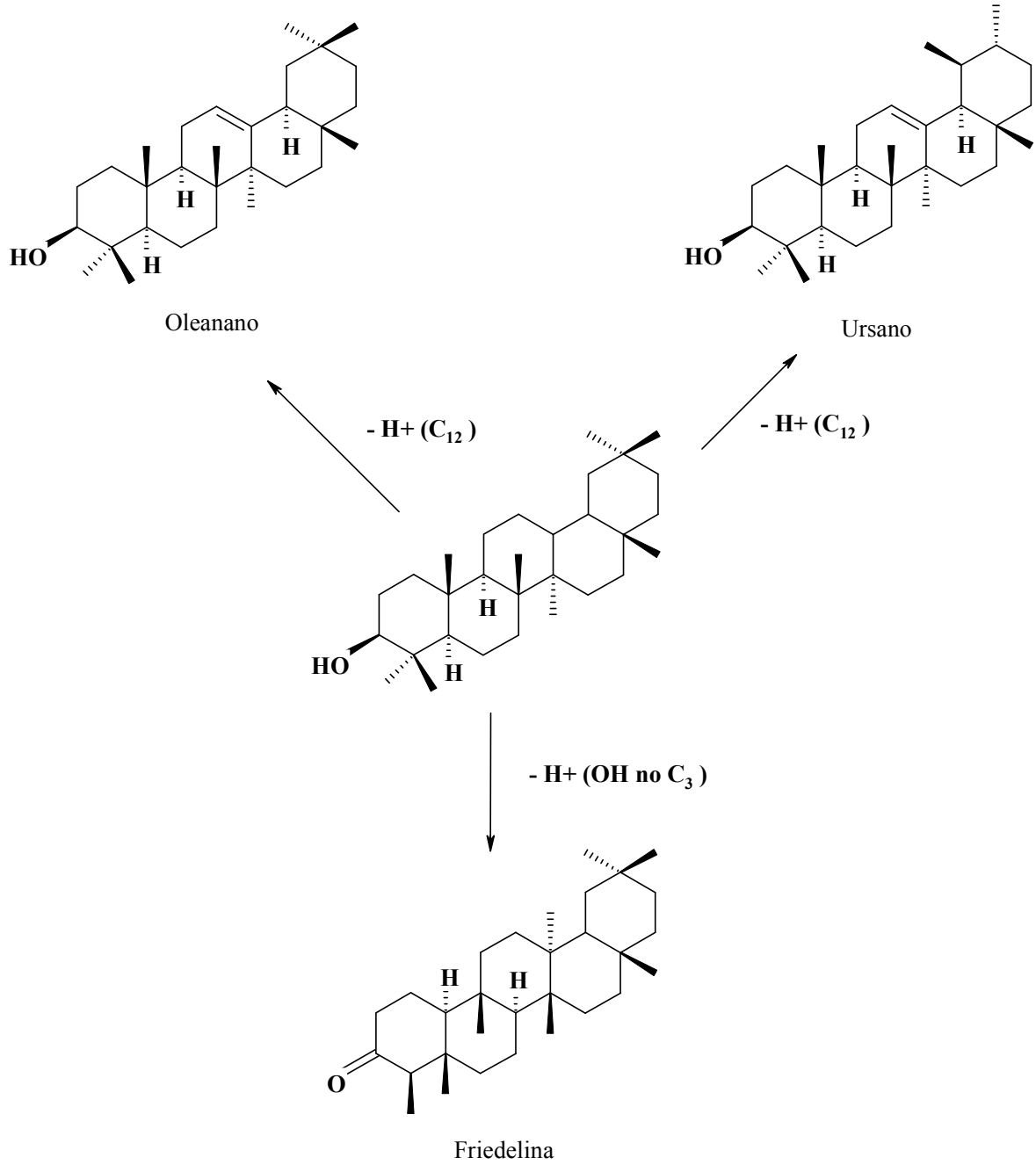
Esquema 3. Rota biossintética para formação dos triterpenos.



Continuação (Esquema 2)



Continuação (Esquema 2)



PARTE EXPERIMENTAL

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material botânico

A espécie vegetal *Richardia brasiliensis* foi coletada em agosto de 2006, no município de Santa Rita, Paraíba, sendo identificada pela Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Agra, do setor de botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB). Uma exsicata da referida planta encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (CCEN/UFPB), da Universidade Federal da Paraíba, sob o código Agra et al. 3195.

4.2 Métodos de análise

4.2.1 Métodos cromatográficos

Para as cromatografias de adsorção em coluna (CC) utilizou-se sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm e Sephadex LH-20 da AMERSHAM BIOSCIENCES, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se sílica gel 60 PF₂₅₄, ART 7749 da MERCK. Como fase móvel foram utilizados os solventes hexano (Hex), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), isoladamente ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

A cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi empregada para a análise das frações obtidas por CC. As revelações das substâncias nas CCDA foram executadas pela exposição das cromatoplasmas à lâmpada de irradiação ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58, bem como pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo.

4.2.2 Métodos espectroscópicos

Os dados espectrais na região do infravermelho (IV) foram obtidos em aparelho de BOMEM FT-IR, série 100 MB do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB, utilizando de 1,00 a 3,00 mg de amostra em pastilhas de KBr, com frequência medida em cm⁻¹.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze (RMN de ^{13}C), uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY, operando na frequência do hidrogênio a 200 MHz e do carbono a 50 MHz, bem como em espectrômetro de marca BRUKER, operando na frequência do hidrogênio a 500 MHz e do carbono a 125 MHz, sendo este pertencente ao CENAUREM-CE. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se uma pequena quantidade em solvente deuterado (CDCl_3 e MeOD). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), sendo referenciados para RMN de ^1H os picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: clorofórmio ($\delta_{\text{H}} = 7,24$ ppm) e metanol ($\delta_{\text{H}} = 3,3$ ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio ($\delta_{\text{C}} = 77,00$ ppm) e metanol ($\delta_{\text{C}} = 49,00$ ppm).

As multiplicidades dos sinais de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dl (duplete largo), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), m (multiplete).

4.2.3 Ponto de fusão

O ponto de fusão (PF) de cada amostra foi determinado em placa de aquecimento de aparelho digital para ponto de fusão (MQAPF - 302, Microquímica Equipamentos LTDA), com temperatura que varia de 0-350 $^{\circ}\text{C}$.

4.2.4 Pureza da amostra

O grau de pureza das substâncias evidenciado por CCDA, foi determinado quando observada uma única mancha após revelação, em pelo menos três tipos de sistemas de eluições diferentes. Além disso, também foram considerados a determinação do ponto de fusão das substâncias (o critério de pureza adotado é que a diferença entre o PF final e o PF inicial não seja maior que 3 $^{\circ}\text{C}$), bem como a análise dos dados espectrais.

4.3 Processamento do material vegetal de *Richardia brasiliensis*

Após coletado, o material vegetal de *Richardia brasiliensis*, contendo todas as partes da planta, foi desidratado em estufa com ar circulante a temperatura média de 45 °C, durante 3 a 4 dias, sendo em seguida submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 2,280 Kg de pó.

4.3.1 Triagem fitoquímica de *Richardia brasiliensis*

Esta triagem procura sistematizar ou rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem o extrato vegetal, através de um exame qualitativo rápido, no qual utiliza-se reagentes de coloração ou precipitação. A triagem fitoquímica preliminar foi realizada seguindo a metodologia descrita por Matos (1997) e seus resultados encontram-se sumarizados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Dados referentes à triagem fitoquímica realizada com o extrato bruto de *Richardia brasiliensis*.

Grupos Químicos	Testes Aplicados	Resultados
Alcalóides	Bouchardat	-
	Mayer	-
	Dragendorff	-
	Ácido sílico-tungstico	-
Esteróides e Terpenóides	Liebermann-Burchard	++
Taninos	Cloreto Férrico 2%	+
Flavonóides	Shinoda	+++
	Oxalo-bórico	+++
Saponinas	Teste de espuma	+

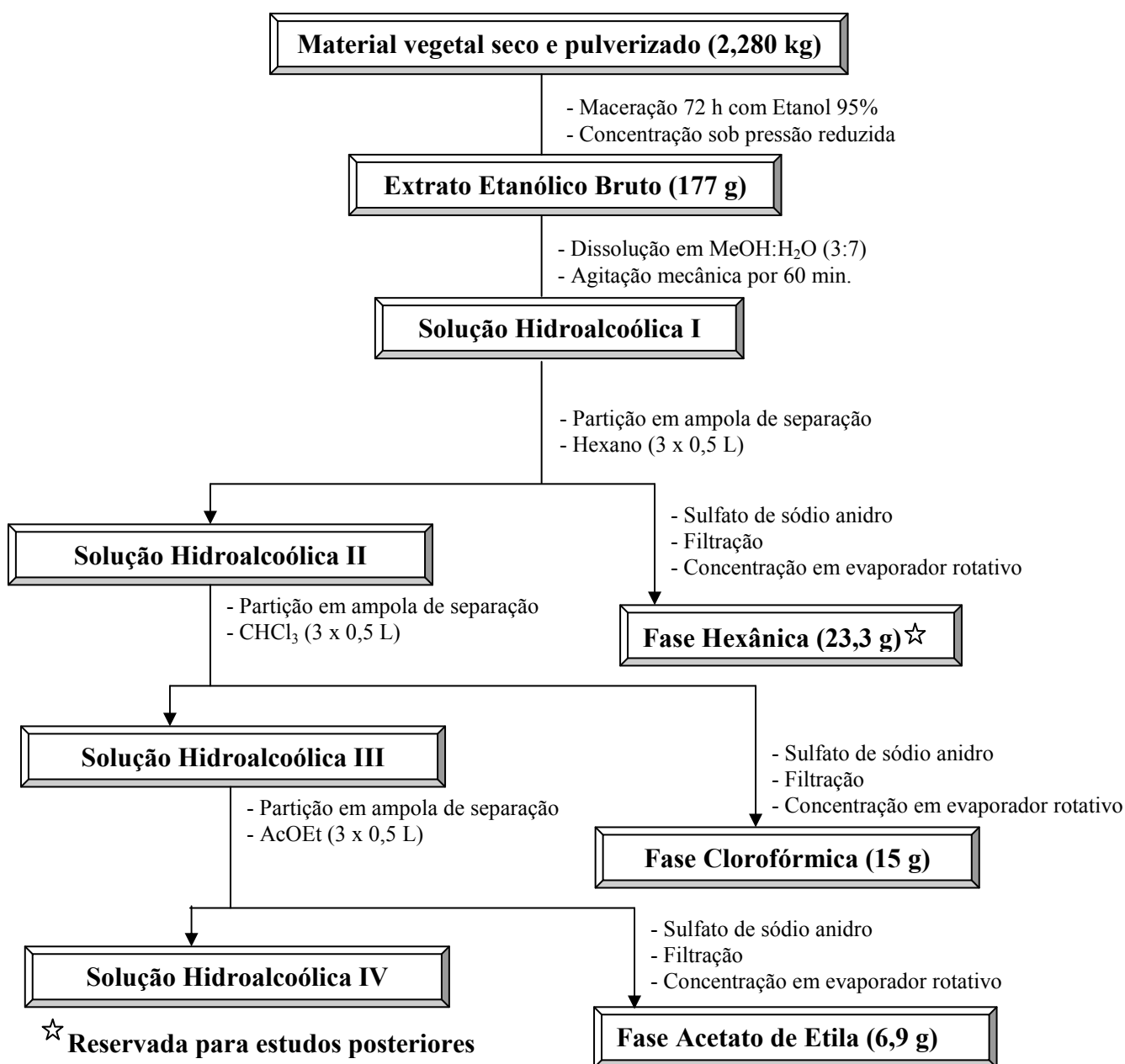
(-) Reação negativa; (+) Reação fracamente positiva; (++) Reação positiva; (+++) Reação fortemente positiva.

4.3.2 Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de *Richardia brasiliensis*

O material vegetal seco e pulverizado (2,280 Kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95% por 72 h, sendo este processo repetido quatro vezes, para obter a máxima extração dos constituintes químicos. A solução etanólica obtida, após filtrada, foi concentrada com auxílio de um evaporador rotativo, a uma temperatura média de 50 °C. Após

esse processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB), que pesou 177 g, com rendimento de 7,76% em relação ao peso da planta seca. Dois gramas (2 g) do EEB foi utilizado para realizar a triagem fitoquímica, 25 g foi reservado e o restante foi solubilizado em MeOH : H₂O (3:7 v/v) sob agitação mecânica durante 60 minutos, obtendo-se uma solução hidroalcoólica I. Esta foi submetida à partição líquido/líquido, em ampola de separação, utilizando-se os solventes Hex (3 x 0,5 L), CHCl₃ (3 x 0,5 L) e AcOEt (3 x 0,5 L), separadamente. As soluções obtidas foram tratadas com sulfato de sódio anidro e submetidas à filtração. Após esse processo, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo sob temperatura média de 50 °C, fornecendo as fases hexânica (23,3 g); clorofórmica (15 g) e acetato de etila (6,9 g), como observado no Fluxograma 1 abaixo.

Fluxograma 1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de *R. brasiliensis*.



4.4 Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica

Uma alíquota de 10 g da fase clorofórmica foi submetida à CC, utilizando-se como fase estacionária 200 g de sílica gel 60 (Artigo 7734 MERCK) (Fluxograma 2, p. 58), e como eluentes Hex, CHCl_3 e MeOH, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 560 frações de 100 mL, que foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas por CCDA, de acordo com seus fatores de retenção (Rfs) em 51 subgrupos (Tabela 2, p. 59).

A fração 189-194 foi purificada através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando-se como eluentes Hex:AcOEt em mistura binária, na proporção de 80%:20% , resultando em um sólido amorfo que mostrou-se como uma única mancha, após análise por CCDA, sendo codificado como Rb- 1 (76 mg) e encaminhado para análise espectral (Fluxograma 2, p.58).

A fração 196-210 foi submetida à CCDP, utilizando-se Hex:AcOEt (70%:30%) como eluentes, obtendo-se 5 subfrações codificadas como: (196-210) 1; (196-210) 2; (196-210) 3; (196-210) 4; (196-210) 5. A subfração (196-210) 5 após CCDP, utilizando-se como eluentes Hex:AcOEt (75%:25%), resultou em cristais amarelos em forma de agulha, que mostrou-se como uma única mancha através de CCDA, sendo codificado como Rb-2 (67 mg) e submetido à análise espectral (Fluxograma 2, p.58).

A fração 284-322 foi recristalizada com MeOH, fornecendo um precipitado branco que apresentou-se como uma única mancha através de CCDA, sendo codificado como Rb-3 (685 mg) e encaminhado para análise espectral (Fluxograma 2, p. 58).

Fluxograma 2. Fracionamento da fase clorofórmica do extrato etanólico bruto de *Richardia brasiliensis*.

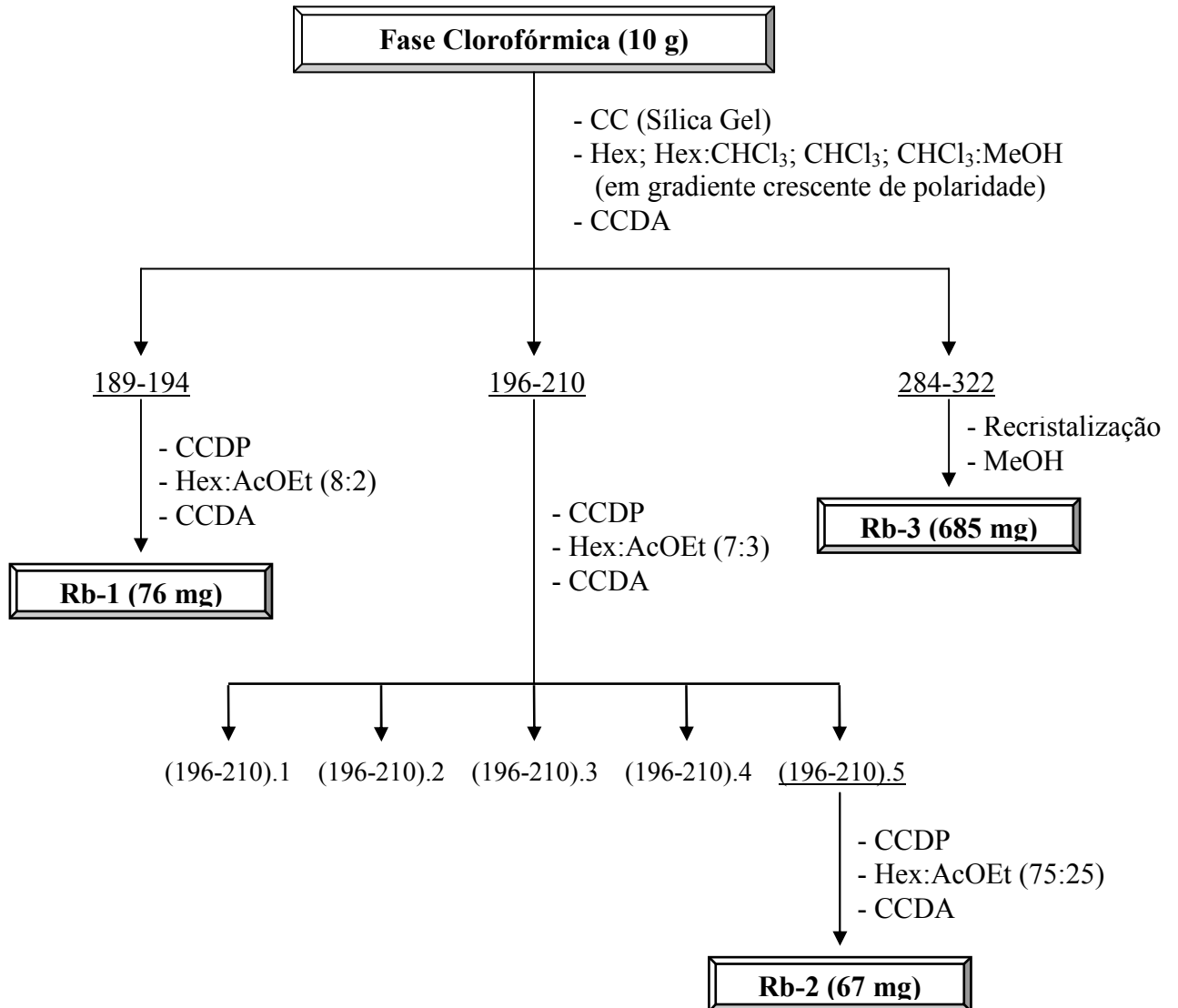


Tabela 2. Frações obtidas e eluentes utilizados e no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Richardia brasiliensis*.

Eluentes	Proporção	Frações obtidas	Frações reunidas
Hex	100%	1-7	1-7
Hex:CHCl ₃	95:5	8-11	8-11
Hex:CHCl ₃	92:8	12-16	12-16
Hex:CHCl ₃	90:10	17-20	17-20
Hex:CHCl ₃	80:20	21-23	21-23
Hex:CHCl ₃	50:50	24-27	24-27
Hex:CHCl ₃	30:70	28-168	28-32; 33-34; 35-45; 46-56; 57-63; 64-67; 68-74; 75-78; 79-86; 87-100; 101-123; 124-134; 135-144; 145; 146-159; 160-164
CHCl ₃	100%	169-337	165-188; 189-194 ; 196-210 ; 211-222; 223-228; 229-230; 231-252; 253-264; 265-271; 272-283; 284-322
CHCl ₃ :MeOH	99:1	338-341	
CHCl ₃ :MeOH	98:2	342-421	323-353; 354-358; 359-373; 374-400; 401-415
CHCl ₃ :MeOH	94:6	422-425	416-423
CHCl ₃ :MeOH	90:10	426-495	424-430; 431-433; 434-447; 448-451; 452-471; 472-492
CHCl ₃ :MeOH	85:15	496-536	493-504; 505-532
CHCl ₃ :MeOH	80:20	536-550	533-538; 539-542 545-550
CHCl ₃ :MeOH	75:25	551-560	551-560

4.5 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila

A fase acetato de etila (2 g) foi submetida à CC, utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e como eluentes CHCl_3 :MeOH (1:1), obtendo-se 43 frações. Estas foram monitoradas através de CCDA e reunidas de acordo com seus Rfs em: Fr 1-5; Fr 6-8; Fr 9-11; Fr 12-13; Fr 14-16; Fr 17-20; Fr 21-22; Fr 23-24; Fr 25-26; Fr 27-28; Fr 29-31; Fr 32-33; Fr 34-38; Fr 39-43.

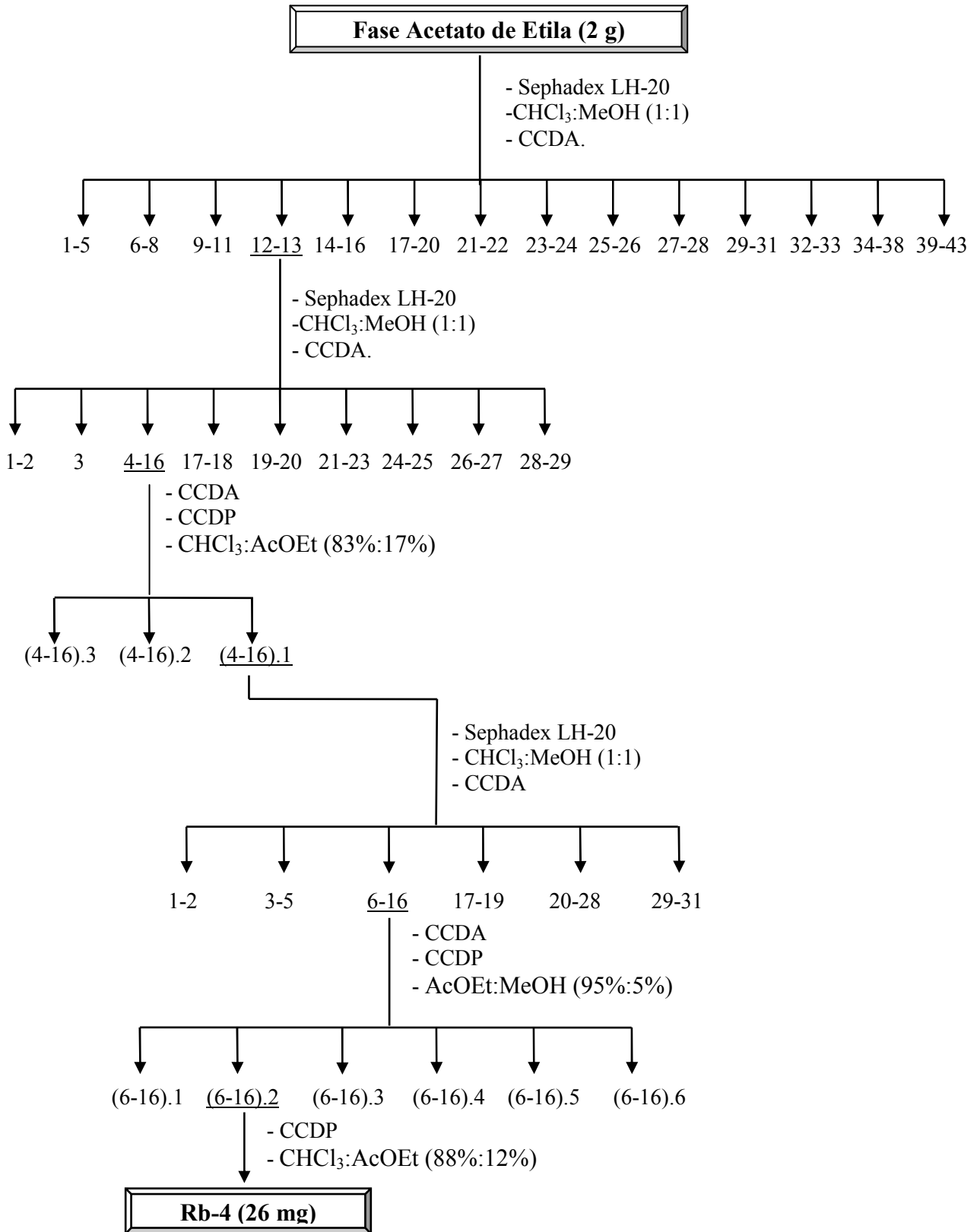
A fração 12-13 foi submetida à CC, utilizando Sephadex LH-20 e como eluentes CHCl_3 :MeOH (1:1), obtendo-se 29 subfrações. Estas foram analisadas através de CCDA e reunidas, de acordo com seus Rfs, na seguinte ordem: Fr 1-2; Fr 3; Fr 4-16; Fr 17-18; Fr 19-20; Fr 21-23; Fr 24-25; Fr 26-27; Fr 28-29.

A subfração 4-16, após análise em CCDA, foi submetida à CCDP, utilizando-se CHCl_3 :AcOEt (83%:17%) como eluentes, obtendo-se 3 subfrações: (4-16).1; (4-16).2; (4-16).3. A subfração codificada como (4-16).1 foi submetida à CC em Sephadex LH-20, eluída com CHCl_3 :MeOH (1:1), fornecendo 31 subfrações. Estas foram analisadas através de CCDA e reunidas, de acordo com seus Rfs, em: Fr 1-2; Fr 3-5; Fr 6-16; Fr 17-19; Fr 20-28; Fr 29-31.

A subfração 6-16, após análise em CCDA, foi submetida à CCDP, utilizando-se AcOEt:MeOH (95%:5%) como eluente, obtendo-se 6 subfrações codificadas como: (6-16) 1; (6-16) 2; (6-16) 3; (6-16) 4; (6-16) 5; (6-16) 6.

A subfração (6-16).2 após purificação, através de CCDP, utilizando-se CHCl_3 :AcOEt (88%:12%) resultou em um precipitado amarelo, codificado como Rb-4 (26 mg), o qual foi levado para análise espectral (Fluxograma 3, p.61).

Fluxograma 3: Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de *Richardia brasiliensis*.



5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação do coeficiente de

Reação

5.1.1 Determinação estrutural de Rb-1

A substância codificada como Rb-1 apresentou-se como sólido amorfo, solúvel em clorofórmio, com rendimento de 0,003%.

O espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), utilizando a técnica APT (Figuras 5, 6 e 7, p. 67-69), revelou a presença de trinta sinais, referentes a sete carbonos não hidrogenados (δ_{C} 36,3; δ_{C} 36,7; δ_{C} 41,6; δ_{C} 41,9; δ_{C} 45,06; δ_{C} 89,6 e δ_{C} 179,0), oito metínicos (δ_{C} 38,1; δ_{C} 40,2; δ_{C} 52,9; δ_{C} 54,7; δ_{C} 60,5; δ_{C} 78,8; δ_{C} 128,7; δ_{C} 133,4), oito metilênicos (δ_{C} 17,6; δ_{C} 22,7; δ_{C} 25,5; δ_{C} 26,9; δ_{C} 30,8; δ_{C} 31,2; δ_{C} 31,3; δ_{C} 38,9) e sete carbonos metílicos (δ_{C} 14,9; δ_{C} 16,1; δ_{C} 17,8; δ_{C} 17,9; δ_{C} 18,9; δ_{C} 19,1; δ_{C} 27,7), podendo-se inferir um esqueleto de triterpeno pentacíclico, para Rb-1.

Os sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 133,4 e δ_{C} 128,7 sugeriram a presença de uma dupla ligação na molécula. Um outro sinal em δ_{C} 78,8 foi atribuído a carbono oximetínico. Os deslocamentos químicos para carbonos não hidrogenados em δ_{C} 89,6 (C-13) e δ_{C} 179,9 (C-28) sugeriram a existência de um grupamento lactônico entre os carbonos C-13 e C-28.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8, 9 e 10, p. 70-72) de Rb-1 evidenciou um envelope de sinais simples na região entre 2,2 e 0,7 ppm, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de triterpenos pentacíclicos. Um duplo duplete em δ_{H} 3,2 (dd, $J=5,6$ e $J=10,4$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio do carbono oximetínico da molécula. A presença de um duplete largo em δ_{H} 5,93 (dl, $J=9,4$ Hz) e de um duplo-duplete em δ_{H} 5,5 (dd, $J=3,6$ e $J=10,6$ Hz), sugeriu a presença de uma insaturação na molécula, corroborando com a proposta feita pelo espectro de RMN de ^{13}C .

O espectro bidimensional, de correlação heteronuclear HMQC (nJ , $n=1$) ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, a 200 e 50 MHz, respectivamente) mostrou as correlações diretas entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos (Figuras 11, 12 e 13, p. 73-75).

No espectro bidimensional, de correlação heteronuclear, HMBC (nJ , $n=2$ e $n=3$) ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, a 200 e 50 MHz, respectivamente) (Figuras 14 a 17, p. 76-79) observou-se as correlações, a duas ligações entre H-11 (dl, δ_{H} 5,93, $J=9,4$ Hz) e C-12 (δ_{C} 128,7); H-18 (m, δ_{H} 1,61) e C-13 (δ_{C} 89,6); H-30 (s, δ_{H} 0,90) e C-20 (δ_{C} 40,2), e a três ligações entre H-5 (m, δ_{H} 0,75) e C-1 (δ_{C} 38,9); H-11 (dl, δ_{H} 5,93, $J=9,4$ Hz) e C-13 (δ_{C} 89,6); H-23 (s, δ_{H} 0,96) e C-3 (δ_{C} 78,8), C-5 (δ_{C} 54,7) e C-24 (δ_{C} 14,9); H-24 (s, δ_{H} 0,76) e os carbonos C-3 (δ_{C} 78,8), C-5 (δ_{C} 54,7) e C-23 (δ_{C} 27,7); H-25 (s, δ_{H} 0,88) e os carbonos C-5 (δ_{C} 54,7), C-9 (δ_{C} 52,9) e C-1 (δ_{C} 38,9); H-26 (δ_{H} 1,02) e C-9 (δ_{C} 52,9), C-14 (δ_{C} 41,9) e C-7 (δ_{C} 31,2); H-27 (s, δ_{H} 1,13) e os carbonos

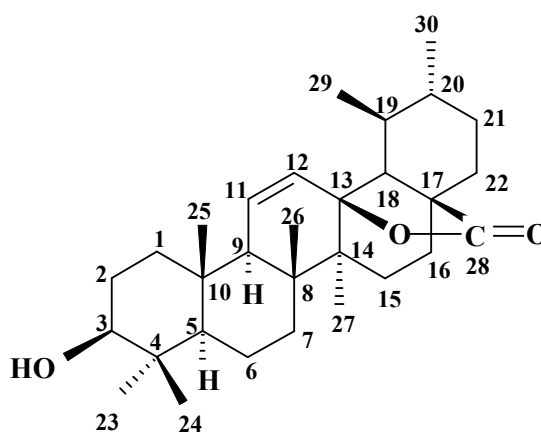
C-8 (δ_C 41,6), C-13 (δ_C 89,6) e C-15 (δ_C 25,5) e, finalmente, entre H-29 (s, δ_H 0,98), C-18 (δ_C 60,5) e C-20 (δ_C 40,2). Estas correlações estão apresentadas na Tabela 3 (p. 65).

O espectro de HMBC evidenciou também as correlações do hidrogênio H-9 (m, δ_H 1,92) a duas ligações com δ_C 133,4 e a três ligações com δ_C 128,7, permitindo, desta forma, definir a posição da dupla ligação em C-11 (δ_C 133,4), reforçando a proposta feita pelos espectros de ^1H e ^{13}C .

Ainda no espectro HMBC, observou-se as correlações, a três ligações, dos hidrogênios das metilas H-23 (s, δ_H 0,96) e H-24 (s, δ_H 0,76) com o carbono oximetínico (δ_C 78,8), definindo, portanto, o carbono C-3.

O espectro bidimensional, de correlação homonuclear COSY (Figuras 18, 19 e 20, p. 80-82) confirmou o acoplamento entre os hidrogênios H-11 (dl, δ_H 5,93, $J=9,4$ Hz) e H-12 5,5 (dd, $J=3,6$ e $J=10,6$ Hz) e entre H-2 (m, δ_H 1,62) e H-3 (dd, δ_H 3,2, $J=5,6$ e $J=10,4$ Hz), ao mostrar interação entre seus deslocamentos químicos.

A comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C com modelos encontrados na literatura (BEGUM et al., 2000) (Tabela 4, p. 66) permitiu identificar a substância Rb-1 como sendo o 3- β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olide, isolada pela primeira vez na família Rubiaceae.

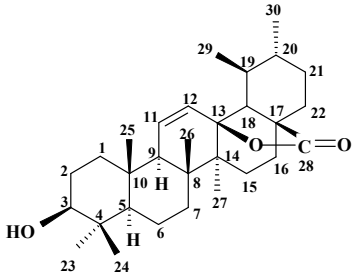
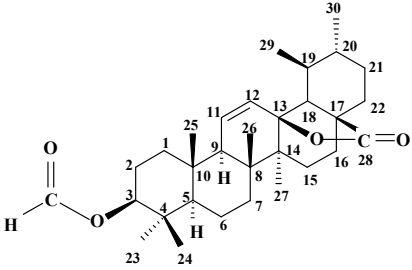


3- β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olide

Tabela 3. Dados de RMN ^1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Rb-1 registrados em CDCl_3 .

	HMQC - $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$		HMBC - $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$		COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$
	δ_{C}	δ_{H}	2J	3J	
C					
4	36,7	-			
8	41,6	-			
10	36,3	-			
13	89,6	-			
14	41,9	-			
17	45,0	-			
28	179,0	-			
CH					
3	78,8	3,2 (dd, $J=5,6$ e $10,4\text{Hz}$)			H-2
5	54,7	0,7 (m)		C-1	
9	52,9	1,9 (m)	C-11	C-12	
11	133,4	5,9 (dl, $J=9,4$ Hz)	C-12	C-13	H-12
12	128,7	5,5 (dd, $J=3,6$ e $10,6$ Hz)			H-11
18	60,5	1,6 (m)	C-13		
19	38,1	1,8 (m)			
20	40,2	0,8 (m)			
CH₂					
1	38,9	1,7 (m)			
2	26,9	1,6 (m)			H-3
6	17,6	1,6 (m)			
7	31,2	1,5 (m)			
15	25,5	1,1 (m)			
16	22,7	1,3 (m)			
21	30,8	1,5 (m)			
22	31,3	1,5 (m)			
CH₃					
23	27,7	0,9 (s)		C-3/C-5/C-24	
24	14,9	0,7 (s)		C-3/C-5/C-23	
25	19,1	0,8 (s)		C-1/C-5/C-9	
26	18,9	1,0 (s)		C-7/C-9/C-14	
27	16,0	1,1 (s)		C-8/C13/C-15	
29	17,8	0,9 (s)		C-18/C-20	
30	17,9	0,9 (s)	C-20		

Tabela 4. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Rb-1 com modelo encontrado na literatura (BEGUM et al., 2000) (δ em ppm e J em Hz).

	Rb-1 (CDCl₃)		Modelo-literatura (CDCl₃)	
				
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
4	36,7	-	37,9	-
8	41,6	-	41,8	-
10	36,3	-	36,4	-
13	89,6	-	89,5	-
14	41,9	-	42,0	-
17	45,0	-	45,1	-
28	179,0	-	179,1	-
CH				
3	78,8	3,2 (dd, $J=5,6$ e $10,4\text{Hz}$)	80,7	4,61 (ddd, $J=8,7$; 7 e 1 Hz)
5	54,7	0,7 (m)	54,9	0,84 (m)
9	52,9	1,9 (m)	53,0	1,97 (dd, $J=3,2$ e $1,5$ Hz)
11	133,4	5,9 (dl, $J=9,4$ Hz)	133,1	5,93 (dd, $J=10,3$ e $1,5\text{Hz}$)
12	128,7	5,5 (dd, $J=3,6$ e $10,6$ Hz)	129,1	5,53 (dd, $J=10,3$ e $3,2$ Hz)
18	60,5	1,6 (m)	60,6	1,64 (d, $J=12$)
19	38,1	1,8 (m)	38,2	1,78 (m)
20	40,2	0,8 (m)	40,3	0,88 (m)
CH₂				
1	38,9	1,7 (m)	38,0	1,87 (m)
2	26,9	1,6 (m)	23,5	1,74 (m)
6	17,6	1,6 (m)	17,6	1,58 (m)
7	31,2	1,5 (m)	31,2	1,56 (m)
15	25,5	1,1 (m)	25,6	1,20 (m)
16	22,7	1,3 (m)	22,8	1,40 (m)
21	30,8	1,5 (m)	30,9	1,58 (m)
22	31,3	1,5 (m)	31,4	1,84 (m)
CH₃				
23	27,7	0,9 (s)	27,7	0,88 (s)
24	14,9	0,7 (s)	16,1	0,86 (s)
25	19,1	0,8 (s)	19,2	0,93 (s)
26	18,9	1,0 (s)	19,0	1,04 (s)
27	16,0	1,1 (s)	16,1	1,15 (s)
29	17,8	0,9 (s)	17,9	0,99 (d, $J=6,1$)
30	17,9	0,9 (s)	18,0	0,92 (d, $J=6,3$)

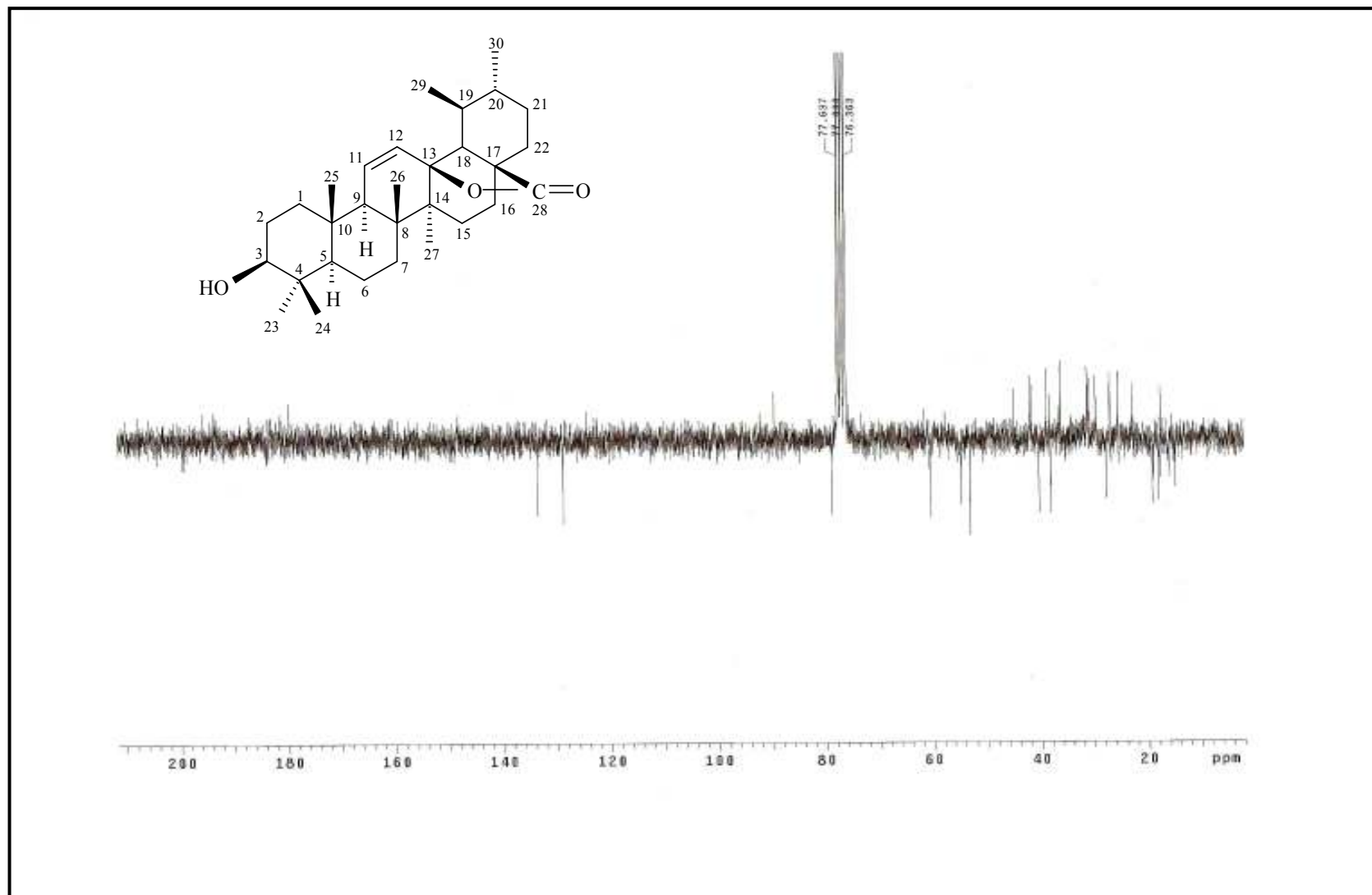


Figura 5. Espectro de RMN ¹³C-APT de Rb-1 (CDCl₃ – 50 MHz)

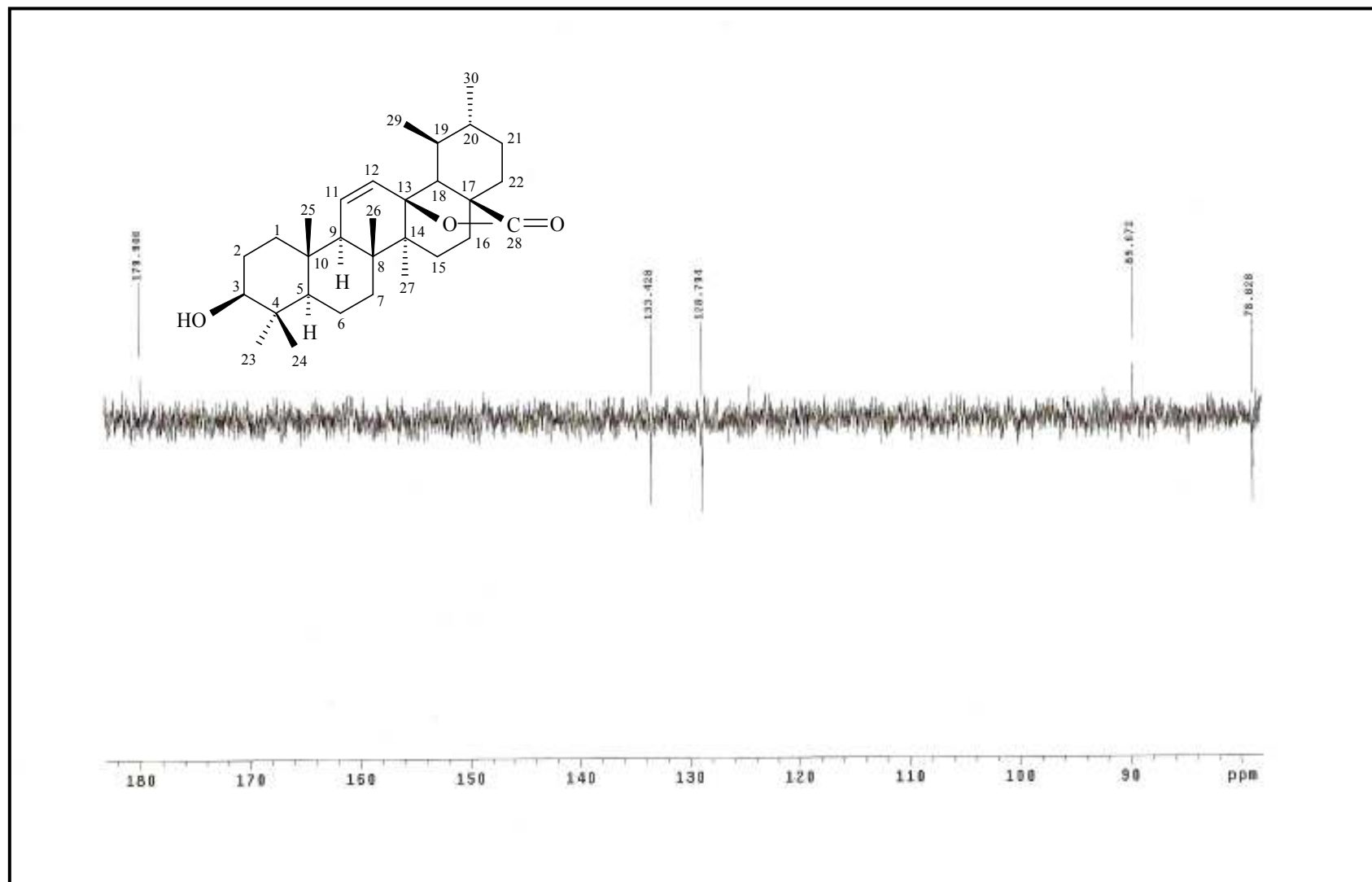


Figura 6. Expansão do espectro de RMN ¹³C-APT de Rb-1 na região de 182 – 78 ppm (CDCl₃ – 50 MHz)

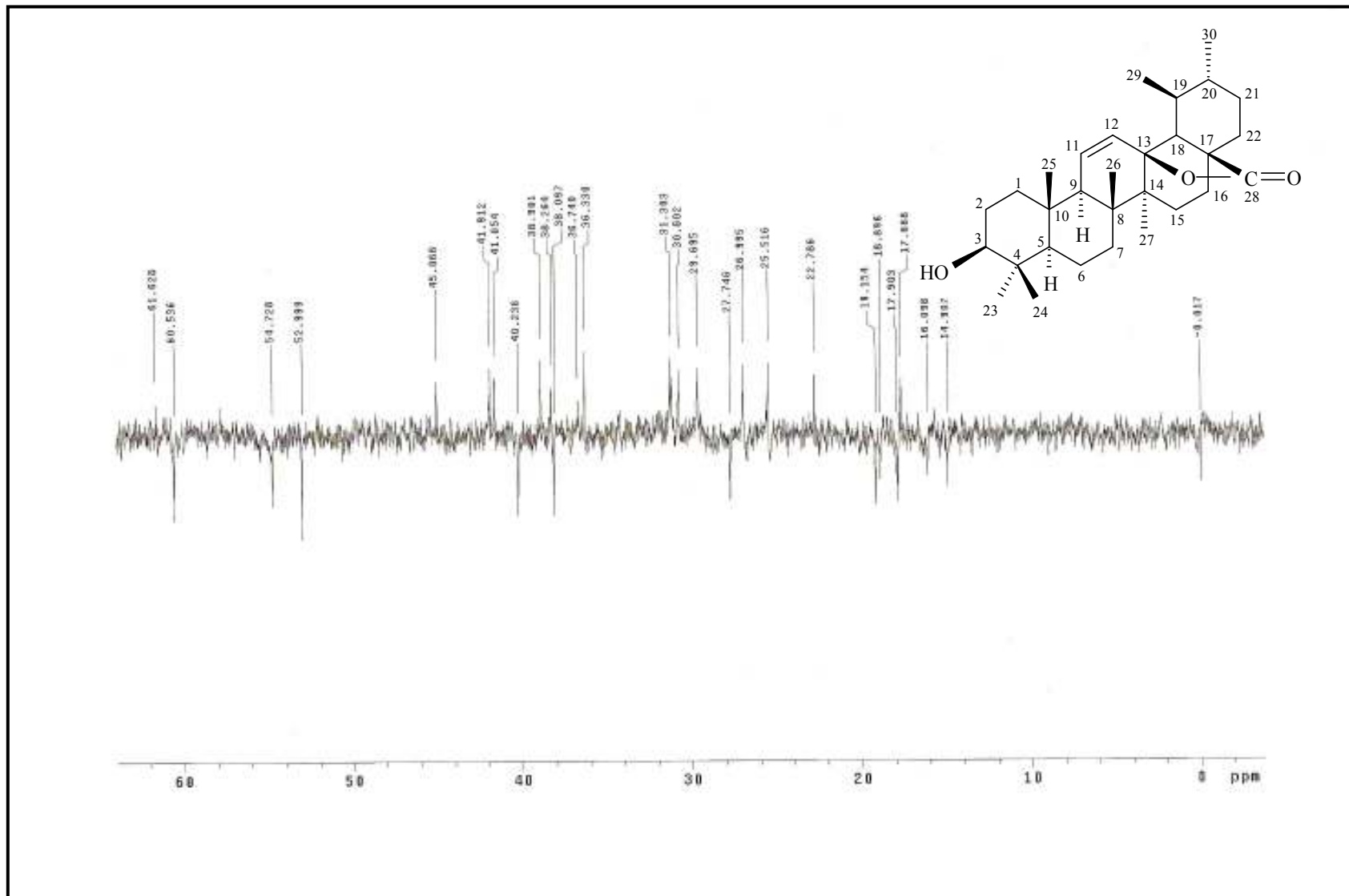


Figura 7. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-1 na região de 62 – 0 ppm (CDCl_3 – 50 MHz)

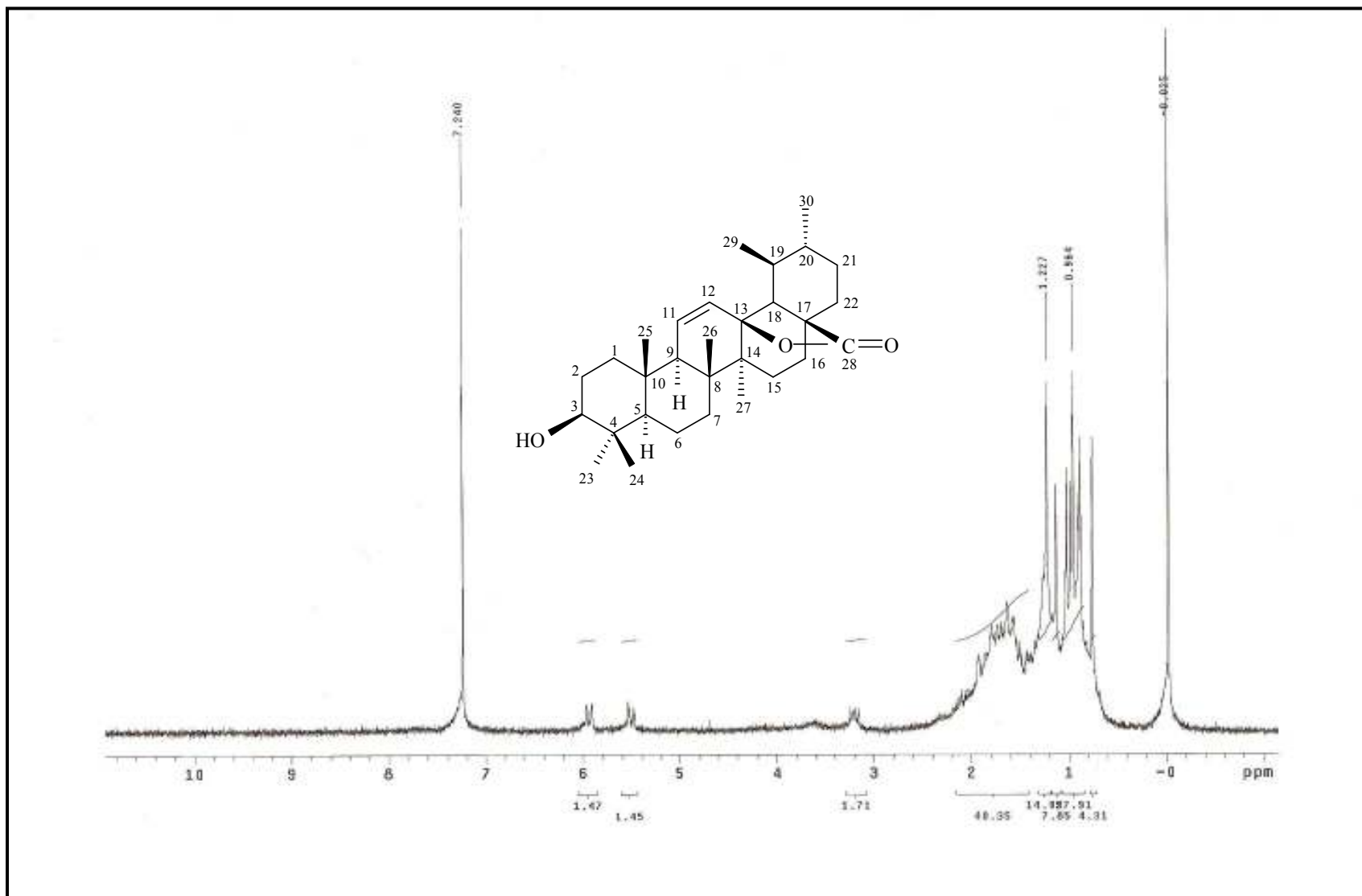


Figura 8. Espectro de RMN ^1H de Rb-1 (CDCl_3 – 200 MHz)

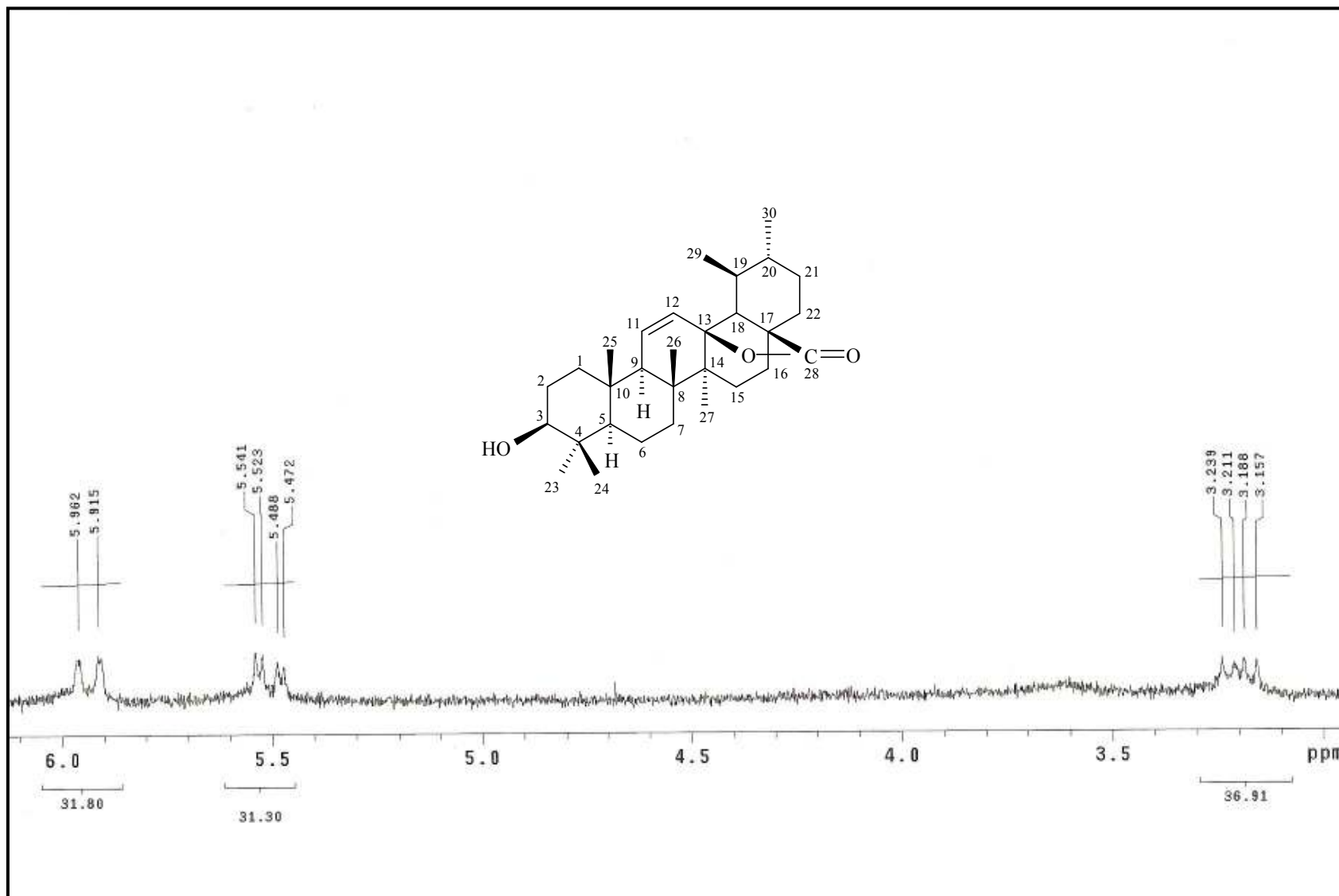


Figura 9. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-1 na região de 6,0 – 3,0 ppm (CDCl_3 – 200 MHz)

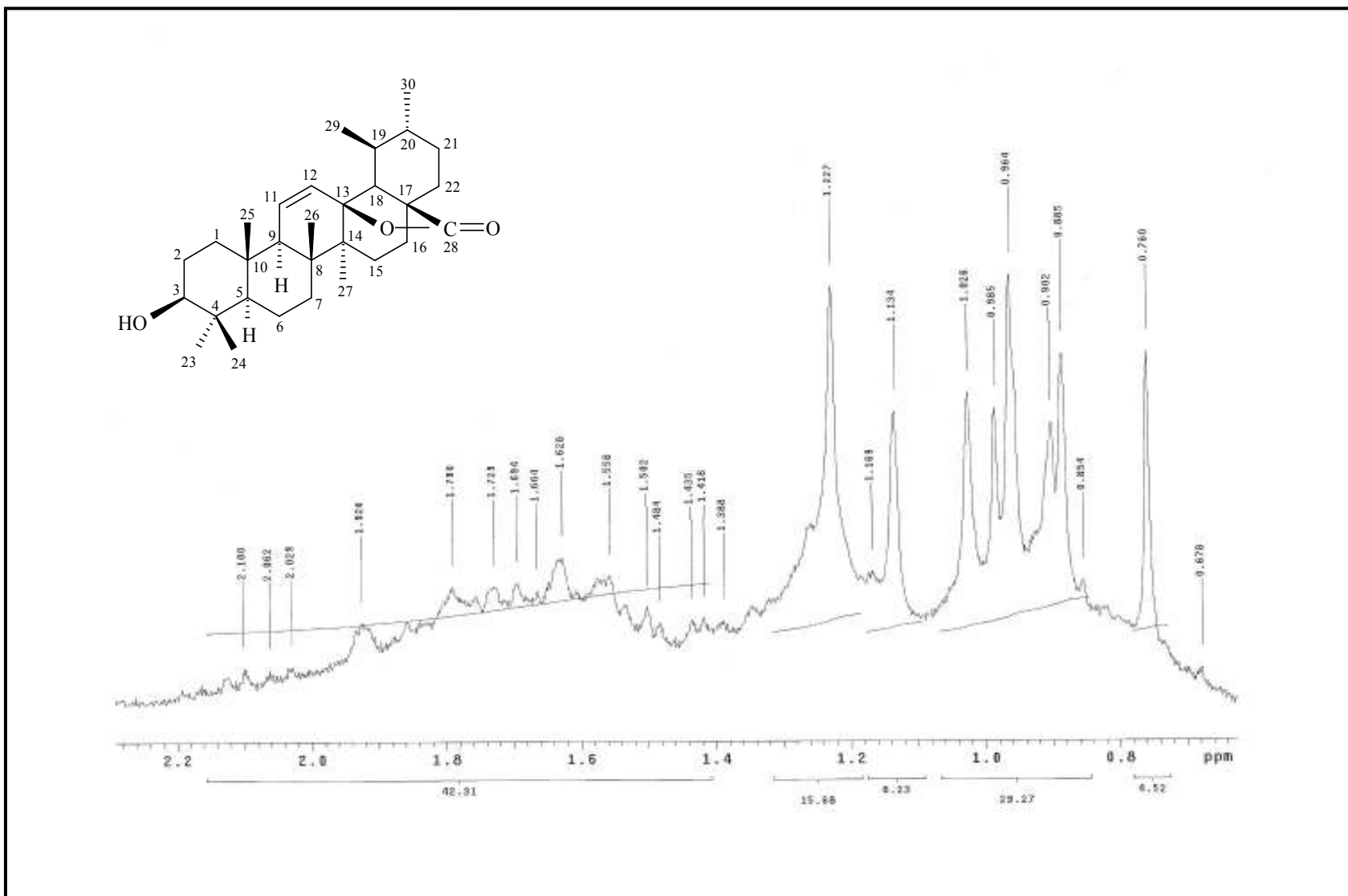


Figura 10. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-1 na região de 2,2 – 0,6 ppm (CDCl_3 – 200 MHz)

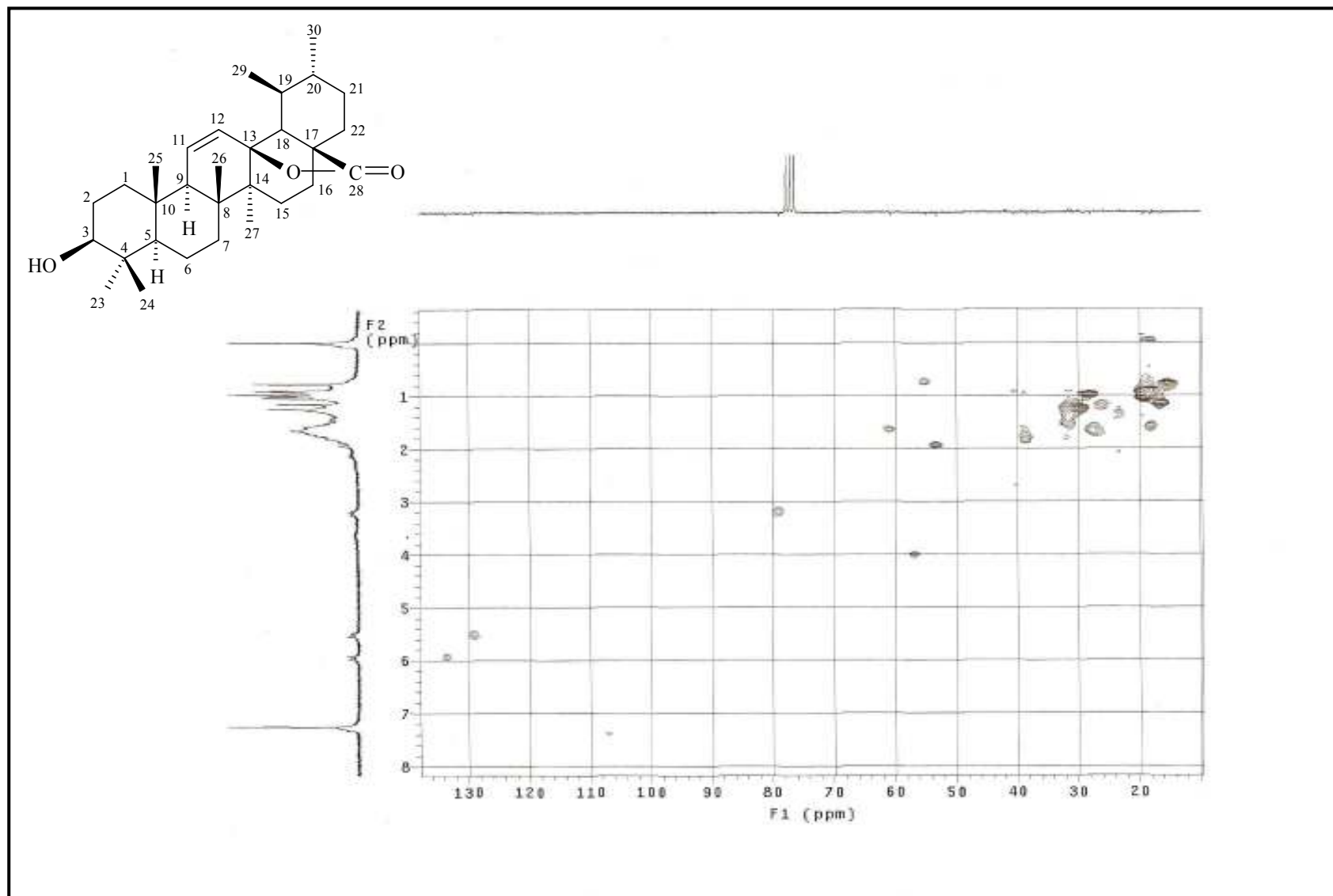


Figura 11. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMOC de Rb-1 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

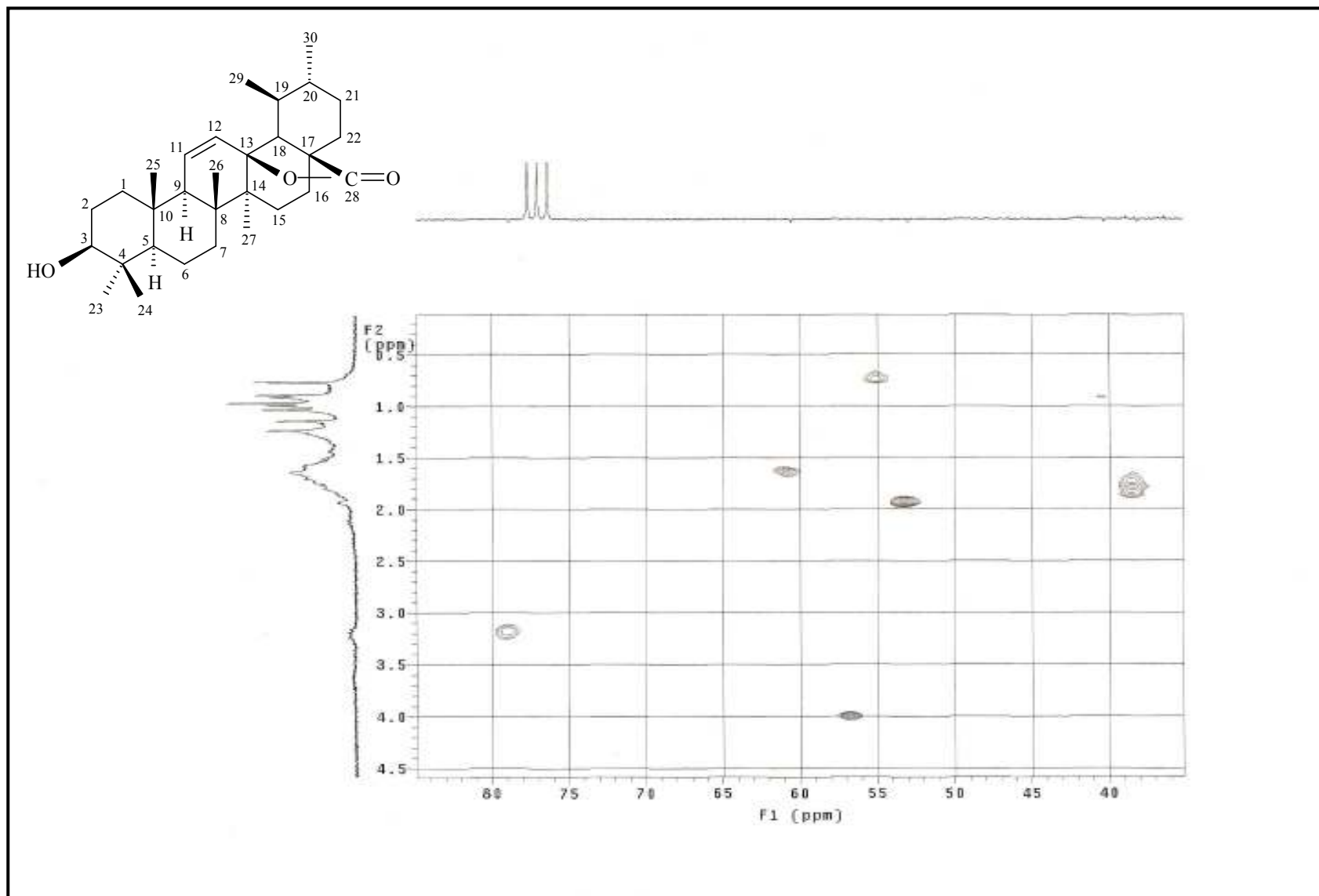


Figura 12. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMQC de Rb-1 na região de 4,5 – 0,5 x 85 – 35 ppm(CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

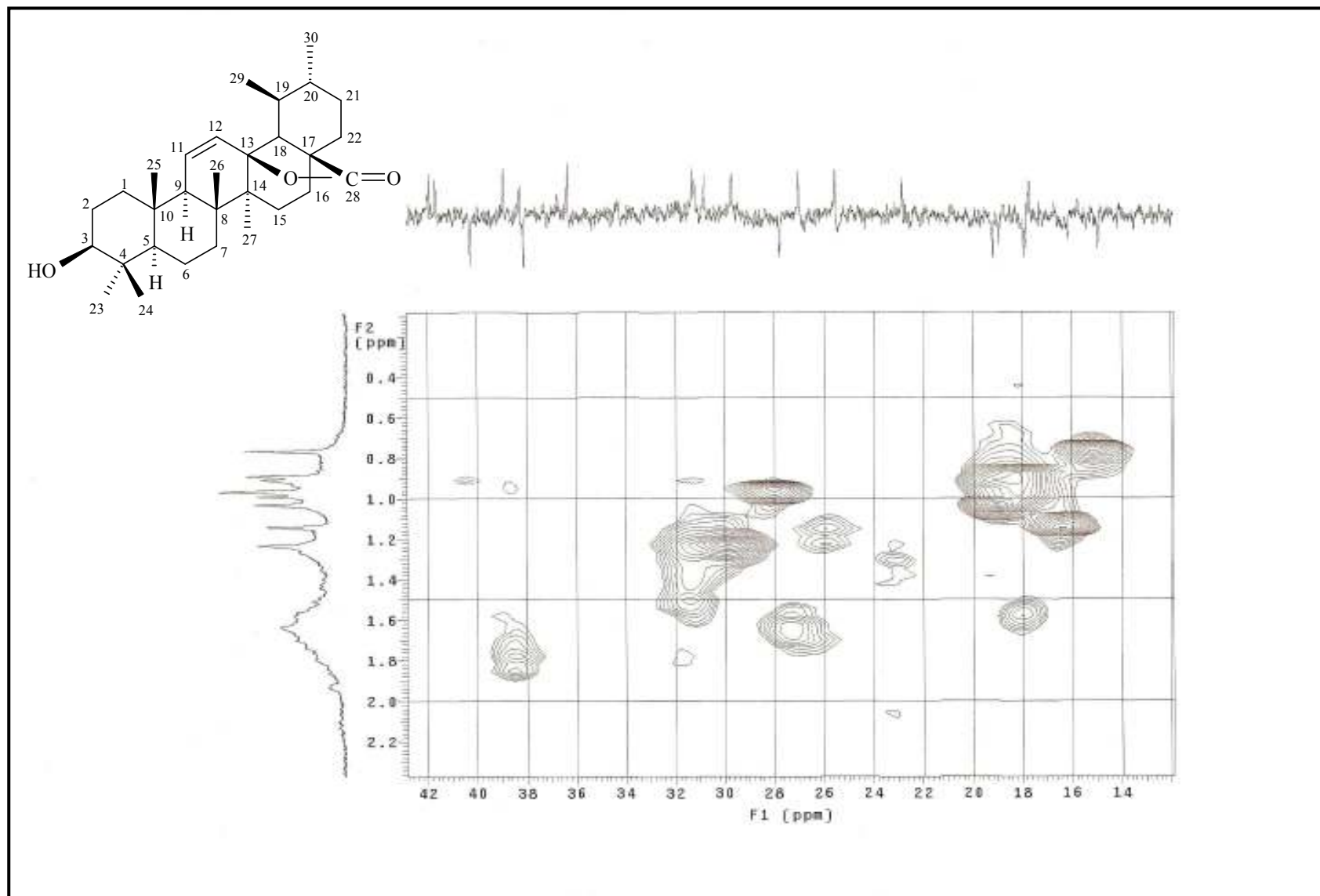


Figura 13. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMOC de Rb-1 na região de 8,2 – 2,2 x 42 – 12 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

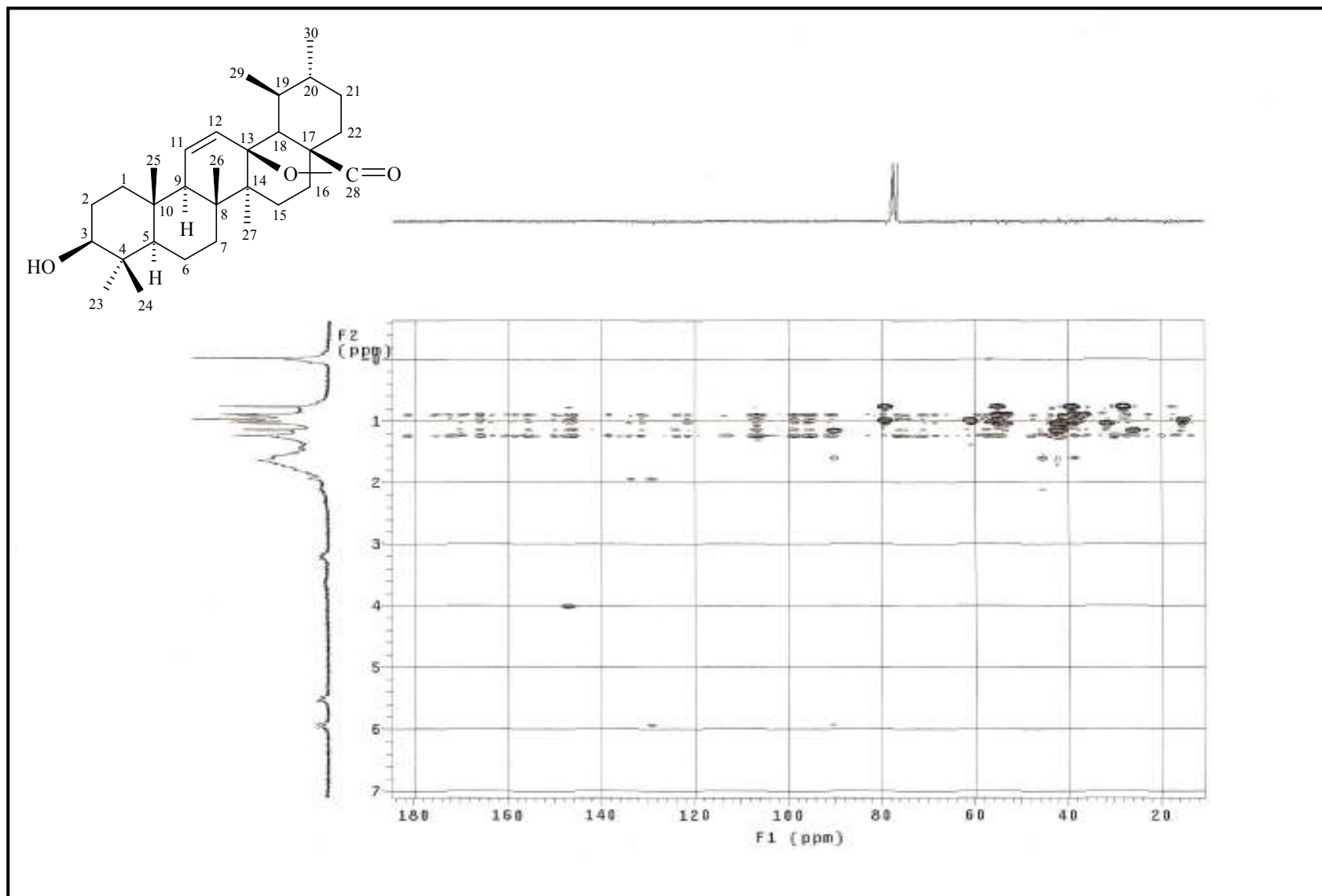


Figura 14. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC de Rb-1 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

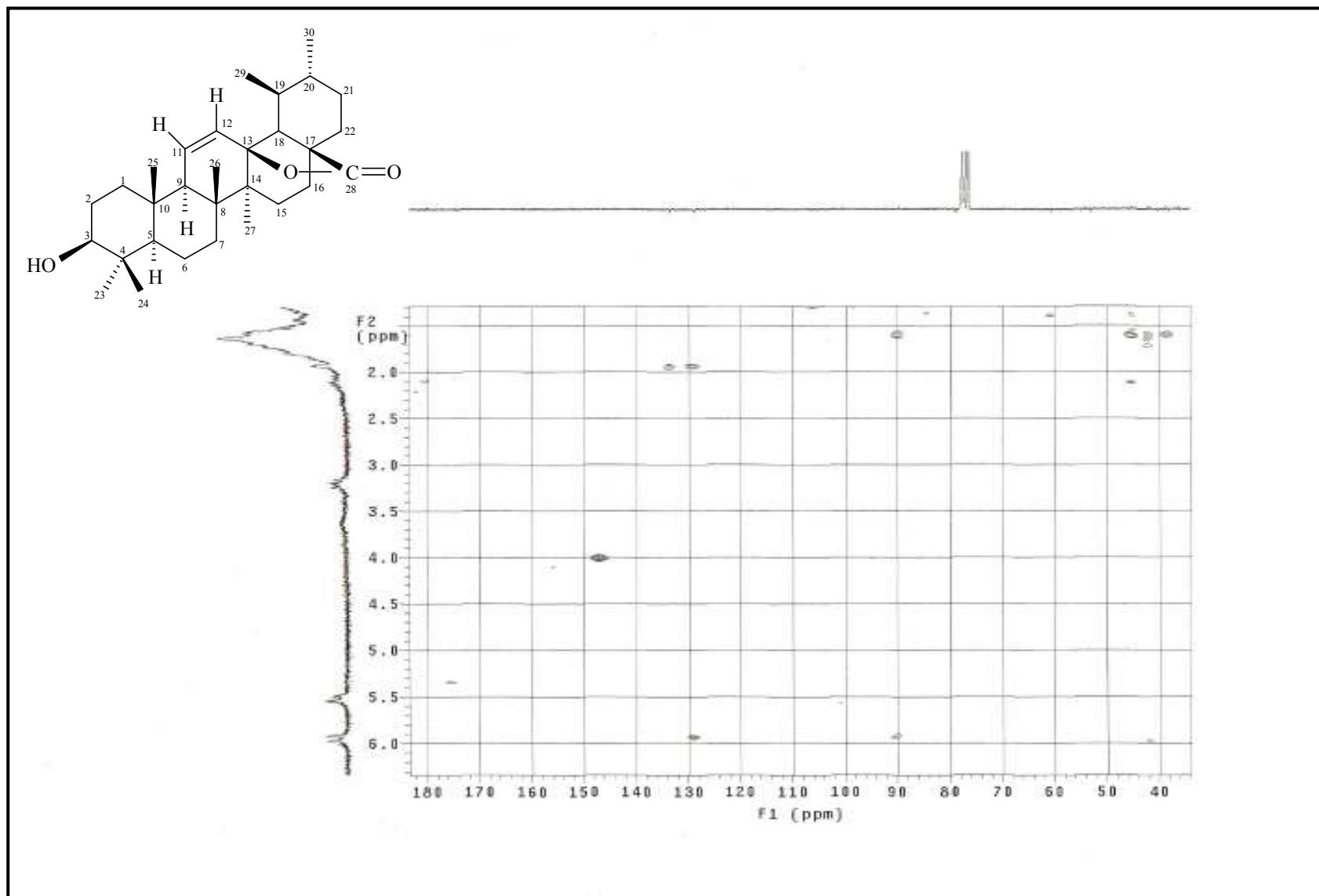


Figura 15. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC de Rb-1 na região de 6,3 – 1,5 x 182 – 34 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

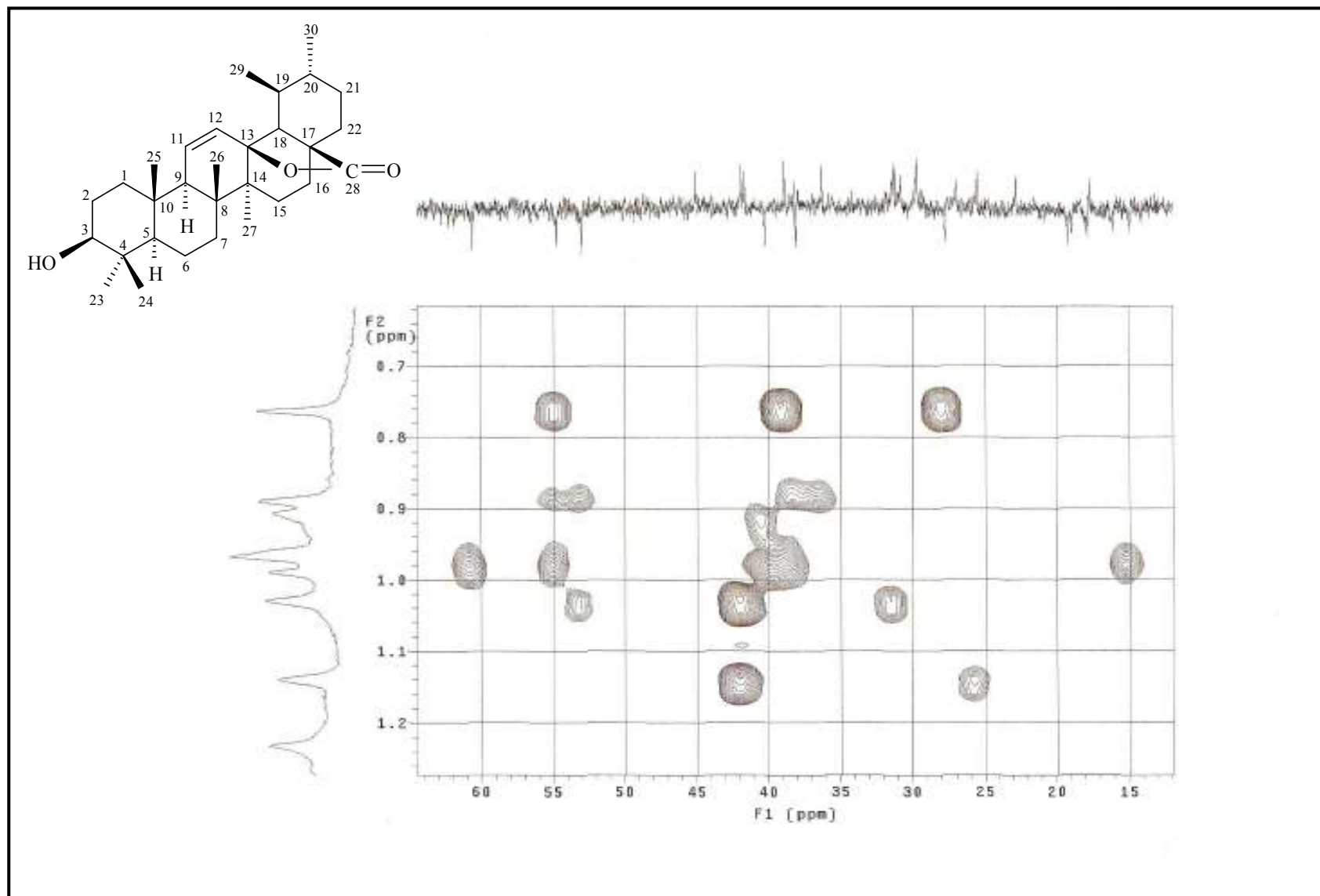


Figura 16. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-1 na região de 1,2 – 0,7 x 64 – 12 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

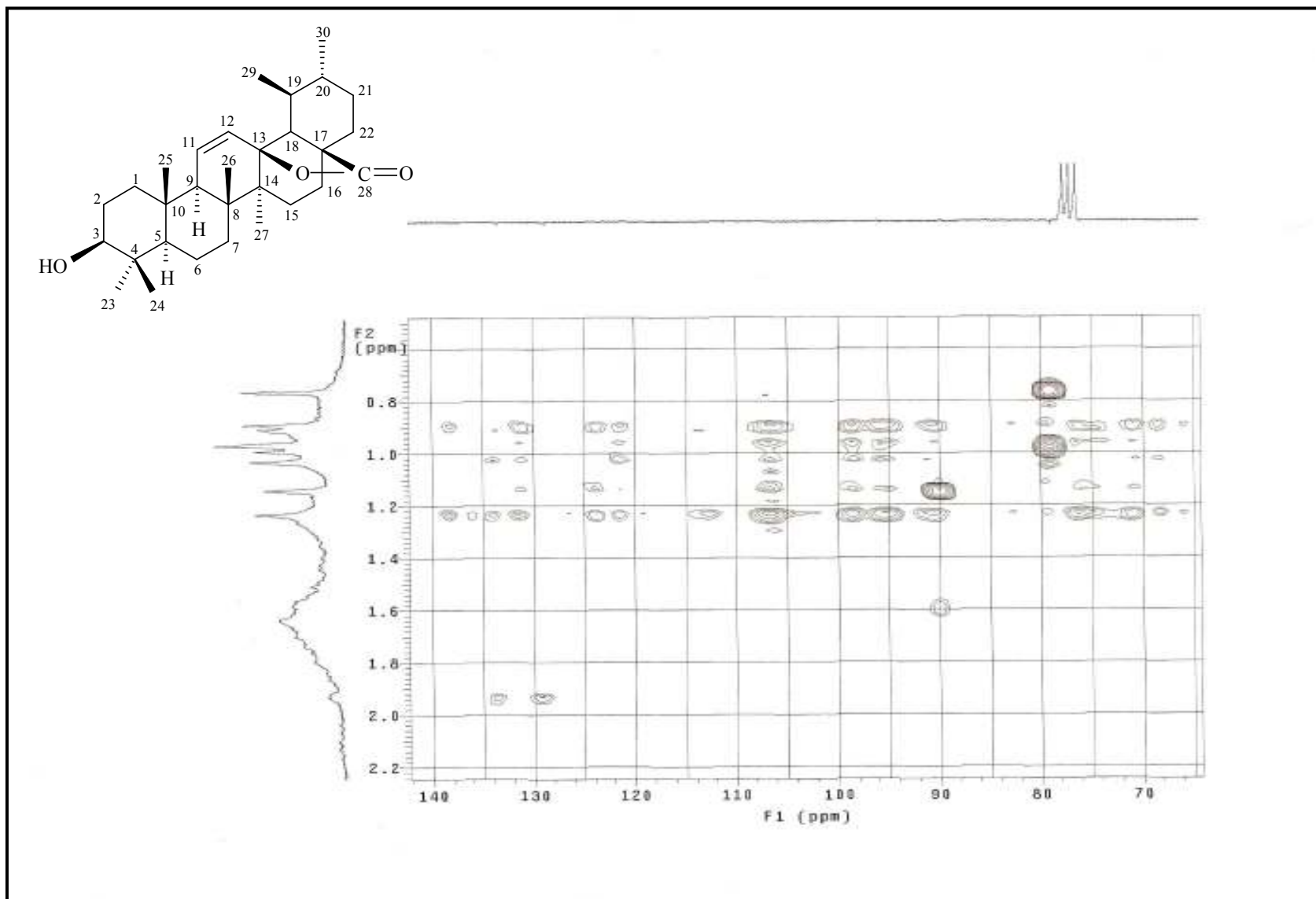


Figura 17. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-1 na região de 2,2 – 0,6 x 142 – 66 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

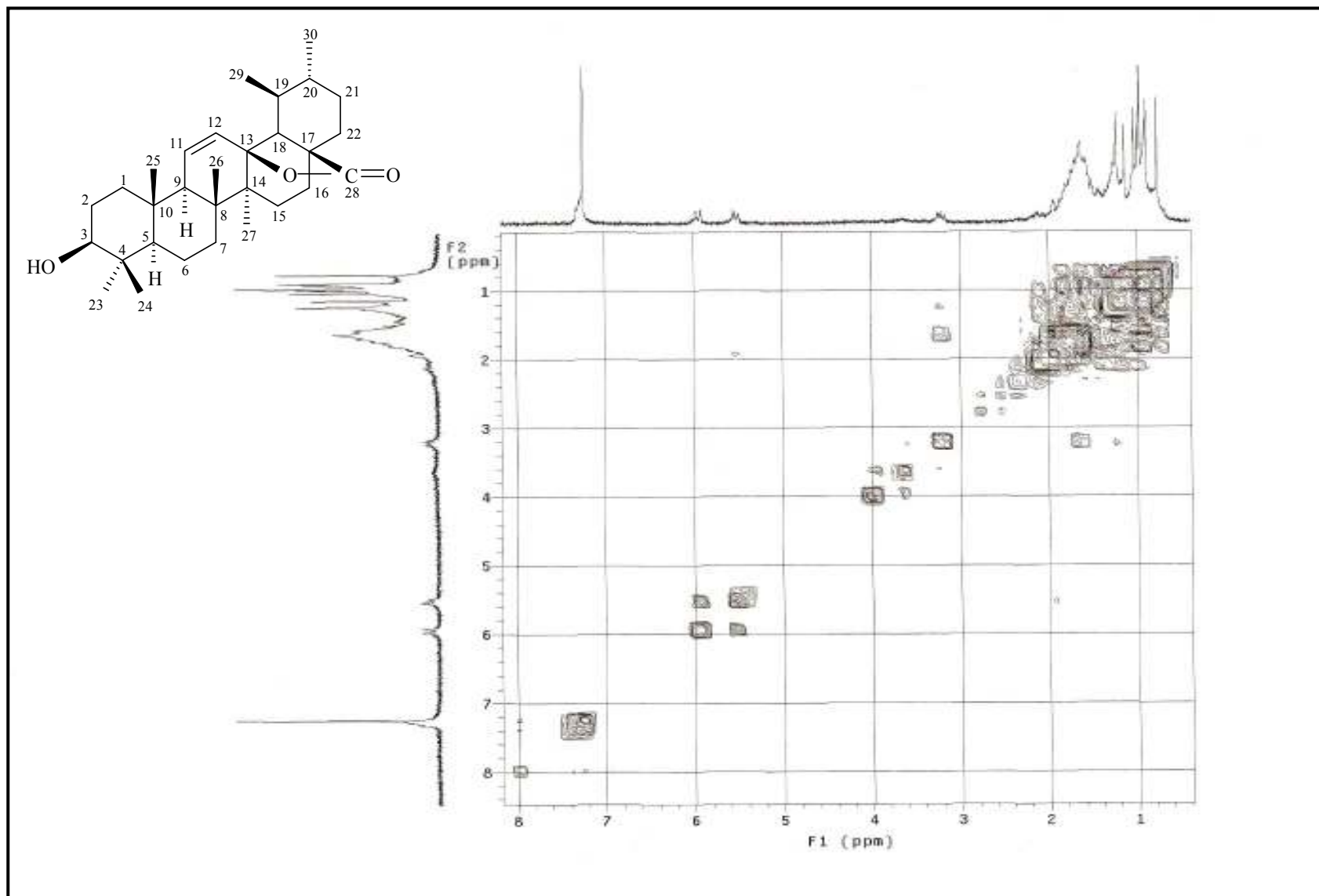


Figura 18. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Rb-1 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

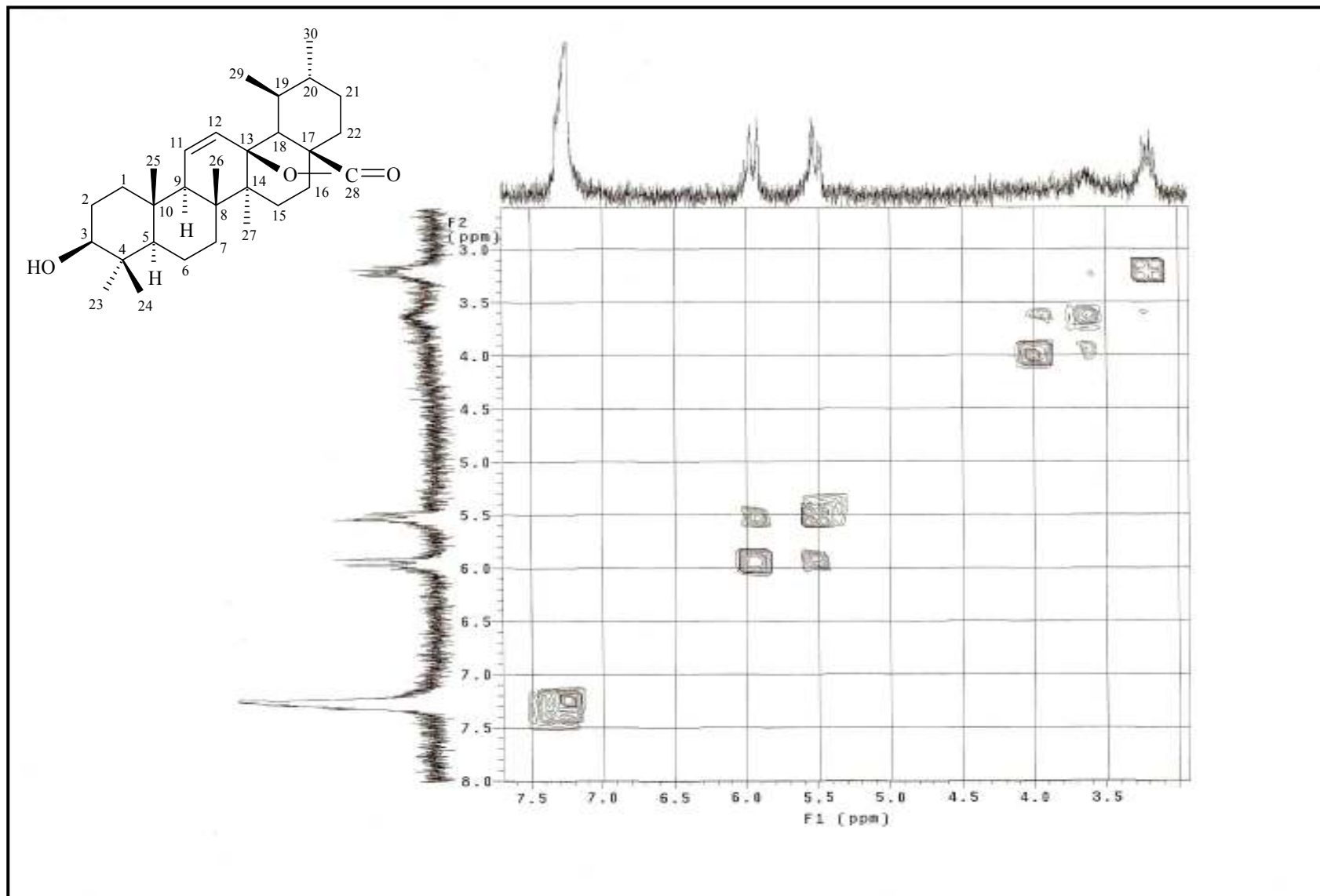


Figura 19. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Rb-1 na região de 3,0 – 7,5 x 8,0 – 2,7 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

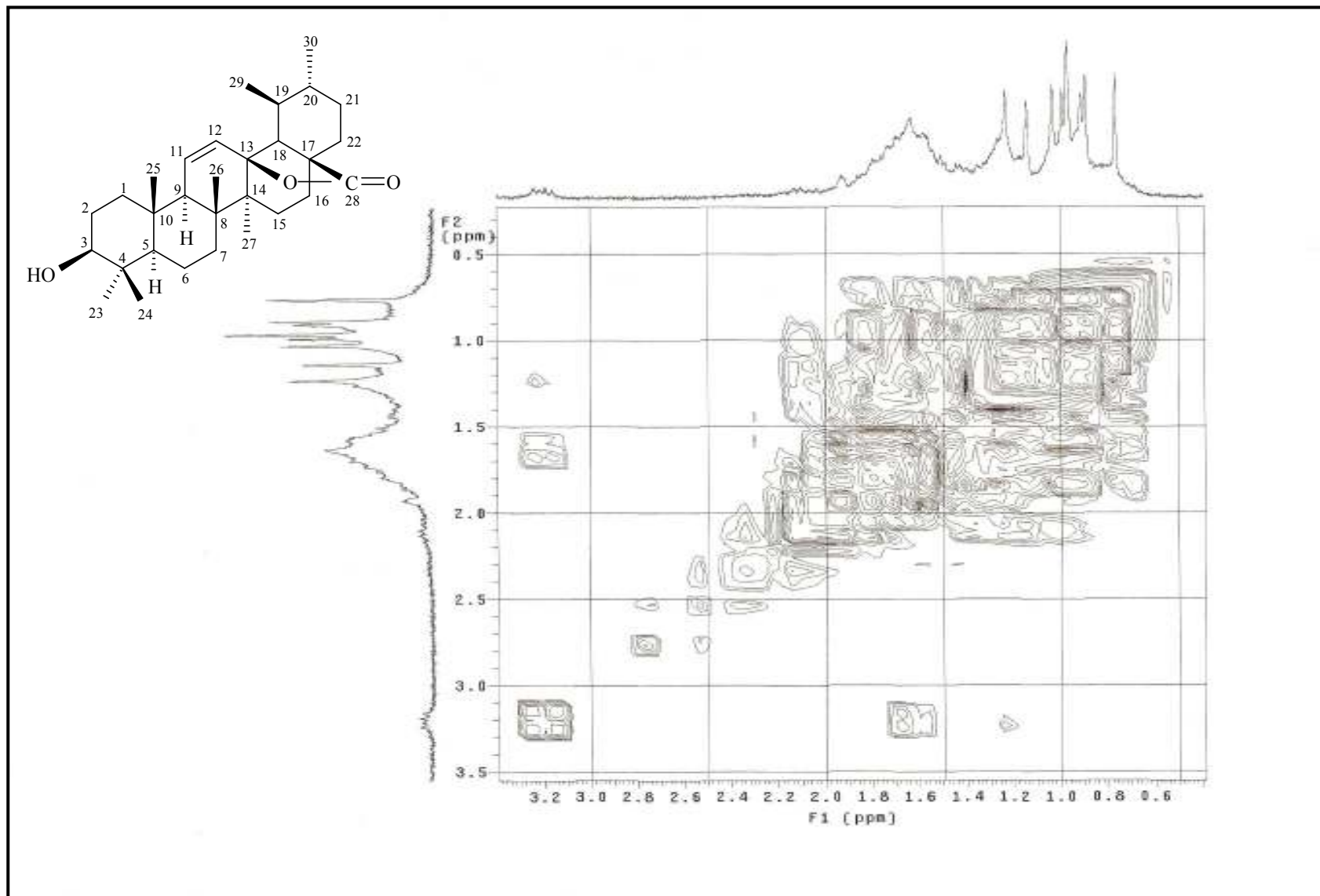


Figura 20. Expansão do espectro de correlação ¹H x ¹H - COSY de Rb-1 na região de 3,4 – 0,4 x 3,5 – 0,3 ppm (CDCl₃, 200 e 50 MHz)

5.1.2 Determinação estrutural de Rb-2

A substância codificada como Rb-2 apresentou-se como cristais amarelos, solúvel em clorofórmio, com rendimento de 0,0029%.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figuras 21 e 22, p. 86 e 87) revelou a presença de cinco sinais de hidrogênios. Na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos observou-se um duplete em δ_{H} 7,58 e outro em δ_{H} 6,24, integrando para um hidrogênio cada e com $J = 9,6$ Hz, sugerindo que estes acoplam orto entre si, atribuindo-se aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. Estes sinais são clássicos de esqueletos cumarínicos. Observou-se ainda, dois simpletos em δ_{H} 6,89 e δ_{H} 6,82 sugerindo a presença de dois hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, um simpleto em δ_{H} 3,93, característico de hidrogênios metoxílicos e um simpleto largo em δ_{H} 6,15 típico de hidrogênio de hidroxila.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), utilizando a técnica APT (Figuras 23 e 24, p. 88 e 89) mostrou dez absorções de carbonos, sendo quatro metínicos (δ_{C} 113,3; δ_{C} 143,3; δ_{C} 107,4 e δ_{C} 103,1), cinco não hidrogenados (δ_{C} 161,4; δ_{C} 111,4; δ_{C} 143,9; δ_{C} 149,6 e δ_{C} 150,2) e um metoxílico (δ_{C} 56,3), reforçando a proposta do espectro de RMN de ^1H , o qual sugeriu a presença de metoxila na estrutura da substância em questão. O deslocamento químico em δ_{C} 161,4 é característico de carbono carbonílico de anel lactônico, conforme comparação com dados da literatura (SILVERSTEIN et al., 1994).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMQC – $^nJ_{\text{CH}}$ – $n=1$) ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, 200 e 50 MHz) (Figuras 25 a 27, p. 90-92) mostrou as correlações diretas entre o carbono metoxílico em δ_{C} 56,3 com o hidrogênio em δ_{H} 3,93. Os carbonos C-3 e C-4 do anel lactônico, em δ_{C} 113,3 e δ_{C} 143,3 mostraram correlação com os hidrogênios em δ_{H} 6,24 e δ_{H} 7,58, respectivamente. A absorção do carbono e hidrogênio da posição 3 em campo mais alto é justificada pela sua posição α em relação à carbonila, portanto mais protegidos pela densidade eletrônica (SILVERSTEIN et al., 1994). Os hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, cujos deslocamentos foram mostrados pelo RMN ^1H em δ_{H} 6,89 e δ_{H} 6,82, correlacionam-se com os respectivos carbonos δ_{C} 103,1 e δ_{C} 107,4. As correlações diretas $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ obtidas no espectro de HMQC (50 MHz, CDCl_3) de Rb-2 estão apresentadas na tabela 5 (p. 84).

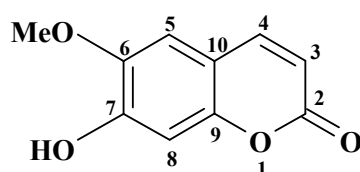
No espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ – $n=2$ e 3) ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, 200 e 50 MHz) (Figuras 28 e 29, p.93 e 94), observou-se as correlações a duas ligações do H-8 (s, δ_{H} 6,89) com os carbonos C-7 (δ_{C} 149,6) e C-9 (δ_{C} 150,2), e a três ligações do H-5 (s, δ_{H} 6,82) com o carbono C-4 (δ_{C} 143,3), bem como do H-4 (d, δ_{H} 7,58; $J = 9,6$ Hz)

com os carbonos em δ_C 161,4, δ_C 150,2 e δ_C 107,4, definindo desta forma os deslocamentos químicos dos carbonos C-2, C-9 e C-5, respectivamente. O hidrogênio H-3 (d, δ_H 6,24; $J = 9,6$ Hz) do anel lactônico, correlacionou-se a três ligações com o carbono C-10 (δ_C 111,4), confirmando assim o deslocamento químico deste carbono. Ainda no espectro de HMBC observou-se a correlação a três ligações dos hidrogênios metoxílicos (s, δ_H 3,93) com o carbono (δ_C 143,9), atribuído a C-6.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear COSY (Figuras 30 a 32, p. 95-97) confirmou o acoplamento entre os hidrogênios H-3 (d, δ_H 6,24; $J = 9,6$ Hz) e H-4 (d, δ_H 7,58; $J = 9,6$ Hz) ao mostrar interação entre seus deslocamentos.

Para reforçar ainda mais as atribuições da metoxila e dos hidrogênios H-3, H-4 e H-5, observou-se no espectro bidimensional NOESY (Figuras 33 e 34, p. 98 e 99) o acoplamento espacial entre os hidrogênios da metoxila (s, δ_H 3,93) e o hidrogênio H-5 (s, δ_H 6,82) e do H-3 (d, δ_H 6,24; $J = 9,6$ Hz) com H-4 (d, δ_H 7,58; $J = 9,6$ Hz).

A comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C com os valores encontrados na literatura (VASCONCELOS et al., 1998) (Tabela 6, p. 85) permitiu identificar a substância Rb-2 como sendo a 6-metoxi-7-hidroxicumarina, conhecida como escopoletina, isolada pela primeira vez no gênero *Richardia*.



6-metoxi-7-hidroxicumarina

Tabela 5. Dados de RMN ^1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY e NOESY) de Rb-2 registrados em CDCl_3 .

	HMQC - $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$		HMBC - $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$	COSY	NOESY
	δ_C	δ_H	2J	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$
C					
2	161,4	-			
10	111,4	-			
6	143,9	-			
7	149,6	-			
9	150,2	-			
CH					
3	113,3	6,2 (d, $J = 9,6$ Hz)		C-10	H-4
4	143,3	7,6 (d, $J = 9,6$ Hz)		C-2; C-9; C-5	H-3

5	107,4	6,8 (s)	C-4	MeO-6
8	103,1	6,9 (s)	C-7; C-9	
CH₃				
MeO-6	56,3	3,9 (s)	C-6	H-5

Tabela 6. Comparação dos dados espectrais de RMN de ¹H e ¹³C de Rb-2 com os valores encontrados na literatura (VASCONCELOS et al., 1998) (δ em ppm e J em Hz).

	Rb-2 (CDCl ₃)		Literatura (CDCl ₃)	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
C				
2	161,4	-	161,5	-
10	111,4	-	111,5	-
6	143,9	-	144,0	-
7	149,6	-	151,2	-
9	150,2	-	150,2	-
CH				
3	113,3	6,2 (d, $J = 9,6$ Hz)	113,4	6,28 (d, $J = 9,5$ Hz)
4	143,3	7,6 (d, $J = 9,6$ Hz)	143,3	7,60 (d, $J = 9,5$ Hz)
5	107,4	6,8 (s)	107,4	6,85 (s)
8	103,1	6,9 (s)	103,2	6,92 (s)
CH₃				
MeO-6	56,3	3,9 (s)	56,4	3,96 (s)

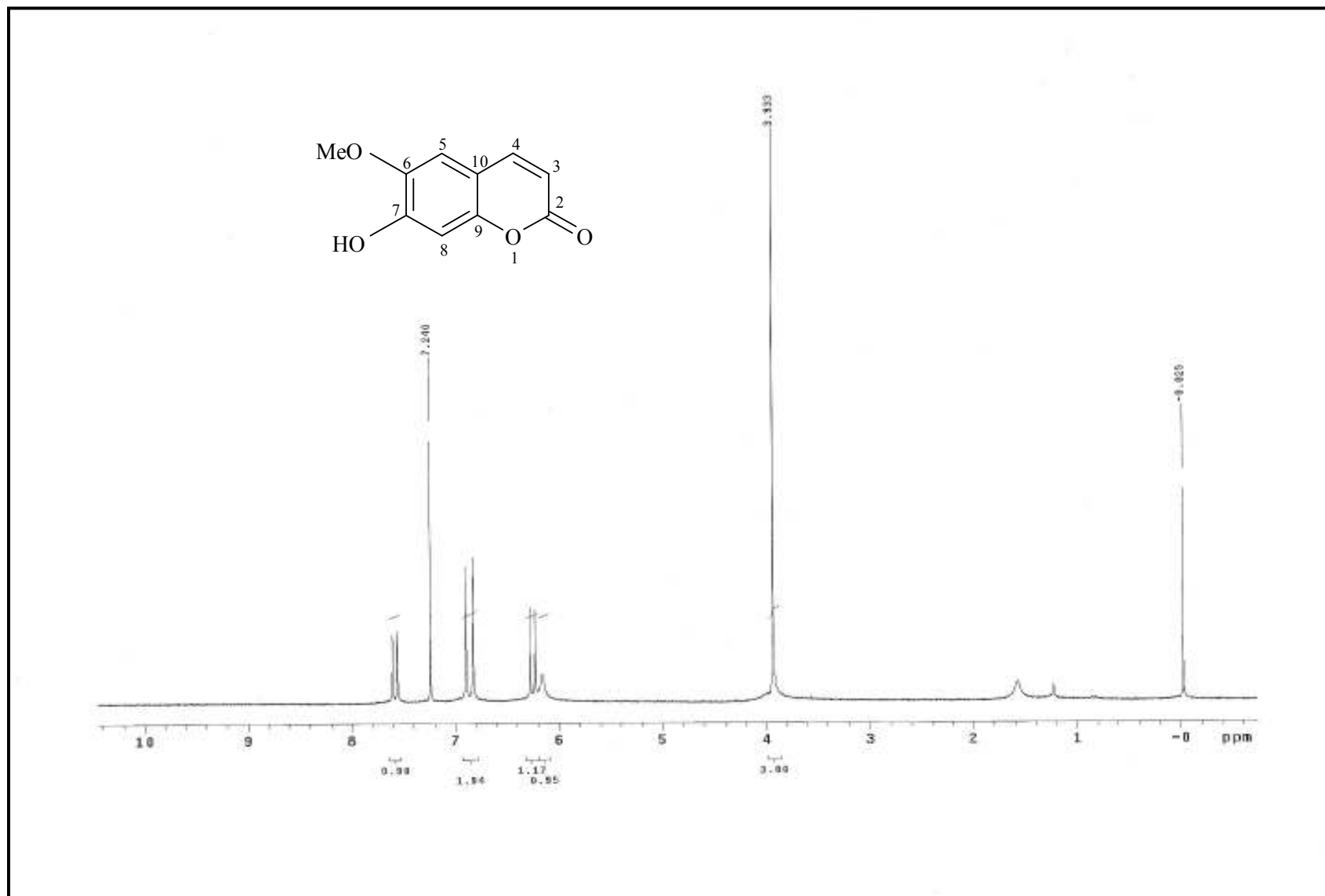


Figura 21. Espectro de RMN ^1H de Rb-2 (CDCl_3 – 200 MHz)

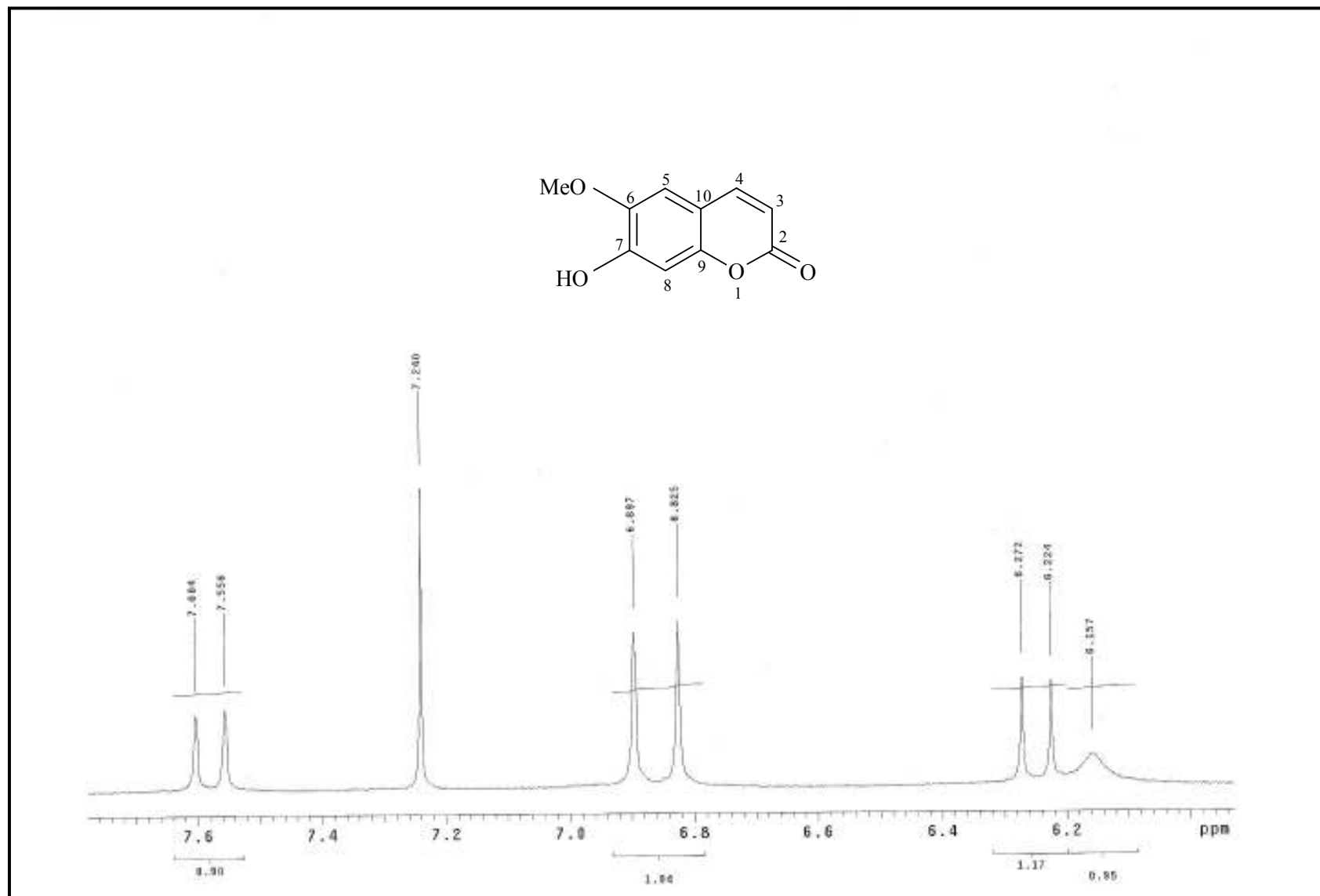


Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-2 na região de 7,7 – 6,1 ppm (CDCl₃ – 200 MHz)

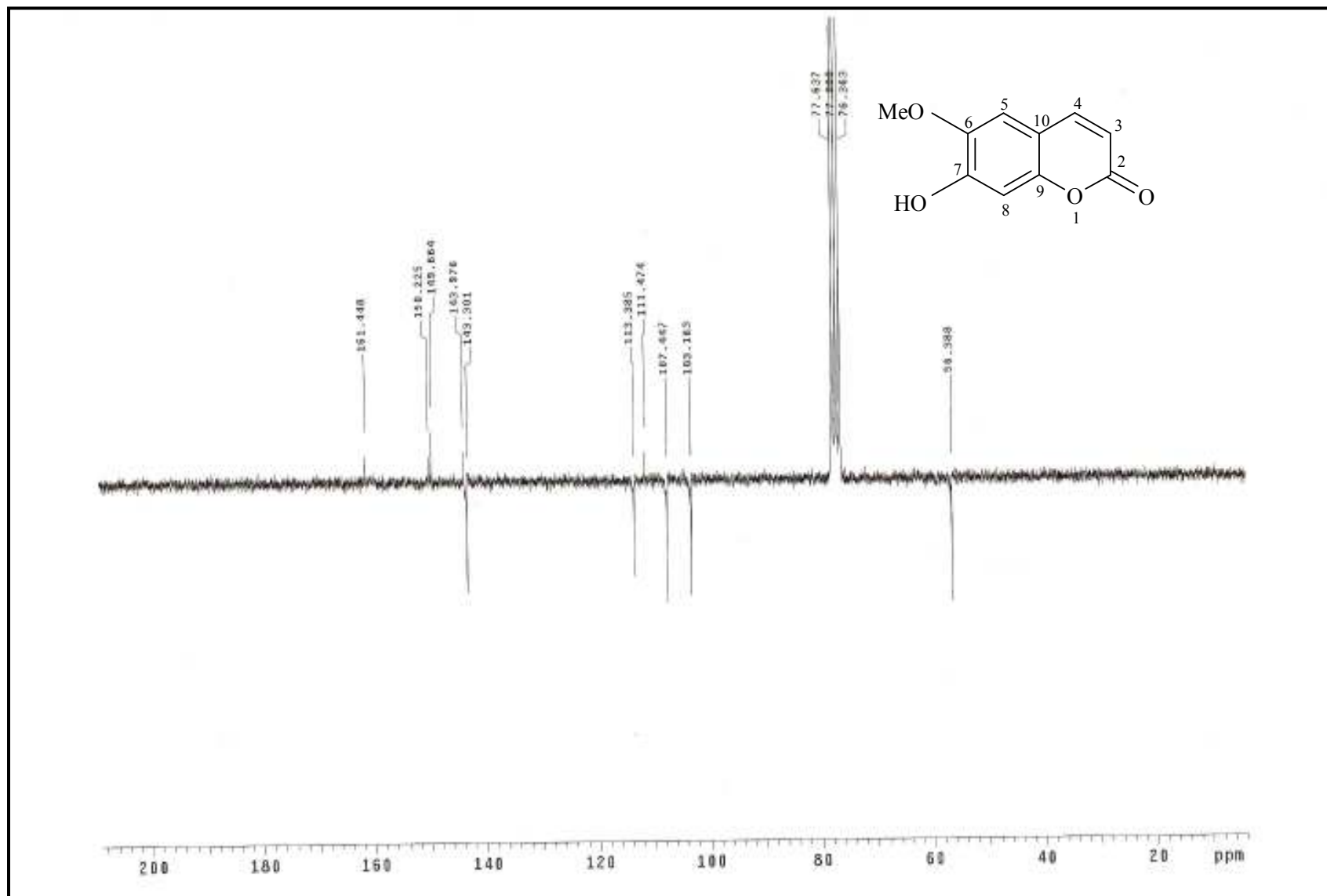


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-2 (CDCl_3 – 50 MHz)

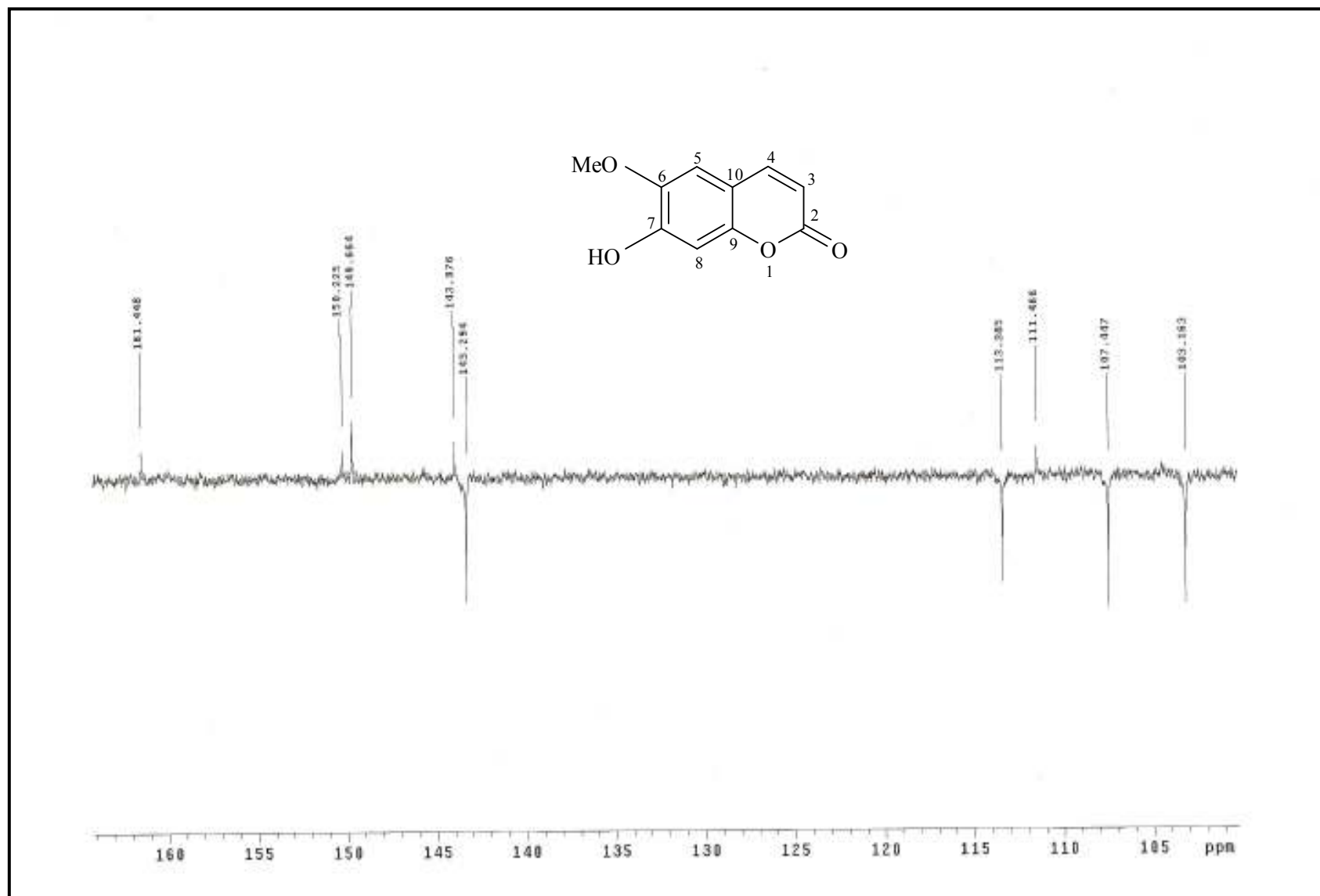


Figura 24. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-2 na região de 164 – 101 ppm (CDCl_3 – 50 MHz)

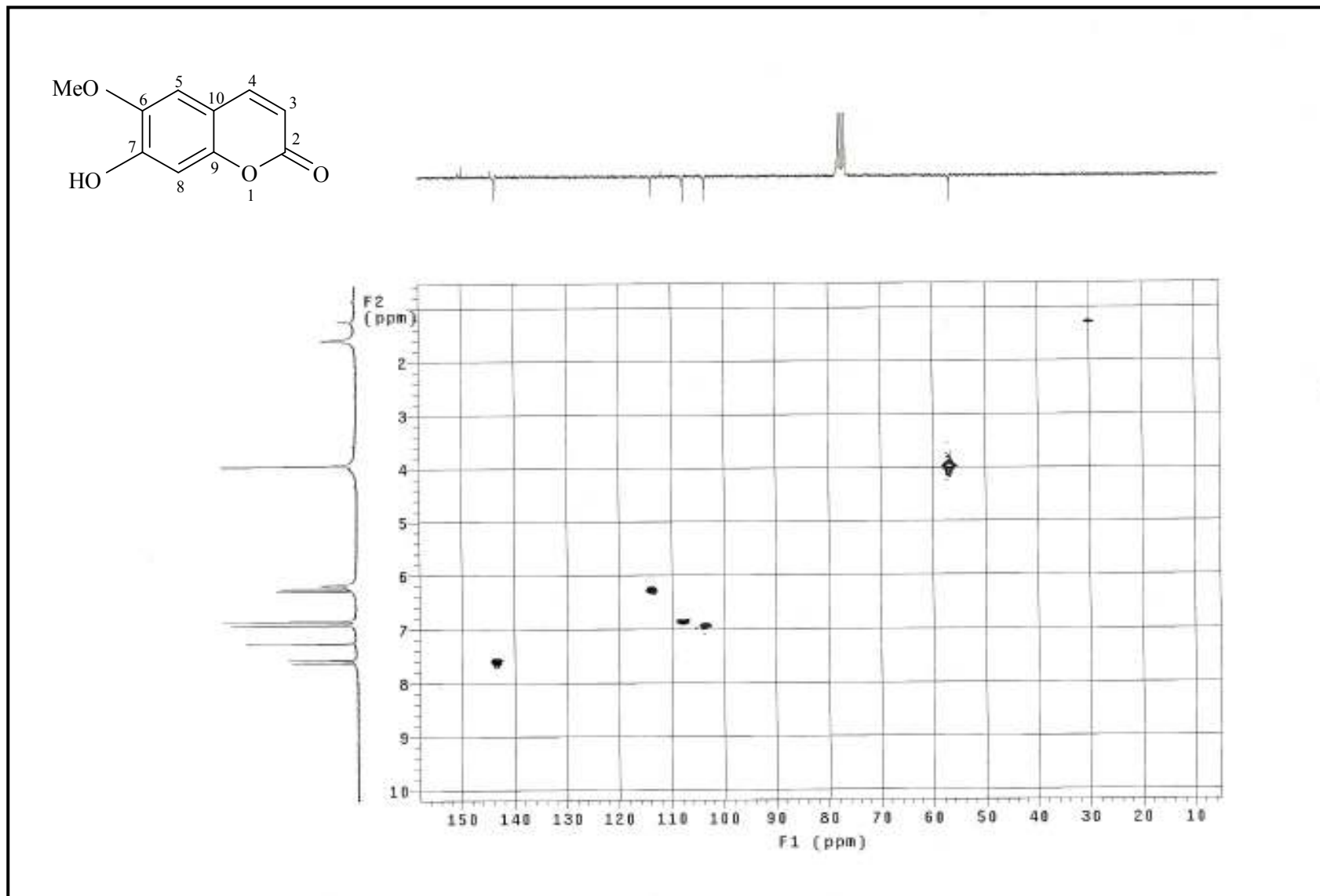


Figura 25. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC de Rb-2 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

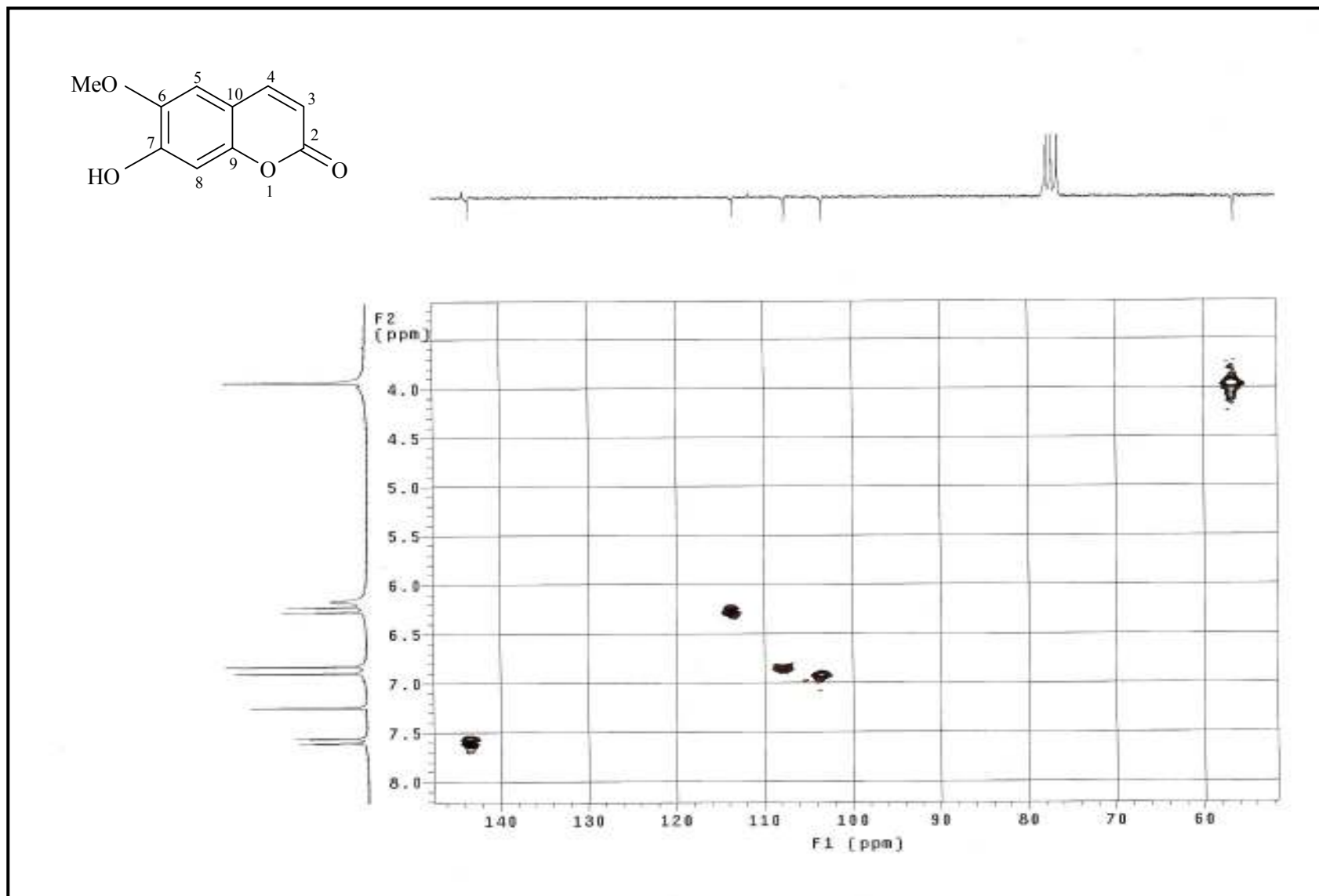


Figura 26. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC de Rb-2 na região de 8,0 – 3,5 x 150- 50 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

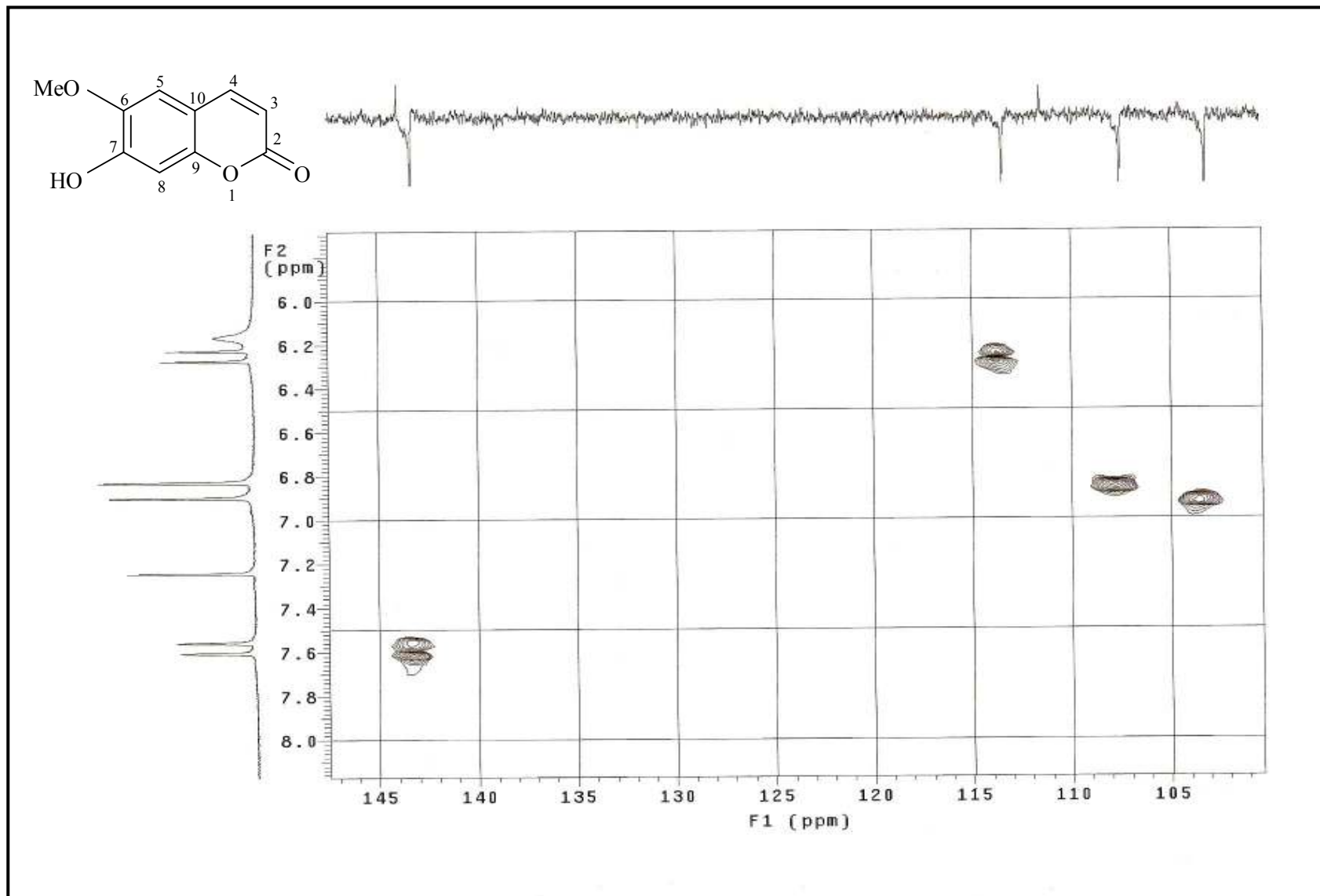


Figura 27. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMQC de Rb-2 na região de 8,0 – 5,8 x 147- 100 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

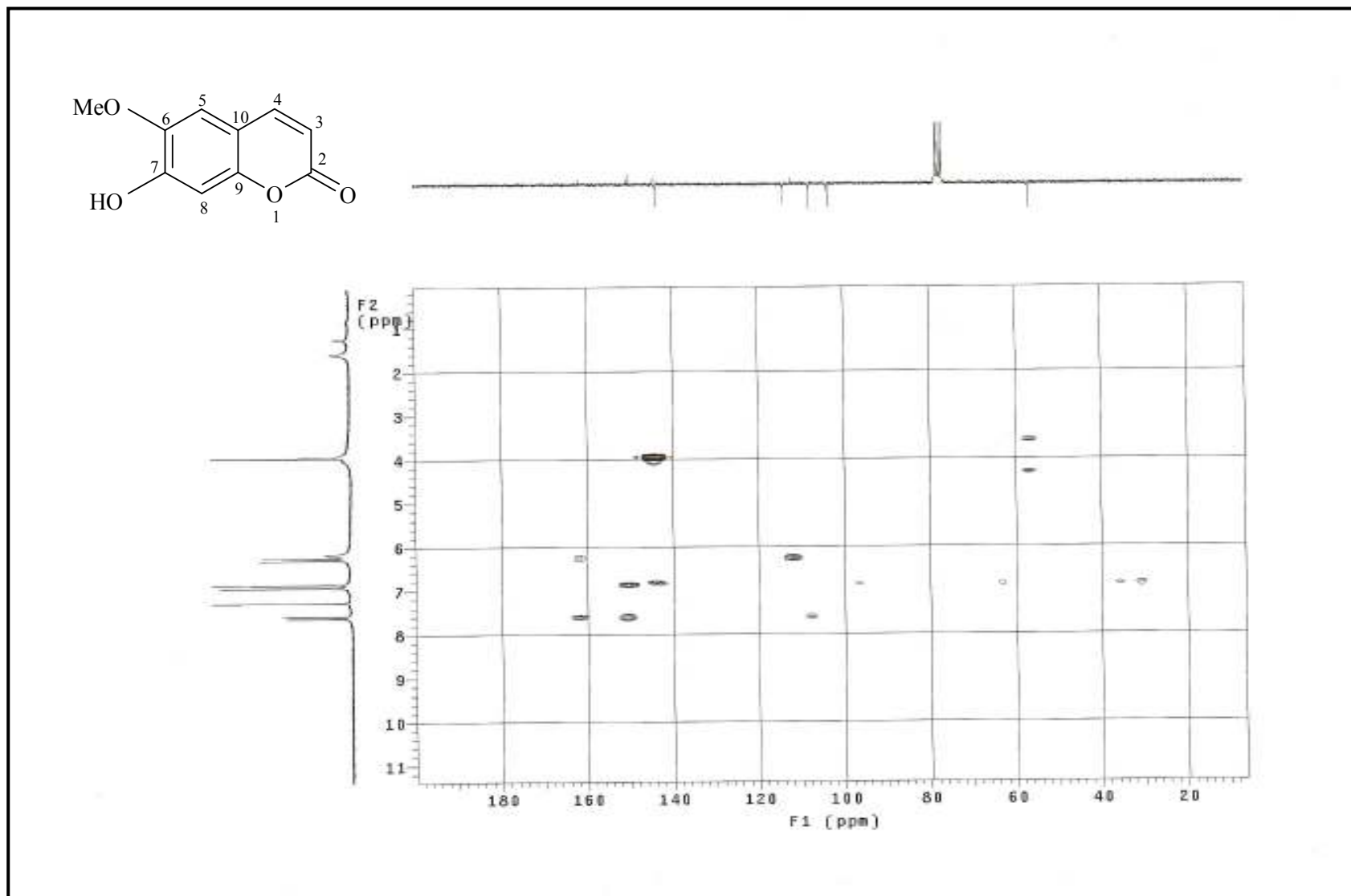


Figura 28. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC de Rb-2 (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

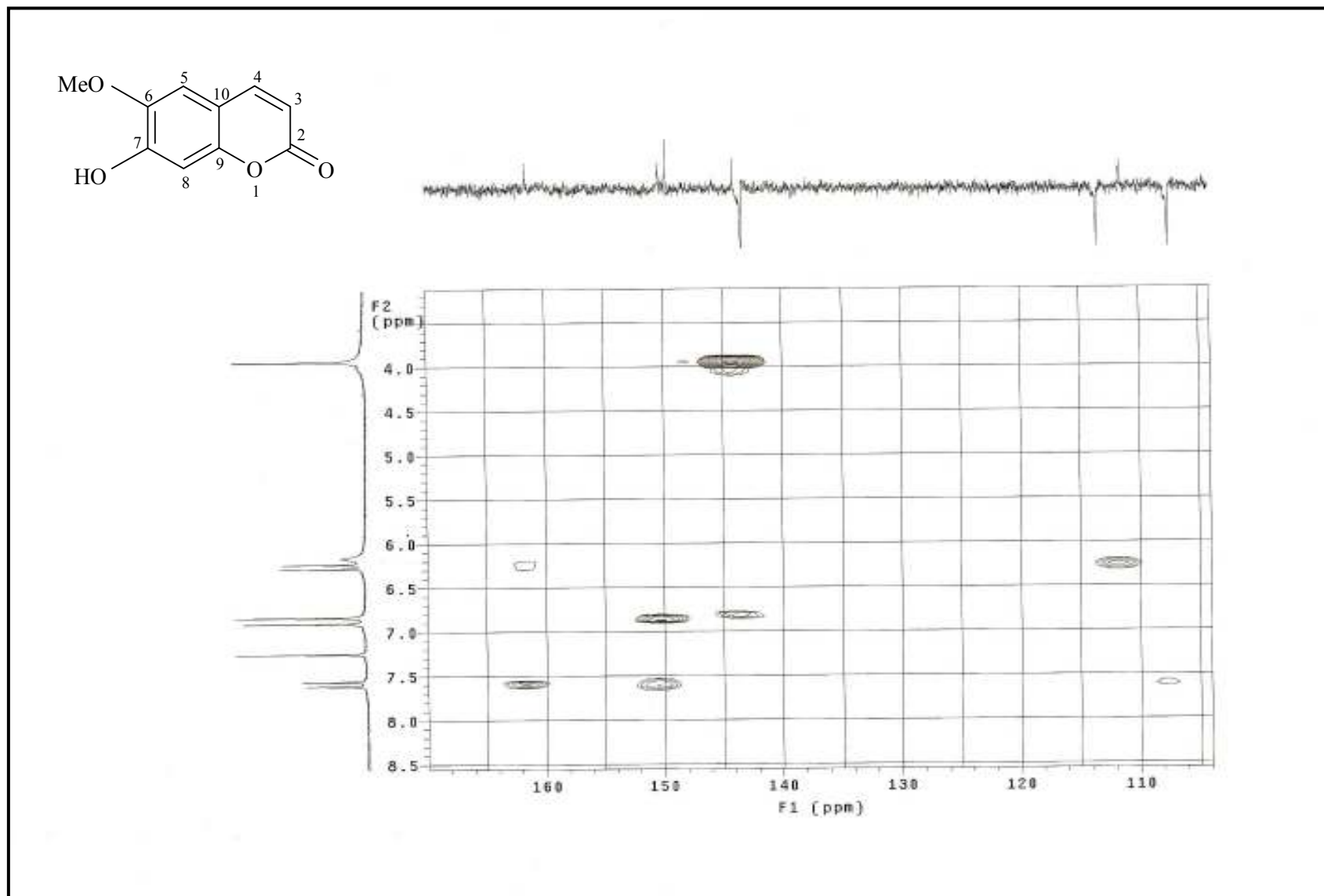


Figura 29. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C - HMBC de Rb-2 na região de 8,3 – 3,2 x 170 – 105 ppm (CDCl_3 , 200 e 50 MHz)

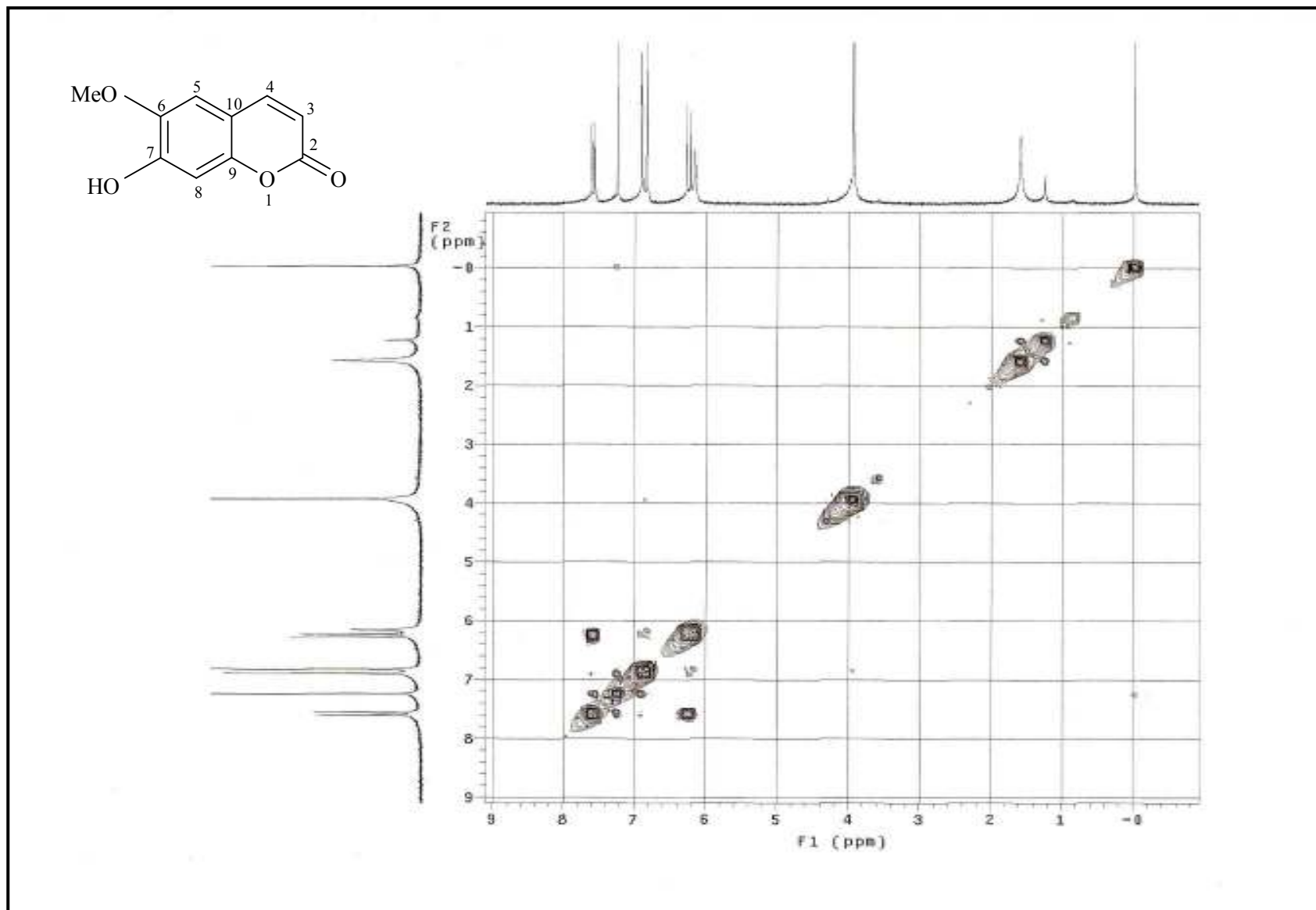


Figura 30. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Rb-2 (CDCl_3 , 200 MHz)

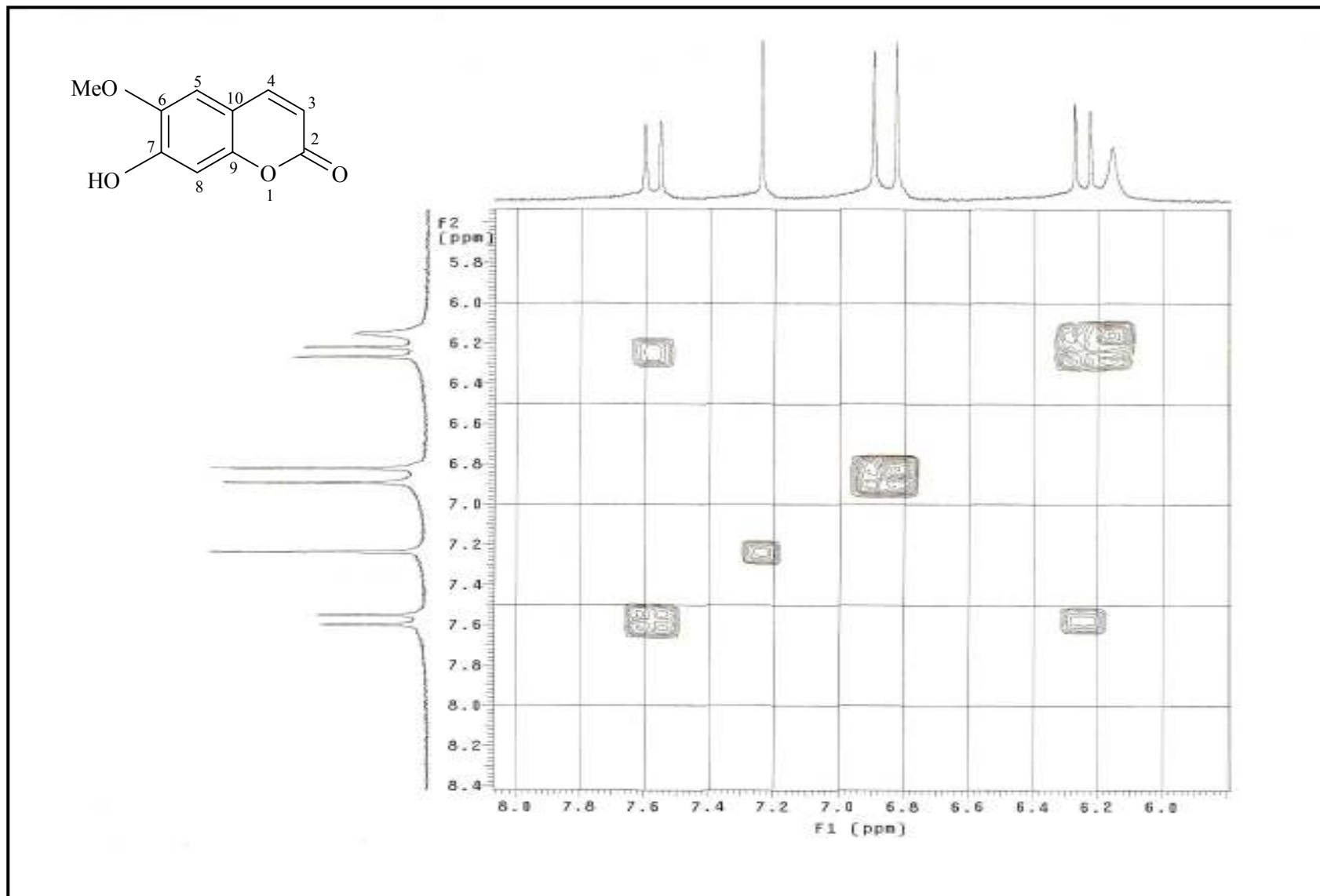


Figura 31. Expansão do espectro de RMN ¹H x ¹H - COSY de Rb-2 na região de 8,0 – 5,8 x 8,4 – 5,6 ppm (CDCl₃, 200 MHz)

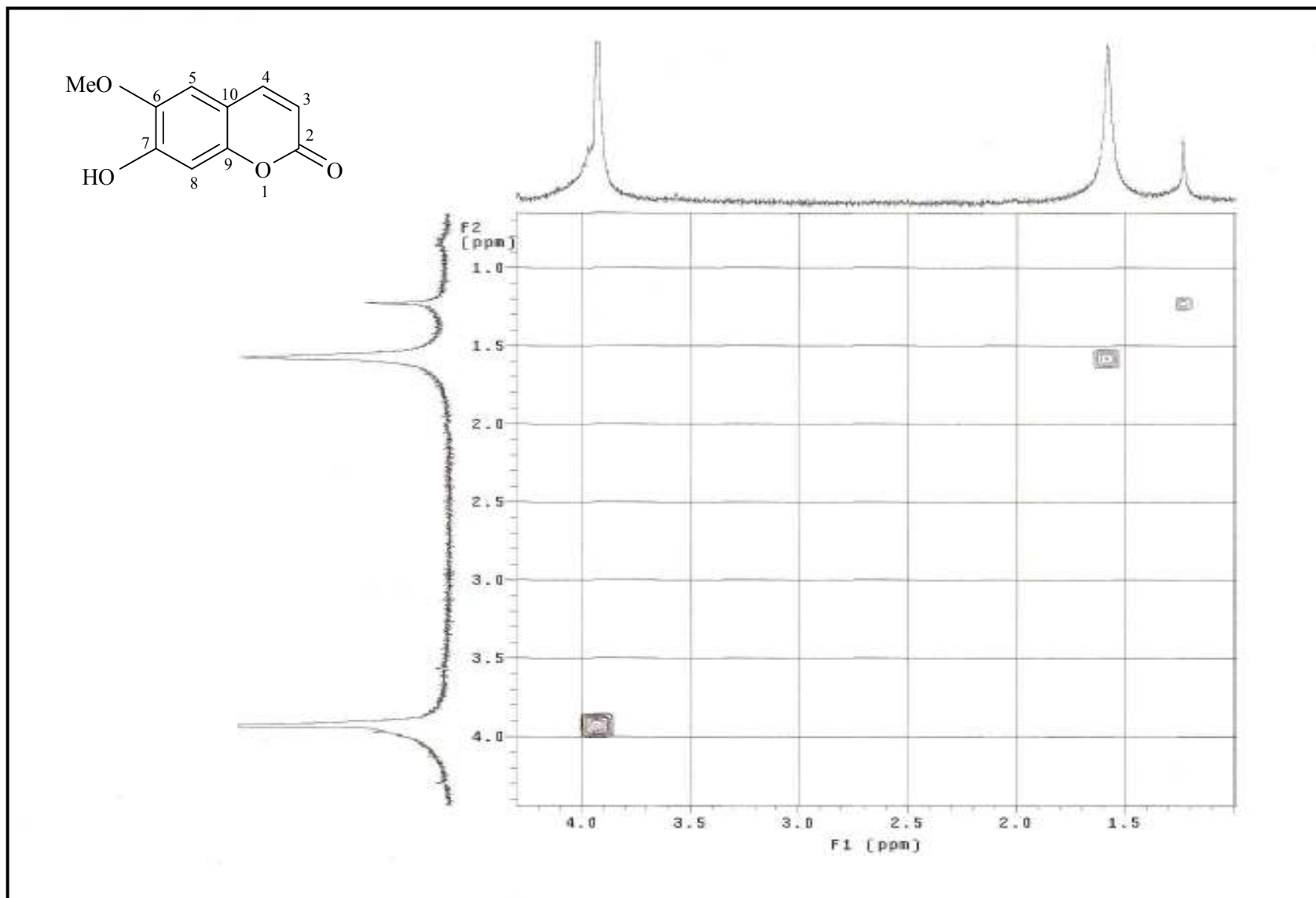


Figura 32. Expansão do espectro de RMN ¹H x ¹H - COSY de Rb-2 na região de 4,2 – 1,0 x 4,5 – 0,7 ppm (CDCl₃, 200 MHz)

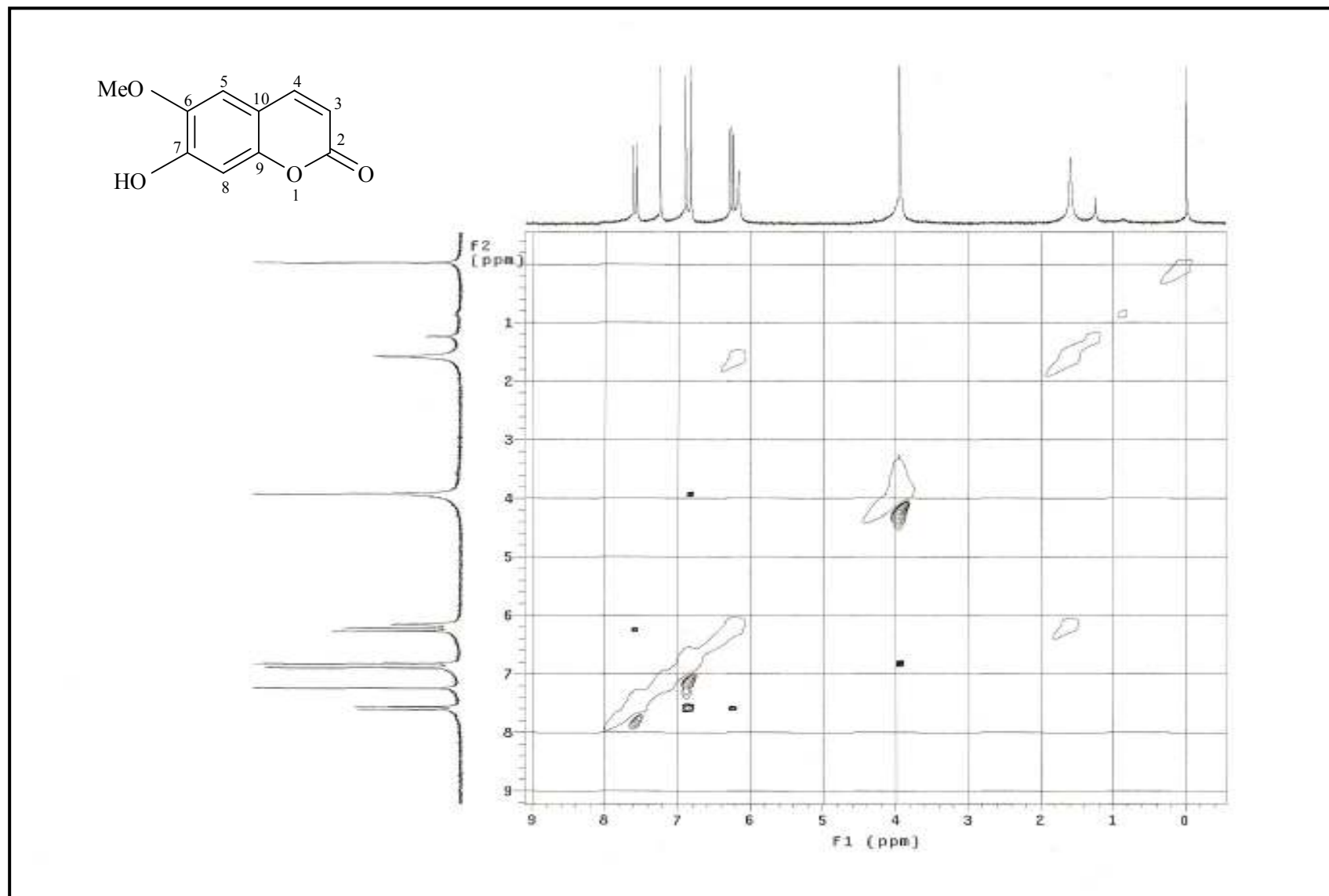


Figura 33. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - NOESY de Rb-2 (CDCl_3 , 200 MHz)

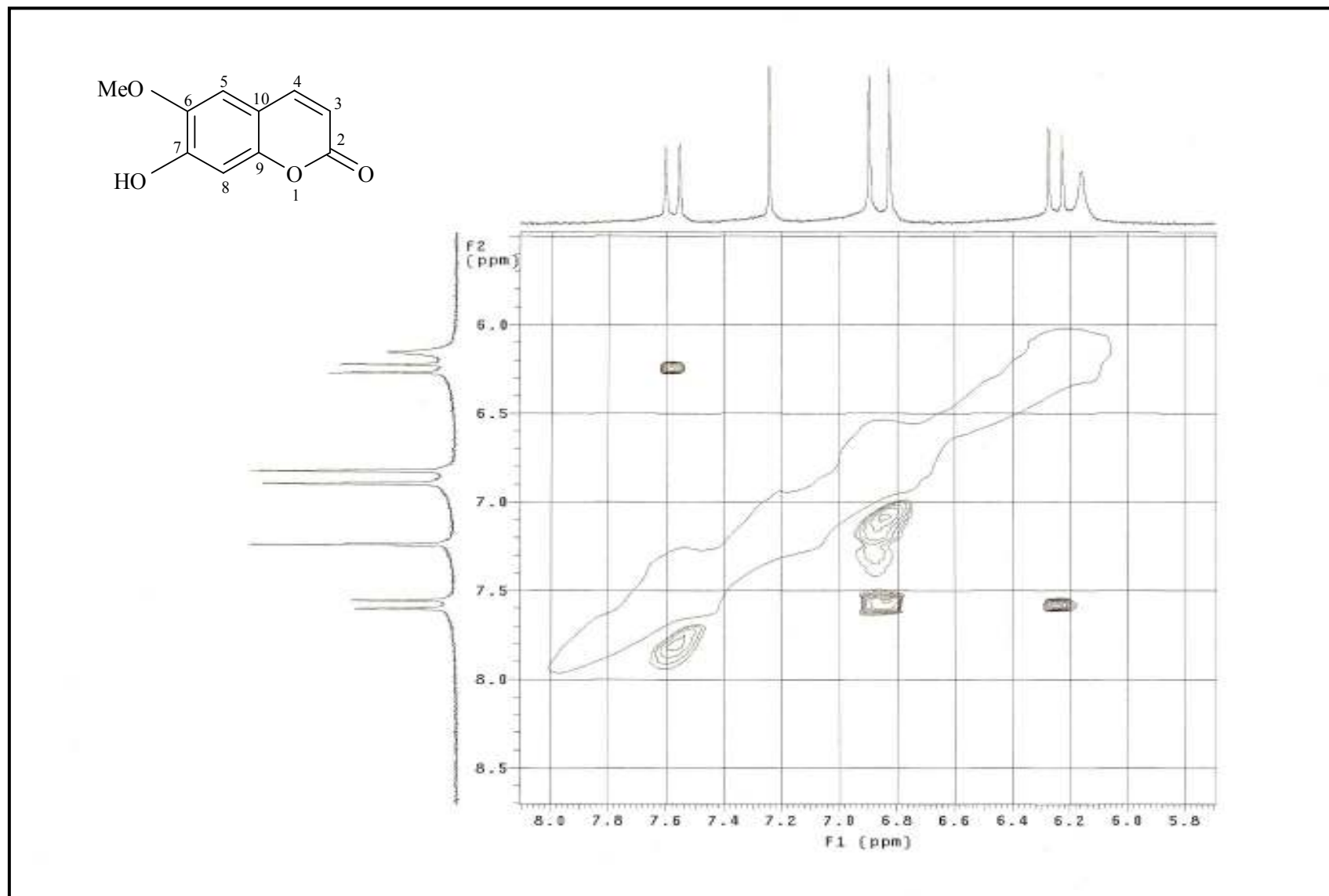


Figura 34. Expansão do espectro de RMN ¹H x ¹H - NOESY de Rb-2 na região de 8,0 – 5,8 x 8,5 – 5,5 ppm (CDCl₃, 200 MHz)

5.1.3 Determinação estrutural de Rb-3

A substância codificada como Rb-3 apresentou-se como pó branco, solúvel em clorofórmio, com rendimento de 0,03%.

O espectro de Rb-3 na região do infravermelho (IV) (Figura 35, p 103) revelou uma banda intensa em 3457 cm^{-1} , característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de hidroxila na molécula. Também foram observadas absorções em 1636 cm^{-1} , atribuída a C=C de alceno e em 2943 cm^{-1} que pode tratar-se de estiramento de C-H de grupos metínicos, metilênicos e/ou metilílicos. Uma banda em 1085 cm^{-1} foi atribuída ao grupamento C-O, e outra em 1689 cm^{-1} atribuiu-se a C=O (SILVERSTEIN et al, 1994).

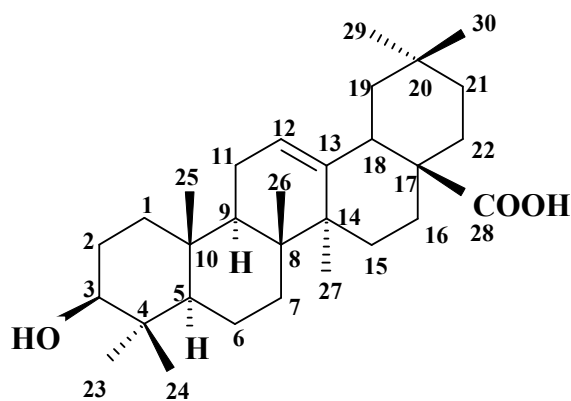
O espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), utilizando a técnica APT (Figuras 36 a 38, p. 104-106), revelou a presença de trinta sinais, referentes a um carbono carbonílico (δ_{C} 183,2), sete carbonos não hidrogenados (δ_{C} 38,7; δ_{C} 39,2; δ_{C} 37,0; δ_{C} 143,5; δ_{C} 46,4; δ_{C} 30,6; δ_{C} 41,5), cinco carbonos metínicos (δ_{C} 55,1; δ_{C} 47,5; δ_{C} 122,6; δ_{C} 79,0; δ_{C} 40,9), dez carbonos metilênicos (δ_{C} 38,3; δ_{C} 27,1; δ_{C} 18,2; δ_{C} 32,6; δ_{C} 22,9; δ_{C} 27,6; δ_{C} 23,3; δ_{C} 45,8; δ_{C} 33,7; δ_{C} 32,4) e sete carbonos metílicos (δ_{C} 28,0; δ_{C} 15,5; δ_{C} 15,2; δ_{C} 17,1; δ_{C} 25,9; δ_{C} 33,0; δ_{C} 23,5), sugerindo esqueleto de triterpeno pentacíclico para Rb-3.

Os sinais para carbono não hidrogenado em δ_{C} 143,5 e para carbono metínico em δ_{C} 122,6 (Figura 37, p.105) sugeriram a presença de uma dupla ligação na molécula, enquanto que o sinal em δ_{C} 79,0 foi atribuído a carbono oximetínico.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figuras 39 a 41, p. 107-109) mostrou um envelope de sinais simples na região compreendida entre 1,89 e 0,73 ppm, característico de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de triterpenos pentacíclicos, reforçando a inferência feita pelo espectro de RMN de ^{13}C . A presença de um simpleto largo δ_{H} 5,25 (1H) e de um duplete largo em δ_{H} 2,80 (dl, $J=8,6\text{ Hz}$) é compatível com os hidrogênios 12 e 18 de esqueleto de $^{12}\Delta$ oleanano, corroborando a proposta de dupla olefínica em Rb-3.

Os dados espectrais de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) de Rb-3 estão descritos na Tabela 7 (p. 101).

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de Rb-3 e sua comparação com modelo obtido na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) (Tabela 8, p. 102) permitiu identificar Rb-3 como sendo o ácido 3- β -hidroxiolean-12-en-28-óico, conhecido como ácido oleanólico, relatado pela primeira vez no gênero *Richardia*.



3-β-hidroxiolean-12-en-28-óico

Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Rb-3 em CDCl_3 (δ em ppm, J em Hz).

Rb-3(CDCl₃)		
	δ_{C}	δ_{H}
C		-
4	38,7	-
8	39,2	-
10	37,0	-
13	143,5	-
14	41,5	-
17	46,4	-
20	30,6	-
28	183,2	-
CH		
3	79,0	3,2 (dd, $J= 6,0$ e $9,4$ Hz)
5	55,1	-
9	47,5	-
12	122,6	5,2(sl)
18	40,9	2,8 (dl, $J=8,6$ Hz)
CH₂		
1	38,3	-
2	27,1	-
6	18,2	-
7	32,6	-
11	22,9	-
15	27,6	-
16	23,3	-
19	45,8	-
21	33,7	-
22	32,4	-
CH₃		
23	28,0	0,9 (s)
24	15,5	0,7 (s)
25	15,2	0,8 (sl)
26	17,1	0,7 (s)
27	25,9	1,1 (s)
29	33,0	0,8 (sl)
30	23,5	0,9 (s)

Tabela 8. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^{13}C de Rb-3 em CDCl_3 com valores encontrados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994).

	Rb-3 (CDCl_3)	Literatura (CDCl_3)
	δ_{C}	δ_{C}
C		
4	38,7	38,7
8	39,2	39,3
10	37,0	37,0
13	143,5	143,4
14	41,5	41,6
17	46,4	46,6
20	30,6	30,6
28	183,2	181,0
CH		
3	79,0	78,7
5	55,1	55,2
9	47,5	47,6
12	122,6	122,1
18	40,9	41,3
CH₂		
1	38,3	38,5
2	27,1	27,4
6	18,2	18,3
7	32,6	32,6
11	22,9	23,1
15	27,6	27,7
16	23,3	23,4
19	45,8	45,8
21	33,7	33,8
22	32,4	32,3
CH₃		
23	28,0	28,1
24	15,5	15,6
25	15,2	15,3
26	17,1	16,8
27	25,9	26,0
29	33,0	33,1
30	23,5	23,6

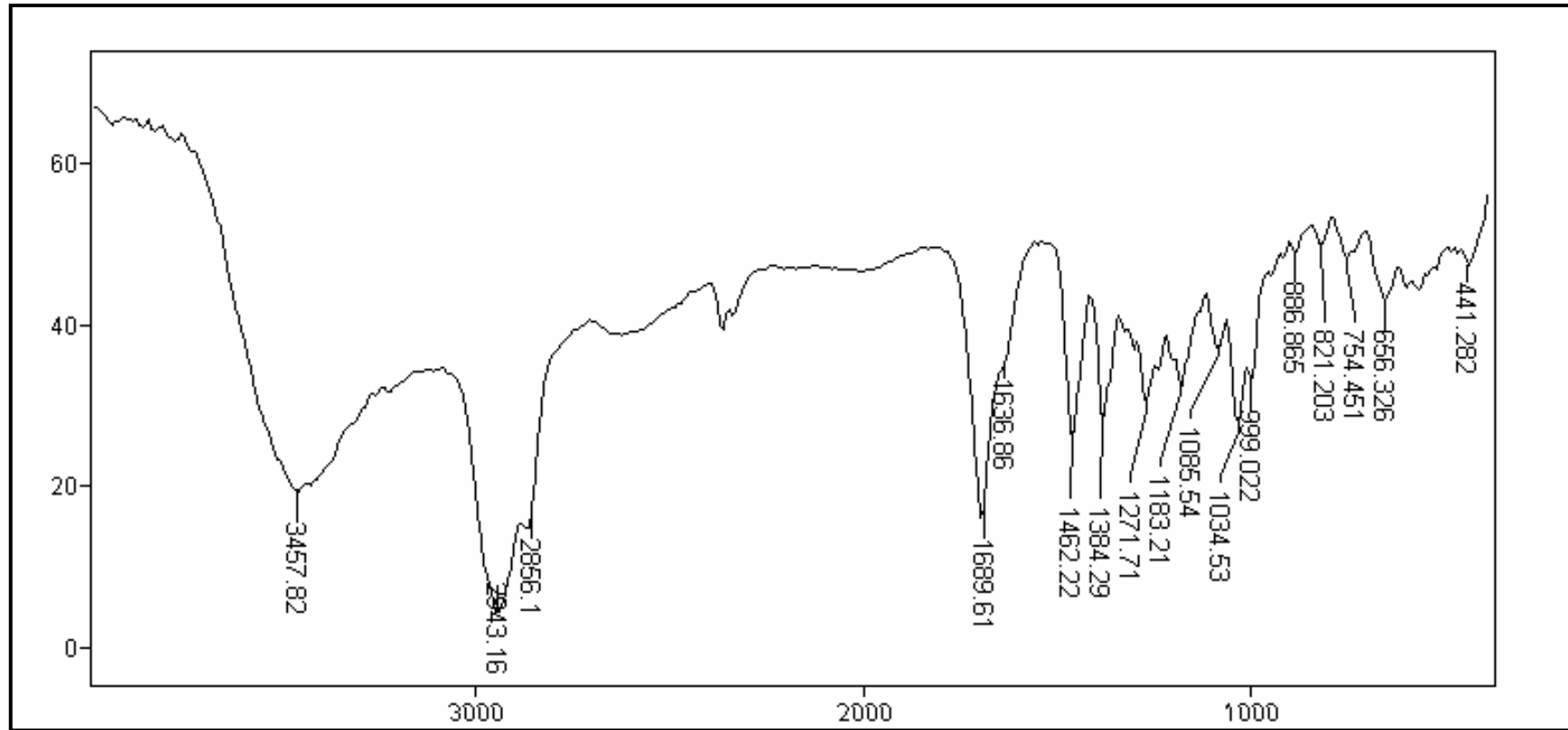


Figura 35. Espectro de IV Rb-3 em pastilhas de KBr

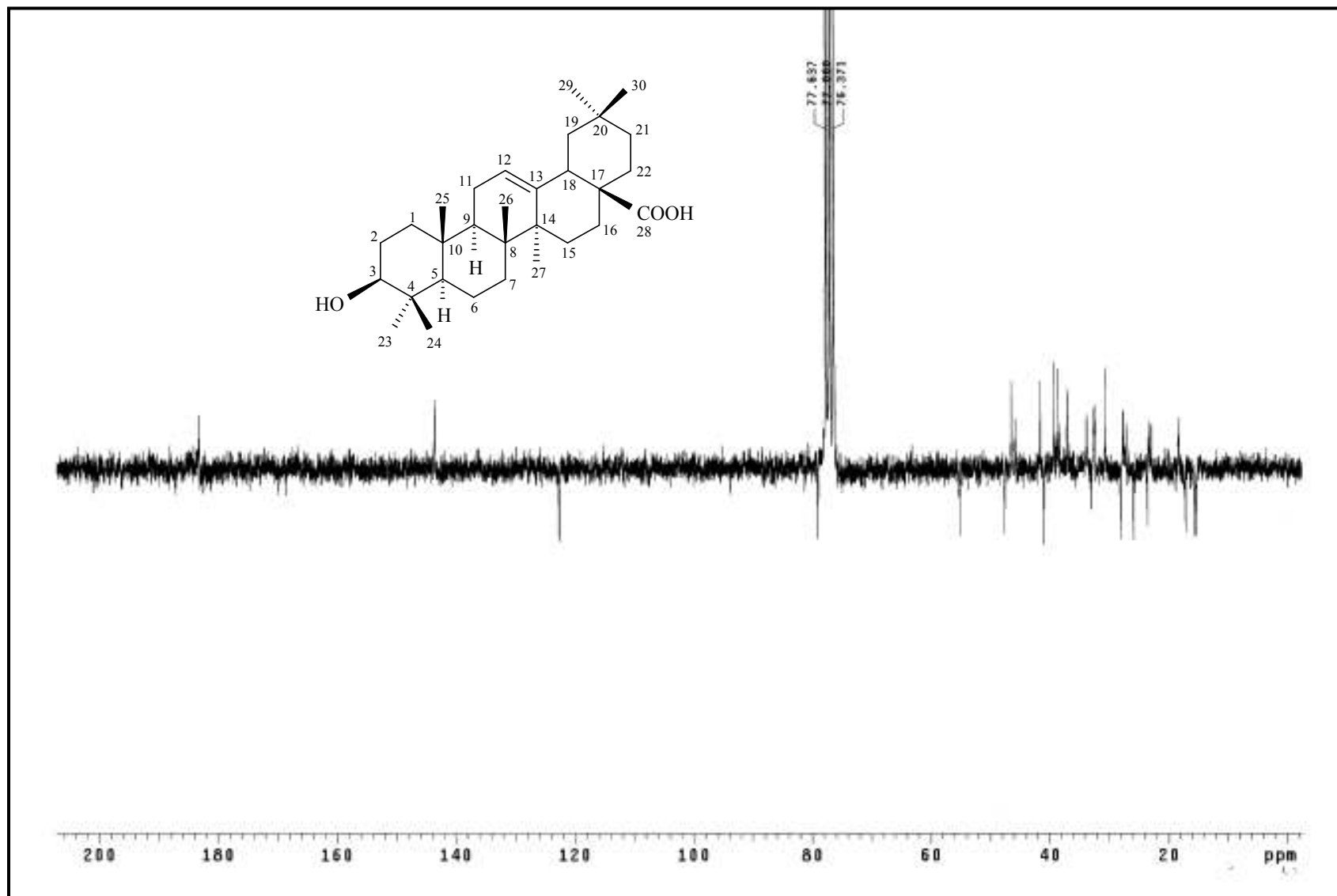


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-3 (CDCl_3 – 50 MHz)

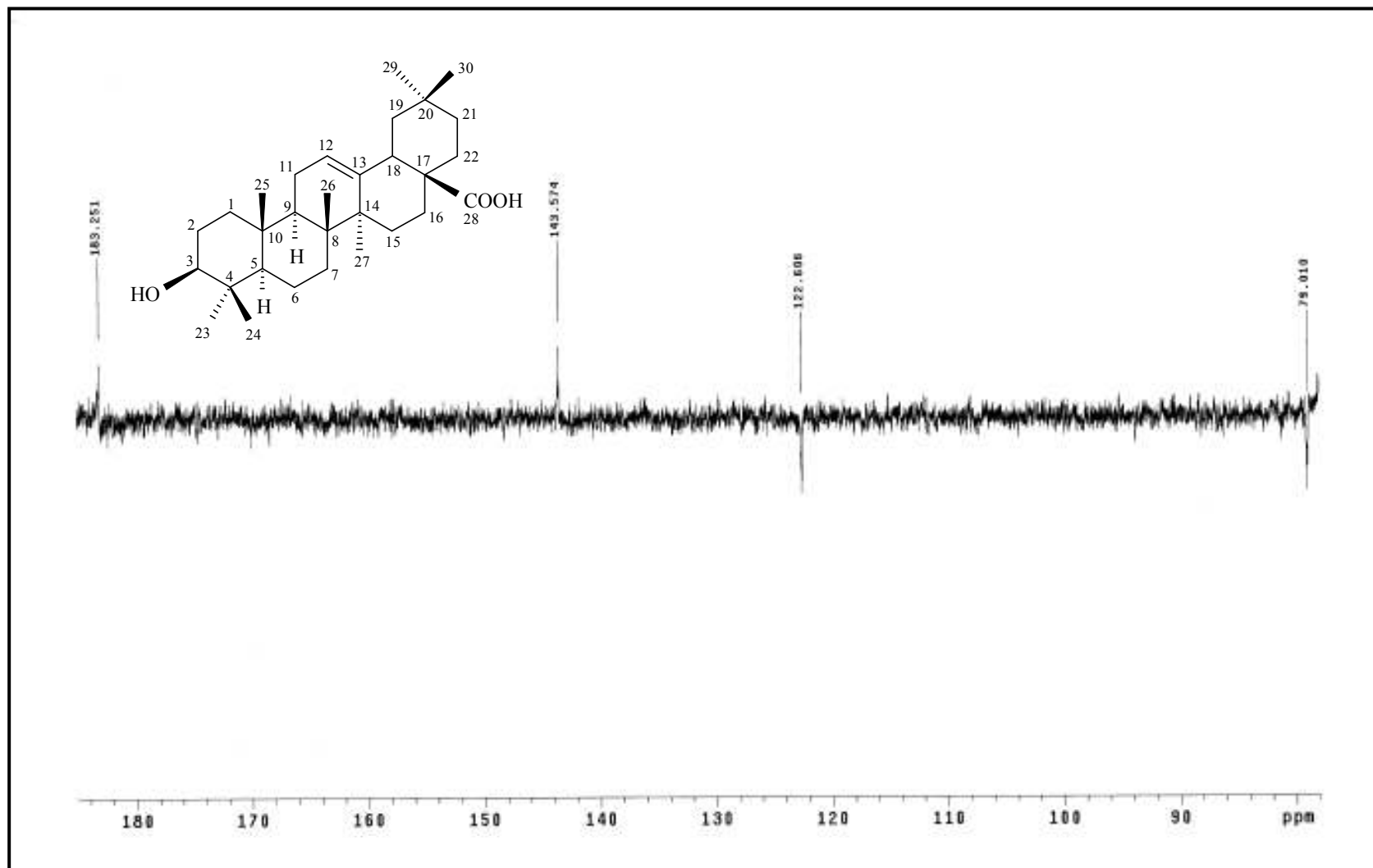


Figura 37. Expansão do espectro de RMN ¹³C-APT de Rb-3 na região de 184 – 78 ppm (CDCl₃ – 50 MHz)

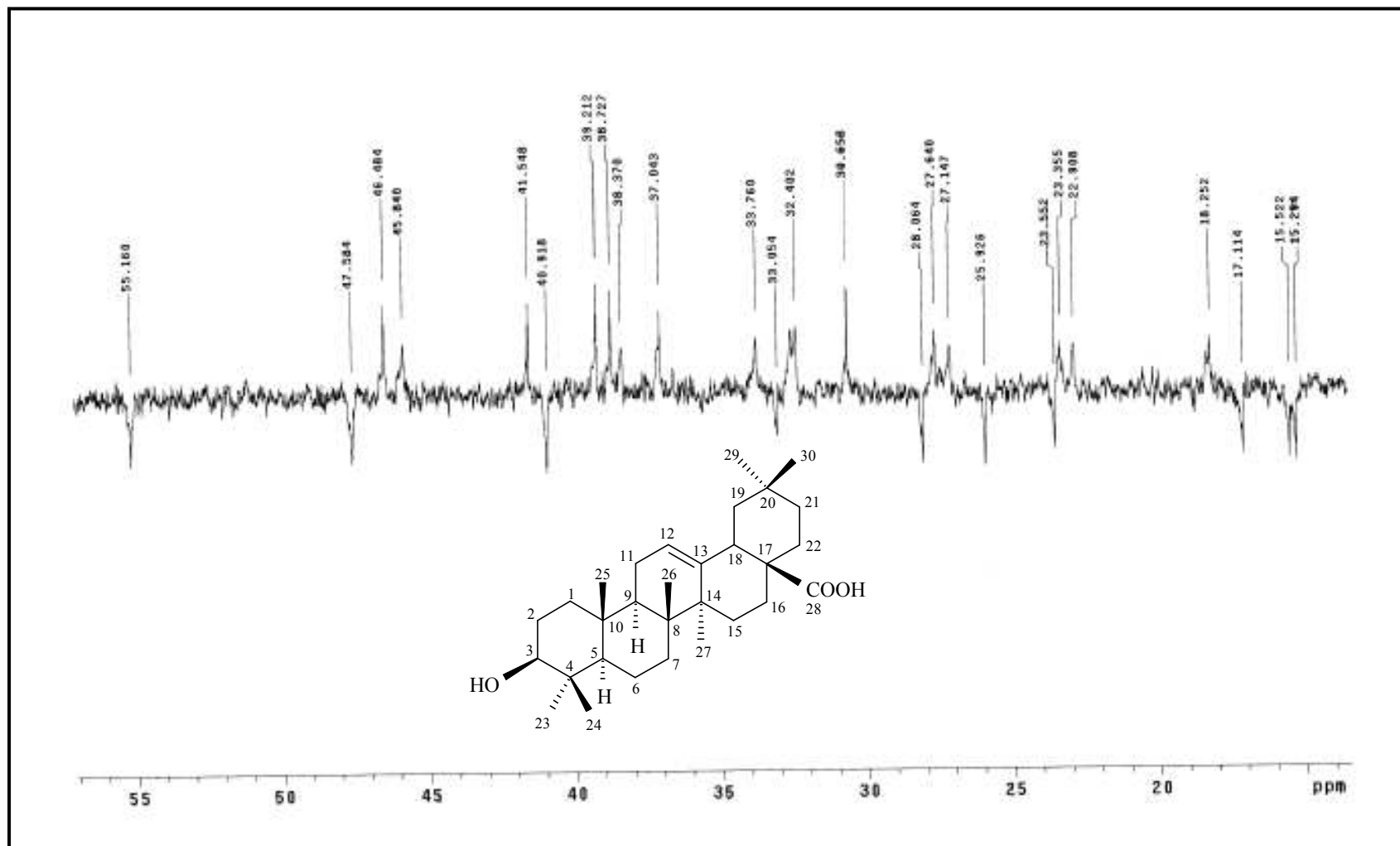


Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Rb-3 na região de 57 – 14 ppm (CDCl_3 – 50 MHz)

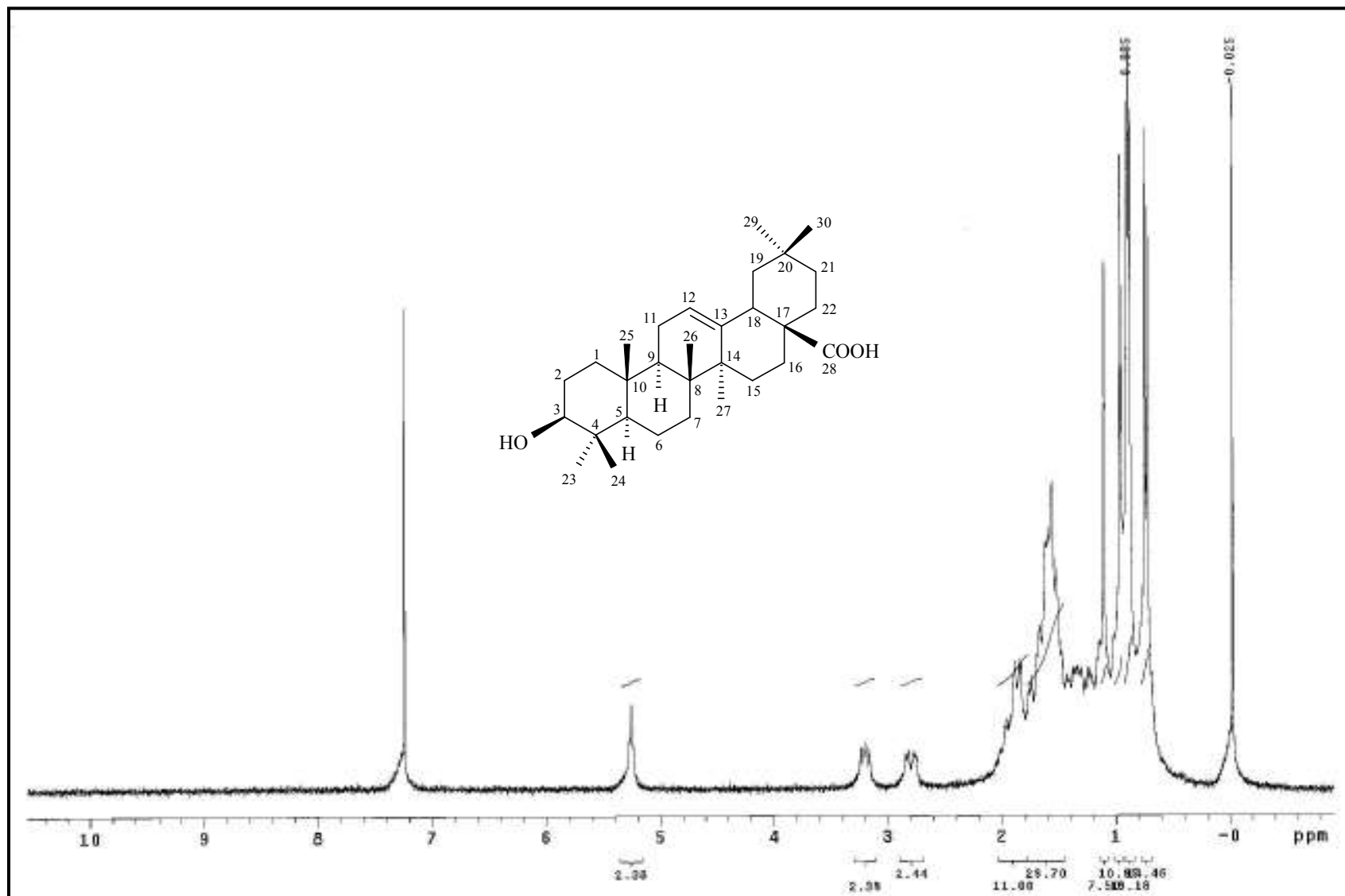


Figura 39. Espectro de RMN ^1H de Rb-3 (CDCl_3 – 200 MHz)

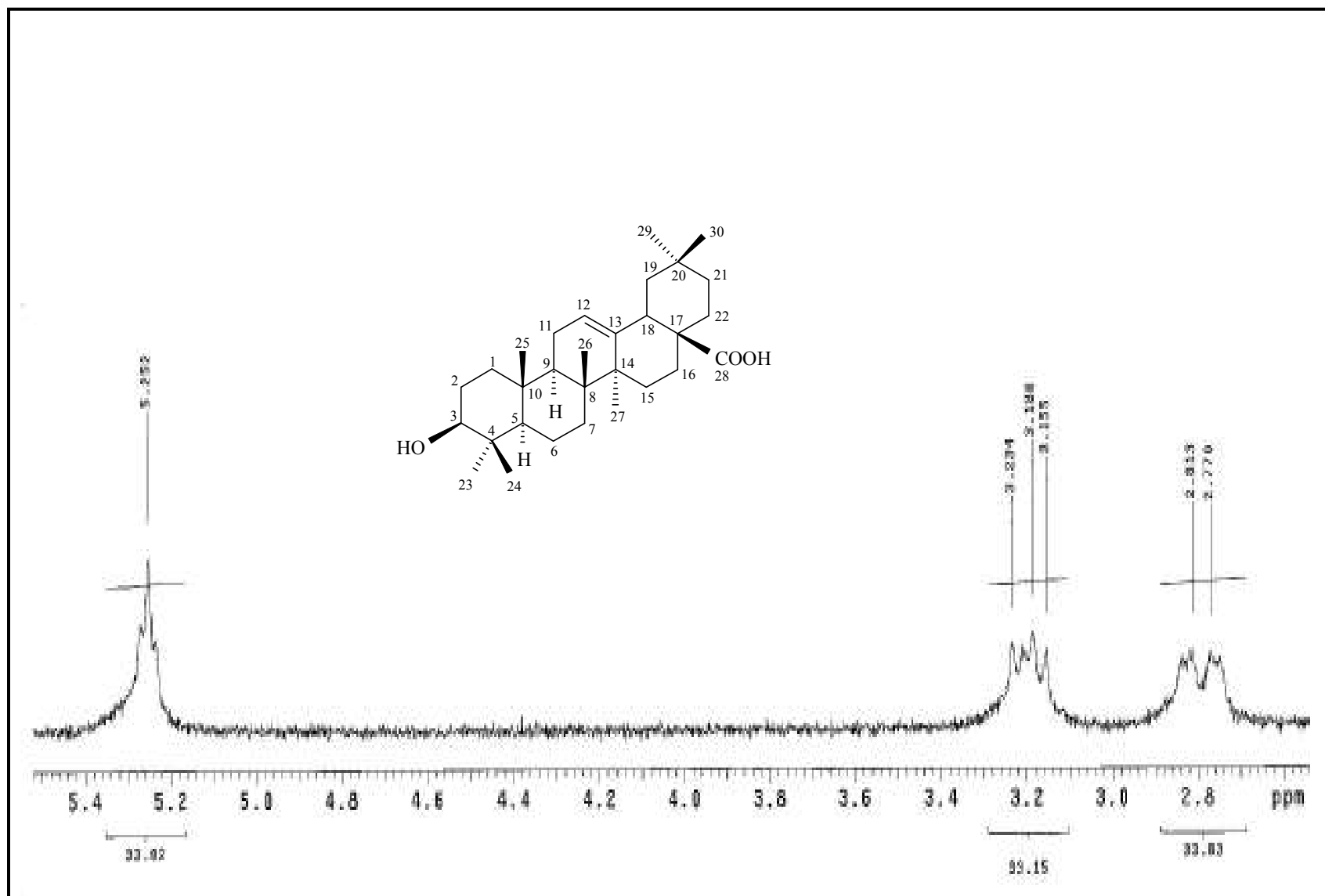


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-3 na região de 5,4 – 2,6 ppm (CDCl_3 – 200 MHz)

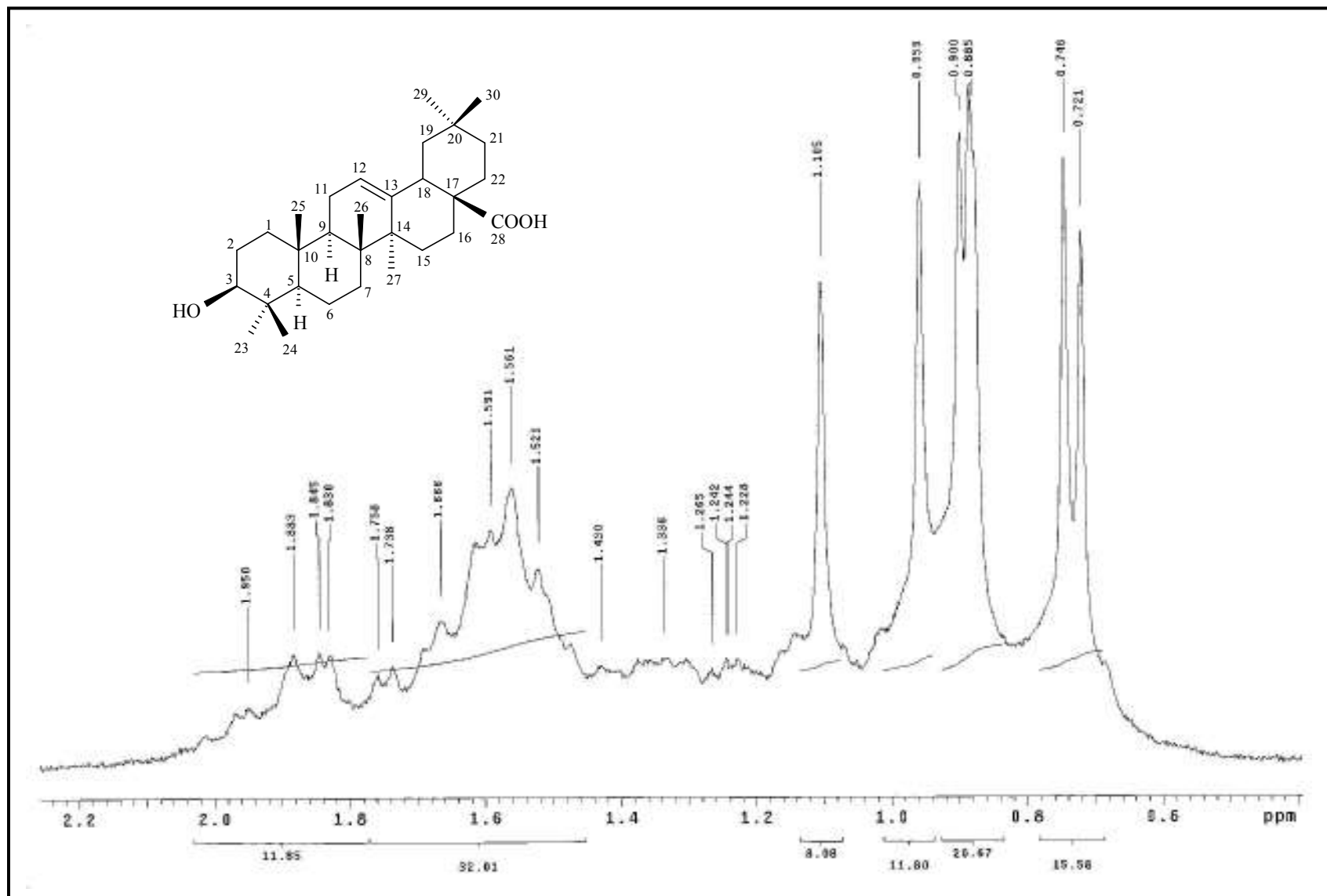


Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-3 na região de 2,2 – 0,4 ppm (CDCl_3 – 200 MHz)

5.1.4 Determinação estrutural de Rb-4

A substância codificada como Rb-4 apresentou-se como sólido amarelo, solúvel em metanol, com rendimento de 0,0011%.

O espectro de Rb-4 na região do IV (Figura 42, p. 115) revelou a presença de uma banda de absorção forte em 3404 cm^{-1} , característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de grupos hidroxila na molécula. Na região de 2919 cm^{-1} tem-se uma absorção que pode tratar-se de estiramento de CH de grupos metínicos, metilênicos e/ou metílicos. Entre 1601 e 1429 cm^{-1} verificam-se absorções que foram atribuídas a C=C de anel aromático. Em 1655 cm^{-1} observa-se um sinal característico de carbonila de cetona quelada (SILVA, 1986), podendo-se inferir a possível presença deste grupamento funcional na estrutura da substância em questão.

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figuras 43 a 45, p. 116-118) apresentou sinais em δ_{H} 8,03 (d, $J=2$ Hz), δ_{H} 7,60 (dd, $J=2$ Hz e 8,5 Hz) e δ_{H} 6,91 (d, $J=8,5$ Hz), atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5', o que pôde inferir a presença de um anel B trissubstituído de flavonóide, caracterizando, assim, em Rb-4 um sistema ABX com substituintes em 3' e 4'. A presença de uma metoxila pôde ser evidenciada pelo sinal característico em δ_{H} 3,97 (s, 3H).

O espectro de RMN de ^1H de Rb-4 apresentou ainda dois dupletos em δ_{H} 6,21 (1H, d, $J=2$ Hz) e δ_{H} 6,41 (1H, d, $J=2$ Hz) atribuídos, respectivamente a H-6 e H-8 do anel A de um flavonóide.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 46 a 49, p. 119-122) utilizando as técnicas de Broad Brand e DEPT-135 (125 MHz, CD_3OD), revelou a presença de 28 sinais espectrais. De acordo com os deslocamentos químicos observou-se que dos vinte e oito átomos de carbono, dois são referentes a carbonos metílicos (δ_{C} 57,10 e δ_{C} 18,11); um referente a carbono metilênico (δ_{C} 67,56); cinco referentes a carbonos metínicos aromáticos (δ_{C} 100,20; 95,07; 114,78; 116,13; 123,91); dez referentes a carbonos oximetínicos alifáticos (δ_{C} 105,12; 73,24; 75,66; 72,43; 75,16; 102,08; 70,18; 72,22; 73,98; 69,86) e os outros dez sinais são referentes a carbonos não hidrogenados (δ_{C} 158,99; 135,63; 179,60; 163,15; 166,51; 158,66; 105,75; 123,12; 148,55; 151,03).

O sinal em δ_{C} 179,60 inferiu-se à absorção de carbonila de uma flavona, corroborando com espectro de IV, que mostrou banda de absorção para carbonila quelada (1655 cm^{-1}). Os sinais em δ_{C} 158,99 e δ_{C} 135,63 foram atribuídos aos carbonos C-2 e C-3 de flavona,

respectivamente, o que fortaleceu a sugestão deste tipo de composto para Rb-4. Um sinal em δ_C 57,10, característico de metoxila de anel aromático, estericamente desimpedida, reforçou ainda mais proposta feita pelo espectro de RMN de 1H , da presença deste grupamento funcional na molécula em questão .

A natureza diglicosídica da substância foi revelada pelo número de sinais oximetínicos observados nos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C . As duas unidades glicosídicas foram identificadas como sendo uma glicose e uma ramnose, com base nos dados espectrais de RMN de 1H e de ^{13}C . Os dupletos em δ_H 5,23 (d, $J=7,8$ Hz) e δ_H 4,54 (d, $J=1,1$ Hz) sugeriram tratar-se dos hidrogênios anoméricos das moléculas de glicose e ramnose, respectivamente. Esta sugestão pôde ser reforçada pelo espectro de RMN ^{13}C que mostrou absorções em δ_C 105,12 atribuída ao carbono anomérico da unidade de glicose e em δ_C 18,11 e δ_C 102,08, referentes à metila e ao carbono anomérico da unidade de ramnose, respectivamente.

A caracterização e a localização da unidade diglicosídica (rutinosídeo) em C-3 foi fundamentada nas seguintes observações: a) o deslocamento químico de C-2 (δ_C 158,99) e C-3 (δ_C 135,63), revelado pelo espectro de RMN ^{13}C , sugeriu a presença de glicosídeo em C-3, uma vez que na molécula livre de unidade osídica C-2 encontra-se mais protegido, enquanto que C-3 apresenta-se em campo mais baixo; b) a correlação a longa distância entre o hidrogênio anomérico da glicose H-1'' (d, δ_H 5,23, $J=7,8$ Hz) e o carbono C-3 (δ_C 135,63; $^3J_{CH}$), observada no espectro HMBC (Figura 50, p. 123 e Figura 55, p. 128), permitiu definir a ligação 3-O glicosídeo; c) o deslocamento químico do carbono metilênico da glicose (δ_C 67,56) permitiu a localização da unidade de ramnose neste átomo de carbono, já que o sinal de grupo hidroximetilênico livre de uma unidade glicosídica aparece em torno de δ_C 62,12 (PIZZOLATTI et al., 2003); d) o espectro de HMBC (Figura 50, p. 123 e Figura 58, p. 131) revelou a correlação do hidrogênio anomérico da ramnose H-1''' (d, δ_H 4,54, $J=1,1$) com o carbono metilênico da glicose C-6''.

O espectro de correlação heteronuclear (HMBC - $^nJ_{CH}$, $n=2$ e $n=3$) (Figura 51, p. 124) permitiu correlacionar a duas ligações ($^2J_{CH}$) o hidrogênio δ_H 6,21 com os carbonos C-7 (δ_C 166,51) e C-5 (δ_C 163,15), sugerindo a presença de hidroxilas ligadas a estes carbonos e definindo o deslocamento químico de H-6 em δ_H 6,21. Também foi possível evidenciar a correlação, a duas ligações ($^2J_{CH}$), H-8 (δ_H 6,41) com o carbono C-7 (δ_C 166,51), confirmando assim, a inexistência de substituintes em C-8. Ainda pelo espectro de HMBC, o hidrogênio H-6 (δ_H 6,21) correlacionou-se a três ligações com os carbonos δ_C 95,07 e δ_C 105,75, atribuídos,

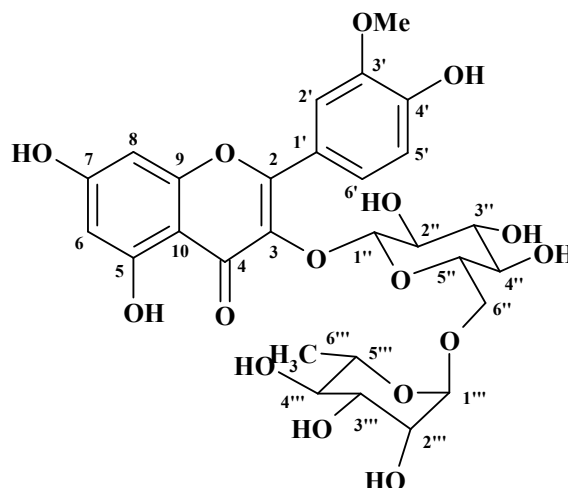
respectivamente a C-8 e C-10. Estas interações permitiram confirmar as atribuições dos deslocamentos químicos do anel A.

Através das correlações, a três ligações, entre os hidrogênios H-2' (δ_H 8,03) e H-6' (δ_H 7,60) e o carbono δ_C 151,03, e a duas ligações entre H-5' (δ_H 6,91) e este mesmo carbono, foi possível atribuir inequivocamente o deslocamento químico de C-4' em δ_C 151,03. A atribuição de C-3' em δ_C 148,55 foi reforçada pelas interações entre H-2' (δ_H 8,03) a duas ligações com δ_C 148,55 e de H-5' (δ_C 6,91) a três ligações com este mesmo carbono. Estas evidências permitiram corrigir os deslocamentos químicos de C-3' e C-4' atribuídos pela literatura.

Observou-se também as interações a duas ligações de H-2' (δ_H 8,03) com C-3' (δ_C 148,55) e a três ligações com os carbonos δ_C 158,99, δ_C 151,03 e δ_C 123,91, atribuídos, respectivamente a C-2, C-4' e C-6', confirmando assim, a ausência de substituinte em C-2' (δ_C 114,78).

A correlação de H-5' (δ_H 6,91) a duas ligações com C-4' (δ_C 151,03) e a três ligações com C-1' (δ_C 123,12) e com C-3' (δ_C 148,55), foi determinante para inferir a inexistência de substituinte em C-5' (δ_C 116,13). Através da correlação entre os hidrogênios metoxílicos (s, δ_H 3,97) e δ_C 148,55, a três ligações ($^3J_{CH}$), foi possível atribuir a presença de metoxila em C-3'. Observou-se ainda a correlação a três ligações de H-6' (δ_H 7,60) com C-2 (δ_C 158,99) e com C-2' (δ_C 114,78). Desta forma atribuiu-se os deslocamentos do anel B, confirmando a hipótese de que os carbonos C-6', C-2', e C-5' não apresentam substituintes. Estas correlações estão apresentadas na Tabela 9 (p. 113).

A análise dos dados de RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais de Rb-4 e sua comparação com valores encontrados na literatura (RASTRELLI, et al, 1995) (Tabela 10, p. 114) permitiu identificar Rb-4 como sendo o 3'-metoxi-3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-5,7,4'-trihidroxi-flavona, conhecida como Isorametina-3-O-rutinosídeo, sendo este o primeiro relato no gênero *Richardia*.



3'-metoxi-3-O-[α -L-ranopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosil]-5,7,4'-trihidroxi flavona

Tabela 9. Dados espectrais de RMN de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 Hz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMBC) de Rb-4 registrados em CD_3OD .

Rb-4 (CD_3OD)			^1H x ^{13}C - HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	158,9	-		
3	135,6	-		
4	179,6	-		
5	163,1	-		
7	166,5	-		
9	158,6	-		
10	105,7	-		
1'	123,1	-		
3'	148,5	-		
4'	151,0	-		
CH				
6	100,2	6,2 (d, $J=2\text{Hz}$)	C-5/C-7	C-8/C-10
8	95,1	6,4 (d, $J=2\text{Hz}$)	C-7/C-9	C-6/C10
2'	114,7	8,0 (d, $J=2\text{Hz}$)	C-3'	C-2/C-4'/C-6'
5'	116,1	6,9 (d, $J=8,5\text{ Hz}$)	C-4'	C-1'/C-3'
6'	123,9	7,6 (dd, $J=2$ e $8,5\text{ Hz}$)		C-2/C-2'/C-4'
1''	105,1	5,2 (d, $J=7,8\text{ Hz}$)		C-3
2''	73,2	3,4 (m)	C-3''	
3''	75,6	3,8 (dd, $J=8$ e $9,6\text{Hz}$)	C-2''	C-1''/C-5''
4''	72,4	3,5 (m)		C-2''
5''	75,1	3,6 (t)	C-6''	C-1''
1'''	102,1	4,5 (d, $J=1,1\text{ Hz}$)		C-6'''/C-3'''/C-5'''
2'''	70,2	3,4-3,5 (m)	C-1'''	C-4'''
3'''	72,2	3,7 (dd, $J=5,5$ e $10,1\text{ Hz}$)	C-2'''	C-1'''
4'''	73,9	3,2 (t)	C-3'''/C-5'''	
5'''	69,8	3,7 (m)		
CH₂				
6''	67,5	3,3 (dd, $J=1,65$ e $J=3,2\text{ Hz}$)		
CH₃				
MeO-3'	57,1	3,9 (s)		C-3'
6'''	18,1	1,1 (d, $J=6,25$)	C-5'''	C-4'''

Tabela 10. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Rb-4 com valores encontrados na literatura (RASTRELLI et al., 1995) (δ em ppm e J em Hz).

Rb-4 (CD_3OD)			Literatura (CD_3OD)	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	158,9	-	158,8	-
3	135,6	-	135,5	-
4	179,6	-	179,3	-
5	163,1	-	162,9	-
7	166,5	-	166,2	-
9	158,6	-	158,8	-
10	105,7	-	105,6	-
1'	123,1	-	124,0	-
3'	148,5	-	150,8	-
4'	151,0	-	148,3	-
CH				
6	100,2	6,2 (d, $J = 2$ Hz)	100,0	6,17 (d, $J=2\text{Hz}$)
8	95,1	6,4 (d, $J = 2$ Hz)	95,0	6,35 (d, $J=2\text{Hz}$)
2'	114,7	8,0 (d, $J = 2$ Hz)	114,6	7,93 (d, $J=2\text{Hz}$)
5'	116,1	6,9 (d, $J = 8,5$ Hz)	116,1	6,88 (d, $J=8,5$ Hz)
6'	123,9	7,6 (dd, $J=2$ e $8,5$ Hz)	124,0	7,59 (dd, $J=2$ e $8,5$ Hz)
1''	105,1	5,2 (d, $J=7,8$ Hz)	104,5	5,22 (d, $J=7,5$ Hz)
2''	73,2	3,4 (m)	75,9	-
3''	75,6	3,8 (dd, $J = 8$ e $9,6$ Hz)	78,2	-
4''	72,4	3,5 (m)	71,6	-
5''	75,1	3,6 (t)	77,3	-
1'''	102,1	4,5 (d, $J = 1,1$ Hz)	102,4	4,51(d, $J=1,5$ Hz)
2'''	70,2	3,4-3,5 (m)	72,1	-
3'''	72,2	3,7 (dd, $J = 5,5$ e $10,1$ Hz)	72,3	-
4'''	73,9	3,2 (t)	73,9	-
5'''	69,8	3,7 (m)	69,7	-
CH₂				
6''	67,5	3,3 (dd, $J = 1,65$ e $J = 3,2$ Hz)	68,5	-
CH₃				
MeO-3'	57,1	3,9 (s)	56,8	3,93 (s)
6'''	18,1	1,1 (d, $J = 6,25$ Hz)	17,9	1,09 (d, $J=6$ Hz)

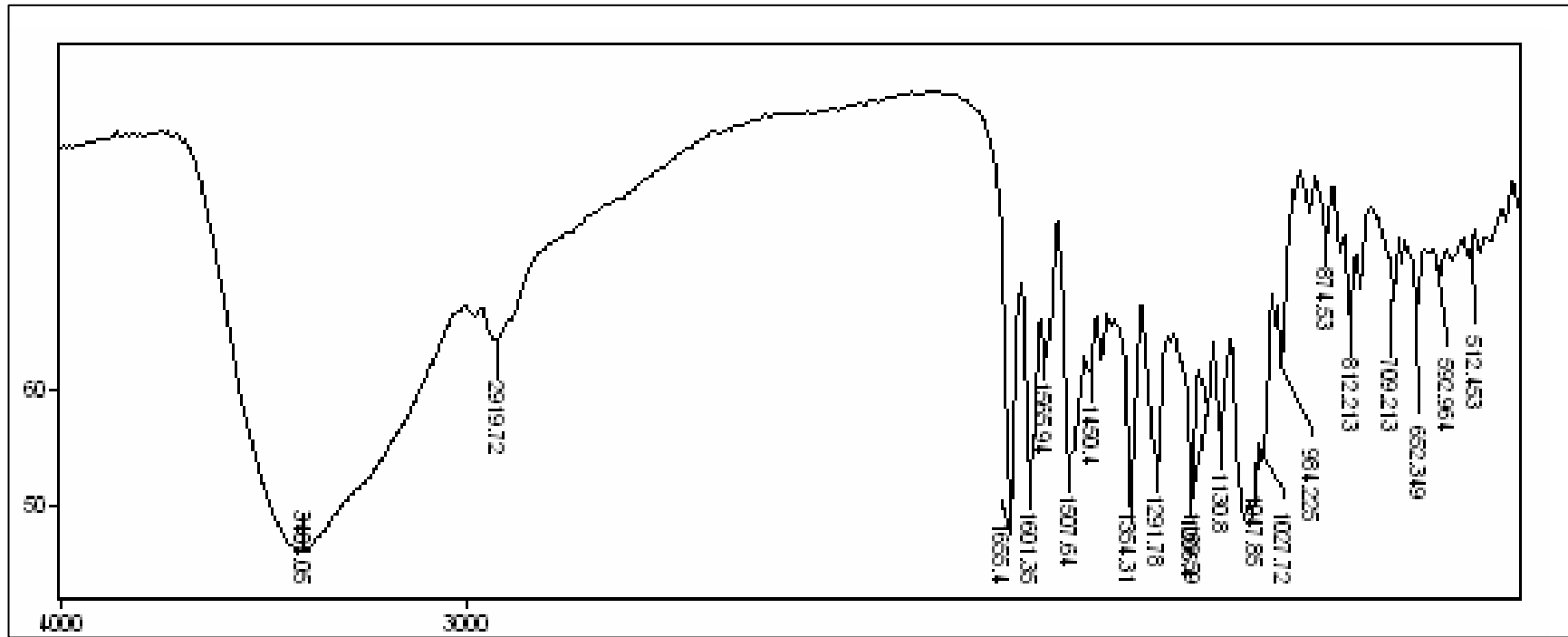


Figura 42. Espectro de IV Rb-4 em pastilha de KBr

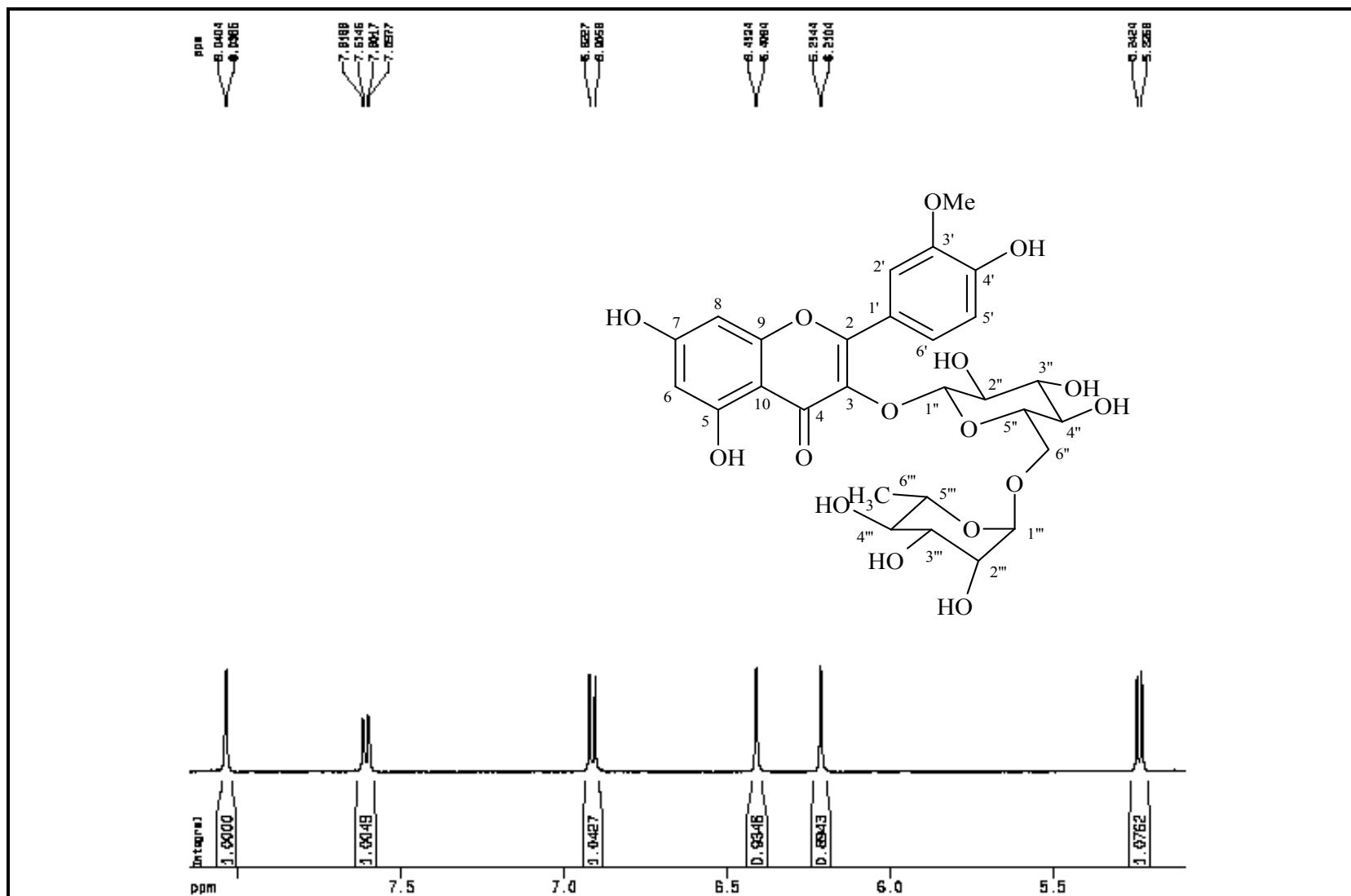


Figura 44. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-4 na região de 8,0 – 5,2 ppm (CD_3OD – 500 MHz)

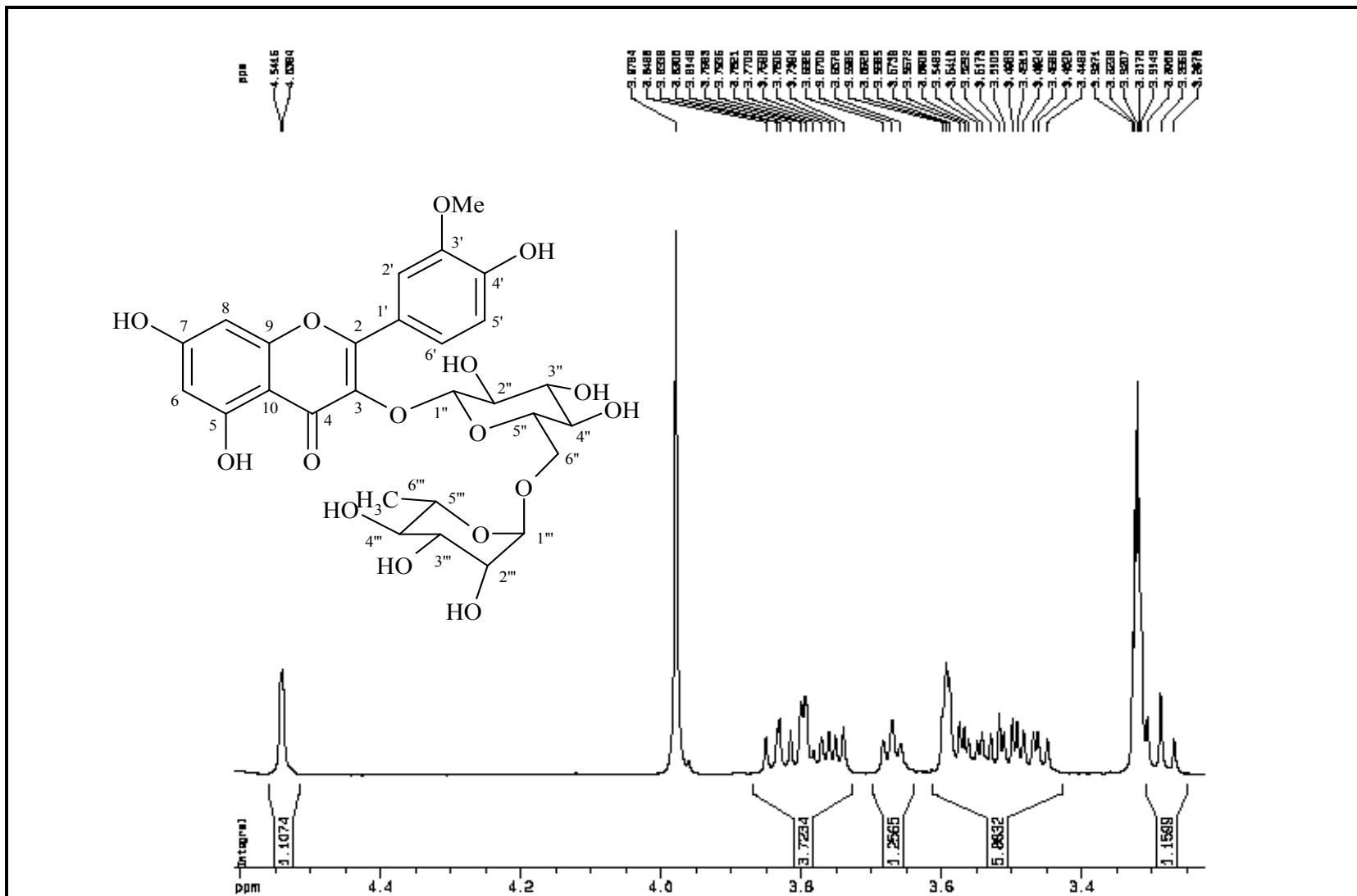


Figura 45. Expansão do espectro de RMN ^1H de Rb-4 na região de 4,6 – 3,2 ppm (CD_3OD – 500 MHz)

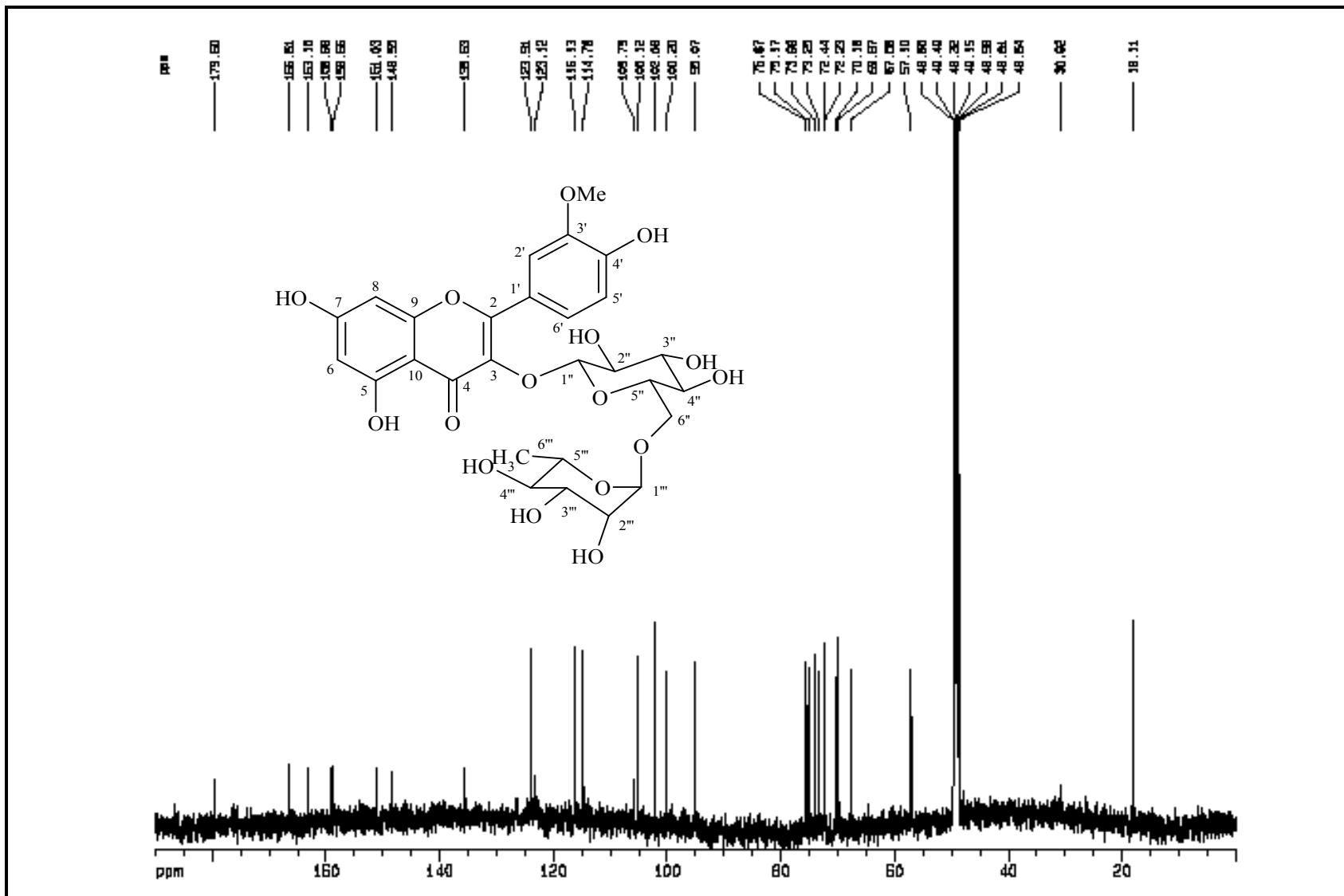


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C -BB de Rb-4 (CD_3OD – 125 MHz)

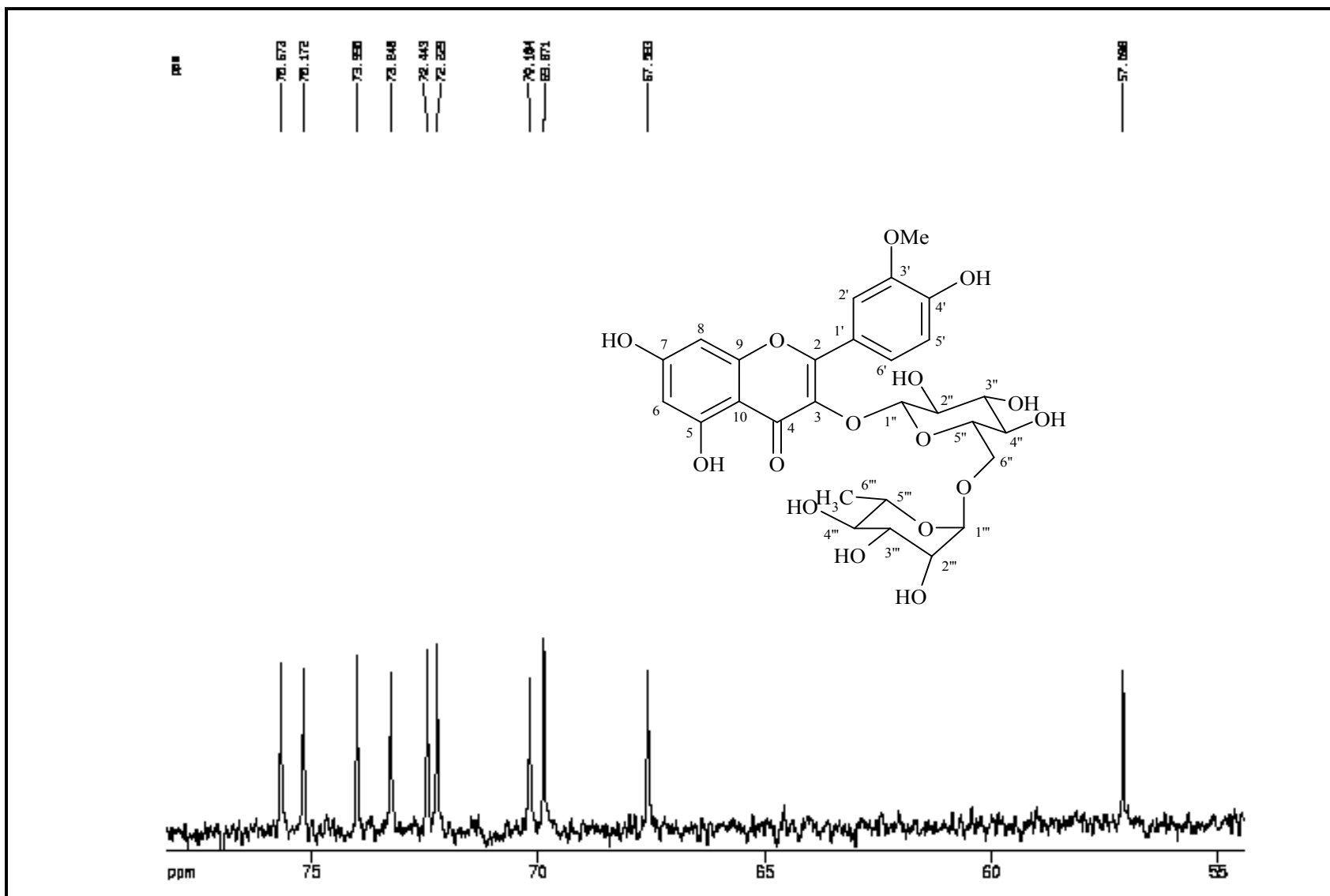


Figura 47. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB de Rb-4 na região de 75 – 55 ppm (CD_3OD – 125 MHz)

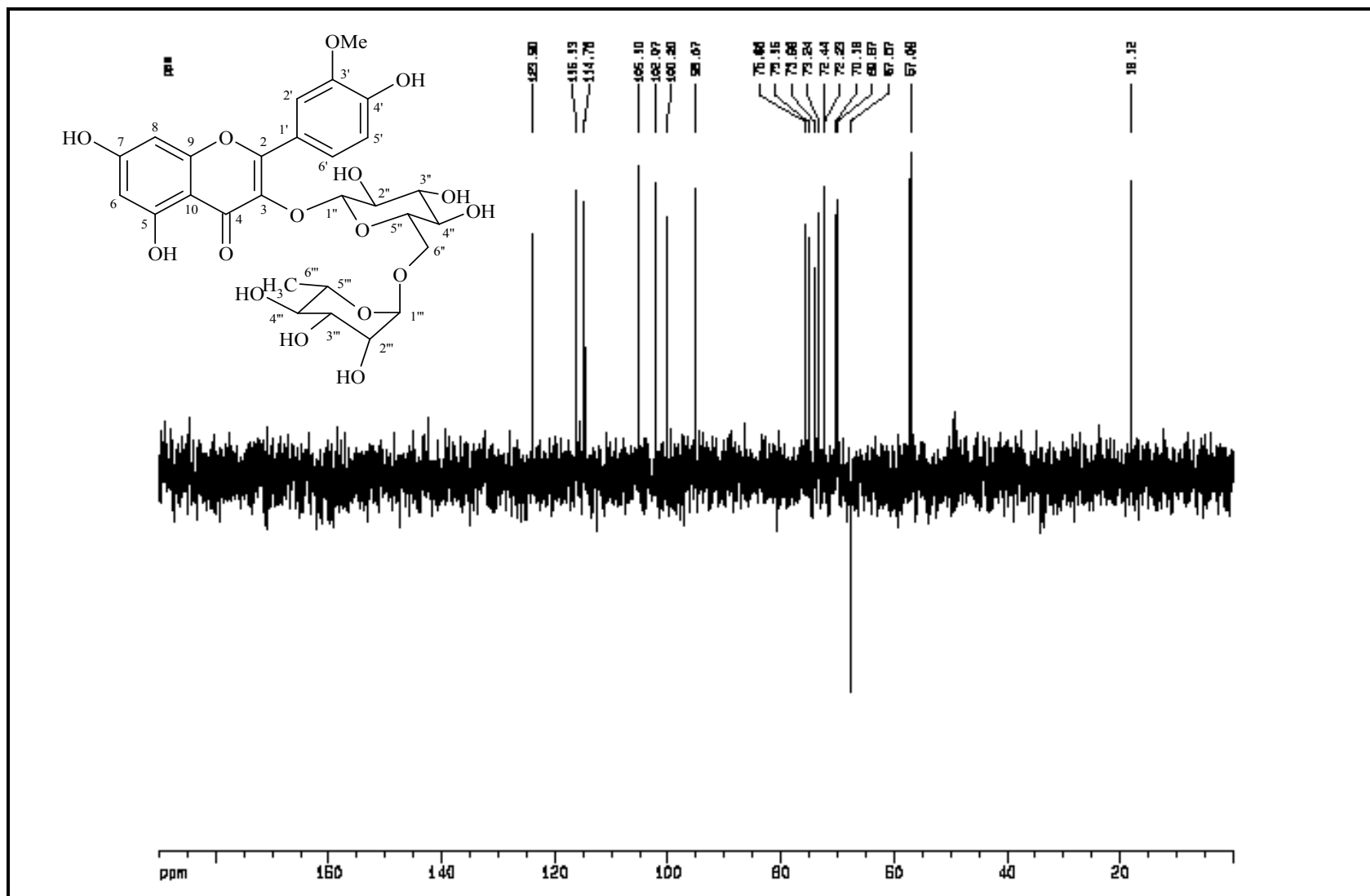


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de Rb-4 (CD_3OD – 125 MHz)

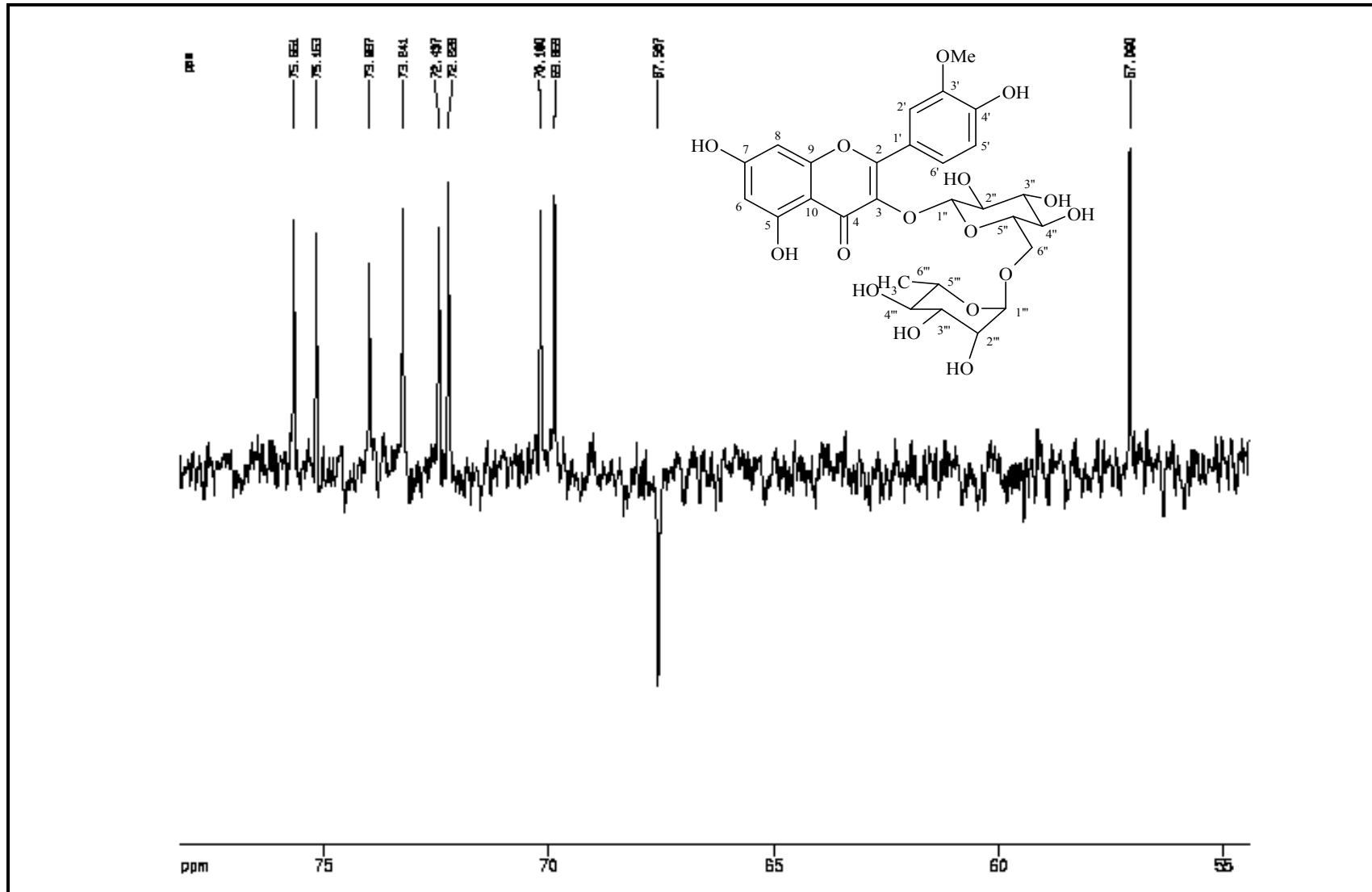


Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de Rb-4 na região de 75 – 55 ppm (CD_3OD – 125 MHz)

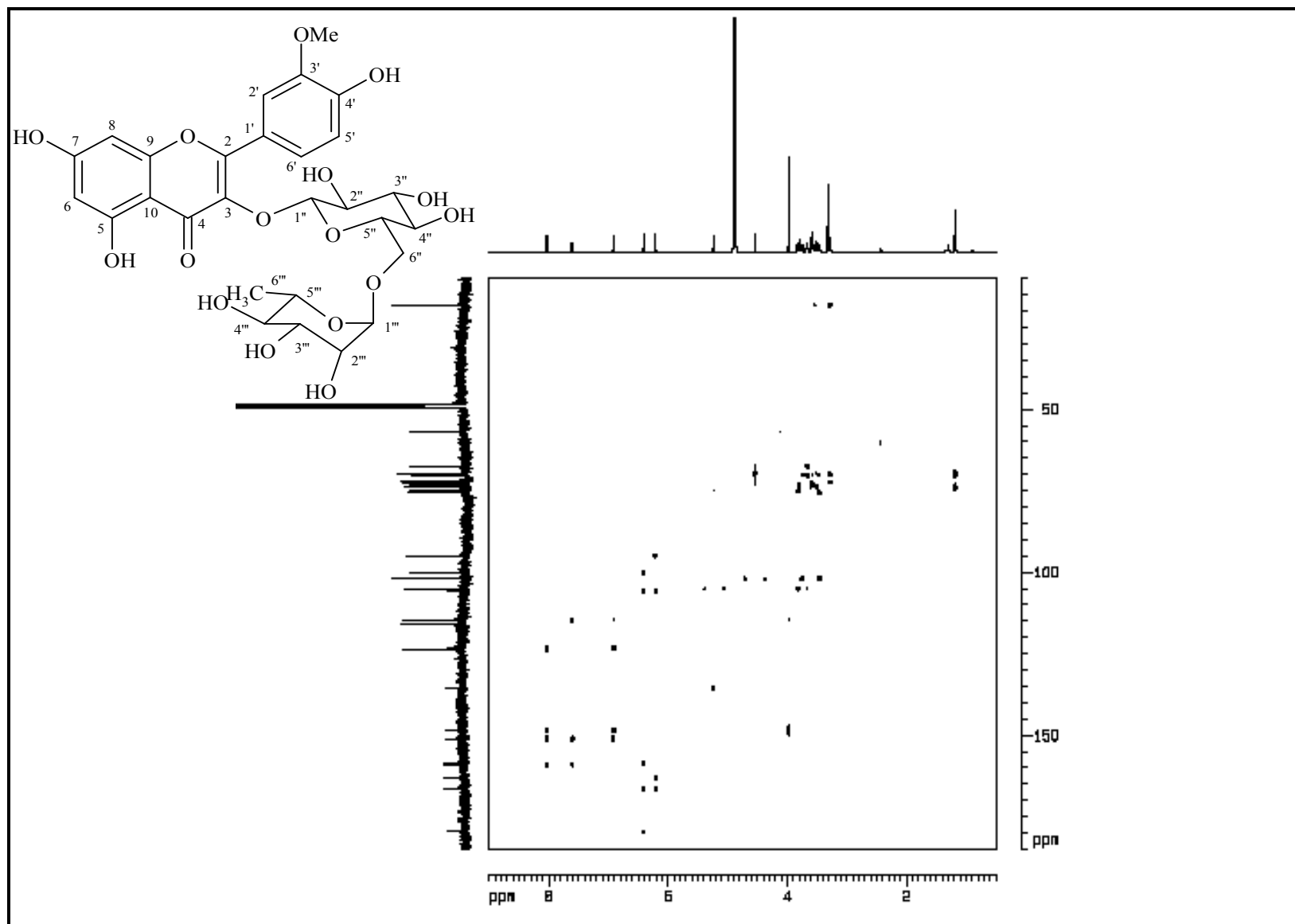


Figura 50. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC de Rb-4 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

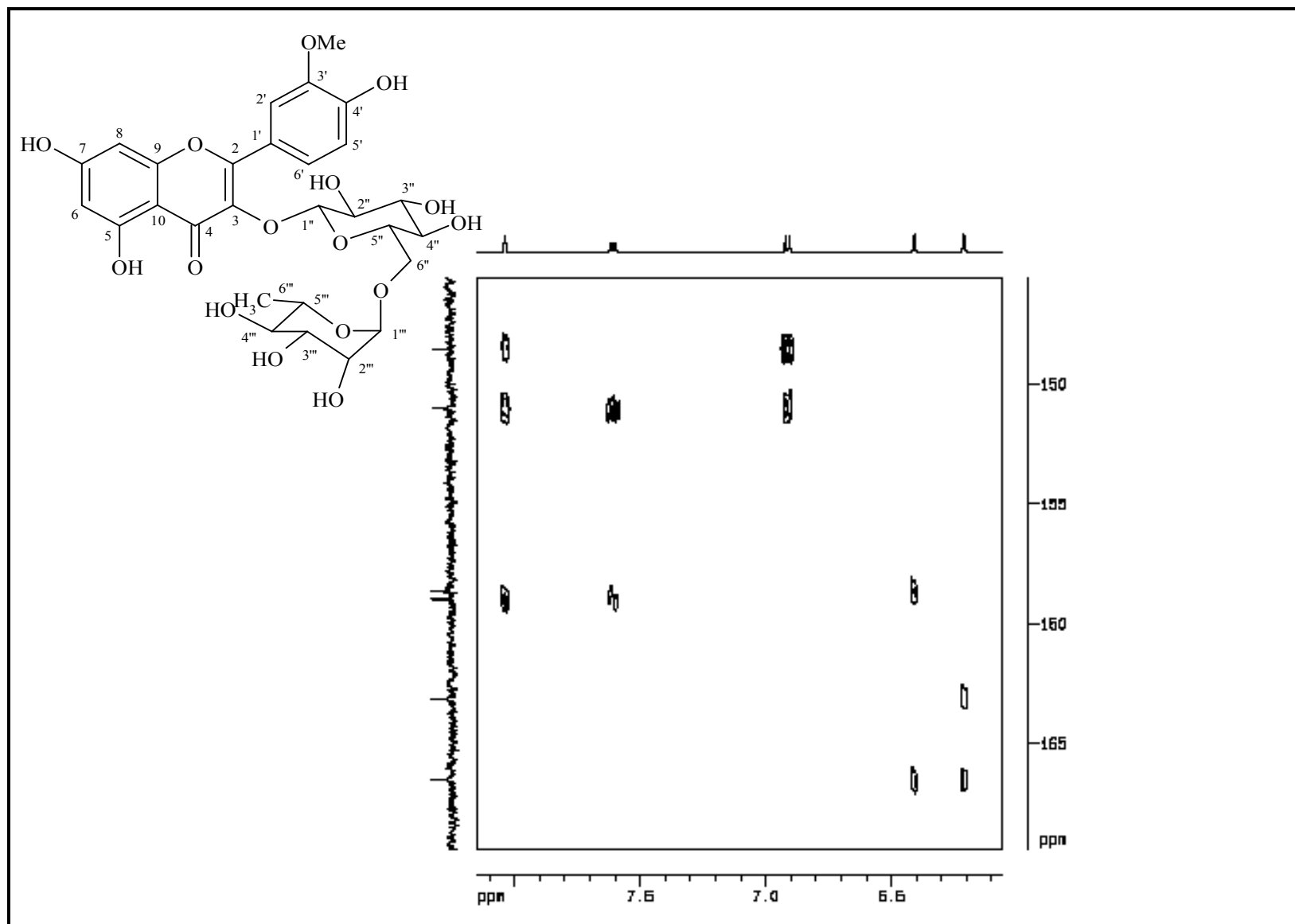


Figura 51. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 8,1 – 6,1 ppm x 170 – 145 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

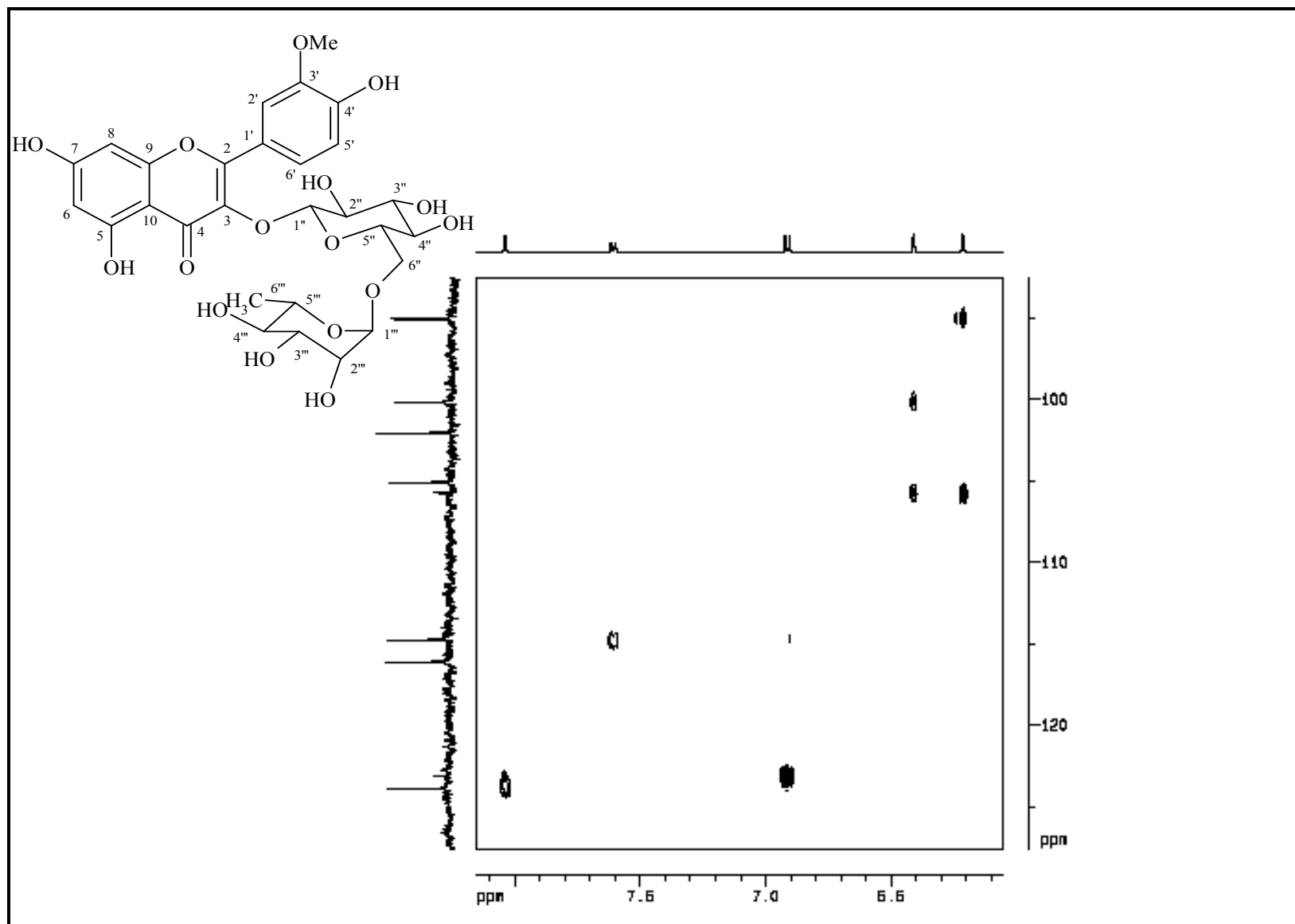


Figura 52. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 8,1 – 6,1 ppm x 125 – 95 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

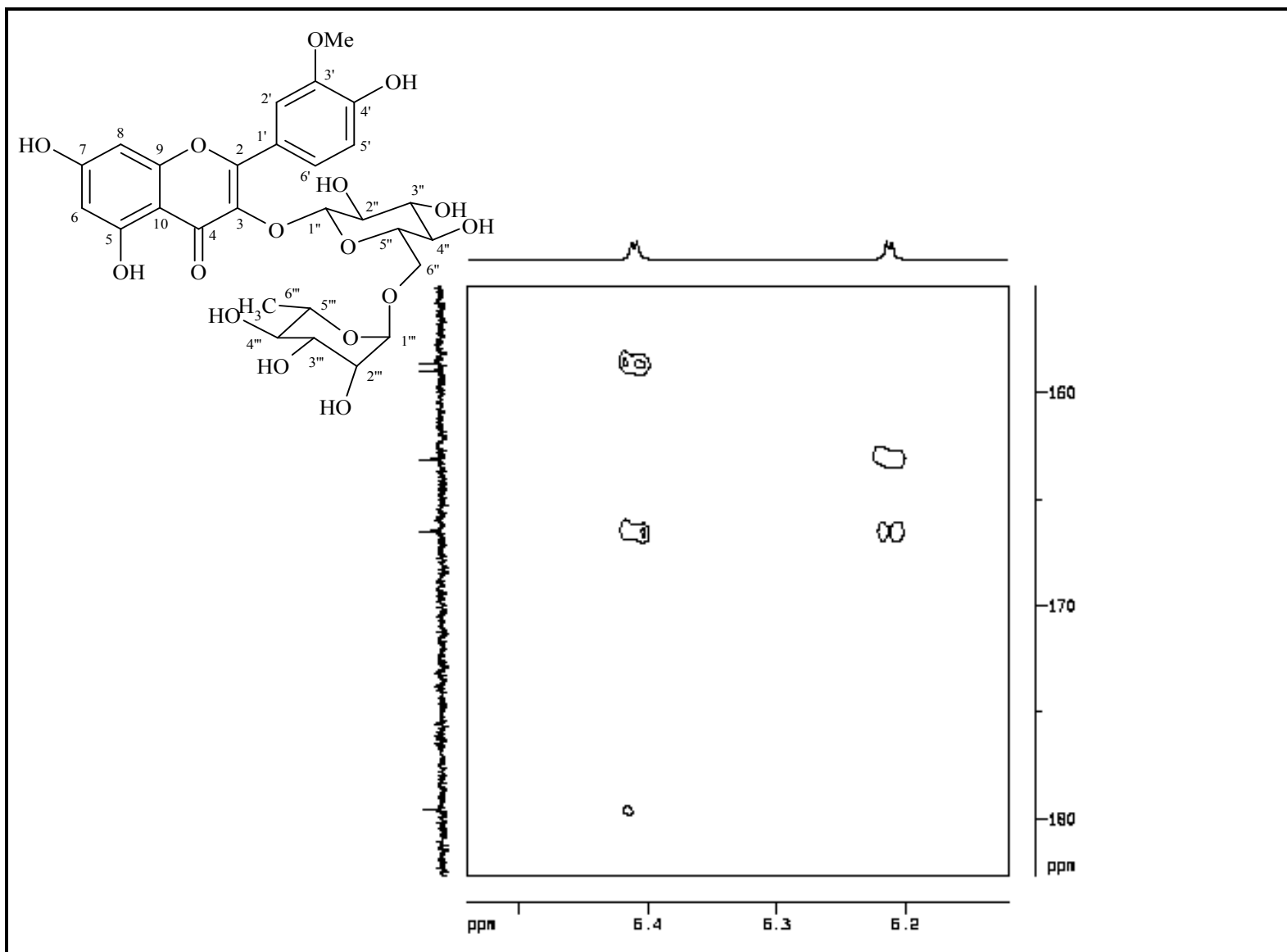


Figura 53. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 6,5 – 6,2 ppm x 180 – 155 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

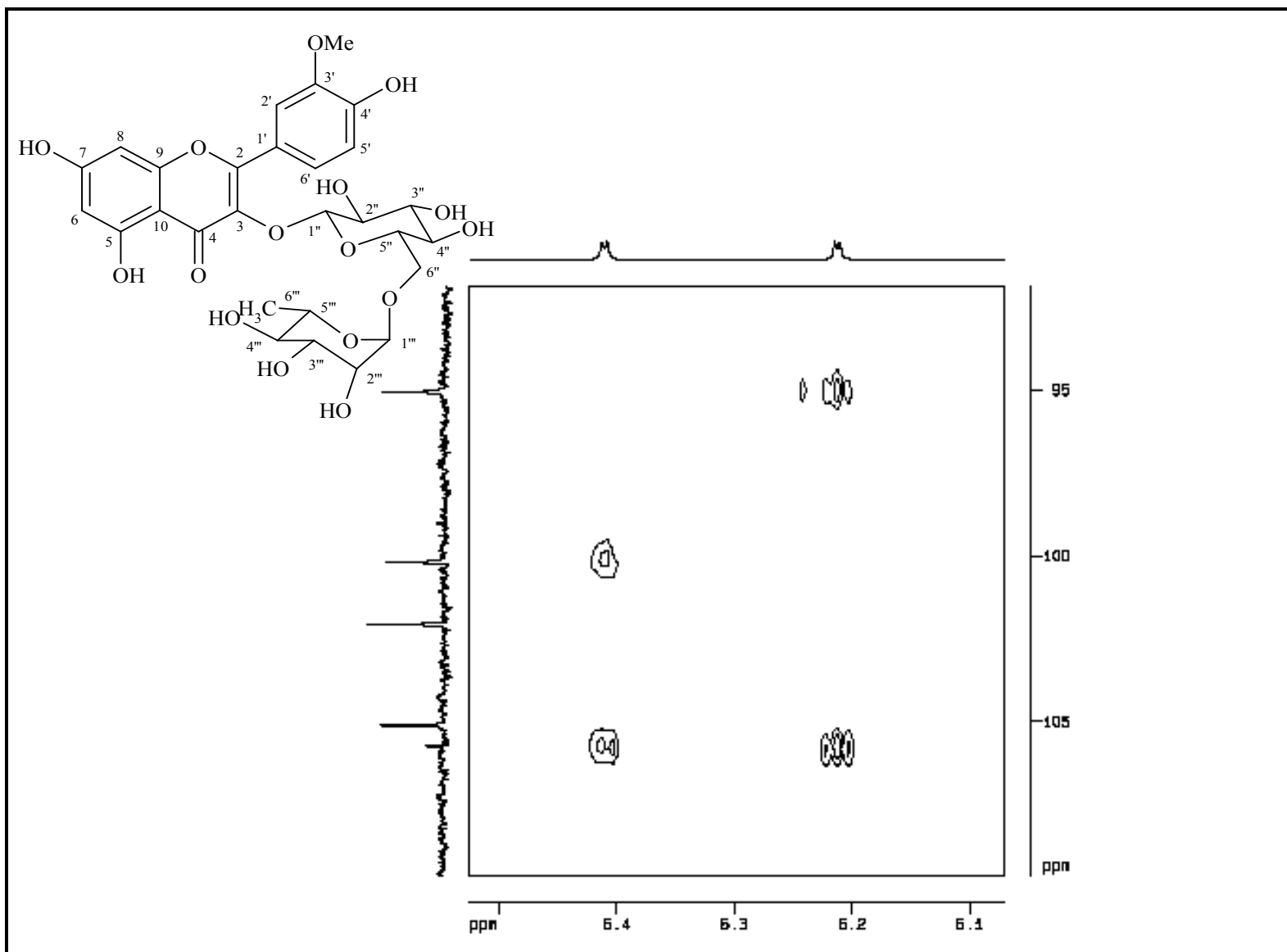


Figura 54. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 6,5 – 6,1 ppm x 110 – 95 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

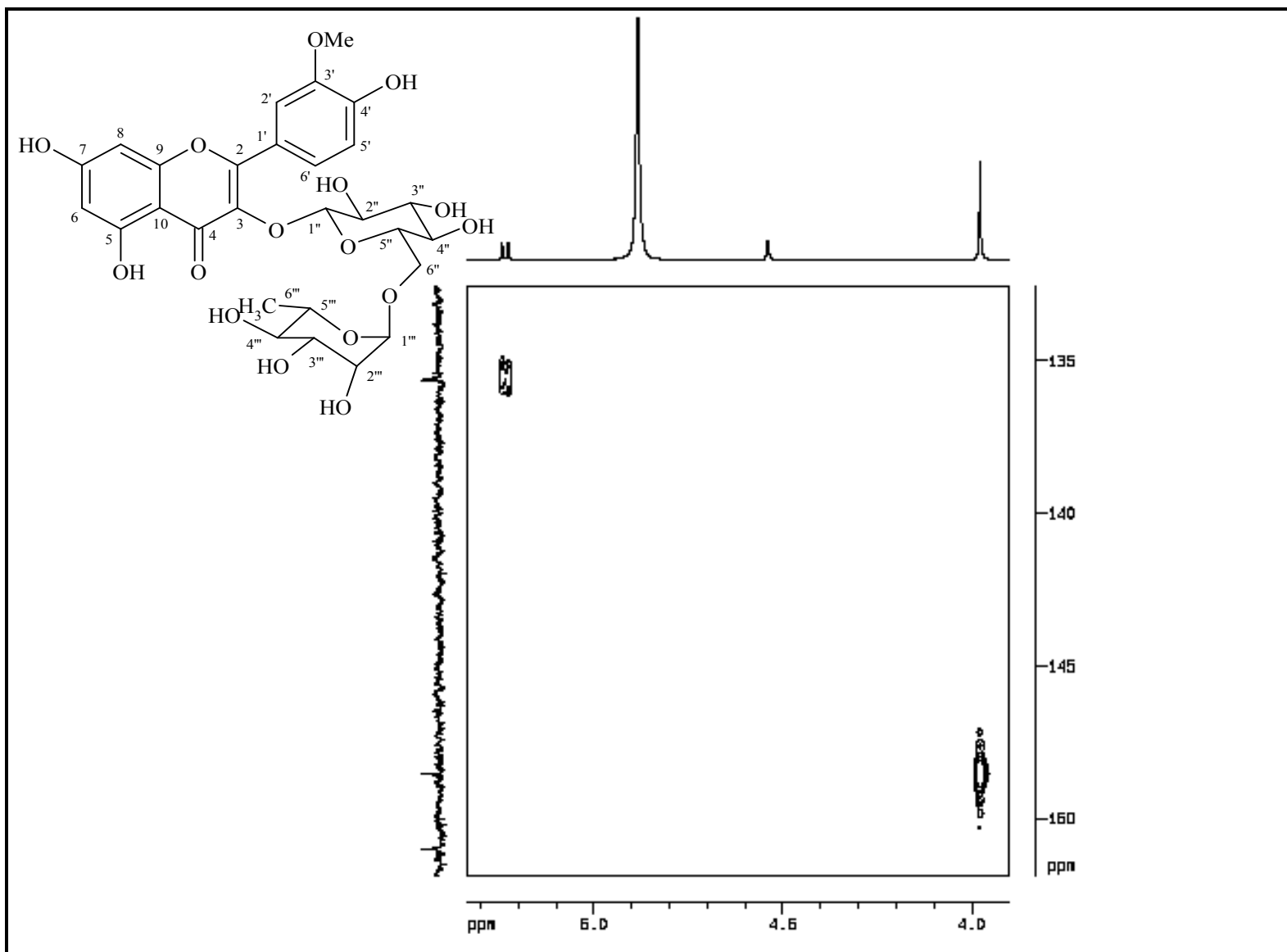


Figura 55. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 5,3 – 4,0 ppm x 150 – 135 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

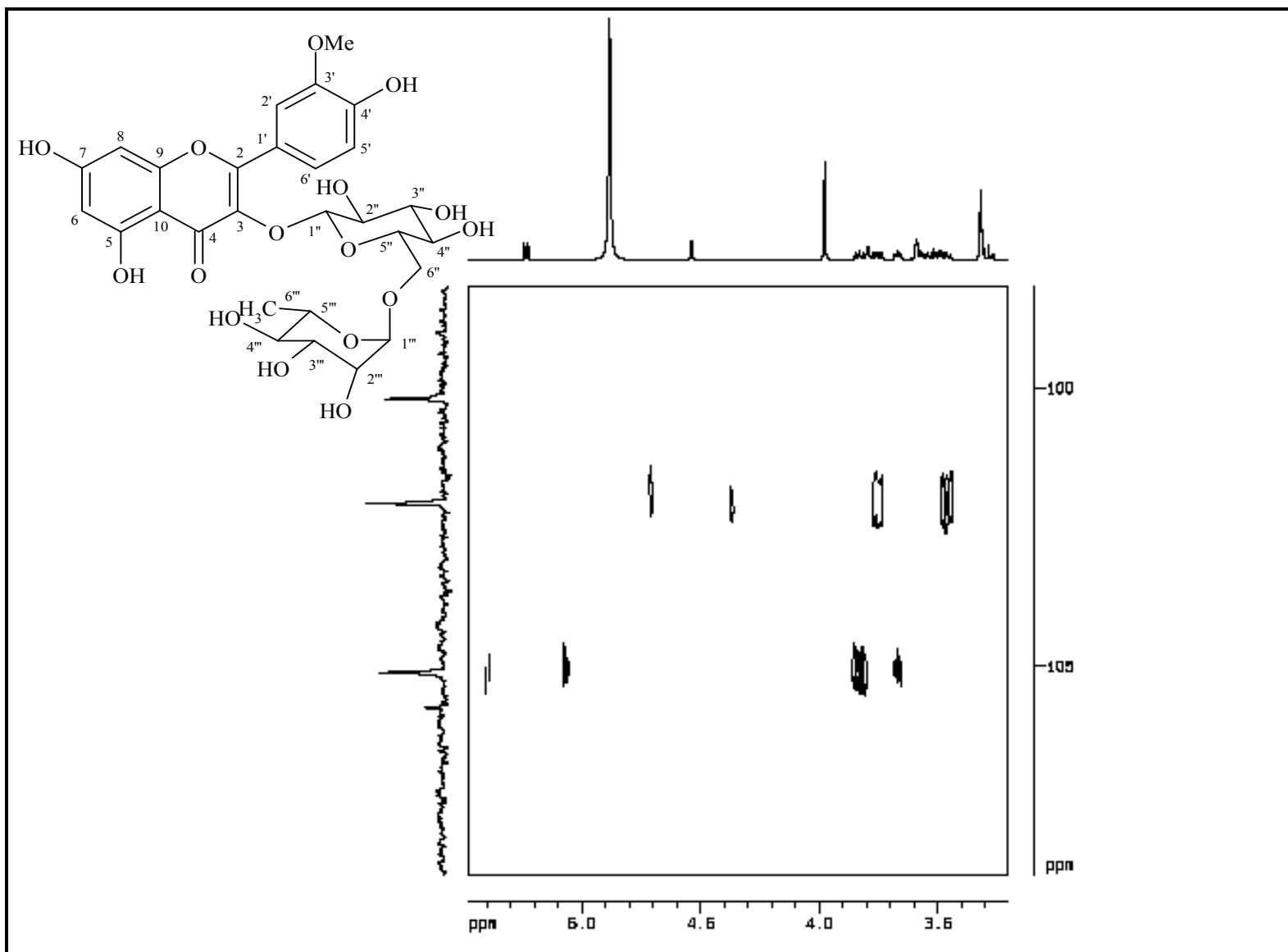


Figura 56. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 6,0 – 3,3 ppm x 110 – 100 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

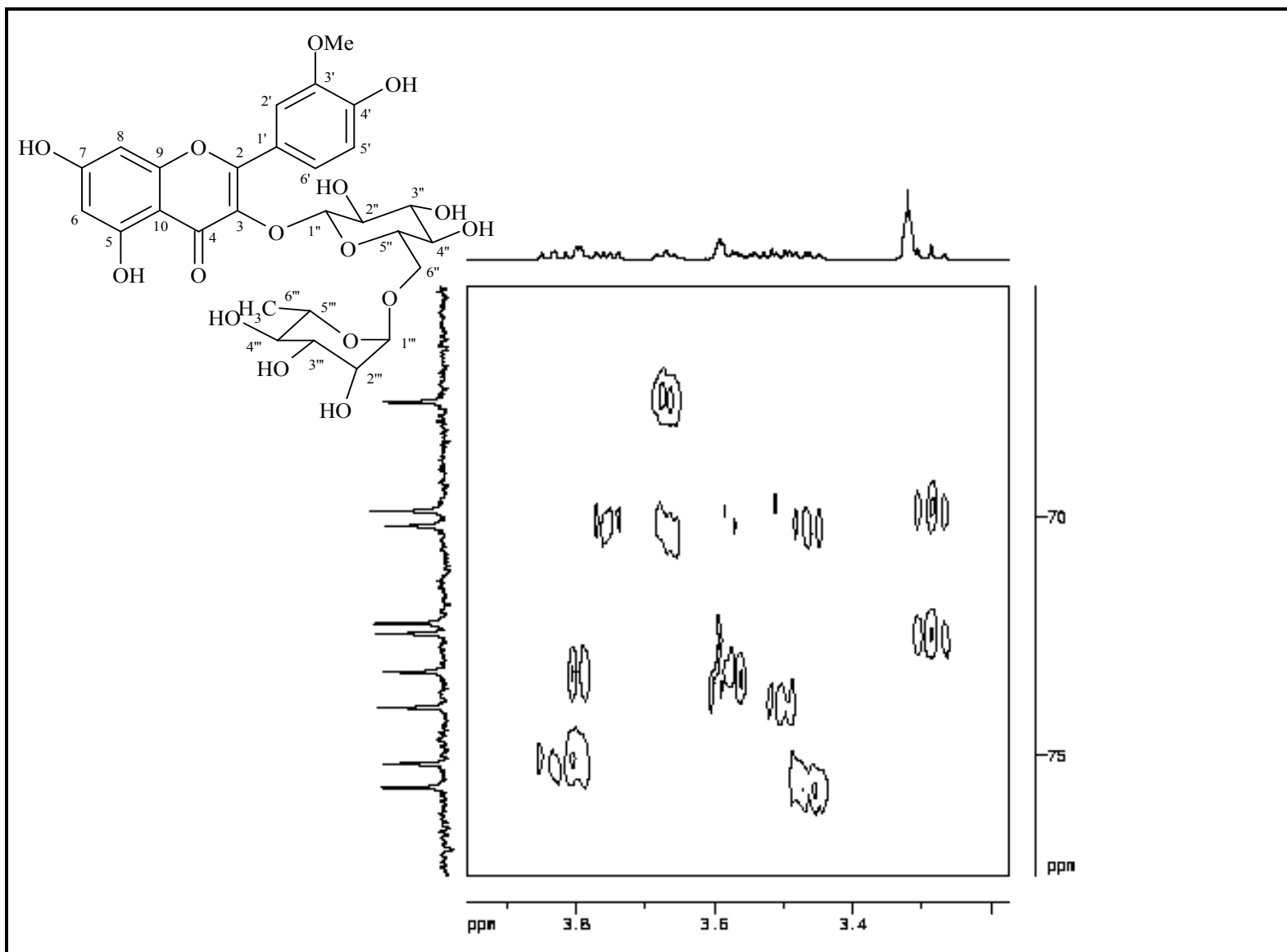


Figura 57. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 3,9 – 3,2 ppm x 75 – 65 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

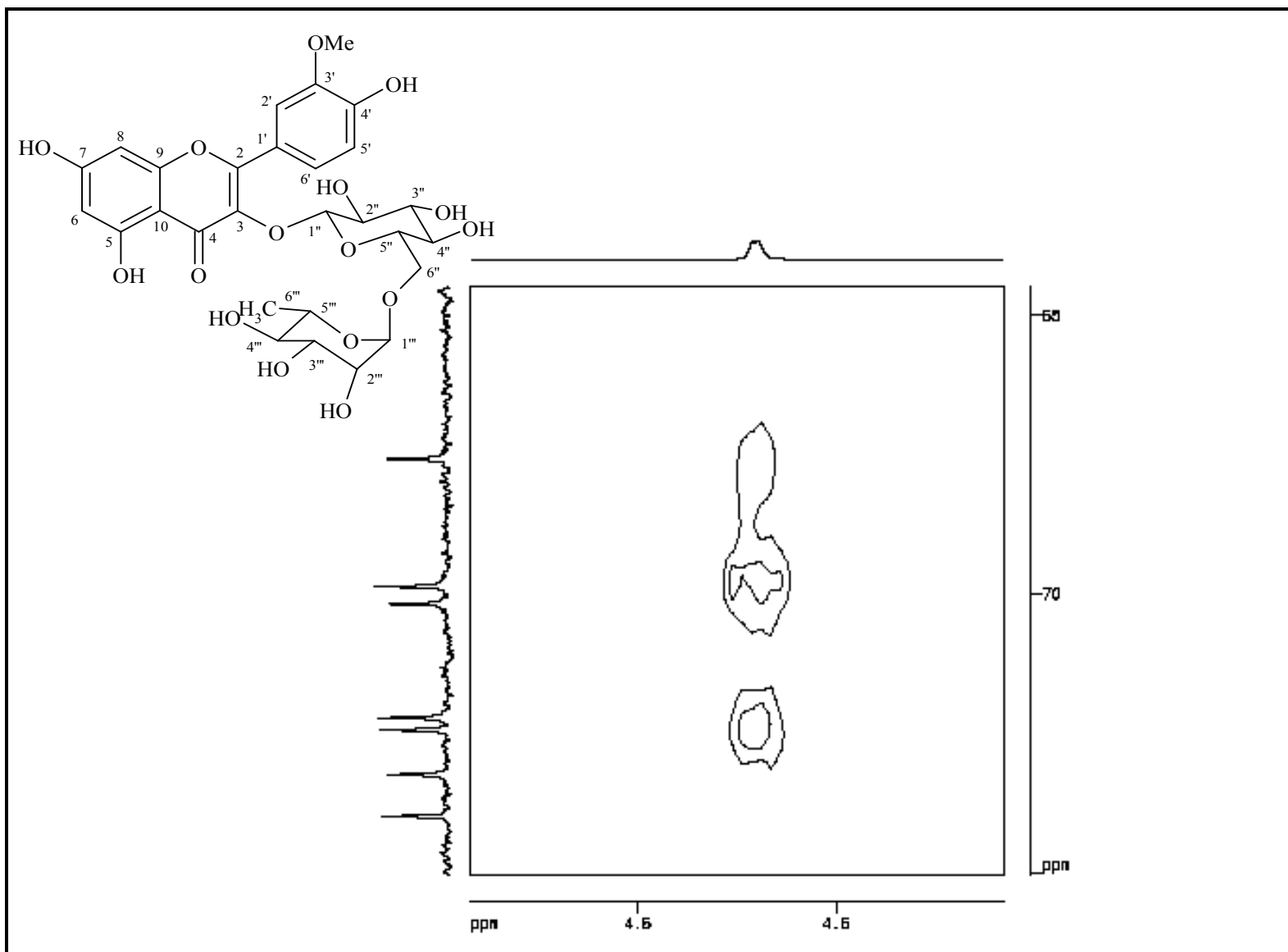


Figura 58. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 4,7 – 4,4 ppm x 75 – 65 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

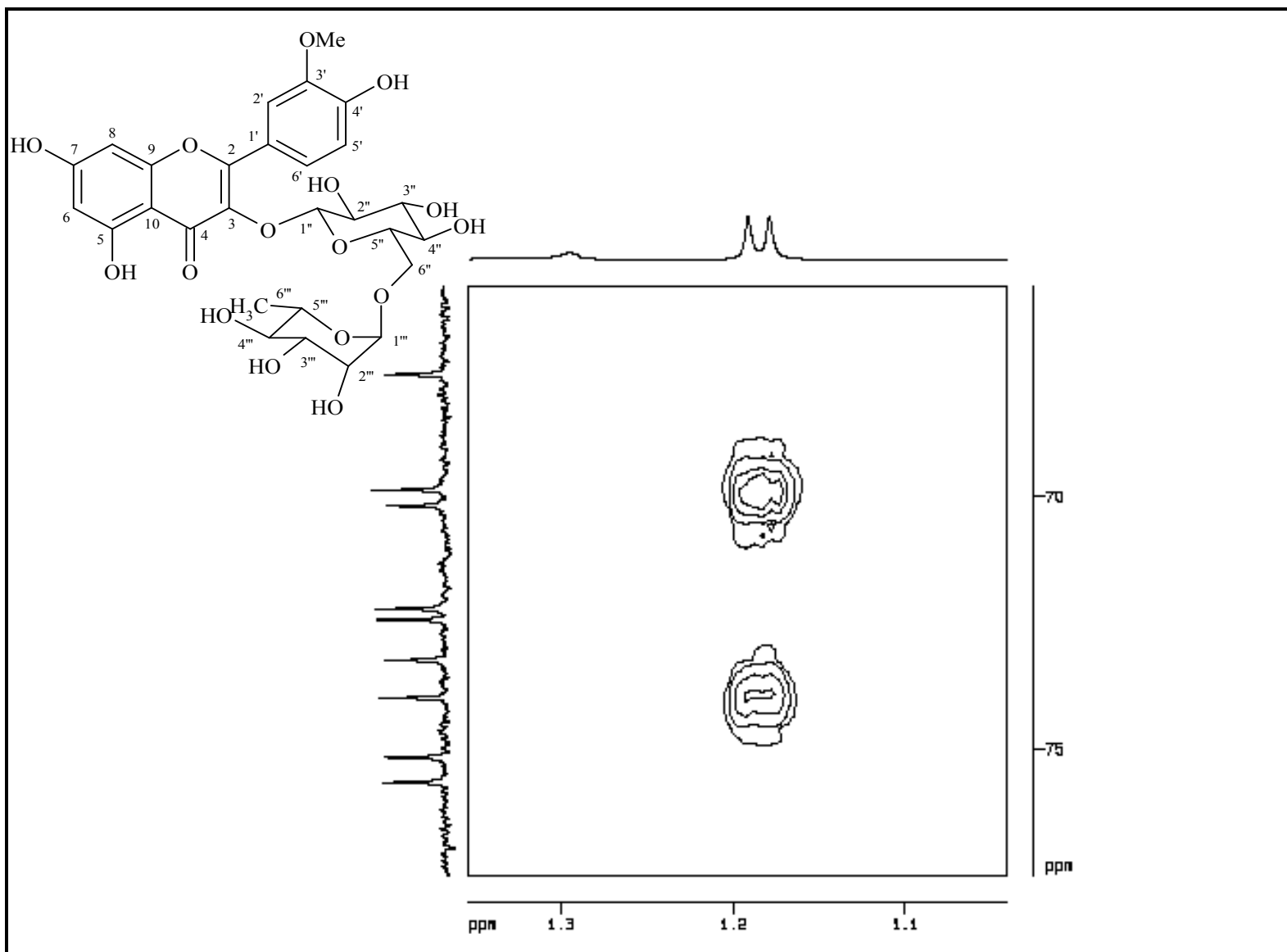
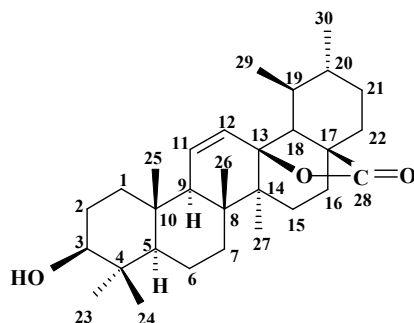


Figura 59. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Rb-4 na região de 1,3 – 1,1 ppm x 75 – 65 ppm (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

5.2 Constantes físicas e dados espectroscópicos dos constituintes químicos isolados de *Richardia brasiliensis*

5.2.1 3-β-hidroxiurs-11-en-28,13-β-olide



Aspecto físico: sólido amorfo

Fórmula molecular: C₃₀H₄₆O₃

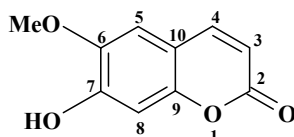
Massa molecular: 454 u.m.a.

Ponto de fusão: 191-194 °C

Dados de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ_H: 3,2 (dd, J=5,6 e 10,4 Hz), 0,75 (m), 1,92 (m), 5,93 (dl, J=9,4 HZ), 5,5 (dd, J=3,6 e 10,6 Hz), 1,61 (m), 1,82 (m), 0,88 (m), 1,79 (m), 1,63 (m), 1,6 (m), 1,56 (m), 1,17 (m), 1,34 (m), 1,56 (m), 1,50 (m), 0,96 (s), 0,76 (s), 0,88 (s), 1,02 (s), 1,13, 0,98 (s), 0,90 (s).

Dados de RMN- ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ_C: 36,7 (C-4), 41,6 (C-8), 36,3 (C-10), 89,6 (C-13), 41,9 (C-14), 45,0 (C-17), 179,9 (C-28), 78,8 (C-3), 54,7 (C-5), 52,9 (C-9), 133,4 (C-11), 128,7 (C-12), 60,5 (C-18), 38,1 (C-19), 40,2 (C-20), 38,9 (C-1), 26,9 (C-2), 17,6 (C-6), 31,2 (C-7), 25,5 (C-15), 22,7 (C-16), 30,8 (C-21), 31,3 (C-22), 27,7 (C-23), 14,9 (C-24), 19,1 (C-25), 18,9 (C-26), 16,1 (C-27), 0,98 (C-29), 17,9 (C-30).

5.2.2 Escopoletina (6-metoxi-7-hidroxicumarina)



Aspecto físico: cristais amarelos em forma de agulha.

Fórmula molecular: $C_{10}H_8O_4$.

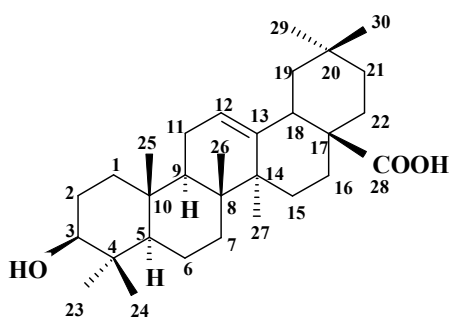
Massa molecular: 192 u.m.a.

Ponto de fusão: 190-191 °C.

Dados de RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 6,24 (d, $J = 9,6$ Hz, H-3), 7,58 (d, $J = 9,6$ Hz, H-4), 6,82 (s, H-5), 6,89 (s, H-8), 3,93 (s, MeO-6).

Dados de RMN- ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 161,4 (C-2), 111,4 (C-10), 143,9 (C-6), 149,6 (C-7), 150,2 (C-9), 113,3 (C-3), 143,3 (C-4), 107,4 (C-5), 103,1 (C-8), 56,3 (MeO-6).

5.2.3 Ácido oleanólico (ácido 3- β -hidroxiolean-12-en-28-óico)



Aspecto físico: pó branco.

Fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_3$.

Massa molecular: 456 u.m.a.

Ponto de fusão: 309-311 °C.

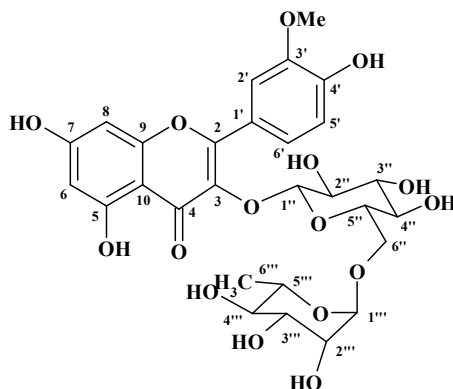
Dados de IV (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3457, 2943, 1689, 1636, 1085.

Dados de RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 3,19 (dd, $J = 6,0$ e $9,4$ Hz, H-3), 5,25 (sl, H-12), 2,80 (dd, $J = 0,2$ e $9,8$ Hz, H-18), 0,95 (s, H-23), 0,74 (s, H-24), 0,88 (sl, H-25), 0,72 (s, H-26), 1,10 (s, H-27), 0,88 (sl, H-29) e 0,90 (s, H-30).

Dados de RMN- ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 38,7 (C-4), 39,2 (C-8), 37,0 (C-10), 143,5 (C-13), 41,5 (C-14), 46,4 (C-17), 30,6 (C-20), 183,2 (C-28), 79,0 (C-3), 55,1 (C-5), 47,5 (C-9), 122,6 (C-12), 40,9 (C-18), 38,3 (C-1), 27,1 (C-2), 18,2 (C-6), 32,6 (C-7), 22,9 (C-11), 27,6 (C-15),

23,3 (C-16), 45,8 (C-19), 33,7 (C-21), 32,4 (C-22), 28,0 (C-23), 15,5 (C-24), 15,2 (C-25), 17,1 (C-26), 25,9 (C-27), 33,0 (C-29), 23,5 (C-30).

5.2.4 Isorametina-3-*O*-rutinosídeo (3'-metoxi-3-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosil]-5,7,4'-trihidroxi-flavona)



Aspecto físico: cristal amarelo.

Fórmula molecular: $C_{28}H_{32}O_{16}$.

Massa molecular: 624 u.m.a.

Ponto de fusão: 173-175 °C.

Dados de IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3404, 2919, 1655, 1601, 1429.

Dados de RMN- ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 6,21 (d, $J = 2$ Hz, H-8), 6,41 (d, $J = 2$ Hz, H-8), 8,03 (d, $J = 2$ Hz, H-2'), 6,91 (d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,60 (dd, $J = 2$ e 8,5 Hz, H-6'), 5,23 (d, $J = 7,8$ Hz, H-1''), 3,44-3,48 (m, H-2''), 3,83 (dd, $J = 8$ e 9,6 Hz, H-3''), 3,54-3,56 (m, H-4''), 3,67 (t, H-5''), 4,54 (d, $J = 1,1$ Hz, 1'''), 3,49-3,52 (m, H-2'''), 3,75 (dd, $J = 5,5$ e 10,1 Hz, H-3'''), 3,28 (t, H-4'''), 3,79 (m, H-5'''), 3,32 (dd, $J = 1,65$ e $J = 3,2$ Hz, H-6''), 3,97 (s, MeO-3'), 1,18 (d, $J = 6,25$ Hz, H-6''').

Dados de RMN- ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 158,99 (C-2), 135,63 (C-3), 179,60 (C-4), 163,15 (C-5), 166,51 (C-7), 158,66 (C-9), 105,75 (C-10), 123,12 (C-1'), 148,55 (C-3'), 151,03 (C-4'), 100,20 (C-6), 95,07 (C-8), 114,78 (C-2'), 116,13 (C-5'), 123,91 (C-6'), 105,12 (C-1''), 73,24 (C-2''), 75,66 (C-3''), 72,43 (C-4''), 75,16 (C-5''), 102,08 (C-1'''), 70,18 (C-2'''), 72,22 (C-3'''), 73,98 (C-4'''), 69,86 (C-5'''), 67,56 (C-6''), 57,10 (MeO-3'), 18,11 (C-6''').

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ✓ Este trabalho, relacionado a um dos primeiros estudos fitoquímicos de uma espécie do gênero *Richardia*, revelou-o como bioprodutor de diferentes metabólitos, tais como terpenóides, cumarinas e flavonóides;
- ✓ Através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional foi possível isolar e identificar quatro constituintes químicos de *Richardia brasiliensis*, sendo estes o 3- β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olide; a 6-metoxi-7-hidroxycumarina; o ácido 3- β -hidroxiolean-12-en-28-óico e a Isorametina 3-*O*-rutinosídeo;
- ✓ Todas as substâncias descritas são novas no gênero *Richardia*, contribuindo assim para o enriquecimento quimiotaxonômico da família Rubiaceae;
- ✓ O isolamento de diversas classes de metabólitos na espécie *Richardia brasiliensis* evidencia potencial deste gênero, gerando perspectivas de investigá-lo através de estudos farmacognósticos;
- ✓ Considerando a riqueza metabólica das classes de constituintes químicos descritos neste trabalho, os extratos, bem como as substâncias isoladas da espécie em estudo estão sendo encaminhados para testes farmacológicos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADEKUNLE, A. A. Antifungal property of the crude extracts of *Rrachystegia eurycoma* and *Richardia brasiliensis*. **Nigerian of Journal Natural Products and Medicine** v.4, p. 70-72, 2000.
- ADOLPHO, L. O.; DALCOL, I.; SILVA, V. S.; STÜCKER, C. Atividade Antimicrobiana e Antioxidante das Frações de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **XIV Jornada de Jovens Pesquisadores do AUGM**, São Paulo, 2006.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, Jan/Mar. 2007.
- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C. Isoflavonoids. In: AGRAWAL, P. K. (ed.). **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, p. 182-235, 1989.
- AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química medicinal: 25 Anos de planejamenyo racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 39-44, 2002.
- ASSIS, M. C.; GIULIETTI, A. M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de "ipecacuanha" - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 205-216, 1999.
- AZIZ, N. H.; FARAG, S. E.; MOUSA, L. A.; ABO-ZAID, M. A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Micróbios**, v.93, n.374, p. 43-54, 1998.
- BEGUM, S.; FARHAT; SULTANA, I.; SIDDIQUI, B. S.; SHAHEEN, F.; GILANI, A. H. Spasmolytic Constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtus*a Leaves. **Journal of Natural Products**, v.63, p. 1265-1268, 2000.
- BERETZ, A.; CAZENAVE, J. P. **Plant flavonoids in biology and medicine II: progress in clinical and biological research**. New York: Alan R. Liss, p. 187-200, 1988.
- BERG, P. A.; DANIEL, P. T. **Plant flavonoids in biology and medicine II: progress in clinical and biological research**. New York: Alan R. Liss, p. 157-171, 1988.
- BOHM, B. A. The minor flavonoids. In: HARBORNE, J. B. (ed.). **The Flavonoids: Advances in research since**. London: Chapman & Hall, p. 387-433, 1994.
- BRACKE, M. E.; PESTEL, G.; GASTRONOVO, G.; UYNCKE, B.; FOIDART, J. M.; VAKAET, L. C. A.; MARCEL, M. M. **Plant flavonoids in biology and medicine II: progress in clinical and biological research**. New York: J. B. Liss, 1988.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Editorial Acribia, S. A. p. 125-189, 1991.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAPASSO, A.; PINTO, A.; SORRENTINO, R.; CAPASSO, F. Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically- induced contractions of guinea pig isolated ileum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 2/3, p. 279-281, 1991.

CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; FLAUSINO JÚNIOR, O. A.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcalóides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 878-881, 2004.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais: sob a ótica de química medicinal moderna**. Chapecó-SC: Ed. Argos, p.41, 2001.

CHAUDRY, P. S.; CABRERA, J.; JULIANI, H. R.; VARIMA, S. D. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indometacin. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1195-1198, 1983.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(2): 170-177, 2006.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 435-442, 1998.

DESCHNER, E. E.; RUPERTO, J.; WONG, G.; NEWMARK, H. L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1193-1196, 1991.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. New York: John Wiley & Sons Ltd., 1997.

DI CARLO, G.; AUTORE, G.; IZZO, A. A.; MAIOLINO, P.; MASCOLO, N.; VIOLA, P.; DIURNO, M. V.; CAPASSO, F. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationship. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 1054-1059, 1993.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Minireview flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. Editora UNESP, São Paulo, 1996.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.

EVANS, J. E. Osteoporosis and the role of diet. **British Journal of Biomedical Science**, v. 51, p. 358-370, 1994.

FERNANDEZ M. A.; SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 10, p. 1183- 1186, 1998.

GAMACHE, P.; RYAN, E.; ACWORTH, I. N. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. **Journal of Chromatography**, v. 635, n. 1, p. 143-150, 1993.

GROTH, D. Identificação botânica de plantas e sementes de espécies invasoras na cultura da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 2, n. 3, p. 59-95, 1980.

HAMERSKI, L.; CAVALHEIRO, A. J.; CARBONEZI, C. A.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, 2005.

HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry: plant phenolics**. London: Academic Press, v. 1, 1989.

HAUSER, E. W.; PARHAM, S. A. Effects of annual weeds and cultivation on the yield of peanuts. **Weed Research**, v. 9, n. 3, p. 192-197, 1969.

HENKEL, T.; BRUNNE, R. N.; MULLER, H.; REICHEL, F. V. **Angewandte Chemie**, v. 38, p. 643, 1999.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. **Archives of Toxicology Supplement**, v. 20, p. 237-248, 1998.

IVANOVA, A.; MILKOVA, T.; GALABOV, A. S.; NIKOLAEVA, L.; VOYNOVA, E. Transformation of cholanolic acid derivatives into pharmacologically active esters of phenolic acids by heterogeneous Wittig reaction. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 36, n. 7-8, p. 516-521, 1997.

IWU, M. M.; IGBOK, O. A.; OKAUNJ, C. O.; TEMPESTA, M. S. Antidiabetic and aldose reductase activities of biflavanones of *Garcinia kola*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42, p. 290-292, 1990.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 6ª ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1983.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KUSTER, R. M. & ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In.: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 451-469, 1999.

LAWARENCE, R. N. Rediscovering natural product biodiversity. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 10, p. 449-451, 1999.

LEWIS, W. H.; OLIVER, R. L. Revision of *Richardia* (Rubiaceae). **Brittonia**, v. 26, p. 271-301, 1974.

LOPES, L. E.; BUZATO, S. Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 785-795, 2005.

LUCKNER, M. **Secondary metabolism in plants and animals**. Published by Science Paperbacks. Great Britain, p. 122-151, 1969.

MAHATO, S. B. & KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p.1517-1575, 1994.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2^a ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide- physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONGRAND, S.; BADO, A.; PATOUILLE, B.; LACOMBLEZ, C.; CHAVENT, M.; BESSOULE, J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. **Phytochemistry**, v. 66, p. 549-559, 2005.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação freqüente do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.21, n.1, p.63-69, Viçosa-MG, 2003.

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 123-132, Viçosa-MG, 2005.

MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTIN, S. M. O.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 452-455, 2006.

NAGEN, T. J.; ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 1, p. 129-138, 1992.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Triterpenos e sua importância Químico-Medicinal. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1ª ed. Itajaí: UNIVALI, p 237-258, 2007.

NIÑO, J.; NARVÁEZ, D. M.; MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 566-570, 2006.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL-FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v.29, n.3, p. 549-554, 2006.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents- recent advances. **Fitoterapia**, v. 62, p. 371-389, 1991.

PEDRINHO JÚNIOR, A.F.F.; BIANCO, S.; PITELLI, R.A. Acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Richardia brasiliensis*. **Planta daninha**, v.22, n.1, p.53-61, Mar 2004.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PEREIRA, M. S.; BARBOSA, M. R. V. A Família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirrhoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 305-318, 2004.

PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M.; GARCIA, F. C. P. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 207-224, 2006.

PIETA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JÚNIOR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides Glicosilados das Folhas e Flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

RASTRELLI, L.; SATURNINO, P.; SCHETTINO, O.; DINI, A. Studies on the Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua) Seeds. Isolation and Characterization of Two New Flavonol Glicosides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 2020-2024, 1995.

RIBÉREAU-GAYON, P. Les Composés Phénoliques des Végétaux. Paris: Dunod, p. 254, 1968.

RONCHI, C. P.; TERRA, A. A.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R. Acúmulo de nutrientes pelo cafeeiro sob interferência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.219-227, Viçosa-MG, 2003.

ROSSI, A. A. B.; OLIVEIRA, L. O.; VIEIRA, M. F. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 2, p. 285-294, 2005.

SAN MARTIN MATHEIS, H. A. **Efeitos de diferentes coberturas mortas obtidas a partir do manejo mecânico com roçadeira lateral na dinâmica populacional de plantas daninhas em citros**. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

SILVA, M. S. **Lignóides e flavonóides em espécies das famílias Lauraceae e Myristicaceae**. Instituto de Química-USP. Tese de Doutorado, São Paulo, 1986.

SILVA, V. C.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, M. N. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. **Eclética Química**, v. 31, n. 4, p. 55-58, 2006.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2003.

SMITH, D. A.; BANK, S. W. **Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure- activity relationship**. New York: Alan R. Liss, p. 113-124, 1986.

SOIKE, H.; PESCHLOW, E. L. Characterization of flavonoids from *Bacharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Médica**, v. 53, p. 37-39, 1987.

SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p. 175-184, 2003.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2007 (<http://www.mobot.org>).

STREET, H. E.; COCKBURN. Plant metabolism. **Pergamon international libray**, p. 204-205, 1972.

TEIXEIRA, L. A. G.; MACHADO, I. C. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, p. 853-862, 2004.

VASCONCELOS, J. M. F.; SILVA, M. A. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris subsp.maritima*. **Phytochemistry**. v. 49, p. 1421-1424, 1998.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drugs development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VIEIRA, M. F.; PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M. Fenologia da floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 3, p. 471-480, 2006.

VON-POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, p. 61-74, 1999.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, p. 489-516, 1999.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.: Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. UFRGS, p. 577-614, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)