

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

ESTUDO FITOFARMACOLÓGICO
DE *IXORA COCCINEA* LINN
(RUBIACEAE)

SILVANA AMADEU FERREIRA ALVES MONTEATH

Sob a Orientação da Professora Doutora

Aurea Echevarria

e Co-orientação da Professora Doutora

Maria Apareida Medeiros Maciel

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Magister Scientiae** em Química Orgânica. Área de Concentração em Fitoquímica

Seropédica, RJ
Março de 2005

547.7
M772e
T

Monteath, Silvana Amadeu Ferreira Alves,
1961-

Estudo fitofarmacológico de *Ixora
coccinea* Linn (Rubiaceae) / Silvana
Amadeu Ferreira Alves Monteath. - 2005.
139 f.

Orientador: Aurea Echevarria.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Ciências Exatas.

Bibliografia: p. 70-75.

1. Química vegetal - Teses. 2.
Plantas - Análise - Teses. 3. Plantas
medicinais - Teses. 4. Rubiaceae - Teses.
5. *Ixora* - Teses. I. Echevarria, Aurea.
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Ciências Exatas.
III. Título

**ESTUDO FITOFARMACOLÓGICO DE *Ixora coccinea* Linn
(Rubiaceae)**

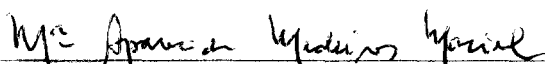
SILVANA AMADEU FERREIRA ALVES MONTEATH

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de Concentração Fitoquímica, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/03/ 2005



Profª Dra. Aurea Echevarria
Departamento de Química –UFRRJ
Orientadora



Profª Dra. Maria Aparecida Medeiros Maciel
Departamento de Química -UFRN
(Co-orientadora)



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Departamento de Química-Universidade Estácio de Sá



Profª Dra. Rosane Nora Castro
Departamento Química –UFRRJ
(Suplente)

DEDICATÓRIA



Cavaleiros Templários em Carcassonne

Traduzem força, fé e esperança

Assim, como meus agradecimentos,
uma imagem vale mais que mil palavras

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho iniciou-se com um estágio oferecido através do projeto “Integração da Química de Produtos Naturais e Seu Uso na Agricultura Através do Estudo de Substâncias Bioativas e sua Aplicação Contra Patógenos em Animais e Vegetais”, oferecido pela RURAL em 1999.

Através deste estágio pude contar com a orientação de duas magníficas pessoas, que através do seu amor a ciência, a preocupação com o ser humano e a imensa vontade de contribuir para a construção da arquitetura do progresso, através de projetos de pesquisas que possam vir a contribuir de alguma forma para o bem geral de todos em nosso país.

Estas duas pessoas foram a Prof^a Dra. Aurea Echevarria e a Prof^a Dra. Maria Aparecida Medeiros Maciel, a primeira como orientadora e a segunda como co-orientadora. Durante por todo o caminho percorrido com elas, pude aprender não só algumas técnicas de pesquisa em produtos naturais, mas também a valorização do ser humano, o respeito e a ética em todos os sentidos.

OBRIGADA

É uma palavra que pouco expressa o sentimento que tenho para com a minha orientadora, e co-orientadora, assim como os meus irmãos da Universidade RURAL, que tanto me auxiliaram de alguma forma, por mínimo que seja, a realizar este trabalho.

O aprendizado dos conceitos teóricos são importantes, no entanto, a vivência e a convivência com a família RURAL, foram as mais significativas para o meu crescimento tanto como ser humano como profissional. Seria ingrato e desonesto de minha parte não ter tal reconhecimento.

Aos professores e funcionários amigos de tantas jornadas do PPGQO e do Departamento de Química, meus sinceros agradecimentos por toda sabedoria que me transmitiram.

Ao técnico Eli que realizou os espectros de absorção no infravermelho e foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1605 série 1600 FT-IR com transformada de Fourier. E também pela paciência que teve comigo em incursões e

ajuda ao manusear o moinho elétrico, marca Vencedora – Máquinas Agrícolas Ltda – MOD.V.611 N° 60482 série VF 1AO2.

A Francis que realizou parte das análises no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, onde utilizou um cromatógrafo a gás HP-5890, cujas análises de espectrometria de massas foram realizadas em aparelho SATURN 2000.

No reconhecimento botânico, a espécie foi coletada por Tatiane Rocha Pereira, aluna do Curso de Agronomia, no Jardim Botânico da UFRRJ, e identificada pela professora Maria Mercedes Rosa, do Departamento de Botânica da UFRRJ (I.B.).

A técnica Áurea Tatanagibe (*in memoriam*) pelas análises por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 (200MHz).

Os estudos farmacológicos foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas sob a coordenação do Prof. Dr. Frederico Argollo Vanderlinde, que prestimosamente realizou vários ensaios biológicos com extratos hidro-alcoólicos da *Ixora coccínea* Linn, e que foram de substancial importância para o conhecimento etnofarmacológico no estudo da espécie.

Aos funcionários do Jardim Botânico da UFRRJ, que foram sempre muito solícitos e gentis em me receber e permitir as coletas de material vegetal para que pudessem ser objetos de estudo

Devo ainda um agradecimento especial a ajuda de outros colaboradores de outras instituições, como:

Ao Prof. Dr. Waldir Florêncio Junior (UFRJ), que analisou as frações obtidas das flores por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM), onde os compostos foram identificados através da comparação de seus espectros de massas com espectros de padrões e com a espectroteca da Wiley.

As análises por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) foram registrados em espectrômetros Varian Gemini-300 (300 MHz), pelo Prof. Dr. Kaiser (UFRJ). E no Bruker AC-400 (400MHz) pelo Prof. Dr. Ian da UENF.

Um agradecimento, com um beijo no coração, a Prof. Raquel (UENF), que me recebeu em sua residência e pude ter a sorte de receber várias orientações no estudo.

**QUE A BANDEIRA DA SANTÍSSIMA TRINDADE NOS CUBRA SEMPRE
COM AS SUAS GRAÇAS E BENÇÃOS!**

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xii

RESUMO

MONTEATH, Silvana Amadeu Ferreira Alves Monteath. **Estudo Fitofarmacológico de *Ixora coccinea* Linn (Rubiaceae)**. Seropédica: UFRRJ, 2005. (Dissertação, Mestrado em Química Orgânica, com Área de concentração em Fitoquímica).

A *Ixora coccinea* Linn é uma planta de origem oriental utilizada na medicina popular das Índias Orientais. O extrato metanólico das flores desta planta mostrou através da análise de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), para as frações de baixa polaridade uma mistura de hidrocarbonetos funcionalizados ou não, e uma mistura esteroideal. O triterpeno bioativo ácido ursólico também foi isolado pelo método fitoquímico usual (gel de sílica impregnado com eluentes em gradiente de polaridade), e por metodologia específica para a obtenção de ácidos (gel de sílica impregnado com base). Ademais, o açúcar manitol, também foi isolado do extrato metanólico das flores. O extrato hexânico das folhas de *Ixora* apresentou através de CG-EM, misturas de hidrocarbonetos, sesquiterpenos, ésteres de ácidos graxos, esteróides e álcoois, além de uma mistura de triterpenos que tiveram suas estruturas confirmadas através de dados espectroscópicos de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT e HMQC. Para o extrato clorofórmico das folhas desta espécie foi isolado um triterpeno da classe dos hopanos, bem como a presença do açúcar manitol nas frações mais polares. Foi realizado um estudo analítico de prospecção dos constituintes micromoleculares presentes nos extratos hidroalcolólicos das flores, folhas, galhos e raízes. Os extratos hidroalcolólicos das flores, folhas, galhos e raízes foram submetidos a ensaios farmacológicos para a investigação da atividade antinociceptiva. Os galhos evidenciaram maior atividade antinociceptiva, envolvendo, a princípio, atividade antiinflamatória. Os resultados obtidos permitiram uma contribuição ao conhecimento do gênero *Ixora* e espécie *coccinea*.

Palavras chaves: *Ixora coccinea* Linn, ácido ursólico, atividade antinoiceptiva

ABSTRACT

MONTEATH, Silvana Amadeu Ferreira Alves Monteath.. **Phytofarmacological Study of *Ixora coccinea* Linn (Rubiaceae)**. Seropédica: UFRRJ, 2005. (Dissertation, Master Science in Organic Chemistry, with Concentration Área of Phytochemistry).

Ixora coccinea Linn is an oriental species which has been used in the popular medicine of the West Indies. The methanolic extract of its flowers was submitted to analysis by gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS), for the low polarity fractions a mixture of both hydrocarbons and functionalized hydrocarbons, and also, a steroidal mixture. The bioactive triterpene ursolic acid also was isolated by the usual phytochemical method (silica gel impregnated with eluents in gradient of polarity), and by specific methodology for acids obtainment (silica gel impregnated with basis). Besides, the mannitol sugar, also obtained from methanolic extract of flowers was isolated. The hexanic extract showed from the hexanic extract of *Ixora coccinea* leaves by GC-MS, a mixture of hydrocarbons, sesquiterpenes, fatty acid esters, steroids and alcohols, beyond a mixture of triterpenes that had its structures confirmed by NMR spectroscopic data of ^1H , ^{13}C , DEPT and HMQC. For the chloroformic extract of this specimen leaves, a hopane class of triterpene was isolated, as well as from the flowers the presence of the sugar mannitol in more polar fractions. Analytical study by prospection of the micromolecular components presents were realized in its extracts hydroalcoholic of flowers, leaves, branches and roots. The extracts hydroalcoholic of flowers, leaves, branches and roots were submitted to pharmacological essays for the research antinociceptive activity. The branches revealed a larger antinociceptive activity involving, at first, anti-inflammatory activity. The results obtained to permit a contribution to the knowledge of the genus *Ixora* and specimen *coccinea*.

Key words: *Ixora coccinea* Linn, ursolic acid, antinociceptive activity

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Produtos Naturais: Da Teosofia a Biotecnologia.....	1
1.2. Histórico.....	1
1.3. Cultivo.....	2
1.4. Considerações Botânicas.....	3
1.5. Considerações Químicas e Farmacológicas.....	4
1.6. Compilação dos Dados Etnofarmacológicos para o Gênero <i>Ixora</i>	5
1.7. Sistematização das Atividades Biológicas Detectadas nos Extratos do Gênero <i>Ixora</i>	5
1.8. Compilação Literária dos Metabólitos Detectados no Gênero <i>Ixora</i>	5
2. OBJETIVOS.....	12
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	13
3.1. Instrumentos Utilizados.....	13
3.1.1. <i>Moinho elétrico</i>	13
3.1.2. <i>Ponto de fusão</i>	13
3.1.3. <i>Cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas (CG - EM)</i>	13
3.1.4. <i>Infravermelho (IV)</i>	13
3.1.5. <i>Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	13
3.1.6. <i>Cromatografia de camada fina (CCF)</i>	13
3.2. Metodologias Gerais.....	14
3.2.1. <i>Reconhecimento botânico</i>	14
3.2.2. <i>Coleta e moagem</i>	14
3.2.3. <i>Obtenção de extrato bruto (EB) por técnica de maceração</i>	14
3.2.4. <i>Preparo da pastilha</i>	15
3.2.5. <i>Montagem do sistema cromatográfico de coluna aberta por empacotamento úmido</i>	15
3.2.6. <i>Montagem do sistema cromatográfico de coluna aberta por empacotamento úmido com anéis de carvão ativado</i>	16

3.2.7. Obtenção de derivados.....	16
3.2.7.1. Esterificação com diazometano.....	16
3.2.7.2. Acetilação com anidrido acético e piridina.....	17
3.3. Parte Experimental de Flores de <i>Ixora coccinea</i>	17
3.3.1. Fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação.....	17
3.3.2. Metodologia alternativa para obtenção de ácidos carboxílicos.....	18
3.4. Parte Experimental de Folhas de <i>Ixora coccinea</i>	19
3.4.1. Fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação.....	19
3.5. Prospecção analítica dos constituintes micromoleculares (MATOS e col., 1972) das flores, folhas, galhos e raízes de <i>Ixora coccinea</i>	21
a) Ácidos orgânicos.....	21
b) Açúcares redutores.....	21
c) Alcalóides.....	22
d) Antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	22
e) Catequinas.....	22
f) Cumarinas.....	22
g) Esteróides e triterpenóides (Lieberman – Buchard)	22
h) Fenóis e taninos.....	23
i) Flavonóides, flavonas, flavononóis e xantonas.....	23
j) Glicosídeos cardíacos.....	23
k) Saponinas.....	23
l) Sesquiterpenolactonas e outras lactonas.....	23
3.6. Preparação dos Extratos Hidro-alcóolicos das Flores, Folhas, Galhos e Raízes de <i>Ixora coccínea</i> Linn (E.B.OH).....	24
3.7. Ensaio Farmacológicos.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Estudo Fitoquímico das Flores.....	25
4.1.1 Identificação das Misturas M-1, M-2, M-3 e M-4 presentes nas frações F ₁₋₁₉	25
4.1.2. Identificação do ácido ursólico (S-1)	28
4.1.3. Identificação do manitol (S-2)	31
4.1.4. Metodologia alternativa para o isolamento do ácido ursólico.....	32

4.2. Estudo Fitoquímico das Folhas.....	32
4.2.1. <i>Identificação dos metabólitos contidos nos grupos de frações do extrato hexânico (E.B.HEX)</i>	<i>32</i>
4.2.1.1. <i>Identificação dos metabólitos em M-5 presentes nas frações F₁₋₂.....</i>	<i>32</i>
4.2.1.2. <i>Identificação dos metabólitos em M-6 presentes no grupo de frações F₃₋₅.....</i>	<i>33</i>
4.2.1.3. <i>Identificação dos metabólitos em M-7 presentes no grupo de frações F₆₋₁₀.....</i>	<i>35</i>
4.2.1.4. <i>Identificação dos metabólitos em M-8 presentes no grupo de frações F₁₁₋₁₄.....</i>	<i>42</i>
4.2.1.5. <i>Identificação dos metabólitos em M-9 presentes no grupo de frações F₁₅₋₂₁.....</i>	<i>43</i>
4.2.1.6. <i>Identificação dos metabólitos em M-10 presente no grupo de frações F₂₂₋₃₂.....</i>	<i>44</i>
4.2.1.7. <i>Identificação dos metabólitos em M-11 presentes no grupo de frações F₃₃₋₃₉.....</i>	<i>44</i>
4.2.2. <i>Identificação dos metabólitos presentes no grupo de frações do E.B.CHCl₃.....</i>	<i>44</i>
4.2.2.1. <i>Identificação do metabólito S-3 presente no grupo de frações F₁₋₇₉.....</i>	<i>44</i>
4.2.2.2. <i>Identificação do metabólito (S-2) presente no grupo de frações F₁₋₈₀.....</i>	<i>47</i>
4.3. Considerações Biossintéticas.....	47
4.4. Estudo analítico por prospecção dos constituintes micromoleculares dos extratos brutos hidro-alcóolicos (E.B.OH).....	50
4.5. Estudo farmacológico dos extratos hidro-alcoólicos e metanólicos de <i>Ixora coccinea</i> Linn.....	51
4.5.1. <i>Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....</i>	<i>52</i>
4.5.2. <i>Teste da placa quente.....</i>	<i>52</i>
4.5.3. <i>Teste da formalina.....</i>	<i>53</i>
4.5.4. <i>Teste do rota-rod.....</i>	<i>53</i>
4.5.5. <i>Teste do Campo Aberto.....</i>	<i>53</i>
5. CONCLUSÕES.....	54
6. BIBLIOGRAFIA.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Indicações etnofarmacológicas dos extratos de espécies do gênero <i>Ixora</i>	6
Tabela 2- Atividades biológicas apresentadas pelos extratos hidro-alcóolicos (1:1) de espécies do gênero <i>Ixora</i>	7
Tabela 3- Continuação das atividades biológicas detectadas nos extratos hidro-alcóolicos (1:1) de espécies do gênero <i>Ixora</i>	8
Tabela 4- Continuação das atividades biológicas detectadas nos extratos hidro-alcóolicos (1:1) de espécies do gênero <i>Ixora</i>	9
Tabela 5- Metabólitos especiais identificados de várias espécies do gênero <i>Ixora</i>	10
Tabela 6: Ácidos graxos metilados mais abundantes detectados na mistura M-2 com seus respectivos percentuais de abundância relativa.....	25
Tabela 7: Tabela da mistura esteroideal (M-4) identificada no grupo de frações F ₁₋₁₉ do E.B.MeOH das flores de <i>Ixora coccinea</i>	26
Tabela 8: Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (δ) para o derivado metilado do ácido ursólico e os correspondentes da literatura (MAHATO <i>et al</i> , 1994).....	29
Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C obtidos para S-2 e dados da literatura.....	31
Tabela 10: Mistura de hidrocarbonetos (M-5) identificados no grupo de frações F ₁₋₂ do E.B.Hex. das folhas de <i>Ixora coccinea</i>	33
Tabela 11: Mistura de hidrocarbonetos (M-6) identificados no grupo de frações F ₃₋₅ do E.B.Hex. das folhas de <i>Ixora coccinea</i>	34
Tabela 12: Mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (M-6) identificados no grupo de frações F ₃₋₅ do E.B.Hex. das folhas de <i>Ixora coccinea</i>	35
Tabela 13: Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o lupeol.....	38
Tabela 14: Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para a α-amirina.....	39
Tabela 15: Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para a β-amirina.....	40
Tabela 16: Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o 4° terpeno.....	41

Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C para a proposta dotriterpeno.....	46
Tabela 18. Resultados obtidos da prospecção dos constituintes micromoleculares para os extratos hidro-alcólicos das flores, folhas, galhos e raízes de <i>Ixora coccinea</i>	50
Tabela 19. Continuação dos resultados obtidos da prospecção dos constituintes micromoleculares para os extratos hidro-alcólicos das flores, folhas, galhos e raízes de <i>Ixora coccinea</i>	51

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Quadro geral das quantidades de extratos e seus respectivos percentuais para cada parte da planta.	15
Esquema 2- Esquema do fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação do E.B.-MeOH das flores de <i>Ixora coccinea</i> Linn.....	18
Esquema 3- Esquema do fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação do E.B.-MeOH das flores de <i>Ixora</i> com sílica impregnada com KOH 10% (p/v).....	19
Esquema 4: Fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação do E.B.Hex. das folhas de <i>Ixora coccinea</i> Linn.....	20
Esquema 5: Fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação do E.B.CHCl ₃ das folhas de <i>Ixora coccinea</i> Linn.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Ixora coccinea</i> sendo visitada por uma borboleta.....	2
Figura 2: Renque de <i>Ixora coccinea</i> Linn.	3
Figura 3. Esquema de montagem da coluna cromatográfica em sistema aberto utilizando empacotamento úmido com anéis de carvão ativado.....	16
Figura 4: Mistura de hidrocarbonetos (M-1) correspondentes ao grupo de frações F ₁₋₁₉	26
Figura 5: Mistura de ácidos graxos metilados (M-2) presentes no grupo de frações F ₁₋₁₉	27
Figura 6: Mistura de hidrocarbonetos (M-3) correspondentes ao grupo de frações F ₁₋₁₉	27
Figura 7: Mistura de esteróides (M-4) correspondentes ao grupo de frações F ₁₋₁₉	28
Figura 8: Ácido ursólico (S-1) e ursolato de metila, metabólito obtido nas frações F ₂₀₋₃₉	29
Figura 9: Proposta de fragmentação de massas para o ursolato de metila.....	30
Figura 10: Manitol (S-2), metabólito correspondente ao grupo de frações F ₄₀₋₄₆	31
Figura 11: Mistura de hidrocarbonetos (M-5) identificados no grupo de frações F ₁₋₂ do E.B.Hex. das folhas de <i>Ixora coccinea</i>	33
Figura 12: Metabólitos (M-5) correspondentes ao grupo de frações F ₁₋₂ do E.B.Hex.....	33
Figura 13: Metabólitos (M-6) correspondentes ao grupo de frações F ₃₋₅ do E.B.Hex.	34
Figura 14: Metabólitos (M-6) correspondentes ao grupo de frações F ₃₋₅ do E.B.Hex.....	35
Figura 15: Mistura de terpenos em M-7 correspondentes ao grupo de frações F ₆₋₁₀	36
Figura 16: Mistura de ésteres metílicos de M-8.	42
Figura 17: Mistura de ésteres isopropílicos em M-8.....	42

Figura 18: Mistura de esteróides em M-8.	43
Figura 19: Mistura de ésteres metílicos e isopropílicos de M-9.....	43
Figura 20: Mistura de álcoois de M-10.....	44
Figura 21: Compostos utilizados da literatura, L-1, L-2, L-3 e L-4, em comparação com a estrutura proposta do triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -OH- fenil- hopano.....	45
Figura 22: Isomerização de IPP e reações subseqüentes na obtenção de óxido de esqualeno na biossíntese de triterpenos e esteróides.....	49
Figura 23: Ciclização do 2,3-óxido de esqualeno na biossíntese de esteróides e triterpenos.....	49
Figura 24: CG-MS para a mistura de hidrocarbonetos de M-1.....	59
Figura 25: CG-MS para a mistura de ácidos graxos metilados de M-2.....	59
Figura 26: Ampliação dos espectros correspondentes de M-1 e M-2.....	60
Figura 27- CG-EM do tetradecanoato de isopropila de M-3.....	61
Figura 28- CG-EM do hexahidro farnesil acetona e palmitado de metila de M-3.....	62
Figura 29: CG-EM do estearato de metila de M-3	63
Figura 30: CG-EM do ergosterol e campesterol de M-4.....	63
Figura 31- CG-EM do estigmasterol e do fucosterol de M-4.....	64
Figura 32- CG-EM do b-sitosterol e colesterol de M-4.....	65
Figura 33- Espectro na região do infravermelho para os esteroides de M-4.....	66
Figura 34- Espectro na região do infravermelho ursolato de metila (S-1 metilado).....	67
Figura-35- CG-EM do ursolato de metila (S-1 metilado).....	68
Figura-36- Espectro de RMN de ^1H para o ursolato de metila (S-1 metilado).....	69
Figura-37- Espectro de RMN de ^{13}C para o ursolato de metila (S-1 metilado).....	71
Figura-38- Espectro na região do infravermelho do açúcar manitol (S-2).....	74
Figura-39- Espectro de RMN de ^1H do manitol (S-2).....	78
Figura-40- Espectro de RMN de ^{13}C do manitol (S-2).....	80
Figura 41. CG-EM da mistura de hidrocarbonetos de M-5.....	81
Figura 42- CG-EM da mistura de sesquiterpenos de M-5.....	82
Figura 43: Infravermelho dos metabólitos de M-6.....	83
Figura 44: CG-EM da mistura de hidrocarbonetos e ésteres metílicos de M-6.....	84
Figura 45- Infravermelho dos metabólitos isolados de M-7.....	85

Figura 46- Espectro de RMN de ^1H para M-7.....	86
Figura 47- Espectro de RMN de ^{13}C da mistura M-7.....	90
Figura 48. Espectro de DEPT 90 - RMN de ^{13}C dos metabólitos isolados de M-7 na faixa de d 150,97 – 55,17.	96
Figura 49. Espectro de DEPT 135 - RMN de ^{13}C dos metabólitos isolados de M-7 na faixa de d 124,41 – 16,11.	98
Figura 50- Espectro de HMQC dos metabólitos isolados de M-7 com a correlação de ^1H e ^{13}C na faixa de d 2,4 – 0 e 59,0 -0, respectivamente.	102
Figura 51- Espectro na região do infravermelho para a mistura M-8.....	104
Figura 52. CG – EM dos metabólitos de M-8.....	105
Figura 53- Espectro na região do infravermelho de M-9.....	107
Figura 54. CG – EM dos esteróides de M-9.....	108
Figura 55- Espectro na região do infravermelho para os metabólitos de M-10.....	109
Figura 56- CG-EM da mistura de álcoois de M-10.....	110
Figura 57- Espectro na região do infravermelho para os metabólitos de M-11.....	111
Figura 58- Espectro na região do infravermelho para o metabólito S-3.....	112
Figura 59- Espectro de RMN de ^1H para o metabólito S-3.....	113
Figura 60- Espectro de RMN de ^{13}C para o metabólito isolado de S-3.....	117
Figura 61- Espectro na região do infravermelho para o metabólito S-2.....	122

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

APT:	attached proton test
CCF :	cromatografia em camada fina
CG-EM:	cromatografia de gás acoplada a espectrômetro de massas
RMN de ^1H :	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C :	ressonância magnética nuclear de carbono-13
Pf:	ponto de fusão
IV:	infravermelho
m/z:	relação massa-carga
d:	deslocamento químico medido em ppm
Hz:	hertz
p/v:	relação peso por volume
v/v:	relação volume por volume
DEPT:	distortionless enchancement by polarization transfer
HMQC:	heteronuclear multiple quantum coherence
<i>J</i> :	constante de acoplamento
s:	singleto
d:	dubleto
dd:	duplo dubleto
t:	tripleto
pH:	potencial hidrogeniônico
F.E.:	fase estacionária
F.M.:	fase móvel

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais: Da Teosofia a Biotecnologia

O conhecimento e a utilização das plantas transmitiu-se através dos séculos pelos grandes povos da antiguidade, tanto na Ásia, África, Europa, Oceania como na América, (BOCCHETTI *et al*, 2004), através de um conjunto de ensinamentos e práticas milenares que foram sendo passadas até os dias de hoje no mundo todo. A utilização de plantas, rituais e elementos básicos da natureza como: água, fogo, cristais, etc., tem-se apresentado com a finalidade da cura do corpo físico, emocional, mental e espiritual.

As observações lógicas e científicas dos fenômenos naturais conduziram o homem ao conhecimento com os olhos espirituais em primeiro plano, e não com os olhos físicos, conceituando os conhecimentos como milagres numa concepção teosófica.

Com a consciência emancipada as observações com os olhos físicos foram pouco a pouco ao longo dos séculos se tornando uma ciência oficial menos ocultista, como: a medicina, a alquimia, a química, a astronomia, etc. E assim, a teosofia termina onde a ciência oficial começa até os dias de hoje.

Segundo Gottlieb (SEIDL *et al*, 1999), é necessário uma visão holística para se entender e solucionar os grandes enigmas da natureza em benefício do povo brasileiro. O conhecimento a respeito de produtos naturais ainda é tão fragmentário quanto no início do século passado. Por incrível que pareça, apesar de ter grande importância pelos males que as substâncias químicas possam vir a aliviar, ainda não se sabe por que essas substâncias existem nas plantas. A descoberta de uma única substância, encontrada entre outras 50, de uma dada espécie pode ser mais importante do que a descoberta de uma galáxia. Se esta substância pudesse ter se tornado um medicamento, o dinheiro gasto nesta pesquisa seria mínimo, dado o bem que representou para a humanidade. Se descobrirmos uma única substância – por exemplo, contra o vírus HIV, toda a verba investida em química de produtos naturais terá sido recompensada.

De acordo com Santarém (2004), a produção de substâncias naturais de interesse farmacêutico e industrial, representa hoje, uma realidade capaz de melhorar a vida de milhares de pessoas, por meio da disponibilidade de produtos naturais em quantidade e qualidade que até alguns anos não poderiam ser obtidas. Nesse contexto, a biotecnologia vegetal permite vislumbrar um futuro com plantas que seriam verdadeiras biofábricas de substâncias que possam ser utilizadas no tratamento de diversas doenças. Além disso, as inúmeras possibilidades de utilização das técnicas de manipulação genética dos vegetais utilizados como alimento permitiram a maior disponibilidade. A biotecnologia permite o acesso às fontes de substâncias naturais, independentemente das variações sazonais, localização geográfica e problemas de reprodutibilidade, além de possibilitar a promoção da síntese de substâncias bioativas nas plantas.

1.2. Histórico

Segundo os relatos de Curtis (1791) a *Ixora coccinea* foi introduzida na Grã Bretanha por Bentick em 1690 pela primeira vez fora do seu *habitat* natural. Esta planta cresce em estado selvagem por várias partes da Índia em arbustos ou árvores com flores tão brilhantes que parecem carvão incandescente, especialmente numa floresta de madeira escura, daí o seu nome original *Flamma Sylvarum*. Esta espécie floresce em setembro e outubro, produzindo uma fruta negra, do tamanho de pequenas cerejas, com as quais supostamente se alimentavam os pavões, originando também o nome de *Cerafa pavonina*. Os chineses a chamavam de *Santanhoa*, produzindo flores e frutos durante o ano inteiro. As flores são muito veneradas e utilizadas por eles nos sacrifícios feitos ao seu ídolo *Ixora*, de onde Linnaeus tirou o nome aplicado por ele ao gênero utilizado até a atualidade. A palavra *Ixora* origina-se do sânscrito e

significa: mestre ou príncipe (www.geocities.com/tatico-2000). A raiz é dita possuir algum amargor e é utilizada pelos nativos da Índia para curar dores de dentes.

A *Ixora coccinea* de origem das Índias Orientais, foi introduzida no Brasil em 1809, através de D. João VI que, neste ano, durante a invasão da Guiana Francesa ganhou a posse do Jardim de Aclimação da Guiana chamado La Gabrielle. Isto facilitou bastante o desenvolvimento do horto botânico do Pará (DICIONÁRIO HISTÓRICO-BIOGEOGRÁFICO DAS CIÊNCIAS DA SAÚDE NO BRASIL, 2004), pois se podiam adquirir plantas exóticas a qualquer instante, sem mais precisar agir na clandestinidade.

O primeiro envio de espécies para Belém foi realizado no final de 1809, por Joseph Martin, administrador de La Gabrielle, que assinou a lista de plantas e as instruções para o plantio. No total, 82 espécies de várias plantas foram embarcadas em seis caixas.

Com a criação do Real Horto, em 1808, no Rio de Janeiro, e a instalação, em 1811, do Horto em Olinda, consolidou-se a rota de remessas de plantas que eram enviadas de Caiena para o Pará, e daí para os demais hortos da América Portuguesa. Essas remessas de plantas eram bens econômicos extremamente valiosos, tendo em vista sua cotação no mercado. A *Ixora coccinea* foi uma das várias espécies de plantas cultivadas pelos franceses em Caiena, que veio para o Brasil. Esta planta rapidamente se adaptou e passou a ocupar lugar de destaque nos jardins, em razão de permanecer florida por quase a metade do ano (BARROSO *et al*, 1991).

1.3. Cultivo

O gênero *Ixora* apresenta-se como arbustos lenhosos, eretos, pouco ramificados que atingem 1,5 a 2,5 m de altura, com ramagem densa e florescimento vistoso (LORENZI *et al*, 1995). Possuem folhas coriáceas e verdes claras; inflorescências terminais longas, eretas, grandes com numerosas flores e cores variadas. A espécie *Ixora coccinea* apresenta flores alaranjadas na variedade mais antiga. As flores formam-se durante a primavera-verão, são muito duráveis e visitadas por beija-flores e borboletas (Figura 1).

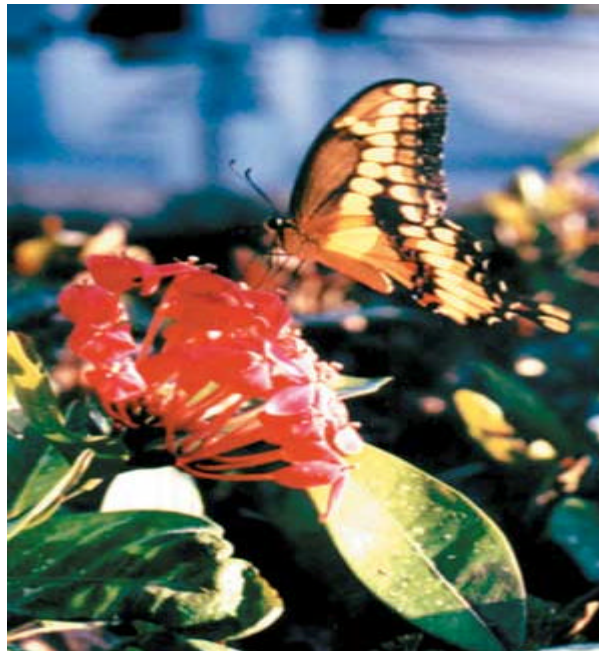


Figura 1: *Ixora coccinea* sendo visitada por uma borboleta

Esta planta adapta-se bem às regiões de clima subtropical e meia-sombra nas regiões mais quentes, já que é sensível a geadas e ao frio intenso. Nos invernos rigorosos, chegam a perder as folhas.

O gênero *Ixora* pode ser cultivado isoladamente, em grupos ou renques (Figura 2), a pleno sol e em terra fértil. Sua multiplicação é feita por estacas enraizadas em ambiente protegido e úmido.

O solo ideal deve receber drenagem e uma boa dose de composto orgânico ou esterco curtido por ocasião do plantio. Uma adubação com farinha de osso, por volta do mês de setembro, ajuda num bom florescimento, principalmente nas mudas mais antigas.

Face ao porte esguio e longa duração das flores, as espécies do gênero *Ixora* são ideais para a formação de cercas vivas ornamentais. Sua propagação é feita através de estacas obtidas durante a poda. As estacas são difíceis de enraizar, devendo-se empregar hormônio enraizador para aumentar as chances de sucesso.

O enraizamento é feito à sombra, em recipiente com areia e recoberto com plástico transparente. Este gênero é facilmente infestado por cochonilhas, um tipo de inseto que ataca ramos e dorsos das folhas. O surgimento deste inseto é controlado com aplicações semanais de calda de fumo com sabão de coco.

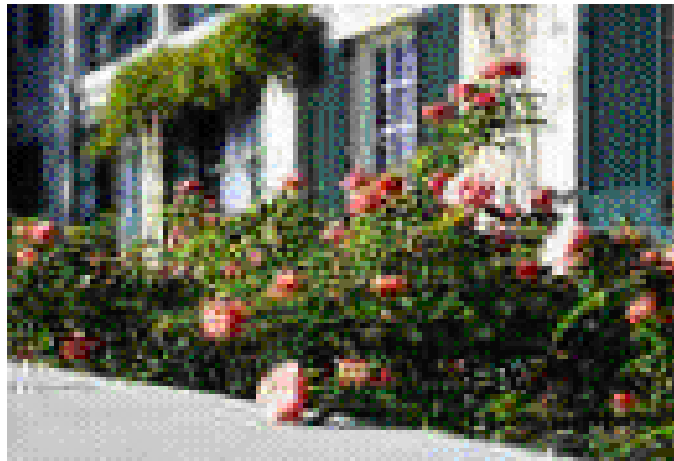


Figura 2: Renque de *Ixora coccinea* Linn.

1.4. Considerações Botânicas

A *Ixora coccinea*, vulgarmente conhecida como ixora, ixora-coral, equisósea, gerânio selvagem, fogo selvagem ou louro de jardim é um arbusto que atinge até 2,5 m de altura, nativa das Índias Orientais, pertence a família Rubiaceae e possui os sinônimos *Ixora bandhuca* Roxbg e *Ixora grandiflora* Ker-Gawl (LORENZI *et al*, 1995).

Segundo a classificação de Robbrecht (JOLY *et al*, 2002), a *Ixora coccinea* Linn possui como taxonomia a seguinte linhagem:

Eucariota

Reino: Viridiplantae

Divisão: Streptophyta

Grupos: Charophyta

Embriophyta

Filo: Embriophyta [fanerógama (órgãos reprodutivos evidentes), angiosperma (sementes contidas no fruto)]

Classes: Traqueophyta

Eufilophyta

Espermatophyta

Magnoliatae (eudicoledonea, core eudicotes)

Subclasse: Asteridae (euasterídios I)

Ordem: Gentiales

Família: Rubiaceae
 Subfamília: Ixoroideae
 Tribo: Paveteae
 Gênero: *Ixora*
 Espécie: *coccinea*-Linn

A subclasse Asteridae é a mais derivada das dicotiledôneas, a qual contém 11 ordens, 49 famílias e 60.000 espécies.

Muitos membros desta subclasse são farmacologicamente importantes. Plantas da família Apocynaceae, por exemplo, forneceram os compostos vimblastina e vincristina, dois potentes agentes quimioterápicos contra o câncer. Doenças cardíacas são tratadas com glicosídeos extraídos de *Digitalis* (Scrophulariaceae), estes compostos fazem o músculo bater mais devagar e com maior força, melhorando a circulação. Já o gênero *Cinchona* (Rubiaceae) contém quinino, que é uma substância que atua como agente antimalárico.

A família Rubiaceae compreende cerca de 500 gêneros e aproximadamente 7.000 espécies, sendo, portanto, uma das maiores famílias de angiospermas. Estão distribuídas em todo o mundo, ocorrendo tanto nas regiões frias como nas zonas temperadas e tropicais. São plantas de hábito muito variado, vão desde ervas, arbustos, subarbustos, árvores até trepadeiras, com folhas opostas ou verticiladas, sempre com estipulas interpeciolares muito características e inteiras.

Exemplo comum desta família é a *Genipa*, o gênero do conhecido jenipapo com frutos do tamanho de uma laranja com polpa comestível, comum na região Nordeste do Brasil. Outro exemplo é *Coffea*, gênero nativo da África, com uma espécie extensamente cultivada entre nós. Dentre as flores destacam-se a gardênia (*Gardenia*), jasmim-do-cabo e ixora, com suas inflorescências arredondadas de cores variadas e vistosas, e frequentemente encontradas nos jardins (BREMER *et al*, 2000).

Bremer e Andreassen (2000) em seu estudo filogenético da subfamília Ixoroideae propuseram uma mudança na classificação taxonômica de Robbrecht, onde o g *Ixora* deveria ser excluído da tribo *Pavetae* e incluído na tribo *Ixoreae*. A proposta da mudança na classificação foi baseada nos dados obtidos, pelas pesquisadoras, a partir da morfologia, mapeamento de restrição do cpDNA (DNA do cloroplasto), e o sequenciamento do gene *rbcL* e da transcrição do DNA ribossomal.

1.5. Considerações Químicas e Farmacológicas

A literatura mostra inúmeros trabalhos envolvendo o gênero *Ixora* no que diz respeito à propagação do gênero (FRANCIS, 2003; JAIN, 1981; KWACK, 1980; LA KSHMAMAN, 1997; NEEL,.; DOLSELMAN, 1978; RAUCH, 1980; SALGARE, 1997; SING, 1979; TJIA, 1988), controle de pragas (CABRERA, 2001; DEVI, 1991; NEEL, 1976, 1978, 1979; UMAPATHI, 1979), investigações nas áreas de química inorgânica (TIKKU, 1990) e fisiologia vegetal (DAVE, 1991; REDDY, 1979, 1980, 1981). Por outro lado, existem estudos fitoquímicos, que mostraram a presença de terpenóides (REENA, 1994; TAKEDA, 1975), flavonóides (CHAUHAN, 1982, 1984, 1996; VIMALA, 1997) e alcalóides (CANNON, 1980; SIRIRUGSA, 1980; SMOLENSKI, 1975), como principais classes de compostos bioativos presentes em plantas do gênero *Ixora*. As análises biológicas feitas, até o momento, com extratos das diversas partes das plantas dessa espécie não mencionam a quais princípios ativos estariam relacionadas as atividades biológicas estudadas.

Os relatos na literatura indicam as atividades: antimicrobiana (JOHN, 1984), anticarcinogênica oral (PANIKKAR, 1986), antitumoral (LATHA, 1998) e quimioprotetora (LATHA, 2001), para o extrato hexânico das flores da *Ixora coccinea* Linn (coletadas em Thiruvanathapuram-Índia). A atividade antimicrobiana também foi detectada nos extratos metanólico e etér-etílico das folhas desta espécie na Índia (ANNAPURNA, 2003).

Os trabalhos fitoquímicos relatados para a *Ixora coccinea* Linn, mostraram a presença de açúcares nas flores (ROWLEY, 1976), do triterpeno lupeol nas folhas (REENA, 1994) e do ácido Δ^{9-11} -octadecadienóico e manitol nas raízes (KARTHA, 1943).

A importância do lupeol encontra-se amplamente descrita na literatura por suas atividades antiinflamatória (FERNANDEZ, M.A.; De La Heras, B., 2001; FERNANDEZ, M.A.; ALVAREZ, A., 2001; GEETHA, 2001; NIKIEMA, 2001), antitumoral (LEE, 1980; SALEEM, 2001), antimicrobiana (HERNANDEZ, 1994) e anti-artrite (GEETHA, 1999).

1.6. Compilação dos Dados Etnofarmacológicos para o Gênero *Ixora*

Embora o cultivo do gênero *Ixora* seja praticado no Brasil há 2 séculos, com uso estritamente ornamental principalmente nos estados de clima quente, os povos orientais utilizam-no por muito mais tempo com fins medicinais de uso popular.

O levantamento bibliográfico realizado através do programa Natural Products ALERT (NAPRALERT, 2001), permitiu uma sistematização das indicações etnofarmacológicas, sendo que as flores da espécie *Ixora coccinea* são utilizadas na Índia para o combate aos piolhos e suas raízes para as dermatites. No Sri Lanka as flores desta espécie são utilizadas no tratamento de desinteria, problemas estomacais e estado catarral.

As indicações etnofarmacológicas, para este gênero, encontradas na literatura estão relacionadas na Tabela 1 e na página 13 encontram-se listados a correlação entre a numeração citada e as respectivas referências bibliográficas.

1.7. Sistematização das Atividades Biológicas Detectadas nos Extratos do Gênero *Ixora*

Diversas espécies do gênero *Ixora* são amplamente utilizadas na medicina popular, fato este que motivou o interesse de pesquisadores farmacêuticos e biólogos que vem ampliando o conhecimento deste gênero, tendo um destaque maior a ação farmacológica das partes aéreas das plantas que foram investigadas. (Tabelas 2, 3 e 4).

O uso das sementes, das plantas deste gênero, parece ser comum no Oriente. No entanto, observou-se num estudo de 6 anos de duração, que as sementes da espécie *coccinea*, no *campus* da Universidade Rural, são difíceis de ocorrer.

As Tabelas 2 a 4 mostram diversas atividades farmacológicas que foram encontradas principalmente através do programa Natural Products ALERT (NAPRALERT, 2001), em diferentes espécies do gênero *Ixora*. Dentre elas pode-se destacar as atividades antibacteriana, antiviral e antitumoral.

1.8. Compilação Literária dos Metabólitos Detectados no Gênero *Ixora*

Embora o gênero *Ixora* seja rico em estudos etnofarmacológicos e detenha relatos de comprovada ação biológica de extratos de diversas partes da planta, poucos são os relatos fitoquímicos das espécies deste gênero. O levantamento bibliográfico dos metabólitos encontrados, segundo uma sistematização do NAPRALERT (2001), estão listados na Tabela 5. Apesar da literatura mostrar esses diversos estudos para a *Ixora coccinea*, poucos são os relatos de investigação fitoquímica realizada com esta espécie, incluindo um levantamento bibliográfico no período de 1791-2004.

Tabela 1- Indicações etnofarmacológicas dos extratos de espécies do gênero *Ixora*.

ESPÉCIE	ORIGEM	PARTES	EXTRATO	USOS
<i>coccinea</i> ¹	Índia	Flores secas	Em concomitância com <i>Saraca indica</i> ou <i>Nigella sativa</i> , H ₂ O quente	Piolhos
<i>coccinea</i> ²	Sri Lanka	Flores secas	H ₂ O quente	Catarro, desintéria e estômago
<i>coccinea</i> ¹	Índia	Raízes secas	Pasta em concomitância com <i>Ixora rubia cordifolia</i> e óleo de coco	dermatites
<i>parviflora</i> ²	Índia	Flores secas	H ₂ O quente	Dor de dentes
<i>parviflora</i> ³	Índia	Frutos secos	-----	Diurético e anti-helmintico comestível
<i>acuminata</i> ⁴	Índia	Flores e folhas	H ₂ O quente	Ciclo menstrual irregular e purificação do sangue
<i>subsessilis</i> ⁴	Índia	Flores, folhas e galhos	-----	Tempero culinário
<i>arborea</i> ⁵	Índia	Folhas	suco	Doenças bucais, usado para rinsar a cavidade bucal
<i>cibdela</i> ⁶	Tailândia	Folhas secas	Não declarado, sendo que as raízes não são usadas	leproses
<i>grandifolia</i> ⁷	Malásia	folhas	-----	Comido no princípio do trabalho de parto para abreviá-lo
<i>alba</i> ⁸	Filipinas	Galhos	H ₂ O quente	Desintéria e diarreia
<i>lobbi</i> ⁷	Malásia	Raízes	H ₂ O quente	Ingerido durante e depois que a criança nasce
<i>species</i> ⁹	Bangladesh	Raízes frescas	suco	Parar o sangramento pós-natal
<i>chinensis</i> ⁷	Malásia	Raízes	H ₂ O quente	Ingerido por crianças recém-nascidas
<i>chinensis</i> ¹⁰	China	Planta inteira	H ₂ O quente	emenagogo
<i>finlaysoniana</i> ¹¹	Tailândia	Planta inteira	H ₂ O quente	Fortificante, energético medicinal

Tabela 2- Atividades biológicas apresentadas pelos extratos hidro-alcóolicos (1:1) de espécies do gênero *Ixora*.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS	FONTES BIBLIOGRÁFICAS
Analgesia (<i>in vivo</i>)	12, 13, 14
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Bacillus subtilis</i>	12, 15, 16, 17, 18, 19
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Escherichia coli</i>	12, 15, 16, 17, 18, 19
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Salmonella typhosa</i>	12, 17, 18
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Staphylococcus albus</i>	12, 17, 18
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Staphylococcus aureus</i>	12, 14, 16, 17, 18, 19
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Proteus species</i>	18
Antibacteriana (<i>in vitro</i>) <i>Shigella dysenteriae</i>	17, 18
Anticonvulsiva (<i>in vivo</i>)	12, 14
Antifúngica (<i>in vitro</i>) <i>Microsporum canis</i>	12
Antifúngica (<i>in vitro</i>) <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	12
Antifúngica (<i>in vitro</i>) <i>Aspergillus niger</i>	12
Antiinflamatória (<i>in vivo</i>) Indução com carrageenin	12
Antiespasmódica (<i>in vivo</i>) Indução com histamina	12, 16, 19
Antifermentativa (<i>in vitro</i>) <i>Cândida albicans</i>	12, 17
Antifermentativa (<i>in vitro</i>) <i>Cryptococcus neoformans</i>	12, 17
Antiviral (<i>in vitro</i>) <i>Virus-vaccinia</i>	12, 16, 19
Cicatrizante	16

Tabela 3- Continuação das atividades biológicas detectadas nos extratos hidro-alcóolicos (1:1) de espécies do gênero *Ixora*.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS	FONTES BIBLIOGRÁFICAS
Antimutagênica (<i>in vitro</i>) <i>Samonella typhimurium</i> TA98	20
Antiprotozoário (<i>in vitro</i>) <i>Entamoeba histolytica</i>	14
Antitranspirante (humano)	21
Antitumoral (<i>in vivo</i>) <i>Sarcoma</i> 180(ASC)	22, 23
Antitumoral (<i>in vivo</i>) CA-Ehrlich-ascites	22, 23
Antitumoral (<i>in vivo</i>) <i>Lymphoma</i> -Dalton's	22, 23
Antitumoral (<i>in vivo</i>) LEUK-P388	24
Antitranspirante (<i>in vivo</i> em humanos)	21
Antiviral (<i>in vitro</i>) <i>Vírus-ranikhet</i>	14, 19
Antiviral (<i>in vitro</i>) <i>Vírus vaccinia</i>	14, 19
Barbiturica (<i>in vivo</i>)	12, 16, 19
Citotóxica (<i>in vitro</i>) CA-9KB	14, 19, 24, 25
Citotóxica (<i>in vitro</i>) <i>Sarcoma</i> -180	19, 26
Citotóxica (<i>in vitro</i>) LEUK-K562	22, 23, 26
Citotóxica (<i>in vitro</i>) <i>Lymphoma</i> -Dalton's	22, 23, 26
Citotóxica (<i>in vitro</i>) CA-Ehrlich-ascites	22, 23, 26
Citotóxica (<i>in vitro</i>) <i>Lymphocytes</i>	22, 23
Citotóxica (<i>in vitro</i>) CA-nasopharyngeal	14
Coagulação de semem (<i>humano</i>)	12, 16, 19
Diurética (<i>in vivo</i>)	12, 14

Tabela 4- Continuação das atividades biológicas detectadas nos extratos hidro-alcóolicos (1:1) de espécies do gênero *Ixora*.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS	FONTES BIBLIOGRÁFICAS
Efeito da estabilização da membrana lisossômica (<i>in vivo</i>)	27
Efeito abortificante (<i>in vivo</i>)	28
Efeito antiimplantação (<i>in vivo</i>)	28
Efeito estrogênico (<i>in vivo</i>)	28
Efeito antiestrogênico (<i>in vivo</i>)	28
Efeito inotrópico positivo (<i>in vivo</i>)	29
Espemicida (<i>in vivo</i>)	12, 16, 19
Espasmolítica (<i>in vivo</i>)	14
Hipoglicêmica (<i>in vivo</i>)	12
Hipotérmica (<i>in vivo</i>)	12, 14
Inibição da síntese de DNA (<i>in vitro</i>) <i>Lymphoma-Dalton's</i>	22, 23
Inibição carcinogênica (<i>in vivo</i>) indução com benzeno	22, 23
Inibição carcinogênica (<i>in vivo</i>) Indução com metilcolantreno	22, 23
Inibição da enzima ácido fosfatase (<i>in vivo</i>)	12, 16, 27
Inibição do glutamato-oxaloacetato-transaminase (<i>in vivo</i>)	12, 16, 27
Inibição do glutamato-piruvato-transaminase (<i>in vivo</i>)	12, 16, 27
Inibição da síntese de proteínas (<i>in vivo</i>)	12, 16
Inseticida (<i>humano</i>)	30
Nemaltelmíntia (<i>in vitro</i>)	31
Quimioterapêutica (<i>in vivo</i>) Indução com cisplatina	32

Tabela 5- Metabólitos especiais identificados de várias espécies do gênero *Ixora*.

ESPÉCIE	ORIGEM	PARTE USADA	METABÓLITOS ENCONTRADOS
<i>coccinea</i> ³³	Filipinas	flores	Glicose, frutose, sacarose e maltose
<i>coccinea</i> ³⁴	Índia	folhas	Lupeol
<i>coccinea</i> ³⁵	Índia	raízes frescas	Ácido Δ^{9-11} -octadecadienoico e manitol
<i>chinensis</i> ³⁶	China	folhas + sementes	Ácido geniposídico, ixorosídico e ixosídico
<i>chinensis</i> ³⁷	China	sementes - óleo	Ácido crepenico e ácido ixórico
<i>finlaysoniana</i> ³³	Filipinas	flores	Glicose, frutose e sacarose
<i>finlaysoniana</i> ³⁸	Índia	Não especificado	Apigenin-4'-O- β -D-glucopiranosídeo, 11-hidroxi-5-en-dodeca-2-ona
<i>javanica</i> ²³	Índia	flores	Ácido cafeico, ácido ferulico, ácido pirocatechuico
<i>brachiata</i> ²⁸	Índia	flores	Luteolin-4'-O-neohesperidosídeo
<i>dolichophylla</i> ³⁹	Tailândia	folhas e galhos	Alcalóides: prospecção
<i>chinensis</i> ³³	Filipinas	flores	Glicose, frutose, sacarose e maltose
<i>alba</i> ⁸	Filipinas	galho	Estigmaterol
<i>arborea</i> ⁴⁰⁻⁴¹	Índia	galho	Apigenin-5-O-beta-D-Galactopiranosose e chrisin-5-O-beta-D-xilopiranosídeo
<i>arborea</i> ⁴²	Índia	partes aéreas	Taninos
<i>parviflora</i> ⁴³	Índia	sementes	Ácido arachídico, ácido behênico, ácido capríco, ácido laurico, ácido linoleico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmítico e ácido esteárico
<i>parviflora</i> ⁴⁴	Paquistão	sementes	Ácido aspártico, cisteína, glicina, prolina e serina, álcool cerílico, beta-sitosterol
<i>parviflora</i> ⁴⁴	Paquistão	partes aéreas	Scoparone
<i>nigricans</i> ⁴⁵	Índia	sementes	Ácidos graxos
<i>nigricans</i> ⁴²	Índia	partes aéreas	Tanino
<i>bauchiensis</i> ⁴⁶	Congo	raízes	Saponinas e taninos: prospecção
<i>species</i> ⁴⁷	EUA	raízes	Alcalóides: prospecção
<i>undulata</i> ⁴⁸	Índia	raízes	Flavonóides e taninos: prospecção

FONTES BIBLIOGRÁFICAS CITADAS NAS TABELAS 1, 2, 3, 4 e 5

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1- JONH <i>et al</i> , 1984 | 25- UNPUBLISHED DATA, 1976 |
| 2- ARSECULERATNE <i>et al</i> , 1985 | 26- NAIR; PANIKKAR <i>et al</i> , 1991 |
| 3- KHAN <i>et al</i> , 1984 | 27- VIMALA <i>et al</i> , 1997 |
| 4- MAIKHURI <i>et al</i> , 1993 | 28- SINGH <i>et al</i> , 1993 |
| 5- REDDY <i>et al</i> , 1989 | 29- CARBAJAL <i>et al</i> , 1991 |
| 6- WASUWAT <i>et al</i> , 1967 | 30- MENON <i>et al</i> , 1980 |
| 7- BURKILL <i>et al</i> , 1966 | 31- KIUCHI <i>et al</i> , 1989 |
| 8- VILLEGAS <i>et al</i> , 1986 | 32- LATHA <i>et al</i> , 2001 |
| 9- ALAM <i>et al</i> , 1992 | 33- ROWLEY <i>et al</i> , 1976 |
| 10- KONG <i>et al</i> , 1976 | 34- REENA <i>et al</i> , 1994 |
| 11- ANDERSON <i>et al</i> , 1986 | 35- KARTHA <i>et al</i> , 1943 |
| 12- DHAWAN <i>et al</i> , 1977 | 36- TAKEDA <i>et al</i> , 1975 |
| 13- PATNAIK <i>et al</i> , 1988 | 37- MINQUAN <i>et al</i> , 1990 |
| 14- BHAKUNI <i>et al</i> , 1988 | 38- CHAUHAN <i>et al</i> , 1996 |
| 15- SASIDHARAN <i>et al</i> , 1997 | 39- CANNON <i>et al</i> , 1980 |
| 16- NAYAK <i>et al</i> , 1999 | 40- CHAUHAN <i>et al</i> , 1982 |
| 17- AVIRUTNANT <i>et al</i> , 1983 | 41- CHAUHAN <i>et al</i> , 1984 |
| 18- OGUNLANA <i>et al</i> , 1975 | 42- ATAL <i>et al</i> , 1978 |
| 19- BHAKUNI <i>et al</i> , 1971 | 43- DAULATABAD <i>et al</i> , 1982 |
| 20- WALL <i>et al</i> , 1988 | 44- KAPADIA <i>et al</i> , 1988 |
| 21- FITZPATRICK <i>et al</i> , 1986 | 45- KITTUR <i>et al</i> , 1983 |
| 22- NAIR, S.C. <i>et al</i> , 1991 | 46- CABALION <i>et al</i> , 1980 |
| 23- NAIR <i>et al</i> , 1990 | 47- SMOLENSKI <i>et al</i> , 1975 |
| 24- ASWAL <i>et al</i> , 1984 | 48- SAXENA <i>et al</i> , 1975 |

2. OBJETIVOS

- ✧ Contribuir para o conhecimento fitoquímico da *Ixora coccinea* Linn, através do isolamento, identificação e caracterização de componentes majoritários e minoritários provenientes do extrato metanólico das flores.

- ✧ Obter por metodologia específica o ácido carboxílico do extrato metanólico das flores desta espécie.

- ✧ Isolar e identificar os componentes majoritários e minoritários oriundos dos extratos hexânico e clorofórmico das folhas de *Ixora coccinea*.

- ✧ Analisar por prospecção os constituintes micromoleculares dos extratos hidroalcoólicos das flores, folhas, galhos e raízes de *Ixora coccinea*, objetivando um conhecimento analítico dos possíveis metabólitos existentes nestas partes da planta.

- ✧ Avaliar as atividades antiinflamatórias, analgésicas e antinociceptivas dos extratos hidroalcoólicos dos galhos, raízes, folhas e flores de *Ixora coccinea* Linn.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentos Utilizados

3.1.1. Moinho elétrico

O moinho elétrico utilizado neste trabalho possui duas facas em hélice com lâminas opostas, sentido horário e peneira com granulometria de 4 mm, marca Vencedora – Máquinas Agrícolas Ltda – MOD.V.611 N° 60482 série VF 1AO2.

3.1.2. Ponto de fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas, foram obtidos em um bloco Kofler (Reichert – Áustria – Nr 334317), constituído de uma placa aquecedora de Reicherd, acoplada a um microscópio, possuindo um termômetro aferido de -5° a 360°C, e os resultados obtidos não foram corrigidos.

3.1.3. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas (CG - EM)

As frações apolares foram analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM). Os compostos foram identificados através da comparação de seus espectros de massas (obtidos por impacto de elétrons) com espectros de padrões e com a espectroteca da Wiley. Foi utilizado um cromatógrafo a gás HP-5890, com coluna capilar de sílica fundida e fase DB-5 (com L= 15 m, $D_i = 0,25$ mm, $D_f = 0,25$ μ m). As análises de espectrometria de massas foram realizadas em aparelho HP5897A, conectados a um cromatógrafo a gás HP5880, utilizando analisador quadrupolo, 70eV (varredura de 40 a 600 u.m.a.), por impacto de elétrons e a mesma coluna. Temperaturas do injetor e do detector: 270°C e 300°C, respectivamente. Injeção em modo “splitless”. O gás de arraste do cromatógrafo: H₂ a 2mL/min e He a 0,5 mL/min (no EM). O forno do cromatógrafo utilizou a seguinte programação: 80°C a 290°C a uma taxa de 8°C/min seguida de isoterma a 290°C por 30 min.

Foi utilizado também um cromatógrafo a gás HP-5890, com coluna capilar de sílica fundida e fase PONA (com L= 25 m, $D_i = 0,20$ mm, $d_f = 0,50$ μ m). As análises de espectrometria de massas foram realizadas em aparelho SATURN 2000, utilizando analisador ON TRAP, 70eV (varredura de 40 a 600 u.m.a.), por impacto de elétrons e coluna CP-SIL8CB (L= 30m, $D_i = 0,25$ mm, $d_f = 0,25$ μ m). Temperaturas do injetor e do detector: 270°C e 290°C (190°C/min – 10°C/min – 290°C/20min), respectivamente. Injeção em modo “split”. O forno do cromatógrafo utilizou a seguinte programação: 60°C a 220°C.

3.1.4. Espectrometria de Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1605 série 1600 FT-IR com transformada de Fourier, em pastilhas de brometo de potássio.

3.1.5. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e de carbono (RMN de ¹³C) foram registrados em espectrômetros Varian Gemini-300 (300 MHz), Bruker AC-400 (400MHz) e Bruker AC-200 (200MHz). Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl₃), metanol deuterado (CD₃OD) e água deuterada (D₂O), utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

3.1.6. Cromatografia de camada fina (CCF)

As cromatografias em camada fina ou analítica, foram realizadas em sílica gel PF₂₅₄ da Merck, sobre suporte de vidro ou alumínio (espessura de 0,25 mm). A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada ultravioleta (254 e 356 nm), e utilizando

como reveladores: vapores de iodo, solução de vanilina, ácido sulfúrico-metanol (5:5), reagente Dragendorff e solução de cloreto férrico.

3.2. Metodologias Gerais

3.2.1. Reconhecimento botânico

A espécie foi coletada por Tatiane Rocha Pereira, aluna do Curso de Agronomia, no Jardim Botânico da UFRRJ, e identificada pela professora Maria Mercedes Rosa, do Departamento de Botânica da UFRRJ (I.B.). Uma excicata de nº 4243 encontra-se depositada no herbário do I.B da UFRRJ.

3.2.2. Coleta e moagem

O material vegetal utilizado neste trabalho, foi coletado no Jardim Botânico da UFRRJ no horário de 8 às 12 horas. As flores foram colhidas em 14 de dezembro de 1998, e as folhas galhos e raízes em 05 de julho de 2000.

As flores foram usadas *in natura* e picadas com tesoura comum, obtendo-se 315g de material vegetal.

As folhas, galhos e raízes foram secas previamente para desidratação em local sombreado, arejado e isento de umidade. Posteriormente foram moídos em moinho elétrico, obtendo-se como material vegetal seco e triturado: 865g de folhas; 731,27g de galhos e 452,92g de raízes.

3.2.3. Obtenção de extrato bruto (EB) por técnica de maceração

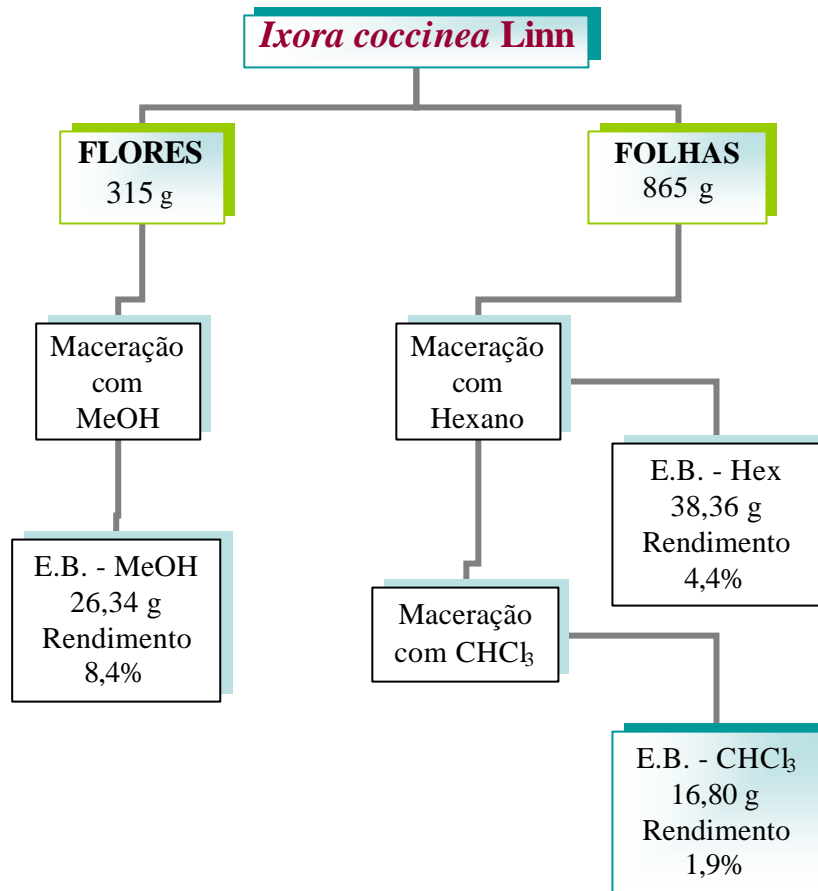
Os materiais vegetais da *Ixora* foram submetidos à extração via maceração utilizando-se um único solvente de alta polaridade, como o metanol, ou solventes em gradiente de polaridade, como hexano, clorofórmio e metanol, um por vez, a fim de que estes extraíssem o máximo das substâncias contidas na planta, como mostrado no esquema 1.

Nas extrações efetuadas utilizou-se um balão de fundo chato de 6L, onde se adicionou primeiro o material vegetal em seguida 1,5L do solvente eleito; na seqüência dos processos de filtração e concentração do solvente à vácuo, mais solvente foi sendo adicionado.

Após 24 horas da adição dos primeiros 1,5L do solvente iniciou-se a primeira filtração do processo de maceração.

O sistema montado para a filtração consistiu em um suporte onde, a este se acoplou uma mufa que sustentava um funil de sólido. A parte inferior do funil foi vedada com algodão, com a finalidade de não deixar passar grão do material vegetal, evitando assim, uma contaminação do material filtrado. Para o recolhimento do material filtrado utilizou-se Becher de 500mL. Repetiu-se o mesmo procedimento em intervalos de 24 em 24h, até que o filtrado não apresentasse coloração forte. O material filtrado neste período foi submetido a várias evaporações à pressão reduzida fornecendo o extrato bruto do solvente utilizado (EB-solvente utilizado). O extrato foi transferido do balão para um Becher, coberto com gaze, para evitar que algum corpo estranho se deposita-se, e posto para secar em temperatura ambiente ou em capela. Recomenda-se o armazenamento por um período longo deste extrato em geladeira, para evitar a proliferação de fungos.

Esquema 1. Quadro geral das quantidades de extratos e seus respectivos percentuais para cada parte da planta.



3.2.4. Preparo da pastilha

Após a obtenção de cada extrato bruto seco e pesado o próximo passo foi a confecção de pastilhas para serem utilizadas em um sistema cromatográfico. A pastilha foi preparada adicionando-se um pouco de hexano, por exemplo, ao extrato bruto do material vegetal, que sendo um solvente de baixa polaridade, dissolveu parte do extrato. Em seguida adicionou-se a sílica (de mesma granulometria a ser utilizada no sistema cromatográfico), aos poucos até a obtenção de grãos ligeiramente úmidos e com aspecto “esfarelado”.

O Becher contendo a pastilha foi tampado com gaze para evitar que algum corpo estranho o contaminasse, na seqüência, deixou-se que o solvente utilizado no preparo da pastilha fosse evaporado (24h de repouso). Posteriormente, preparou-se o sistema cromatográfico adequado.

3.2.5. Montagem do sistema cromatográfico de coluna aberta por empacotamento úmido

Após a obtenção da pastilha, preparou-se a coluna cromatográfica em sistema aberto, obedecendo a seguinte ordem: com o auxílio de um bastão de vidro colocou-se um algodão no fundo da coluna umedecido com solvente, (geralmente um bem pouco polar, ou o primeiro eluente eleito no sistema de eluição), em seguida adicionou-se aos poucos uma suspensão (uma papa) feita com o solvente eleito e sílica. A granulometria da sílica foi a mesma utilizada no preparo da pastilha. A suspensão foi adicionada na coluna através de um funil de sólido. Este processo foi repetido até que a sílica chegasse a menos da metade da altura da coluna.

Depois, adicionou-se mais solvente, a torneira da coluna foi aberta para que o eluente corresse através da sílica deixando-a homogênea. Colocou-se a pastilha feita do extrato bruto, e um algodão em cima da pastilha. Completou-se a coluna com solvente. O procedimento acima descrito é o que se designa como empacotamento úmido, pois a sílica é posta dentro coluna como uma papa, caso contrário seria um empacotamento seco. O solvente utilizado foi reaproveitado no processo de alimentação da cromatografia de coluna por gravidade ou aberta.

3.2.6. Montagem do sistema cromatográfico de coluna aberta por empacotamento úmido com anéis de carvão ativado

A técnica de empacotamento úmido com anéis de carvão ativado foi a mesma que a descrita no empacotamento úmido (item 3.2.3), a utilização do carvão ativo permite que se retenha um pouco a quantidade de clorofila e impurezas contidas na pastilha, no entanto, sua quantidade deve ser mínima, para que não retenha também metabólitos de maiores pesos moleculares. Inicialmente adicionou-se cerca de um terço da suspensão de sílica, em seguida alguns miligramas de carvão ativo, abriu-se a torneira da coluna e deixou-se que o hexano corresse bastante para que o anel ficasse bem assentado sobre a sílica. A operação foi repetida até que se formassem os dois ou três anéis, terminando com uma camada de suspensão de gel de sílica, conforme mostra a Figura 3.

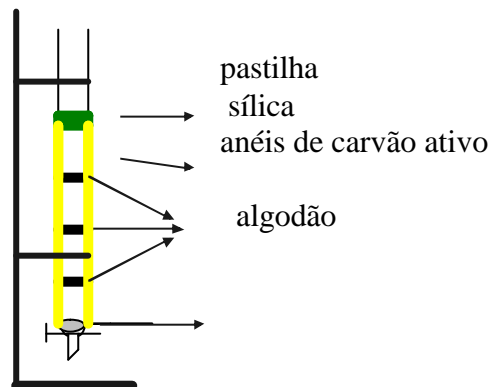


Figura 3. Esquema de montagem da coluna cromatográfica em sistema aberto utilizando empacotamento úmido com anéis de carvão ativado.

3.2.7. Obtenção de derivados

3.2.7.1. Esterificação com diazometano

Para metilar um metabólito qualquer com o diazometano, inicia-se preparando uma solução de hidróxido de potássio alcoólico (0,4 g de hidróxido de potássio dissolvidos em 10 mL de etanol. Coloca-se um balão em banho de gelo com 2,14 g de Diazald (N-nitrosotoluol-4-sulfometilamida) e adiciona-se 30mL de éter etílico. Após a solubilização adiciona-se lentamente a solução de potassa alcoólica. Tapa-se o balão e deixa-se homogeneizar. Logo em seguida o balão é acoplado num sistema de condensação em banho-maria a 50°C, que faz parte do Kit (apropriado) Diazald e recolhe-se o destilado amarelo de diazometano condensado em banho de gelo.

Para metilar a amostra solubiliza-se primeiro em metanol, e então se adiciona o diazometano lentamente até que não borbulhe mais e a cor amarela do diazometano persista. Deixa-se em repouso a temperatura do ambiente até que todo o solvente tenha evaporado. Se a amostra estiver pura pode-se enviá-la para testes espectroscópicos, se não se utiliza métodos de purificação, como recristalização.

3.2.7.2- Acetilação com anidrido acético e piridina

Com a amostra seca adiona-se 1 mL de anidrido acético e 1 mL de piridina em um balão. Deixa-se agitando por 30 minutos. Após isto, a mistura fica em repouso à temperatura ambiente por 24 horas. Na sequência o balão é posto em banho de gelo e adiona-se 1 mL de água destilada. Ocorrendo precipitação, filtra-se e lava-se o material sólido com porções de 5 mL de água destilada para retirar a piridina. Não ocorrendo precipitação, adiciona-se mais 2 mL de água destilada. Extraí-se o derivado acetilado em funil de separação com clorofórmio (três porções de 10 a 20 mL, cada vez). Retira-se o excesso de piridina da fase orgânica adicionando-se HCl 1N (três porções de 5 mL de cada vez), separando a fase orgânica. Ajusta-se o pH da fase orgânica (que deve ficar abaixo de sete), adicionando-se tres porções de 10 mL de água destilada. Para garantir a neutralização do meio, retirando o excesso de ácido, adiciona-se na fase orgânica uma porção de 20 mL de bicarbonato de sódio a cinco por cento. Separa-se a fase orgânica e adiciona-se 20 mL de água destilada. Separa-se novamente a fase orgânica e adiciona-se sulfato de sódio anidro como secante e deixa-se repousar por uma hora. Filtra-se e o material acetilado que está pronto para ser enviado para ensaios espectroscópicos.

3.3. Parte Experimental de Flores de *Ixora coccinea*

3.3.1. Fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação

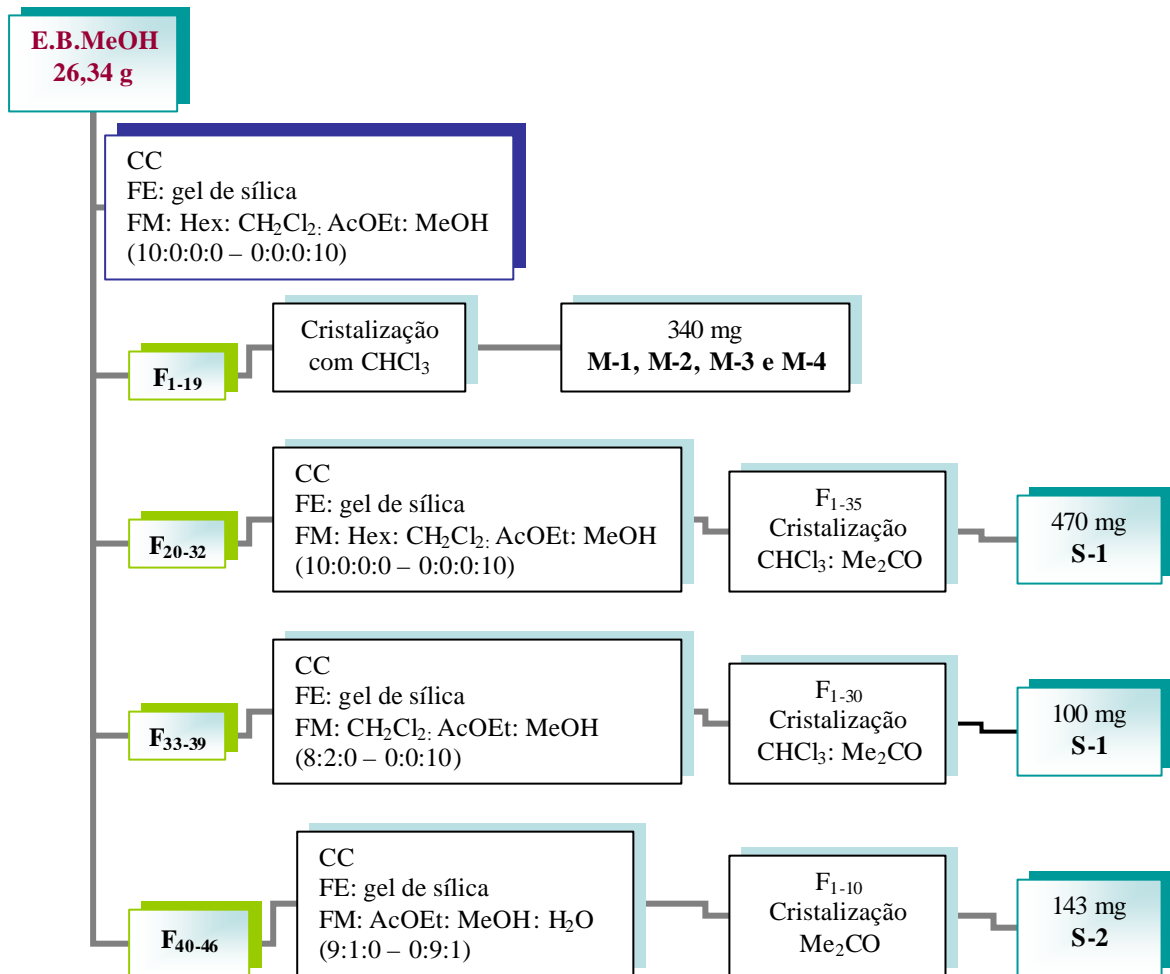
O extrato bruto metanólico das flores de *Ixora coccinea* (26,34g) foi submetido à cromatografia de coluna aberta, utilizando-se como adsorvente gel de sílica (35-70 Mesh) na fase fixa e para a fase móvel, foram utilizados como eluentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, constituindo um gradiente de polaridade para a obtenção das diferentes frações, perfazendo um total de 46 frações de 400mL cada. A análise preliminar das frações foi efetuada por cromatografia de camada fina (CCF) e permitiu que as 46 frações fossem reunidas em quatro grupos. Cada grupo, separadamente, foi submetido a procedimentos de purificação, conforme estão descritos abaixo e mostrado no Esquema 2.

O grupo de frações F₁₋₁₉ foi reunido, evaporado e o produto obtido foi recristalizado em clorofórmio, a temperatura ambiente, obtendo-se 340mg de um sólido amorfo. Posteriormente o material purificado foi analisado por IV e metilado para análise de CG-MS. Fornecendo as substâncias **M-1**, **M-2**, **M-3** e **M-4**.

Os grupos de frações F₂₀₋₃₂, F₃₃₋₃₉ e F₄₀₋₄₆ foram submetidos a procedimento cromatográfico em sílica gel (70-230 Mesh), utilizando: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água em gradiente de polaridade. Os grupos de frações F₂₀₋₃₂ e F₃₃₋₃₉ forneceram 35 frações de 15 mL e 30 frações de 50 mL cada, respectivamente. Os grupos de frações foram submetidos isoladamente a processos de recristalização em mistura de clorofórmio e acetona (5:5). Após análise comparativa por CCF dos dois grupos de frações, observou-se que mostraram-se ricas no metabólito **S-1**. As frações ricas neste metabólito foram reunidas e forneceram 470 mg e 100 mg para os grupos de frações F₂₀₋₃₂ e F₃₃₋₃₉. Obtendo-se, então, um total de 570 mg de uma substância de baixa polaridade, que após análise espectroscópica mostrou ser um ácido triterpênico (**S-1**). O material purificado foi analisado por IV, CG-EM, RMN de ¹H e de ¹³C.

O grupo de frações F₄₀₋₄₆ também foi submetido a procedimento cromatográfico fornecendo 10 frações de 200 mL cada fornecendo 143 mg de uma substância de alta polaridade, posteriormente recristalizado em acetona que após análise espectroscópica mostrou ser um açúcar (**S-2**).

Esquema 2- Esquema do fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação do E.B.-MeOH das flores de *Ixora coccinea* Linn.



3.3.2. Metodologia alternativa para a obtenção de ácidos carboxílicos

Para a extração do ácido triterpênico **S-1** utilizou-se um sistema de coluna aberta com o tratamento prévio da sílica gel (230-400 Mesh) com KOH 10% (p/v), com posterior secagem em estufa a $\pm 110^{\circ}\text{C}$ por 8 horas (PINTO *et al*, 2000 e JUNIOR *et al*, 2002).

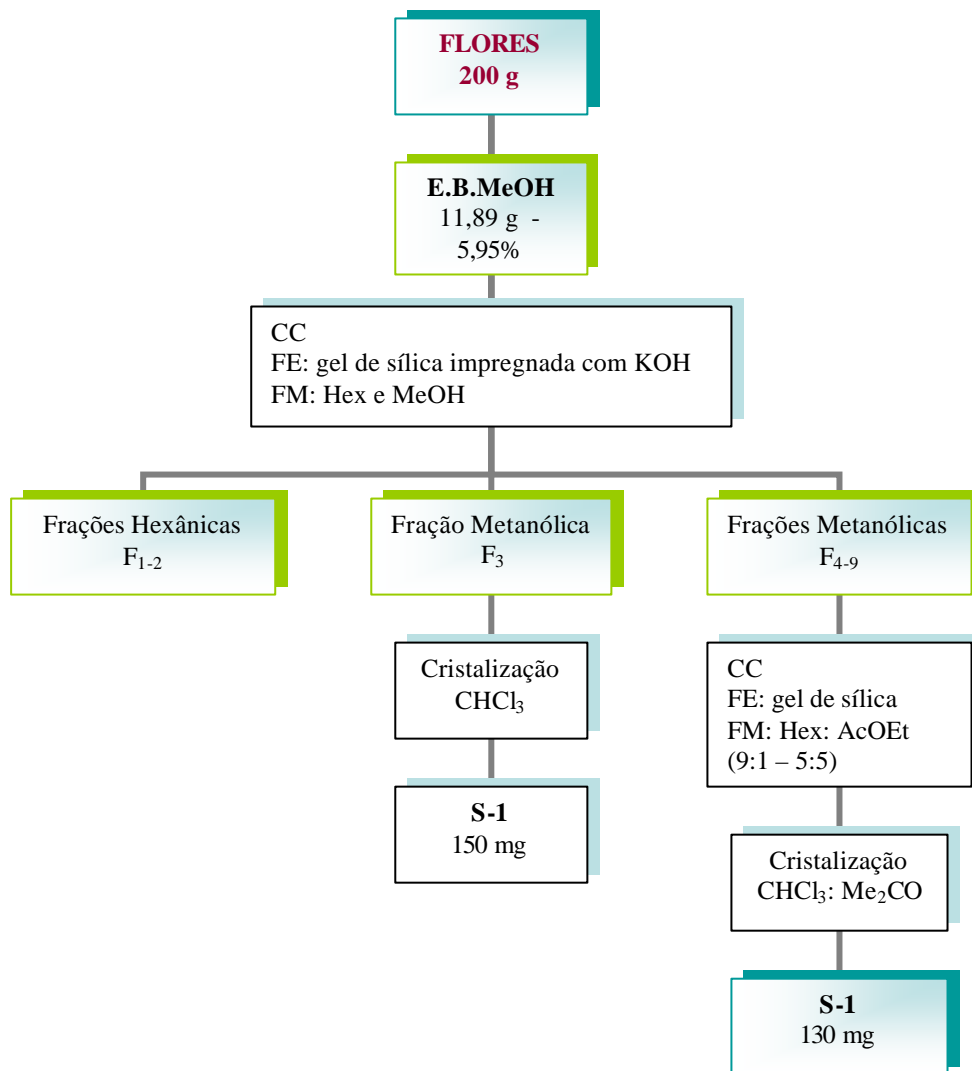
Nesta metodologia, utilizou-se 200g de flores *in natura* da *Ixora coccinea*, obtendo-se 11,89 g de extrato bruto por maceração com metanol. O extrato foi fracionado utilizando-se como eluentes: hexano e metanol, obtendo-se nove frações de 300mL cada, sendo duas hexânicas e sete metanólicas. As frações obtidas foram submetidas a evaporação à pressão reduzida e acidificadas com HCl 10% (v/v) até pH 4.

Das 9 frações obtidas, somente a fração F_3 apresentou pouca impureza, então esta fração sofreu purificação, por recristalização, com clorofórmio e forneceu 150mg de um sólido branco amorfo.

O grupo das frações F_{4-9} foi reunido, fornecendo 1,01g de um material sólido, que foi submetido a um refracionamento cromatográfico com sílica gel (230-400 Mesh) sem estar impregnada com KOH 10% (p/v), fornecendo 14 frações de 50 mL.

Procedeu-se a análise comparativa das frações obtidas por cromatografia em camada fina (CCF) com o material de partida (triterpeno ácido ursólico), previamente obtido das frações F_{20-39} da primeira metodologia, conforme descrito no item 3.3.1. Obtendo-se um total de 130 mg para este grupo de frações, de um sólido branco amorfo insolúvel em clorofórmio, igualmente a fração F_3 , perfazendo um total de 280 mg do triterpeno ácido **S-1**, conforme descrito no Esquema 3.

Esquema 3- Esquema do fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação do E.B.-MeOH das flores de *Ixora coccinea* com sílica impregnada com KOH 10% (p/v).



3.4. Parte Experimental de Folhas de *Ixora coccinea*

3.4.1. Fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação

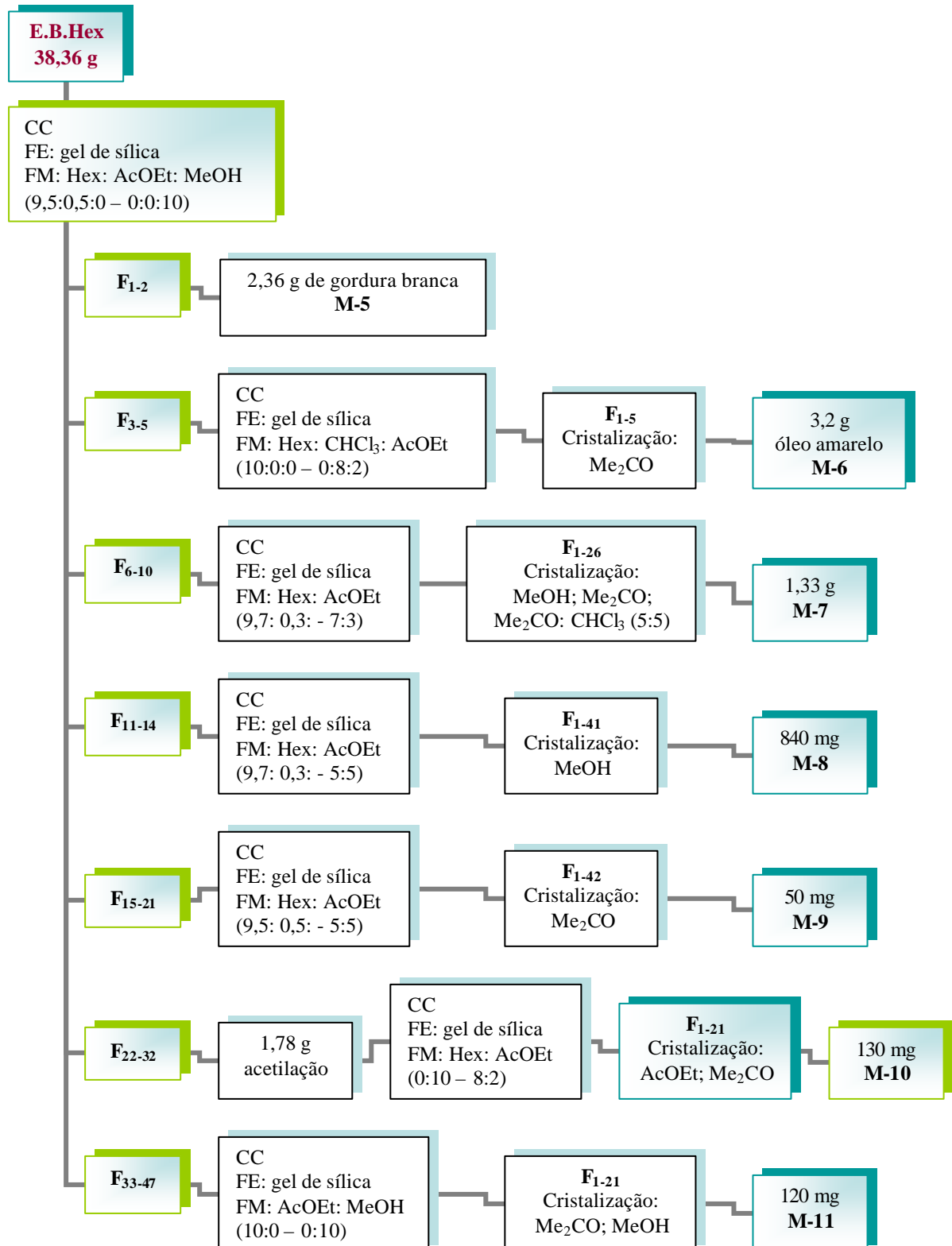
Os extratos brutos das folhas de *Ixora coccinea* foram obtidos via maceração, utilizando-se dois solventes em gradiente crescente de polaridade (hexano e clorofórmio), respectivamente um por vez sobre o mesmo material vegetal, conforme descrito no Esquema 1. Posteriormente, os extratos brutos foram utilizados num sistema cromatográfico de coluna aberta por empacotamento úmido separadamente.

Os 38,36 g de extrato hexânico e 16,80 g de extrato clorofórmico foram submetidos a cromatografia em coluna aberta, utilizando gel de sílica (35-70 Mesh) na fase fixa, e na fase móvel escolheu-se como eluentes: hexano, acetato de etila e metanol, constituindo um gradiente de polaridade na obtenção de 47 frações de 500 mL e 90 frações de 500 mL cada, respectivamente. Enquanto que para as 9,11 g do extrato bruto metanólico, utilizou-se gel de sílica 230-400 Mesh com dois anéis de carvão ativado na fase fixa, e na fase móvel utilizou-se um gradiente de polaridade com os solventes: clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se 22 frações de 300 mL. As frações obtidas pelo fracionamento cromatográfico dos extratos hexânico e clorofórmico, após análise preliminar por CCF, permitiram a reunião por grupos. Cada grupo, separadamente, foi submetido a processos de purificação, com base na

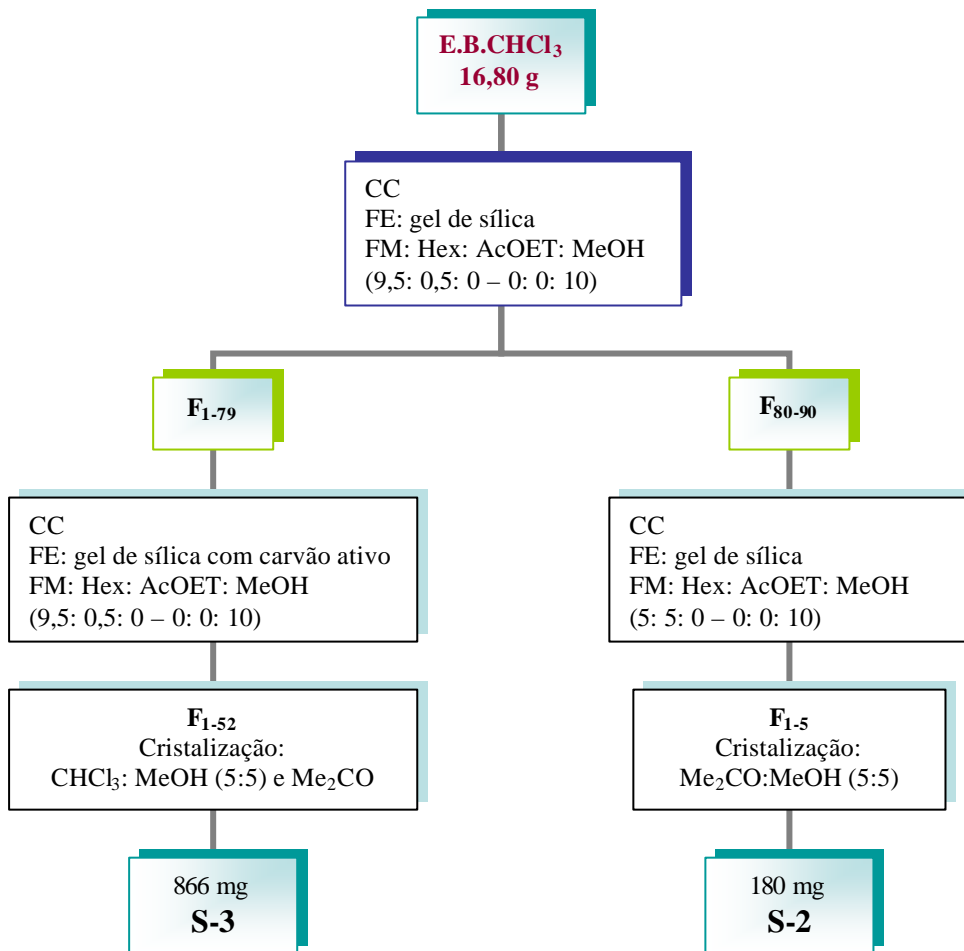
quantidade de material contido e na complexidade da mistura das frações, estabelecendo-se assim, a ordem de prioridade para prosseguir a análise dos grupos de frações.

A metodologia empregada envolveu sucessivas análises cromatográficas em coluna (CC), cromatografia em camada fina (CCF), cristalização e cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-MS) e encontra-se especificadas nos Esquemas 4 e 5.

ESQUEMA 4: Fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação do E.B.Hex. das folhas de *Ixora coccinea* Linn



ESQUEMA 5: Fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação do E.B. CHCl_3 das folhas de *Ixora coccinea* Linn



3.5. Prospecção analítica dos constituintes micromoleculares (MATOS e col., 1972) dos extratos hidroalcoólicos de flores, folhas, galhos e raízes de *Ixora coccinea*

a) Ácidos orgânicos

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 3 mL de água destilada. Filtrar se necessário. Se descorar gotas do reativo de Pásková é indicativo de reação positiva.

Aqui foi utilizado o ácido acético no teste em branco para comparação com os demais resultados, o qual pode-se observar que a coloração azul anil causada pelo reativo passa a amarelo.

b) Açúcares redutores

- 1) Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 3 mL de água destilada. Filtrar se necessário. Adicionar 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL de reativo de Fehling B. Aquecer em banho-maria até ebulição por 5 minutos. Formação de um precipitado vermelho-tijolo indica reação positiva. No caso de reação negativa executar o teste 2.
- 2) Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 3 mL de água destilada. Adicionar 1 mL de HCl concentrado e ferver em banho-maria por 10 minutos. Esfriar, neutralizar com NaOH 20%. Filtrar se necessário. Adicionar 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. Aquecer em banho-maria por 5 minutos em ebulição. A formação de um precipitado vermelho-tijolo indica reação positiva.

c) Alcalóides

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 4 mL de HCl 1%. Filtrar se necessário. Separar duas porções de 2 mL para tubos de ensaio diferentes e adicionar 5 gotas dos reagentes abaixo. No caso de precipitação indica reação positiva.

A) Dragendorff – precipitado vermelho tijolo

B) Mayer - precipitado Esbranquiçado

Neste ensaio foi utilizado para o teste positivo o alcalóide solasodina.

d) Antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Em 3 tubos de ensaio dissolva o extrato bruto com metanol. Acidule o primeiro com HCl até pH 3. Alcalinize o segundo tubo de ensaio com NaOH até pH 8,5 e o terceiro tubo de ensaio alcalinize até pH 11. Observe qualquer mudança de coloração do material. A presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa de outro.

O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes, de acordo com a tabela seguinte:

Constituintes	Cor no meio		
	Ácido (pH 3)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul-purpura
Flavonas, Flavononóis e Xantonas	----	----	Amarelo
Chalconas e Auronas	Vermelho	----	Vermelho-purpura
Flavanonóis	----	----	Vermelho Laranja

e) Catequinas

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 3 mL de metanol. Filtrar se necessário. Adicionar 1 mL de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

f) Cumarinas

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 5 mL de éter etílico. Concentrar em banho-maria até 0,5 mL. Em papel de filtro aplique gotas da solução etérea de modo a formar duas manchas de 1 cm de diâmetro cada. A uma destas manchas, juntar 1 gota de NaOH 1N. Cubra metade da mancha com um anteparo escuro e exponha a luz ultravioleta. Descubra e observe.

O desenvolvimento de fluorescência azulada, forte, bem visível na metade não encoberta da mancha alcalinizada indica a presença de cumarinas.

g) Esteróides e triterpenóides (Lieberman – Buchard)

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 3 mL de CHCl_3 . Filtrar se necessário. Juntar ao extrato clorofórmico 2 mL de anidrido acético. Agitar suavemente. Pelas paredes do tubo adicionar lentamente 1 mL de H_2SO_4 concentrado. No caso de reação positiva observa-se o desenvolvimento rápido de cores:

i) Coloração azul esvanecente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteróides livres.

ii) Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

Para o teste positivo foi utilizado o ácido ursólico.

h) Fenóis e taninos

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em metanol. Filtrar se necessário. Adicionar 3 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 . Agite bem e observe qualquer variação de cor ou formação de precipitado abundante e escuro. Compare com um teste em branco, isto é, usando apenas metanol e cloreto férrico.

Coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis, quando o teste em “branco” for negativo.

Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobafênicos (taninos condensados ou catéquicos).

i) Flavonóides, flavonas, flavononóis e xantonas

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em metanol. Filtrar se necessário. Adicionar 1 mL de HCl concentrado. Deixar esta solução reagir com 1 cm de fita de magnésio. Aguarda-se o término da reação pelo fim da efervescência

O surgimento de uma coloração rósea a vermelha na solução é indicativo da presença de flavonóis, flavonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

j) Glicosídeos cardíacos

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 4mL de MeOH. Filtrar se necessário. Separar em duas porções de 2 mL cada e adicionar gotas dos reagentes abaixo:

- 1) Reativo de KEDDE. A formação de coloração azul ou violeta indica reação positiva.
- 2) Adicionar 3 gotas de solução recente a 5% de nitroprussiato de sódio em água e 3 gotas de NaOH 2N. O desenvolvimento de coloração roxa intensa indica reação positiva.

k) Saponinas

i) Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em CHCl_3 . Filtra-se e descarta-se o filtrado. Redissolve-se o resíduo insolúvel em clorofórmio com 5-10 mL de H_2O destilada e filtra-se para um outro tubo de ensaio. Agita-se o tubo com a solução vigorosamente por 2-3 min. E observa-se se há formação de espuma.

Espuma persistente e abundante, formando um tipo de colarinho, indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

ii) Adicione 2 mL de HCl concentrado ao conteúdo do tubo preparado no teste anterior e deixe-o durante pelo menos uma hora imerso em banho-maria. Deixe-o esfriar, neutralize-o com NaOH e agite novamente.

O tratamento hidrolisa as saponinas, precipitando as agliconas, que podem ser extraídas com CHCl_3 e então submetidas ao teste de Lieberman – Burchard.

A presença de precipitado e a não formação de espuma confirma a presença de saponinas.

l) Sesquiterpenolactonas e outras lactonas

Dissolver alguns miligramas do extrato bruto em 2 mL de metanol. Adicionar duas gotas de cloridrato de hidroxilamina 10%, e duas gotas de solução metanólica de KOH a 10%. Aquecer suavemente em banho-maria durante dois minutos. Em seguida esfriar e acidificar com HCl 1N. Adicionar uma gota de FeCl_3 1%.

Coloração violeta indica reação positiva.

3.6. Preparação dos Extratos Hidro-alcólicos das Flores, Folhas, Galhos e Raízes de *Ixora coccínea* Linn (E.B.OH)

Foram pesados cerca de 50g de material vegetal para 500mL de solução hidro-alcólica (constituindo uma mistura de 10% v/v de etanol:água, e 40% p/v em relação ao extrato). A mistura foi posta em frascos âmbar, lacrados e colocados na completa ausência de luz por um período de 7 dias. Após este período o material macerado foi filtrado e submetido à pressão reduzida para a obtenção dos extratos brutos. Devido a grande quantidade de água, os extratos brutos tiveram foram colocados em estufa com temperatura controlada à 50⁰C para acabar de secar.

Os extratos foram submetidos aos ensaios de prospecção dos constituintes químicos, para algumas classes de metabólitos especiais e enviados para testes farmacológicos.

3.7. Ensaios Farmacológicos

Os ensaios farmacológicos foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia da UFRRJ, sob a coordenação do Prof. Dr. Frederico Argollo Vanderlinde.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo Fitoquímico das Flores

O fracionamento cromatográfico do extrato bruto metanólico da *Ixora coccinea*, análise qualitativa em CCF e os processos preliminares de purificação (Parte Experimental, esquema 2), possibilitaram reunir as 46 frações obtidas deste fracionamento, em 4 grupos de frações: F₁₋₁₉; F₂₀₋₃₂; F₃₃₋₃₉; F₄₀₋₄₆.

Das frações F₁₋₁₉ obteve-se 340 mg de sólido amorfo parcialmente solúvel em CHCl₃, deste montante 10 mg foram metilados com diazometano e analisados por CG-EM.

As frações F₂₀₋₃₂ e F₃₃₋₃₉ apresentaram por estudo comparativo em CCF uma única mancha vermelha, (R_f = 0,6) sugerindo ser um terpeno (**S-1**). O sólido amorfo obtido, (570 mg) mostrou-se insolúvel em CHCl₃ e apresentou ponto de fusão 288°C (não corrigido), correspondendo ao ácido ursólico (CHAPMAN e HALL, 1982, P.F. = 291°C), com rendimento de 2,16% a partir do extrato bruto metanólico. Trinta miligramas de **S-1** foram metilados com diazometano e submetidos a análise por IV, CG-EM e RMN de ¹H e de ¹³C. A análise dos dados obtidos revelou que **S-1** corresponde ao triterpeno ácido ursólico (MAHATO *et al.*, 1994).

O grupo de frações F₄₀₋₄₆ forneceu 143 mg de um sólido branco granuloso com ponto de fusão 160°C, que foi submetido à análise espectrométrica por IV e RMN de ¹H e de ¹³C, correspondendo ao açúcar manitol (**S-2**) (CHAPMAN e HALL, 1982, Pf= 166°C), solúvel em MeOH:Me₂CO (1:1), DMSO:MeOH (1:1) e, em H₂O.

4.1.1 Identificação das Misturas M-1, M-2, M-3 e M-4 presentes nas frações F₁₋₁₉

A análise por cromatografia gasosa e comparação com a biblioteca de espectros de massas para o grupo de frações F₁₋₁₉, após metilação (Figura 24 e 26), revelou a presença da mistura de hidrocarbonetos (**M-1**) com 20 até 31 átomos de carbono, conforme mostra a Figura 4, sendo que os hidrocarbonetos mais abundantes foram o heptacosano (100%) seguido pelos pentacosano e nonacosano (50%).

Foi detectada ainda uma mistura de ácidos graxos (**M-2**, Figuras 25 e 26), através de seus derivados metilados, com 14 a 28 átomos de carbonos (Figura 5), sendo que os mais abundantes foram hexadecanoato de metila, octadecanoato de metila, heptadecanoato de metila, seguidos de docosanoato de metila e tetradecanoato de metila, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Ácidos graxos metilados mais abundantes detectados na mistura **M-2** com seus respectivos percentuais de abundância relativa.

CARBONOS	NOMENCLATURA	ABUNDÂNCIA RELATIVA %
C-16	Hexadecanoato de metila	100
C-18	Octadecanoato de metila	98
C-17	Heptadecanoato de metila	90
C-22	Docosanoato de metila	65
C-14	Tetradecanoato de metila	50

Uma mistura de hidrocarbonetos funcionalizados (**M-3**, Figura 6) foi também detectada pela análise de CG-EM indicando o palmitato de metila (20%), tetradecanoato de isopropila (16%), hexahidro-farnesil-acetona (13%) e o estearato de metila (10%). A análise do espectro de massas mostrou os íons moleculares (M^+) em m/z 270,26 (11%) e 298,29 (13%) para o palmitato de metila e estearato de metila, respectivamente. Além desses fragmentos foi possível detectar o pico base em m/z 74, fragmento típico de ésteres de ácidos carboxílicos para esses dois metabólitos. No caso do tetradecanoato de isopropila e hexahidro-farnesil-acetona os íons moleculares não foram observados, sendo que ambos os picos bases em m/z 43, correspondem ao fragmento cátion isopropila, também característico para esse tipo de estrutura (Figura 27, 28 e 29).

E, para finalizar, de acordo com a espectroteca do CG-EM (Figuras 30, 31 e 32), e comparação com os dados da literatura (NACIONAL INSTITUTE OF ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY), foram detectados neste grupo de frações F_{1-19} , uma mistura de esteróides (**M-4**, Figura 7), conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7: Tabela da mistura esteroidal (**M-4**) identificada no grupo de frações F_{1-19} do E.B.MeOH das flores de *Ixora coccinea*.

ESTERÓIDE	ÍON MOLECULAR m/z	ABUNDÂNCIA RELATIVA %
Ergosterol	396	20
Campesterol	400	53
Estigmasterol	412	42
Fucoesterol	412	42
β -sitosterol	414	58
Colesterol	414	58

O espectro de infravermelho confirmou a presença dos esteróides através das absorções (figura 33): 3424 cm^{-1} (OH); 2931 e 2852 cm^{-1} (grupos CH_2 e CH_3); 1463 e 1377 cm^{-1} (C-H alifático); 1638 e 959 cm^{-1} (olefina).

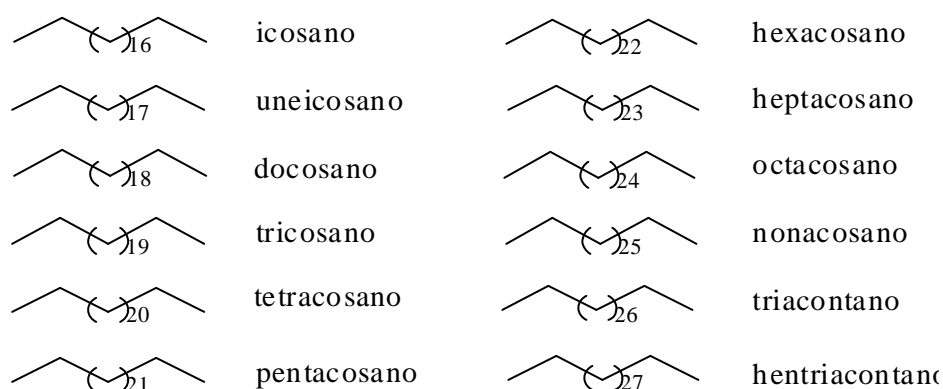


Figura 4: Mistura de hidrocarbonetos (**M-1**) correspondentes ao grupo de frações F_{1-19} .

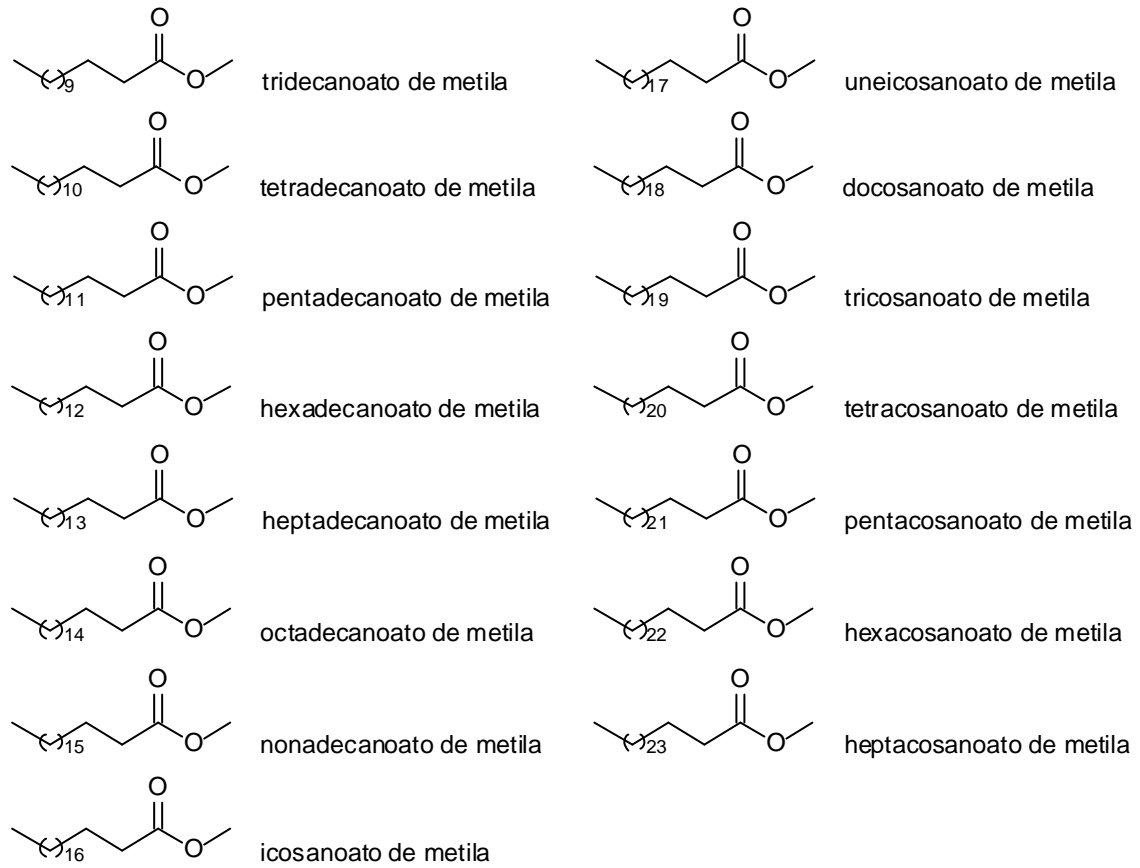


Figura 5: Mistura de ácidos graxos metilados (M-2) presentes no grupo de frações F₁₋₁₉.

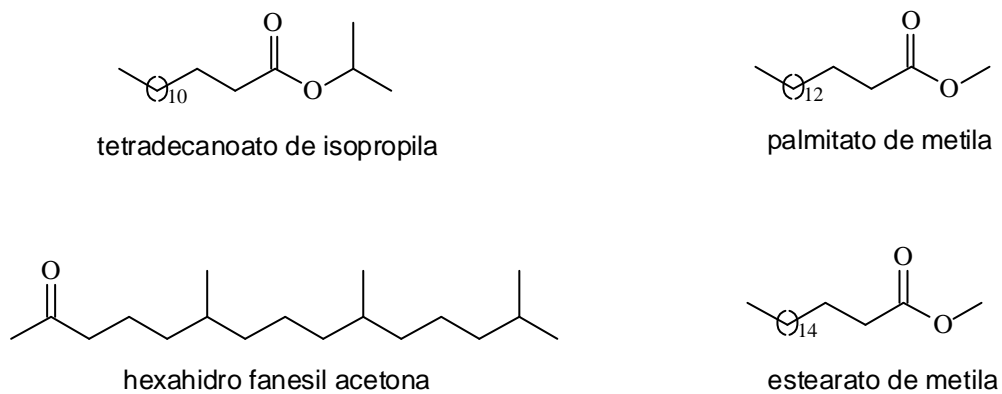


Figura 6: Mistura de hidrocarbonetos (M-3) correspondentes ao grupo de frações F₁₋₁₉.

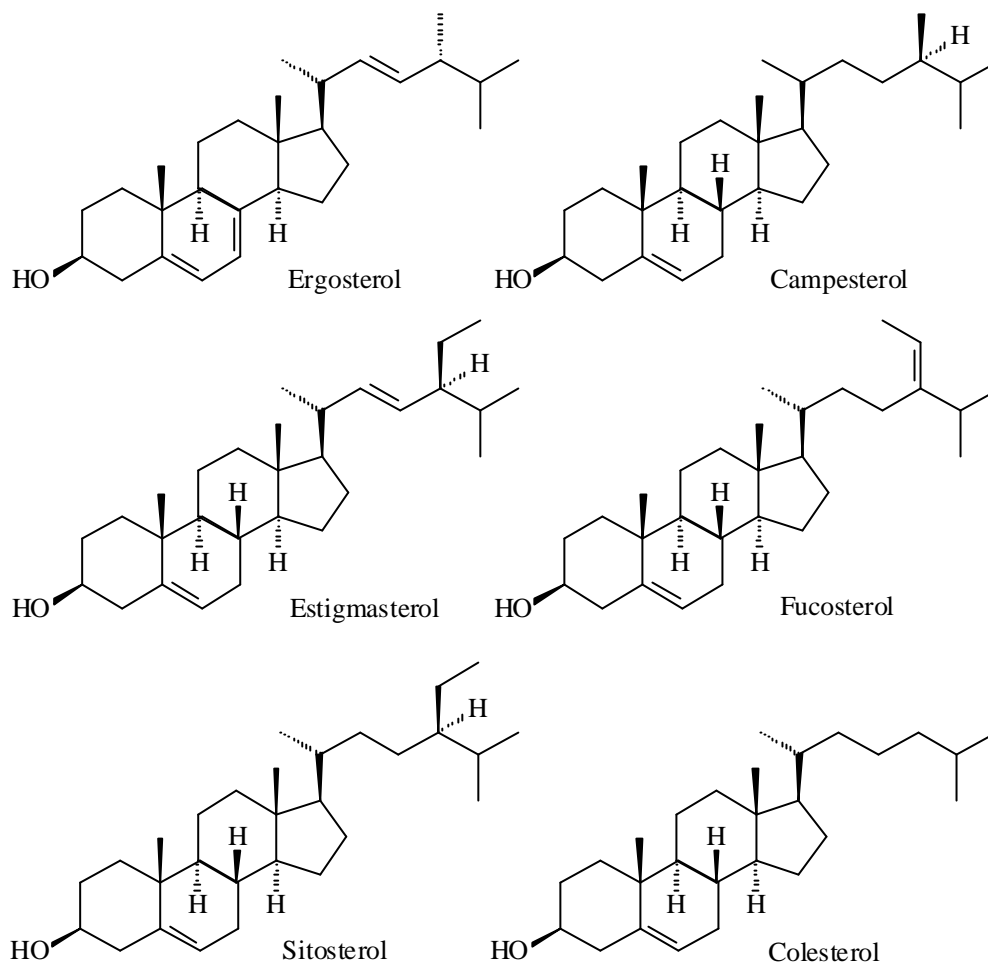


Figura 7: Mistura de esteróides (M-4) correspondentes ao grupo de frações F₁₋₁₉.

4.1.2. Identificação do ácido ursólico (S-1)

O produto natural isolado das frações F₂₀₋₃₉, denominado de **S-1** foi identificado como sendo o triterpeno ácido ursólico, que teve sua estrutura confirmada através de dados espectroscópicos de infravermelho, CG-EM e RMN de ¹H e de ¹³C do seu derivado metilado, Figura 8.

O espectro na região do infravermelho apresentou absorções em 3380 cm⁻¹ (grupo hidroxila); 2944 e 2871 cm⁻¹ (grupos CH₂ e CH₃) e 1726 cm⁻¹ (carbonila de éster), (Figura 34)

Na análise por CG-EM observou-se o pico do íon molecular (m/z) 470 (1,8%), (Figura 35), correspondendo a fórmula molecular C₃₁H₅₀O₃. A Figura 9 mostra uma proposta para o esquema de fragmentação dos principais picos observados no espectro de massas do ursolato de metila.

O espectro de RMN de ¹H (BILIA *et al*, 1996) apresentou absorções para hidrogênio olefínico em δ 5,2 (triplete); um grupo metoxila em δ 3,62 (singleto); hidrogênio carbinólico em δ 3,2 (multiplete); e na faixa entre δ 1,07 e 0,72 singletos correspondentes a 7 grupos metílicos (Figura 36).

No espectro de RMN de ¹³C (MAHATO *et al*, 1994) observou-se carbonos olefínicos em δ 138,19 (C-13) e 125,62 (C-12); carbono carbinólico em δ 79,11 (C-3); carbono carbonílico de éster em δ 178,17; metoxila em δ 51,54 e 7 grupos metilas na faixa entre δ 15,50 e 28,19 (Figura 37). Na Tabela 8 podem ser observadas as indicações para os deslocamentos químicos de RMN de ¹³C para o ácido ursólico e seu derivado metilado obtidos na literatura e correspondentes para o éster metílico do ácido ursólico obtido neste trabalho.

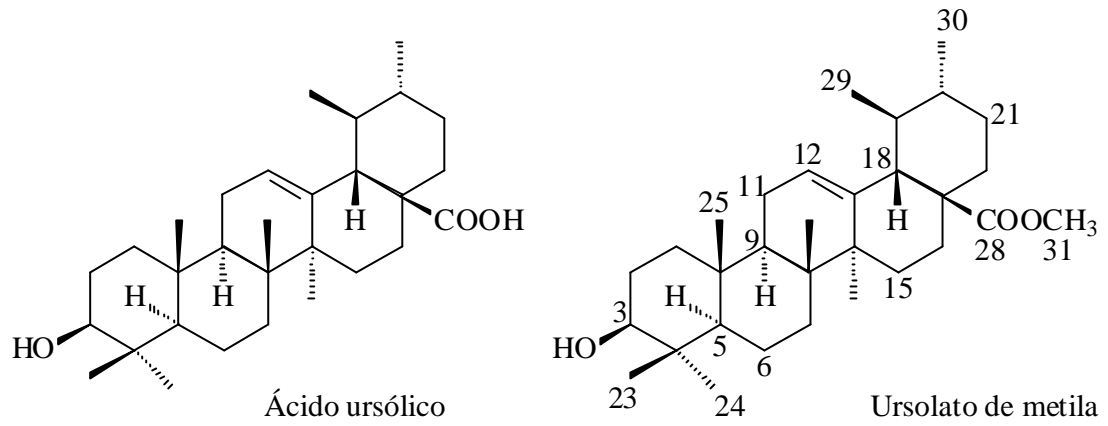


Figura 8: Ácido ursólico (S-1) e ursolato de metila, metabólito obtido nas frações F₂₀₋₃₉.

Tabela 8: Deslocamentos químicos de RMN de ¹³C (δ) para o derivado metilado do ácido ursólico e os correspondentes da literatura (MAHATO *et al*, 1994).

C	Ácido ursólico d	Ursolato de metila d	S-1 d
1	38,9	38,8	38,66
2	23,5	27,3	27,27
3	78,3	78,8	79,11
4	37,3	38,8	39,10
5	55,7	55,4	55,26
6	18,7	18,4	18,37
7	33,3	33,0	33,02
8	39,3	39,6	39,53
9	46,7	47,5	47,61
10	37,2	37,0	37,03
11	23,8	23,3	23,35
12	125,5	125,5	125,62
13	139,2	138,0	138,19
14	42,0	42,0	42,05
15	28,4	28,2	28,08
16	22,7	24,3	24,28
17	47,9	48,1	48,15
18	53,4	52,8	52,93
19	39,3	39,1	38,92
20	39,8	38,8	38,80
21	30,9	30,7	30,71
22	37,3	36,7	36,70
23	28,6	28,2	28,19
24	16,5	15,5	15,50
25	15,6	15,7	15,60
26	16,5	16,9	17,10
27	23,5	23,6	23,67
28	179,8	177,7	178,17
29	17,3	16,9	16,97
30	21,3	21,2	21,26
31	-	-	51,54

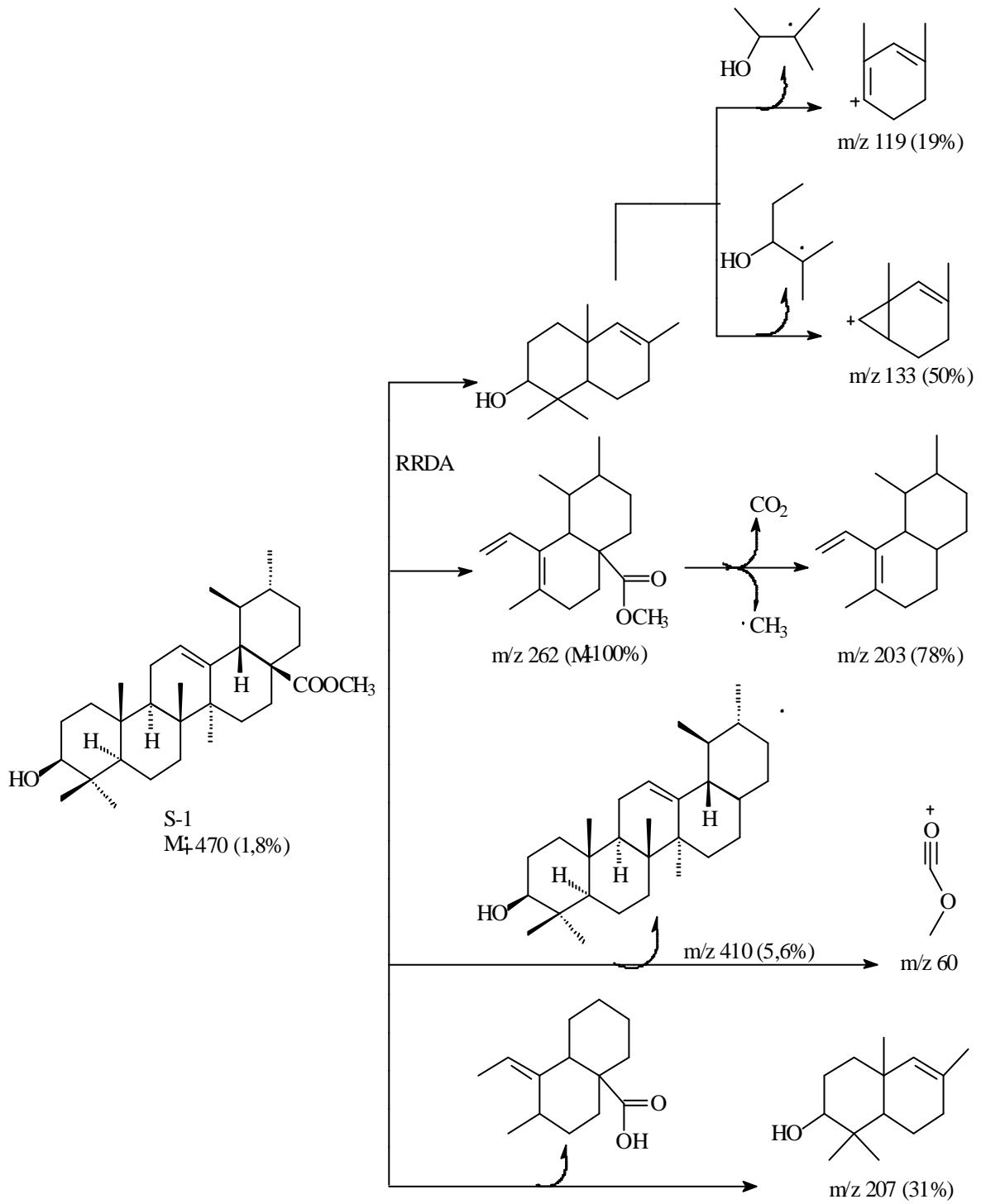


Figura 9: Proposta de fragmentação de massas para o ursolato de metila.

4.1.3. Identificação do manitol (S-2)

Da reunião do grupo de frações F₄₀₋₄₆ foi isolado um açúcar identificado como sendo o manitol (S-2, Figura 10), que teve sua estrutura confirmada por dados espectroscópicos de infravermelho e RMN de ¹H e de ¹³C. O manitol foi isolado do extrato bruto metanólico em 0,54% de rendimento e apresentou ponto de fusão de 160°C (CHAPMAN e HALL, 1982, P. F. =166°C).

O espectro de infravermelho mostrou absorções em 3383-3316 cm⁻¹, como banda larga referente ao grupo hidroxila, e em 2939 cm⁻¹, devido aos grupos CH₂ e CH₃ (Figura 38).

Nos espectros de RMN de ¹H observou-se sinais na faixa entre δ 3,75 e 3,50 relativos a grupos CH₂, valores similares aos correspondentes da literatura (BREITMAIER *et al*, 1989 e PAULA *et al*, 1998), e δ 4,68 referente a grupos hidroxilicos (Figura 39).

A análise do espectro de RMN de ¹³C mostrou apenas três sinais, sendo dois deles em δ 70,79 e 69,23, correspondentes a carbonos carbinólicos, e um sinal em δ 63,21 atribuído aos grupos CH₂ (Figura 40). A Tabela 9 mostra os deslocamentos químicos de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos e os da literatura (BREITMAIER *et al*, 1989 e PAULA *et al*, 1998).

Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos para S-2 e dados da literatura.

C	d _C		d _H	
	Literatura	S-2	Literatura	S-2
1	64,6	63,2	4,32	3,71
2	72,2	70,8	4,42	3,75
3	70,7	69,2	4,12	3,67
4	70,7	69,2	3,54	3,55
5	72,2	70,8	3,45	3,50
6	64,6	63,2	3,37 e 3,61	3,64

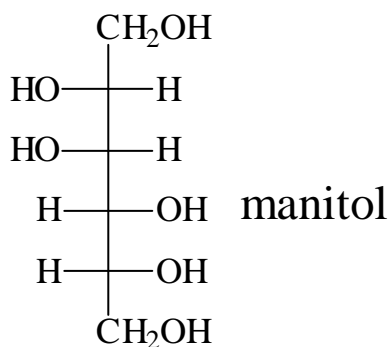


Figura 10: Manitol (S-2), metabólito correspondente ao grupo de frações F₄₀₋₄₆.

4.1.4. Metodologia alternativa para o isolamento do ácido ursólico

Devido a abundância do ácido ursólico nas flores (570 mg, Esquema 2)) e aos recentes relatos na literatura sobre as bioatividades atribuídas a este metabólito como antitumoral (LEE *et al*, 1998 e 2001 e NOVOTY *et al*, 2001), antiinflamatório (BARICEVIC *et al*, 2001; DEEPAK *et al*, 2000; DIAZ *et al*, 2000; HONDA *et al*, 2000; ISMAILI *et al*, 2001; POKROVSKII *et al*, 1999 e RYU *et al*, 2000), antialérgico (RYU *et al*, 2000), antimicrobiano (CHATTOPADHYAY *et al*, 2001), antimalarial (TRAORE-KEITA *et al*, 2000), com propriedades antifertilidade (AKBARSHA *et al*, 2000), como inibidor do DNA polimerase e DNA topoisomerase (DENG *et al*, 1999 e MIZUSHINA *et al*, 2000) e anti-HIV (KASHIWADA *et al*, 2000 e MIN *et al*, 1999), motivaram-nos a utilizar uma metodologia específica, para o isolamento do triterpeno das flores de *Ixora coccínea*, onde se utiliza gel de sílica basificada.

A metodologia envolvendo o tratamento prévio do gel de sílica com KOH 10% (p/v), para o fracionamento cromatográfico do extrato bruto metanólico das flores de *Ixora coccínea*, se apresentou como alternativa indicada na literatura (PINTO *et al*, 2000 e JUNIOR *et al*, 2002), para o isolamento mais rápido e eficaz do ácido ursólico.

Após o tratamento cromatográfico do extrato bruto das flores através da coluna de gel de sílica tratada com KOH, o fracionamento forneceu 9 frações (parte experimental, Esquema 3), que após acidificação com HCl 10% (v/v), foram submetidas a análise por cromatografia em camada fina em comparação com a amostra pura de ácido ursólico obtido pela cromatografia usual e identificado no estudo fitoquímico.

A análise comparativa do grupo de frações F₃₋₉ eluídas com metanol revelou a presença do referido ácido. O ponto de fusão do sólido obtido da reunião das frações F₃₋₉ foi de 276°C, não corrigido, correspondendo ao ácido ursólico (CHAPMAN e HALL, 1982, P.F. = 291°C).

Apenas da fração F₃ obteve-se 150mg de ácido ursólico. O grupo de frações F₄₋₉ foram recromatografados (parte experimental, Esquema 3), e forneceram mais 130mg de ácido ursólico.

Esta metodologia possibilitou a obtenção de um total de 280mg de ácido ursólico, constituindo um rendimento percentual de 2,35% em relação ao extrato bruto das flores de *Ixora coccínea*.

Este resultado representa um aumento no rendimento percentual (2,35%), em comparação com o obtido (2,16%), do grupo de frações F₂₀₋₃₉ por estudo fitoquímico usual. A diferença de 0,15% apresenta-se significativa na extração de metabólitos secundários, além disso, a metodologia alternativa possibilitou maior rapidez e economia no processo de extração quando comparada ao método usual.

4.2. Estudo Fitoquímico das Folhas

4.2.1. Identificação dos metabólitos contidos nos grupos de frações do extrato hexânico (E.B.HEX)

O fracionamento cromatográfico do extrato bruto hexânico das folhas de *Ixora coccínea* (E.B.Hex.), após análise qualitativa em CCF, e os processos preliminares de purificação (parte experimental, Esquema 4) possibilitaram a reunião das 47 frações em sete grupos de frações: F₁₋₂, F₃₋₅, F₆₋₁₀, F₁₁₋₁₄, F₁₅₋₂₁, F₂₂₋₃₂ e F₃₃₋₄₇.

Dentre as análises e estudos feitos no isolamento e purificação dos metabólitos, para a elucidação estrutural por técnicas espectroscópicas (IV; CG-EM; RMN de ¹H e de ¹³C, DEPT e HMQC), obtivemos os resultados descritos a seguir.

4.2.1.1. Identificação dos metabólitos em M-5 presentes nas frações F₁₋₂

A análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-EM) do grupo de frações M-5 (Figuras 41 e 42), que constituiu 2,36g de um material sólido com aspecto de gordura (parte da amostra foi metilada com diazometano), foi realizada em comparação com a espectroteca do aparelho que revelou a presença de uma mistura de

hidrocarbonetos com C-14 a C-20 e C-29 a C-33 (Figura 11). Os hidrocarbonetos que se apresentaram como majoritários foram os untriacontano, tritriacontano e dotriacontano, conforme mostra a Tabela 10. E ainda uma mistura sequisterpenos: beta-selineno (100%), alfa-selineno (78,5%) e delta-cadineno (40,5%), conforme mostra a Figura 12.

Tabela 10: Mistura de hidrocarbonetos (**M-5**) identificados no grupo de frações F_{1-2} do E.B.Hex. das folhas de *Ixora coccinea*.

Número de C	Nomenclatura	Abundância Relativa %
31	Untriacontano	100
33	Tritriacontano	43,4
32	Dotriacontano	20,8

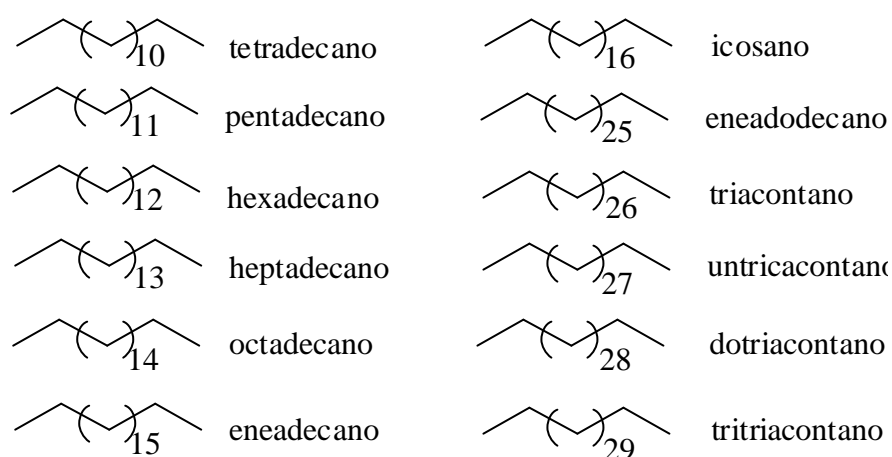


Figura 11: Mistura de hidrocarbonetos (**M-5**) identificados no grupo de frações F_{1-2} do E.B.Hex. das folhas de *Ixora coccinea*.

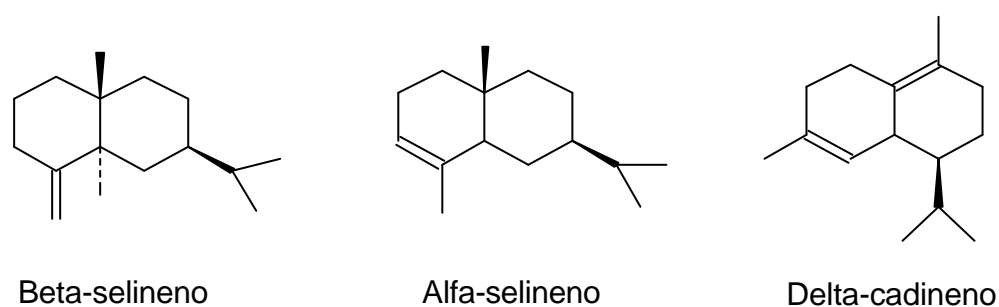


Figura 12: Metabólitos (**M-5**) correspondentes ao grupo de frações F_{1-2} do E.B.Hex.

4.2.1.2. Identificação dos metabólitos em **M-6** presentes no grupo de frações F_{3-5}

Os metabólitos (**M-6**) correspondentes ao grupo de frações F_{3-5} constituíram um total de 3,2g de uma gordura amarela. Os dados espectroscópicos de IV apresentaram absorções em 2920-2851 cm^{-1} correspondentes a presença de grupos CH_3 e CH_2 e 1730 cm^{-1} (Figura 43).

A análise por cromatografia gasosa de **M-6** em comparação com a espectroteca do aparelho (Figura 44) revelou uma mistura de hidrocarbonetos com C-18 a C-31 (Figura 13),

onde os hidrocarbonetos com C-27, C-25, C-20, C-18, C-29 e C-22 foram majoritários, conforme mostra a Tabela 11. E ainda, uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos de C-14 a C-24 (Figura 14), tendo pentadecanoato de metila, heptadecanoato de metila e nonadecanoato de metila como majoritários, de acordo com a Tabela 12.

Tabela 11: Mistura de hidrocarbonetos (**M-6**) identificados no grupo de frações F₃₋₅ do E.B.Hex. das folhas de *Ixora coccinea*.

C	Nomenclatura	Abundância relativa %
27	Heptacosano	100
25	Pentacosano	57,6
20	Icosano	55,3
18	Octadecano	25,9
29	Eneacosano	25,9
22	duodocosano	22,4

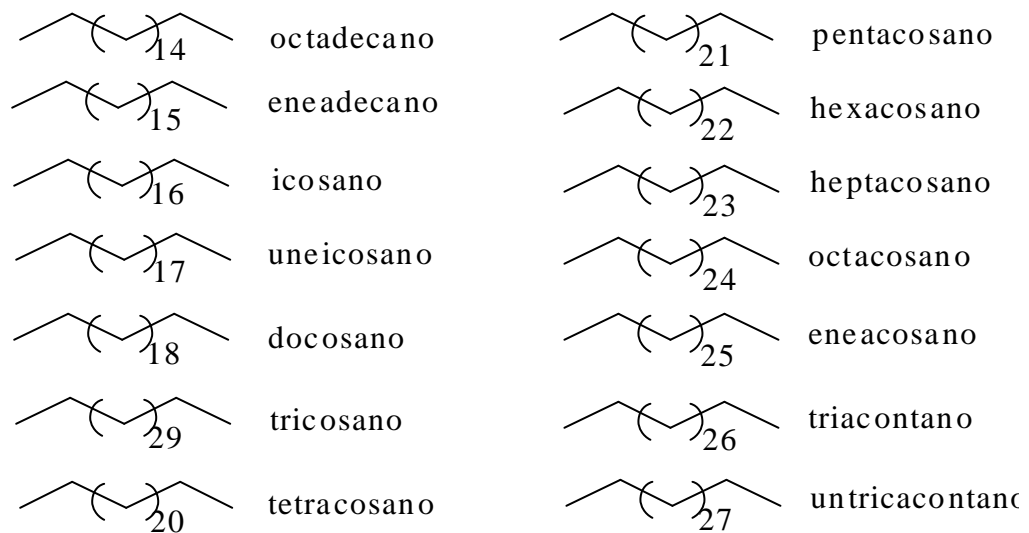


Figura 13: Metabólitos (**M-6**) correspondentes ao grupo de frações F₃₋₅ do E.B.Hex.

Tabela 12: Mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (**M-6**) identificados no grupo de frações F₃₋₅ do E.B.Hex. das folhas de *Ixora coccinea*.

C	Nomenclatura	Abundância relativa %
16	Pentadecanoato de metila	100
18	Heptadecanoato de metila	22,7
20	Nonadecanoato de metila	9,1

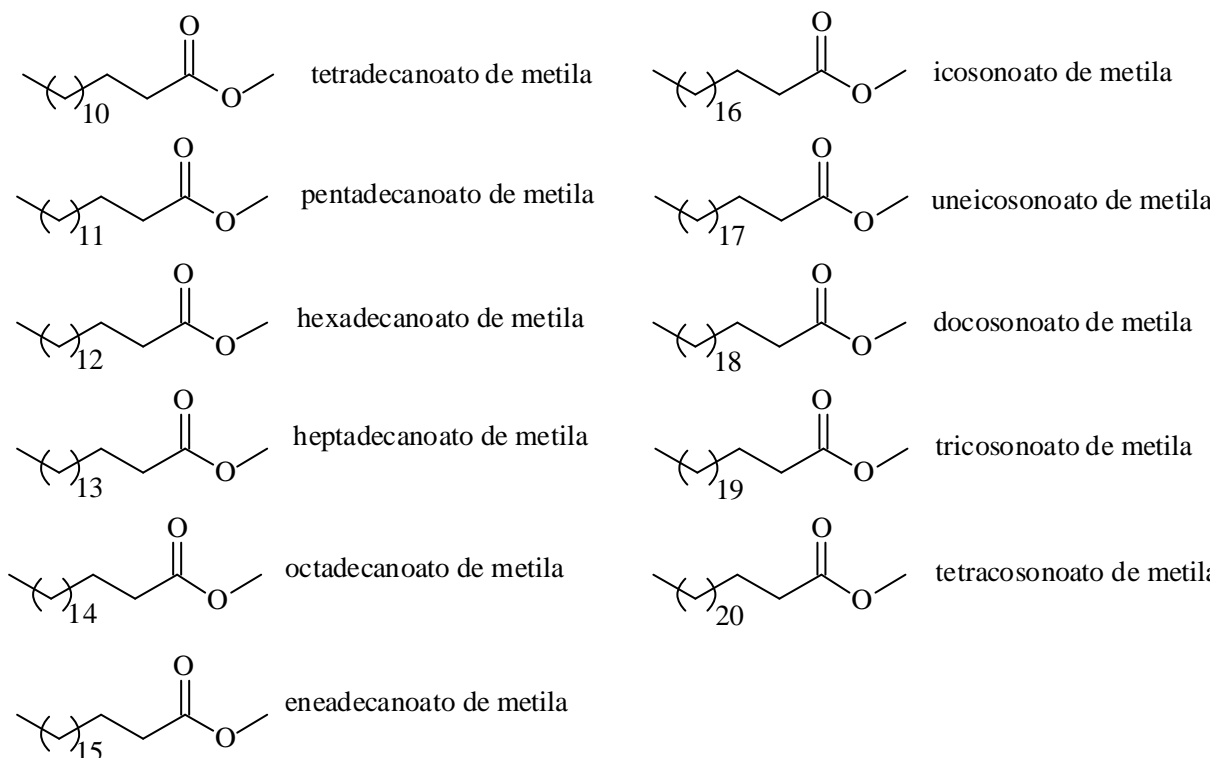


Figura 14: Metabólitos (**M-6**) correspondentes ao grupo de frações F₃₋₅ do E.B.Hex.

4.2.1.3. Identificação dos metabólitos em M-7 presentes no grupo de frações F₆₋₁₀

O sólido branco amorfo (**M-7**) obtido do grupo de frações F₆₋₁₀ apresentou no espectro de infravermelho sinais em 3313 cm⁻¹ banda larga referente ao grupo OH, em 2923 e 2852 cm⁻¹ a grupos CH₃ e CH₂ e ainda em 3068, 1640, 986 e 721 correspondendo a grupos olefínicos, (Figura 45).

Os espectros de RMN de ¹H, de ¹³C, DEPT de 90, DEPT de 135 e HMQC das frações F₆₋₁₀ (**M-7**) obtidas do extrato hexânico das folhas apresentaram uma mistura de triterpenos. O solvente utilizado para a solubilização destas frações foi o clorofórmio deuterado (CDCl₂), conforme mostram as Figuras 46, 47, 48, 49 e 50, respectivamente.

O espectro de RMN de ¹H apresentou absorções correspondentes ao lupeol com hidrogênio carbinólico em δ 3,19 (triplete largo) e hidrogênios olefínicos em δ 4,56 e 4,68 (singletos). Foram observadas outras absorções referentes a a-amirina para hidrogênio carbinólico em δ 3,17 (dubleto largo) e hidrogênio olefínico em δ 5,12 (triplete). E foram observadas, ainda absorções para β-amirina com sinal para o hidrogênio carbinólico em δ 3,24 (dubleto largo) e para o hidrogênio olefínico em δ 5,18 (triplete).

No espectro de RMN de ^{13}C , o lupeol apresentou carbono carbinólico em δ 79,01 e carbonos olefínicos em δ 150,90 e 109,3. As amirinas α e β apresentaram carbonos carbinólicos na mesma região do lupeol (δ 79,01). Foram observados carbonos olefínicos em δ 124,4 e 139,5 correspondentes a α -amirina, e em δ 121,7 e 145,1 para a β -amirina.

Os demais sinais de RMN de ^{13}C e de ^1H , em comparação com a literatura, corresponderam a esses três triterpenos (Figura 15), ou seja, o lupeol (MAHATO et KUNDU, 1994 e REYNOLDS *et al*, 1986), a α -amirina e a β -amirina (MAHATO et KUNDU, 1994 e MORITA *et al*, 2000), descritos nas Tabelas 13, 14 e 15, respectivamente.

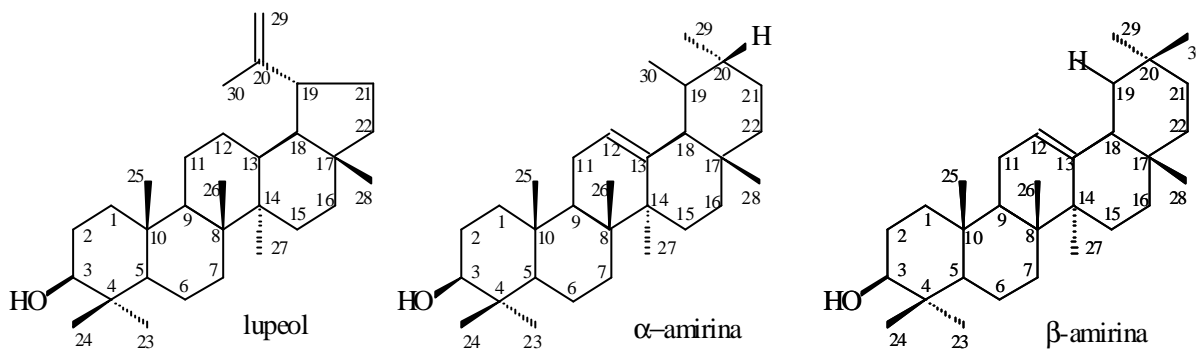


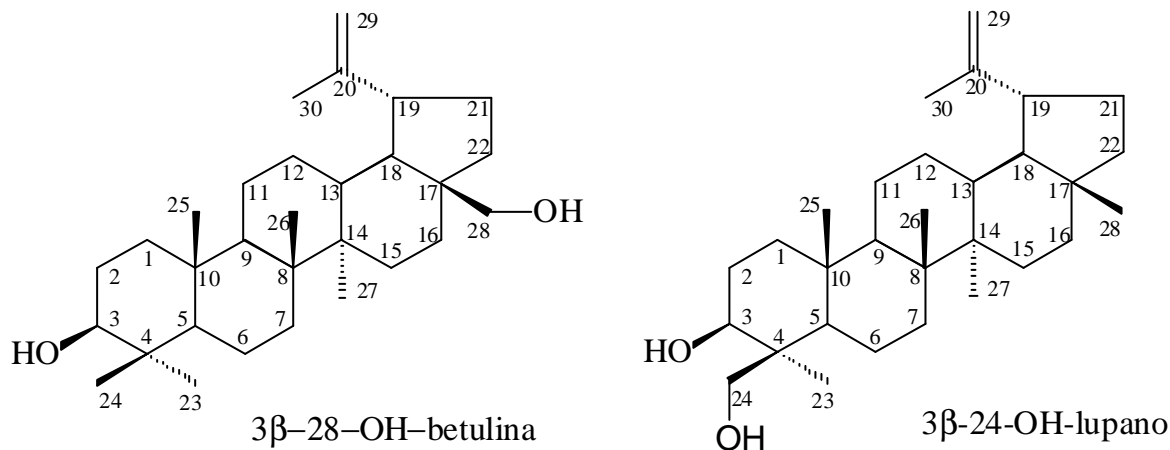
Figura 15: Mistura de terpenos em **M-7** correspondentes ao grupo de frações F₆₋₁₀.

Os sinais remanescentes para absorções de ^1H em δ 3,63 (triplete, $J = 11,97$ Hz); em 1,07 (triplete, $J = 10,9$ Hz) e 0,91 (singleto largo, $J = 0,9$), sugerem a presença de um quarto triterpeno.

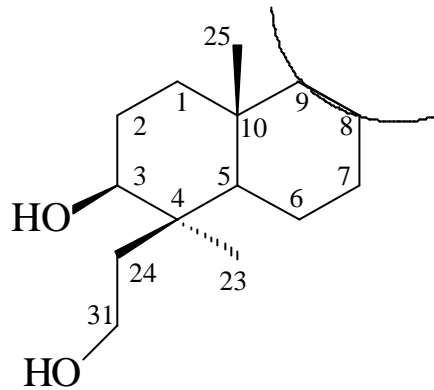
Além disso, também foram observados sinais remanescentes no espectro de RMN de ^{13}C , que corresponderiam aos átomos de carbono C-13, C-20, C-21, C-22, C-25, C-26, C-27, C-29 e C-30. No entanto, puderam ainda ser observadas absorções em δ 63,07, 31,91 e 23,51.

A comparação cuidadosa com dados da literatura (MAHATO et KUNDU, 1994) permitiu indicar que o quarto triterpeno poderia possuir esqueleto correspondente aos lupanos ou betulinas, com um carbono carbinólico adicional justificado pelos sinais de RMN de ^{13}C (δ 63,07) e de ^1H (δ 3,63).

Os metabólitos 3- β -24-OH-lupano e 3- β -28-OH-betulina, além dos valores simulados através do programa ACD para RMN de ^{13}C , possibilitaram sugerir a estrutura para o quarto triterpeno. A tabela 15 indica a comparação dos deslocamentos químicos da literatura e do quarto triterpeno.



O sinal em δ 3,63 para RMN de ^1H com multiplicidade de tripleto permitiu sugerir a ligação deste grupo carbinólico à outro metilênico, justificado pelo deslocamento químico em δ 31,91 para o C-24. Em adição este grupamento estaria ligado ao C-4 também unido ao C-23 em posição β com relação a hidroxila do C-3.



Portanto, a estrutura proposta para o quarto triterpeno da mistura **M-7**, teria o esqueleto básico da classe dos lupanos.

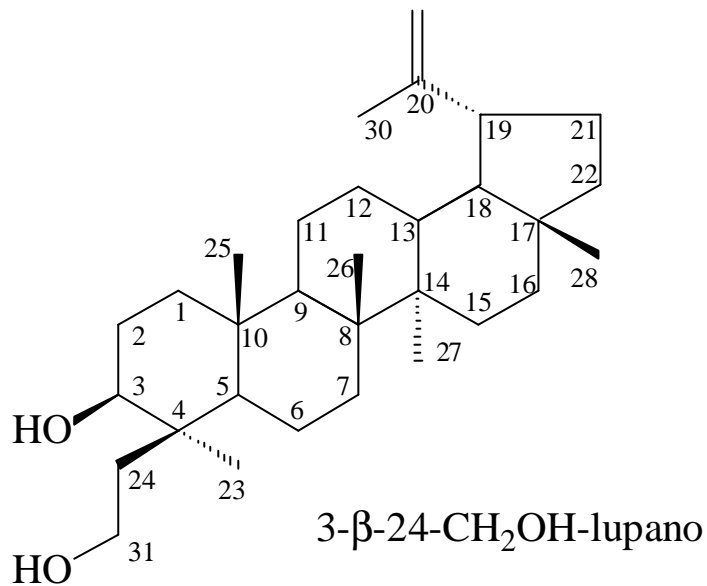


Tabela 13: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C para o lupeol.

C	d_C				d_H	
	Literatura	M-7	DEPT 90	DEPT 135	Literatura	M-7
1	38,7	38,75	-	38,53	0,91 (t) e 1,68 (d)	0,91 (d) e 1,63 (t)
2	27,4	27,39	-	27,22	1,54 (q) e 1,61 (d)	1,55 (d) e 1,59 (t)
3	78,9	78,98	79,01	-	3,18 (dd)	3,19 (t)
4	38,8	38,83	-	-	-	-
5	55,3	55,16	55,29	-	0,69 (d)	0,69 (t)
6	18,3	18,30	-	18,33	1,39 (q) e 1,54 (d)	1,38 (m)
7	34,2	34,26	-	34,10	1,41 (m)	1,35 (t)
8	40,8	40,81	-	-	-	-
9	50,4	50,42	50,41	-	1,28 (d)	1,28 (d)
10	37,1	37,15	-	-	-	-
11	20,9	20,91	-	20,94	1,25 (q) e 1,42 (d)	1,20 (m) e 1,40 (s)
12	25,1	25,12	-	25,12	1,07 (q) e 1,68 (d)	-
13	38,0	38,04	38,04	-	1,67 (t)	1,67 (s)
14	42,8	42,81	-	-	-	-
15	27,4	27,42	-	27,04	1,01 (d) e 1,71 (t)	-
16	35,5	35,56	-	35,41	1,38 (t) e 1,49 (d)	-
17	43,0	42,98	-	-	-	-
18	48,2	48,28	48,29	-	1,37 (t)	1,35 (t)
19	47,9	47,96	47,99	-	2,39 (m)	2,38 (m)
20	150,9	150,94	-	-	-	-
21	29,8	29,69	-	29,67	1,33 (m) e 1,93 (m)	1,92 (m)
22	40,0	39,98	-	39,83	1,20 (m) e 1,42 (m)	-
23	28,0	27,97	-	27,82	0,98 (s)	0,96 (s)
24	15,4	15,34	-	15,39	0,77 (s)	0,76 (s)
25	16,1	16,09	-	16,11	0,84 (s)	0,82 (s)
26	15,9	15,95	-	15,96	1,04 (s)	1,02 (s)
27	14,5	14,52	-	14,54	0,97 (s)	0,94 (s)
28	18,0	17,98	-	17,99	0,79 (s)	0,78 (s)
29	109,3	109,30	-	109,33	4,56 (m) e 4,69 (m)	4,56 (s) e 4,68 (s)
30	19,3	19,29	-	19,30	1,69 (s)	1,67 (s)

Tabela 14: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C para a a-amirina.

C	d_c				d_H	
	Literatura	M-7	DEPT 90	DEPT 135	Literatura	M-7
1	38,7	38,69	-	38,53	-	-
2	27,2	27,25	-	27,21	-	-
3	78,3	78,98	78,83	-	3,22 (dd, $J=5$ e 11Hz)	3,17 (d)
4	38,7	38,56	-	-	-	-
5	55,2	55,29	55,29	-	-	-
6	18,3	18,30	-	18,33	-	-
7	32,9	32,91	-	32,73	-	-
8	40,0	39,78	-	-	-	-
9	47,7	47,62	47,63	-	-	-
10	36,9	36,93	-	-	-	-
11	23,3	23,35	-	23,36	-	-
12	124,3	124,40	124,41	-	5,12 (t, $J=3,5$ Hz)	5,12
13	139,3	139,56	-	-	-	-
14	42,0	42,06	-	-	-	-
15	28,7	28,72	-	-	-	-
16	26,6	26,60	-	26,46	-	-
17	33,7	33,73	-	-	-	-
18	58,9	59,06	59,06	-	-	-
19	39,6	39,64	39,65	-	-	0,91 (s)
20	39,6	39,59	39,37	-	-	-
21	31,2	31,23	-	31,07	-	-
22	41,5	41,51	-	41,35	-	-
23	28,1	28,07	-	28,22	0,99 (s)	-
24	15,6	15,56	-	15,51	0,79 (s)	-
25	15,6	15,65	-	15,60	0,95 (s)	-
26	16,8	16,84	-	16,82	1,01 (s)	-
27	23,3	23,25	-	23,27	1,07 (s)	-
28	28,1	28,07	-	28,22	0,80 (s)	-
29	17,4	17,44	-	17,48	0,79 (d, $J=5,5$ Hz)	-
30	21,3	21,37	-	21,42	0,92 (d, $J=5,5$ Hz)	-

Tabela 15: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C para a β -amirina.

C	d_C				d_H	
	Literatura	M-7	DEPT 90	DEPT 135	Literatura	M-7
1	38,7	38,56	-	38,53	-	-
2	27,3	27,21	-	27,03	-	-
3	79,0	78,98	79,01	-	3,24 (dd, $J=5$ e 11)	3,24 (d)
4	38,8	38,83	-	-	-	-
5	55,3	55,28	55,29	-	-	-
6	18,5	18,30	-	18,33	-	-
7	32,8	32,63	-	32,74	-	-
8	38,8	38,75	-	-	-	-
9	47,7	47,69	47,62	-	-	-
10	37,6	37,15	-	-	-	-
11	23,6	23,67	-	23,33	-	-
12	121,8	121,70	121,74	-	5,18 (t, $J=3,5$ Hz)	5,18 (t)
13	145,1	145,17	-	-	-	-
14	41,8	41,69	-	-	-	-
15	26,2	26,13	-	26,46	-	-
16	27,0	27,21	-	27,03	-	-
17	32,5	32,63	-	-	-	-
18	47,4	47,21	47,23	-	-	1,59 (t)
19	46,9	46,81	-	46,62	-	1,40 (s)
20	31,1	31,06	-	-	-	-
21	34,8	34,71	-	34,55	-	-
22	37,2	36,93	-	36,95	-	-
23	28,2	28,38	-	28,21	1,00 (s)	-
24	15,5	15,56	-	15,51	0,79 (s)	-
25	15,6	15,65	-	15,60	0,94 (s)	-
26	16,9	16,84	-	16,81	0,97 (s)	-
27	26,0	25,97	-	25,97	1,13 (s)	-
28	28,4	28,38	-	28,58	0,83 (s)	-
29	33,3	33,32	-	33,16	0,87 (s)	-
30	23,7	23,67	-	23,51	0,87 (s)	-

Tabela 16: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C para o 4^o terpeno.

C	d _C			d _H
	3-β-24-OH-lupano	3-β-28-OH-betulina	4 ^o terpeno	4 ^o terpeno
1	38,5	38,8	38,75	
2	27,8	27,2	27,39	
3	80,9	78,9	78,98	
4	42,8	38,9	38,83	
5	55,9	55,3	55,16	
6	18,4	18,3	18,30	
7	34,9	34,3	34,26	
8	40,9	40,9	40,81	
9	50,5	50,4	50,42	
10	38,0	37,2	37,15	
11	21,2	20,9	20,91	
12	25,1	25,3	25,12	
13	36,9	37,3	36,88	
14	42,8	42,7	42,81	
15	27,4	27,0	26,92	1,13 (singleto largo)
16	35,6	29,2	35,56	
17	43,0	47,8	42,98	
18	48,0	48,8	47,96	
19	48,3	47,8	48,28	
20	150,9	150,6	150,9	
21	29,9	29,8	29,83	1,25 (singleto)
22	40,0	34,0	32,46	
23	22,4	28,0	22,60	0,91 (singleto largo, J=0,9)
24	64,5	15,4	63,07	3,63 (t, J=11,97)
25	15,9	16,1	15,47	0,94 (singleto largo)
26	16,7	16,0	16,79	1,02 (singleto)
27	14,6	14,8	14,10	
28	18,0	60,2	31,91	
29	109,4	109,6	109,3	
30	19,3	19,1	19,29	
31	-	-	23,51	

4.2.1.4. Identificação dos metabólitos em M-8 presentes no grupo de frações F₁₁₋₁₄

Um sólido branco amorfo (840mg, **M-8**) foi obtido do grupo de frações F₁₁₋₁₄, fornecendo absorções na região do IV em 3436 cm⁻¹, banda larga correspondendo a grupo hidroxila, 2920-2850 cm⁻¹ grupos CH₃ e CH₂ e 1461 e 1379 cm⁻¹ referente a ligações C-H alifáticas, 1632 e 979 cm⁻¹ grupos olefínicos (Figura 51).

De acordo com os dados da espectroteca fornecidos pelo espectro de CG-EM (Figura 52), o sólido **M-7** apresentou uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos: C-14, C-19, C-21 e C-23 (Figura 16); uma mistura de ésteres isopropílicos de ácidos graxos: C-16, C-17 e C-20 (Figura 17). E ainda, uma mistura esteroidal contendo ergosterol, estigmasterol colesterol e colesteroína, conforme mostra a Figura 18.

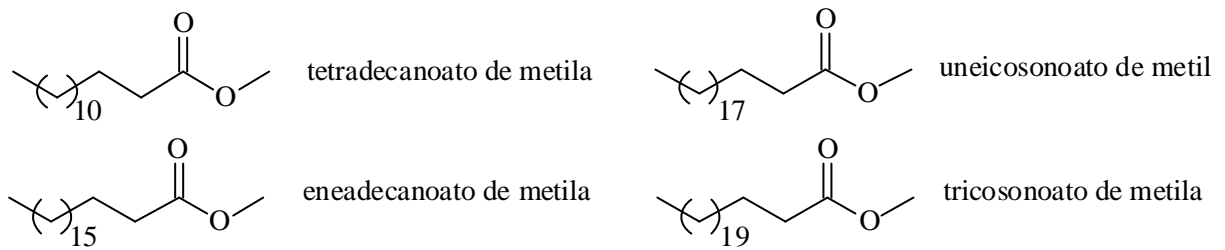


Figura 16: Mistura de ésteres metílicos de **M-8**.

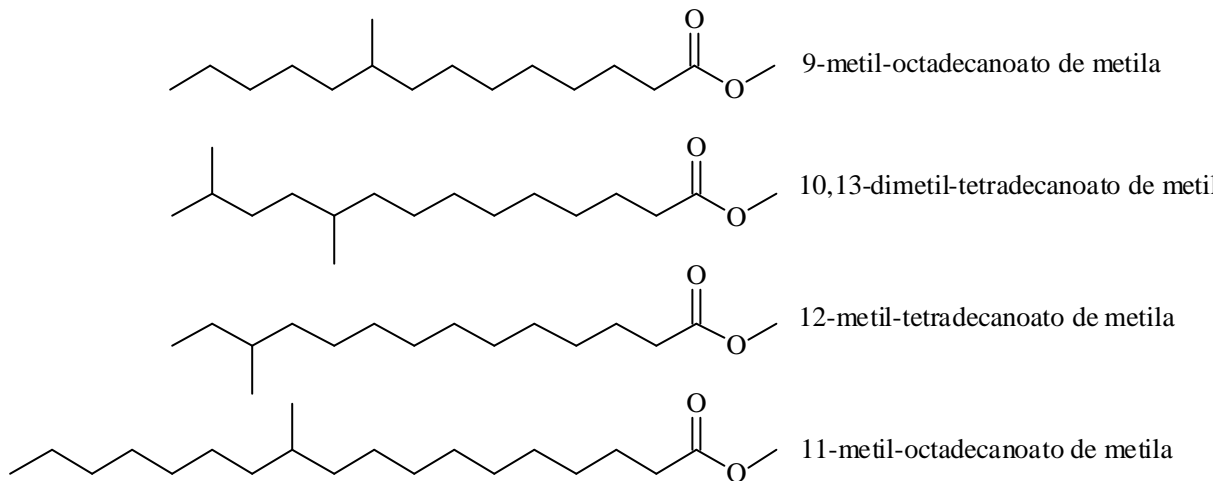


Figura 17: Mistura de ésteres isopropílicos em **M-8**.

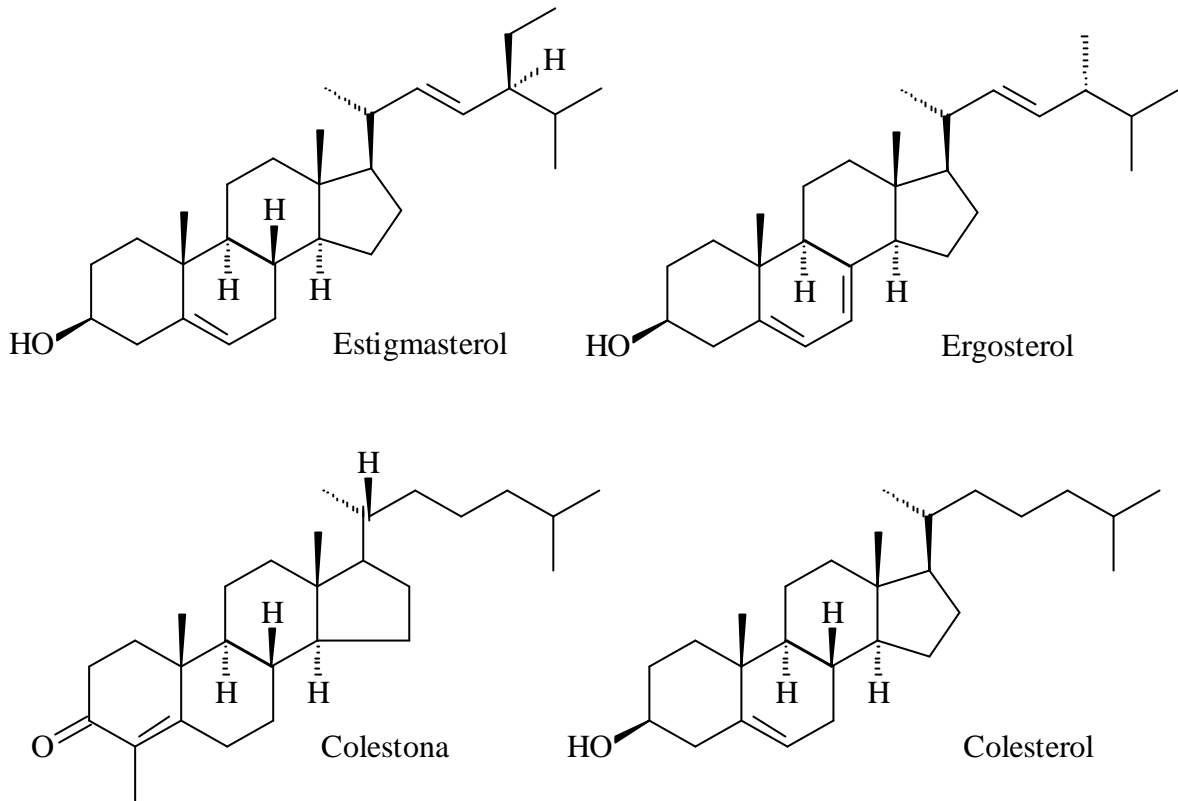


Figura 18: Mistura de esteróides em **M-8**.

4.2.1.5. Identificação dos metabólitos em **M-9** presentes no grupo de frações F_{15-21}

O grupo de frações F_{15-21} forneceu 50 mg de um sólido branco (**M-9**) que após purificação com metanol forneceu por IV absorções em 3422 cm^{-1} banda larga referente ao grupo hidroxila, $2921\text{-}2852\text{ cm}^{-1}$ grupos CH_2 e CH_3 e 1733 cm^{-1} carbonila de éster (Figura 53).

A análise por CG-EM da amostra metilada com diazo metano forneceu por comparação aos dados da biblioteca do aparelho (Figura 54) uma mistura de ésteres metílicos e isopropílicos de ácidos graxos, conforme mostra a Figura 19.

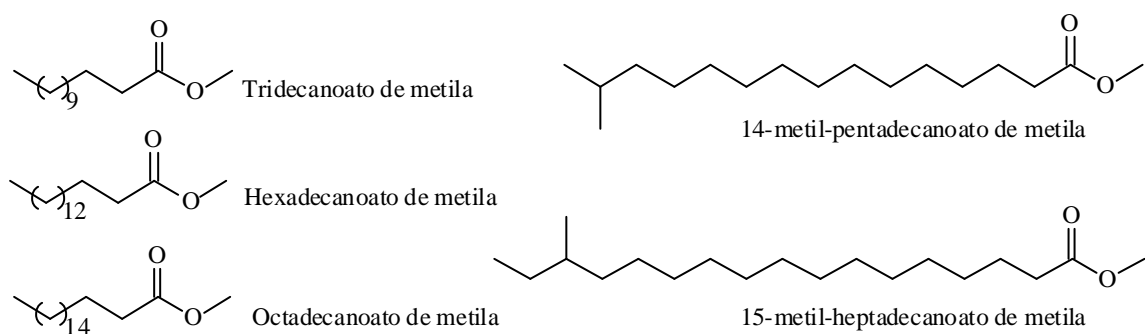


Figura 19: Mistura de ésteres metílicos e isopropílicos de **M-9**.

4.2.1.6. Identificação dos metabólitos em M-10 presente no grupo de frações F₂₂₋₃₂

Após purificação com acetato de etila e acetona o grupo de frações F₂₂₋₃₂, forneceu 130 mg de um sólido branco amorfo, o qual por dados espectroscópicos de IV apresentou absorções em 3261 cm⁻¹ referente a grupo hidroxila e 2959-2878 cm⁻¹ referentes a grupos CH₂ e CH₃ (Figura 55).

O sólido M-10 depois de acetilado foi submetido a análise por CG-EM (Figura 56), e em comparação com a espectroteca do aparelho apresentou uma mistura de álcoois (Figura 20).

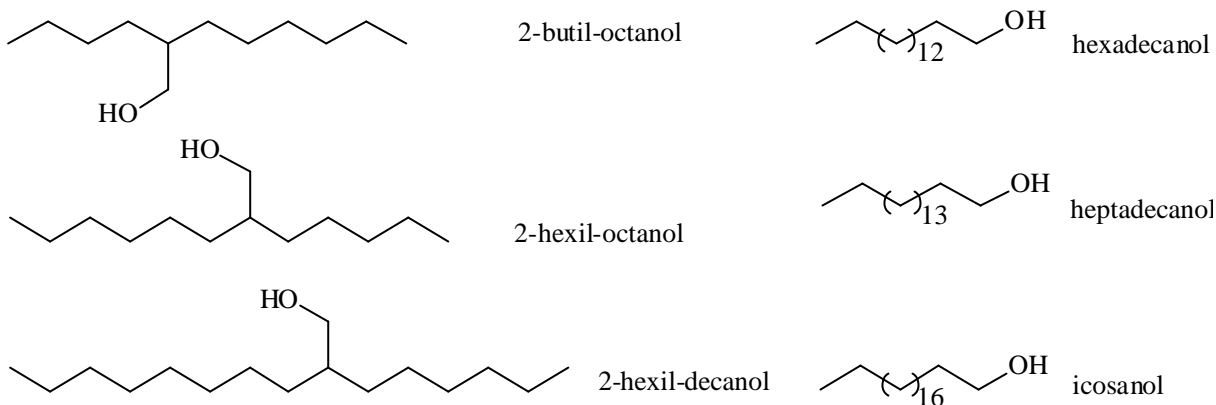


Figura 20: Mistura de álcoois de M-10.

4.2.1.7. Identificação do metabólito S-2 no grupo de frações F₃₃₋₃₉

Os grupos F₃₃₋₄₇ foram comparados em CCF e com o espectro de IV do manitol (S-2), açúcar isolado das flores da *Ixora coccinea* (parte experimental, Esquema 2). O grupo forneceu um total de 120 mg de sólido branco granuloso (S-2) com ponto de fusão = 162^oC, não corrigido (CHAPMAN e HALL, 1982, P.F. = 166^oC), solúvel em metanol/acetona (5:5), DMSO/metanol (9:1) e em água. O espectro em IV (Figura 57) forneceu absorções em 3410 cm⁻¹ banda larga referente ao grupo hidroxila; 2923-2853 cm⁻¹ a grupos CH₂ e CH₃, confirmando a estrutura do manitol também presente nas folhas.

4.2.2. Identificação dos metabólitos contidos no grupo de frações do E.B.CHCl₃

O fracionamento cromatográfico do extrato bruto clorofórmico das folhas de *Ixora coccinea*, denominado de E.B.CHCl₃, após análise qualitativa em CCF, e os processos preliminares de purificação (parte experimental, Esquema 5) possibilitaram a reunião das frações em dois grupos: F₁₋₇₉ e F₈₀₋₉₀.

Os dois grupos, isoladamente foram submetidos a análise por técnicas espectroscópicas, para a elucidação estrutural, através de IV, RMN de ¹H e de ¹³C e APT, onde os resultados obtidos serão descritos a seguir.

4.2.2.1. Identificação do metabólito S-3 no grupo de frações F₁₋₇₉

O sólido isolado das frações F₁₋₇₉ (S-3) se apresentou como um pó branco, amorfo e revelou se tratar de um triterpeno tri-hidroxiado com um grupamento oxi-benzeno, da classe dos hopanos, e que teve sua estrutura confirmada através de dados espectroscópicos já citados acima.

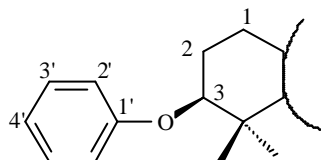
O espectro na região do infravermelho apresentou absorções em 3422 cm⁻¹, banda larga correspondendo ao grupo hidroxila, 2920-2851 cm⁻¹ para grupos CH₃ e CH₂, 1641, 1539 e 1466 cm⁻¹ na região aromática e 1462 cm⁻¹ deformação de grupo CH₂, ligado a grupo aromático e olefínico (Figura 58).

O espectro de RMN de ^1H , conforme mostra a Figura 59, apresenta sinais para hidrogênios aromáticos em δ 8,26 (d, $J=4,0$ Hz); 7,93 (s); 7,89 (d, $J=8,0$ Hz); 7,54 (t, $J=8,0$ Hz) e 7,44 (d, $J=4,0$ Hz); hidrogênios carbinólicos em δ 4,21 (t, $J=11$ Hz); 4,05 (t, $J=11$ Hz) e 3,65 (t, $J=11$ Hz); hidrogênio olefínico em δ 5,82 (m, $J=5$ Hz). O espectro mostrou ainda, sinais de hidrogênio para cinco grupos metílicos entre δ 0,99 e 1,2. A tabela 16 mostra os deslocamentos químicos assinalados (PRETSCH, E., *et al*, 1982).

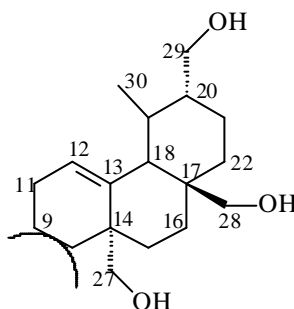
Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C no espectro totalmente desacoplado e APT (Figura 60), foram comparados com a literatura (MAHATO *et KUNDU*, 1994) através de: L-1 = 3 β -OH- α -amirina, (Figura 21). Observou-se sinais de carbonos na região aromática em δ 128,99 (C-3'); 125,48 (C-4') e 114,04 (C-2'), carbonos olefínicos em δ 139,3 (C-13); 124,27 (C-12), e carbonos carbinólicos em δ 80,57 (C-3); 68,16 (C-29), 63,09 (C-27) e 59,53 (C-28), conforme mostra a Tabela 17.

Em comparação com dados da literatura (MAHATO *et KUNDU*, 1994) possibilitaram sugerir como componente majoritário um triterpeno com esqueleto básico similar ao da 3 β -OH- α -amirina. A Tabela 17 indica a comparação dos deslocamentos químicos da literatura e do triterpeno sugerido.

O sinal de RMN de ^{13}C em δ 80,57 para o C-3 em campo mais baixo, sugere que este esteja ligado a um grupo aromático.



E os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e APT em δ 68,17 (C-28); 63,09 (C-27) e 59,53 (C-28) indicam grupos hidroxílicos ligados a carbonos metilênicos, com sinais de RMN de ^1H em δ 4,21 (t, $J=11$ Hz); 4,05 (t, $J=11$ Hz) e 3,65 (t, $J=11$ Hz).



Assim, a estrutura sugerida como metabólito majoritário observado nos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C e APT, teria o esqueleto básico da série das amirinas, conforme mostra a figura 21.

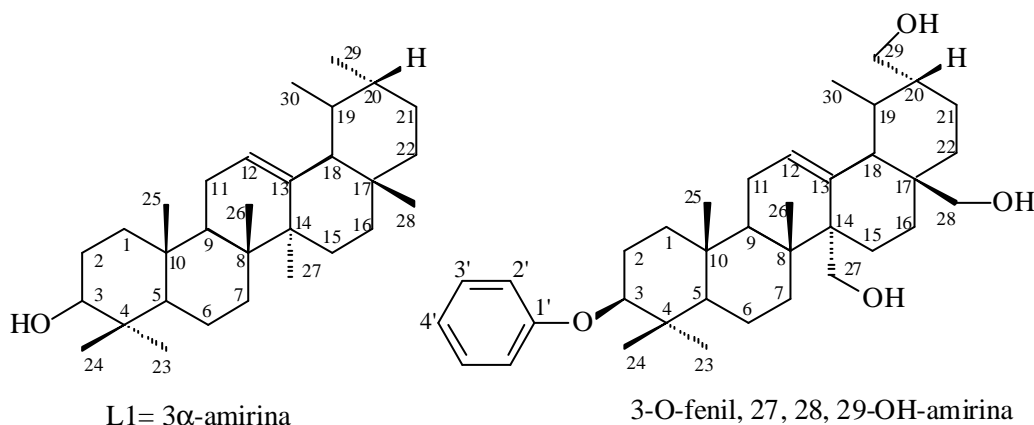


Figura 21: Composto utilizado da literatura, L-1, em comparação com a estrutura proposta do triterpeno 3-O-fenil, 27 α , 28 β , 29 α -OH-amirina

Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C para a proposta de **S-3**

	d_C	d_C	d_H
C	L-1	S-3	S-3
1	38,7	37,40	-
2	27,2	27,18	-
3	78,3	80,57	3,5 (s)
4	38,7	38,06	-
5	55,2	55,38	-
6	18,3	17,96	-
7	32,9	34,06	-
8	40,0	39,97	-
9	47,7	47,97	-
10	36,9	36,50	-
11	23,3	23,72	-
12	124,3	124,28	5,82 (m, $J= 5$ Hz)
13	139,3	139,26	-
14	42,0	42,97	-
15	28,7	28,24	-
16	26,6	26,63	-
17	33,7	31,9	-
18	58,9	48,28	-
19	39,6	39,70	-
20	39,6	38,06	-
21	31,2	30,14	-
22	41,5	40,92	0,99 (s)
23	28,1	31,23	0,99 (s)
24	15,6	14,62	0,10 (s)
25	15,6	14,04	0,9 (s)
26	16,8	15,95	1,2 (s)
27	23,3	63,09	3,65 (t, $J= 11$ Hz)
28	28,1	59,53	4,21 (t, $J= 11$ Hz)
29	17,4	68,17	4,05 (t, $J= 11$ Hz)
30	21,3	31,91	-
1'	-	Não observado.	-
2'	-	114,04	7,54 (t, $J= 8$ Hz)
3'	-	128,99	7,44 (d, $J= 4$ Hz)
4'	-	125,01	7,93 (s)

4.2.2.2. Identificação do metabólito (S-2) presente no grupo de frações F₈₀₋₉₀

Para o grupo de frações F₈₀₋₉₀ foi feito um estudo comparativo com o açúcar manitol isolado das flores da *Ixora coccinea* (MONTEATH, S.A.F.A.; *et al*, 2000) e descrito na parte de resultados, 4.1.3. Sua estrutura foi confirmada através de dados espectroscópicos de infravermelho.

O espectro de infravermelho mostrou absorções em 3413 cm⁻¹, como banda larga referente ao grupo hidroxila, e em 2930 e 2870 cm⁻¹ devido aos grupos CH₂ e CH₃ (figura 61).

4.3. Considerações Biossintéticas

A feição mais espetacular da complexa maquinaria física e química que permite o funcionamento dos seres vivos, desde a sua origem através do desenvolvimento até a morte, é a total interdependência de todos os fenômenos envolvidos nesses três estágios. Em plantas, as partes essenciais da maquinaria celular constam de uma unidade informativa (genes) que controla a matéria-prima necessária para a sua reprodução, instruindo a formação de catalisadores (enzimas) para a síntese inicialmente de metabólitos primários. Essa designação decorre de sua condição de fornecedores de matéria-prima e energia para um outro grupo de metabólitos de ocorrência esporádica e designada de metabólitos especiais (GOTTLIEG *et al*, 1996). Seis são as propriedades destes metabólitos especiais que os caracterizam como mensageiros de informação: 1. polaridade; 2. pequena massa molecular; 3. meia-vida curta; 4. reatividade química (variabilidade estrutural); 5. ocorrência esporádica; 6. potencial anti-oxidante.

Polaridade e pequeno tamanho molecular possibilitam associação e transporte por dobramentos de seus veículos protéicos e deslocamento através de estreitos canais das membranas que separam os compartimentos celulares. Meia-vida curta, não excedendo o período entre a liberação por um conjunto macromolecular e a recepção por outro, possibilita a desobstrução da rede de comunicações. Variabilidade molecular permite a modulação das mensagens à maneira dos vocábulos de uma linguagem. Ocorrência esporádica, expressão de um caminho metabólico particular, permite ao organismo atingir um nível de biodiversidade em adequação as condições impostas pelo ambiente. Finalmente, a inserção desses metabólitos especiais ocorre predominantemente em caminhos oxidativos. Essa característica, talvez a mais geral, não apenas facilita a transformação e decomposição metabólicas, atributos essenciais para o seu funcionamento como mensageiros, mas também protege o metabolismo vegetal como um todo contra a ação do agente destruidor que ela mesma produz, o oxigênio.

Para o químico de produtos naturais, o conhecimento dos precursores e, às vezes, das etapas necessárias para a elaboração das diferentes classes de substâncias naturais, é a base fundamental de raciocínio para a determinação estrutural das substâncias isoladas. A origem biossintética não pode ser discutida em termos gerais, cada grupo de substâncias tem uma rota metabólica diferente (BASTOS, 2001) e todas elas de igual importância para a compreensão de uma dada espécie.

A biossíntese e degradação de carboidratos (DEWICK *et al*, 1998) são importantes componentes do metabolismo primário o qual é essencial para todos os organismos. Os carboidratos são os primeiros produtos formados na fotossíntese, e são os produtos do qual plantas sintetizam sua reserva alimentícia bem como para a produção de outros constituintes químicos. Metabólitos especiais são também derivados do metabolismo dos carboidratos e relacionados com as vias do acetato, chiquimato e mevalonato, muitos bem elucidados através da literatura (BU'LOCK, 1969 e DEWICK, 1998).

Na glicólise, o hexofosfato se hidrolisa produzindo triosefosfato que numa posterior oxidação através do fosfoenolpiruvato e piruvato conduz à acetil coenzima A. Este tioéster reativo é o principal substrato que toma parte no ciclo dos ácidos tricarbóxicos e suas variações, no qual, como processo oxidante, tem um papel chave na formação de agentes fosforilantes e redutores, e é também uma fonte importante de metabólitos especiais.

Além disso, a partir do mesmo acetil-CoA derivam dos importantes processos de biossíntese primária, um dos quais que via malonil-CoA conduza aos ácidos graxos, e outro que via acetoacetil-CoA, a substâncias isoprenóides são produzidos por estes dois processos.

Um grande número de produtos naturais com estruturas definidas e regulares é formado por unidades de cinco carbonos, chamados de isopentenil ou unidades isopreno. O isopreno tem o seu correspondente biologicamente ativo no ácido mevalônico através de uma série de etapas catalisadas enzimaticamente. Os compostos formados pela ligação cabeça-cauda das unidades isopreno são chamados coletivamente de terpenos.

Triterpenos são formados por seis unidades de isopreno, constituindo metabólitos com trinta átomos de carbono. Os triterpenos não são formados por uma extensão do processo de adição de isopentenil difosfato (IPP) para o crescimento da cadeia. Ao invés, duas moléculas de farnesil difosfato são unidas cauda-cauda para produzir o hidrocarboneto esqualeno, originalmente isolado do óleo de fígado de tubarão. O esqualeno foi subsequentemente encontrado em fígado de rato fermentado, e este sistema usado para estudar esta rota biossintética como precursor de triterpenos e esteróides.

A ciclização do esqualeno é via o intermediário esqualeno-2,3-óxido, produzido na reação catalisada por uma flavoproteína requerendo oxigênio (O_2) e NADPH como cofatores, conforme mostra a Figura 22.

Se o óxido de esqualeno é posicionado e quebrado na superfície da enzima, a estrutura policíclica do triterpeno formado pode ser racionalizada em termos de primeiro uma ciclização concertada mediada por carbocátion, seguida por uma série de migrações concertadas de metil e hidretos por rearranjos do tipo Wagner-Meerwein. A ciclização pode ser melhor entendida se um passo da seqüência for considerado. A protonação permitirá a abertura do anel e gerará um carbocátion terciário preferencialmente, posicionado para permitir uma adição eletrofílica na dupla ligação formando um anel de seis membros. Este processo é contínuo, gerando um novo carbocátion após cada formação de anel, até um cátion lupenil ser formado. A estereoquímica neste cátion é controlada pelo tipo de dobra realizada na superfície da enzima, e isto provavelmente também limita a extensão do processo de ciclização. Assim, se a dobra do óxido de esqualeno aproxima da conformação cadeira-cadeira-cadeira, o cátion transitório lupenil será produzido com esta conformação característica. A perda de um próton do cátion lupenil fornece lupeol, e a expansão do anel no cátion lupenil pela migração da ligação fornecendo um sistema oleanil, e este íon é descarregado pela migração do hidreto e perda de um próton como demonstrado por estudos qualificados, fornecendo a largamente distribuída β -amirina. Formação do isomérico a-amirina envolvendo primeiro a migração do metil no cátion oleanil, então descarrega para o novo cátion taraxasteril pela migração de três hidretos e a perda de um próton. A comparação com a-amirina mostra a súbita diferença estereoquímica presente porque a inversão da configuração causada pela migração de hidreto não tem ocorrência. Onde as evidências são avaliáveis, desta série extensiva de ciclizações e rearranjos Wagner-Meerwein parece ser catalisada por uma única enzima o qual converte óxido de esqualeno no produto final, exemplo: lupeol, a-amirina e β -amirina (Figura 23).

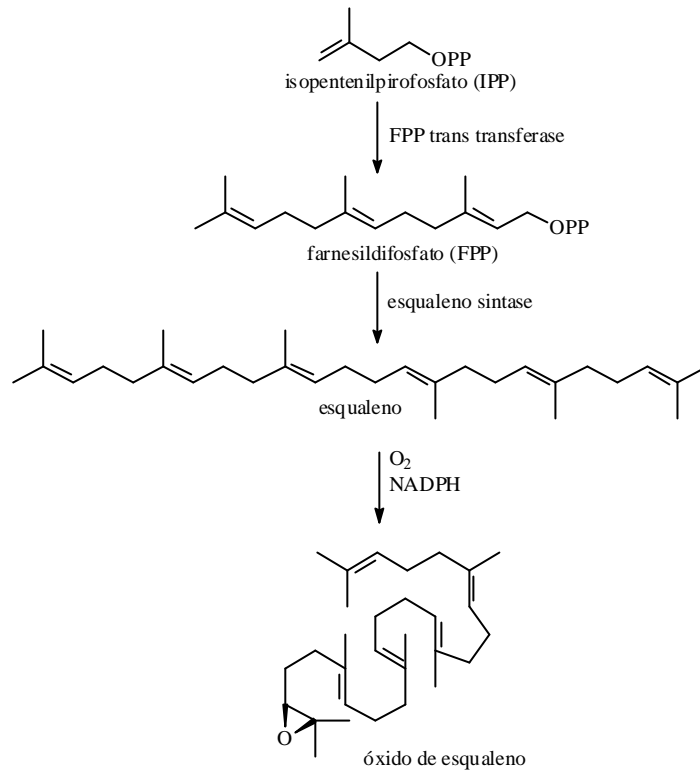


Figura 22: Isomerização de IPP e reações subsequentes na obtenção de óxido de esqualeno na biossíntese de triterpenos e esteróides.

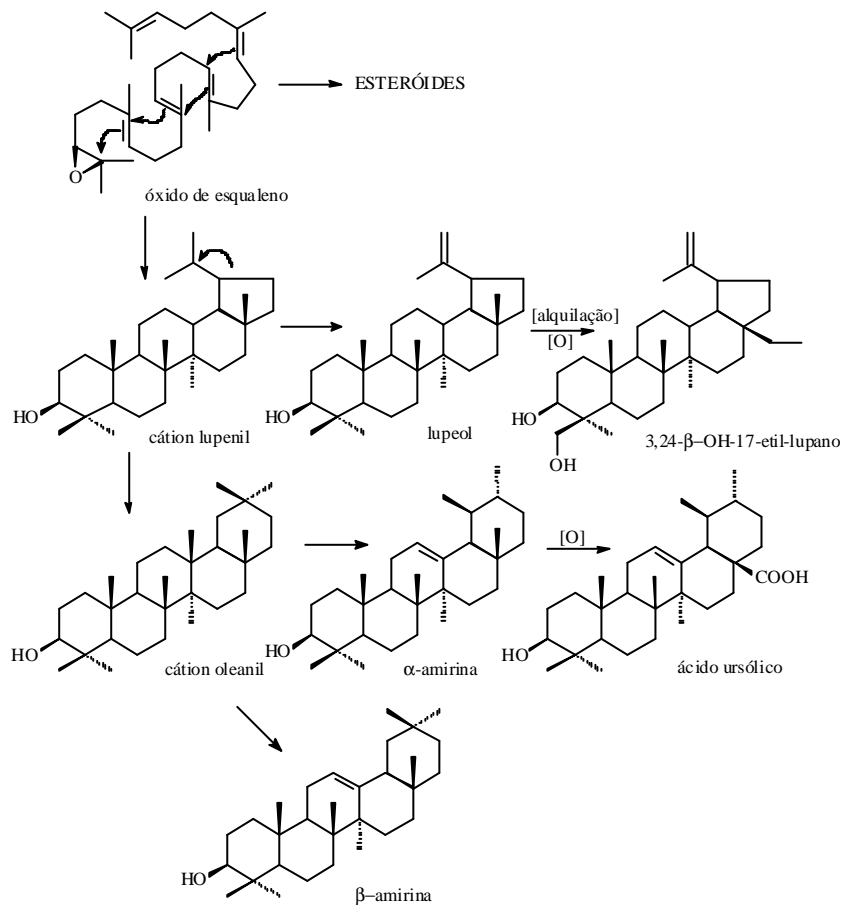


Figura 23: Ciclização do 2,3-óxido de esqualeno na biossíntese de esteróides e triterpenos

4.4. Estudo analítico por prospecção dos constituintes micromoleculares dos extratos brutos hidro-alcóolicos (E.B.OH)

A técnica de prospecção dos constituintes micromoleculares dos extratos de uma planta é um conjunto de ensaios que permitem a detecção de determinadas classes de substâncias presentes em um vegetal, tais como: alcalóides, flavonóides, saponinas, etc. Os ensaios são suficientemente sensíveis (alguns na razão de nanogramas e outros em partes por milhão) para detectar essas classes de compostos, não requerendo mais que alguns miligramas do extrato.

Os resultados de prospecção dos constituintes micromoleculares para os extratos hidro-alcóolicos mostraram a possível presença de ácidos orgânicos, açúcares, alcalóides, cumarinas, terpenos, taninos, fenóis e flavanonóis, evidenciados pelas cores características explicitadas no item 3.7.3.

O interesse pelo estudo dos constituintes nos extratos hidro-alcóolicos foi devido aos ensaios farmacológicos que foram realizados posteriormente.

A tabela 18 mostra os resultados analíticos de prospecção obtidos para os extratos hidro-alcóolicos das flores, folhas, galhos e raízes de *Ixora coccinea*.

Tabela 18. Resultados obtidos da prospecção dos constituintes micromoleculares para os extratos hidro-alcóolicos das flores, folhas, galhos e raízes de *Ixora coccinea*.

ENSAIOS	Teste em branco	FLORES	FOLHAS	GALHOS	RAÍZES
Ácidos orgânicos	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Açúcares	-	positivo	positivo	positivo	positivo
Alcalóides Dragendorff	Precipitado laranja forte	negativo	negativo	positivo	positivo
Alcalóides Mayer	Precipitado branco	negativo	negativo	positivo	positivo
Antocianinas, cianidinas, flavonóis, flavonas, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis	pH 3	negativo	negativo	negativo	negativo
	pH 8,5	negativo	negativo	negativo	negativo
	pH 11	positivo	positivo	positivo	positivo
Catequinas	-	negativo	negativo	positivo	negativo

Tabela 19. Continuação dos resultados obtidos da prospecção dos constituintes micromoleculares para os extratos hidro-alcóolicos das flores, folhas, galhos e raízes de *Ixora coccinea*.

ENSAIOS	Teste em branco	FLORES	FOLHAS	GALHOS	RAÍZES
Cumarina	-	negativo	negativo	positivo	negativo
Esteróides e triterpenos	violeta	positivo	positivo	positivo	positivo
Fenóis e taninos	Coloração amarela	negativo	negativo	negativo	positivo
Flavonóides, flavonas e xantonas	incolor	negativo	positivo	negativo	positivo
Glicosídeos cardíacos	1	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo
Saponinas	-	negativo	negativo	positivo	positivo
Sesquiterpenos e lactonas	Coloração amarela	negativo	negativo	negativo	negativo

4.5. Estudo farmacológico dos extratos hidro-alcóolicos de *Ixora coccinea* Linn

Os estudos farmacológicos foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas sob a coordenação do Prof. Dr. Frederico Argollo Vanderlinde.

A extração hidro-alcóolica foi baseada nos xaropes obtidos a partir das partes da plantas com cachaça, que normalmente o povo usa e designa como “garrafadas”.

As garrafadas são preparadas com a adição de uma ou mais plantas em cachaça, e postas por um período mínimo de 3 dias para macerar, para que os usuários possam então beber. Este tipo de extração, via maceração, empírica às vezes é feita na completa ausência de luz, para tal costumam lacrar a boca do frasco e depois enterram no solo.

As garrafadas que nos propusemos a fazer para testes toxicológicos e farmacológicos foi com o intuito de se aproximar da realidade etnofarmacológica, pois não se toma m xaropes obtidos a partir de extratos de metanol, hexano, etc. Assim, após uma pesquisa de campo sobre o teor alcóolico das cachaças comerciais, utilizou-se uma solução de etanol-água constituindo em 40% de etanol (v/v).

Os testes farmacológicos foram realizados com os extratos hidro-alcóolicos das flores, folhas, galhos e raízes da *Ixora coccinea*. Foram utilizados camundongos do tipo *Swiss* albinos, machos e adultos (25-30 g). O objetivo dos testes farmacológicos é de avaliar a atividade antinociceptiva que, ao contrário da analgesia, não atua a nível de sistema nervoso central, onde os efeitos colaterais são atenuados ou diminuídos.

4.5.1. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste das contorções abdominais foi utilizado com o objetivo de avaliar a presença de atividade analgésica. Este método tem a vantagem de permitir evidenciar até mesmo fracas atividades analgésicas, porém é um teste inespecífico, pois tanto drogas exclusivamente analgésicas como anti-hiperalgésicas semelhantes às drogas antiinflamatórias não estereoidais, inibem as contorções (HENDERSHOT & FORSAITH, 1959; CHERNOV et al., 1967; LOUX et al., 1978).

Extrato Hidroalcoólico dos Galhos (EBOH-G)

O pré-tratamento (*p.o.*) com o **EBOH-G** dos galhos da *Ixora coccinea*, nas doses de 2000, 1000, e 300 mg/kg inibiram em 83,7% ($7,1 \pm 2,7$ contorções), 72,5% ($12,0 \pm 8,4$) e 51,5% ($21,2 \pm 9,3$), respectivamente, o número de contorções acumuladas (30 minutos), comparativamente ao grupo experimental controle (água) que apresentou $43,7 \pm 3,7$ contorções. Resultado semelhante foi obtido com a pré-administração de indometacina (10 mg/kg, *p.o.*), controle positivo do teste, que inibiu em 68,2% o número de contorções acumuladas ($13,9 \pm 2,6$).

Extrato Hidroalcoólico das Raízes e das Folhas (EBOH-R e EBOH-F)

O pré-tratamento (*p.o.*) com o **EBOH-F** ou com o **EBOH-R** da *Ixora coccinea*, na dose de 2000 mg/kg, inibiu em 36% ($36,4 \pm 4,2$ contorções) e 57% ($24,4 \pm 4,4$), respectivamente, o número de contorções acumuladas (30 minutos), comparativamente ao grupo experimental controle (água) que apresentou $57,2 \pm 2,2$ contorções. Da mesma forma, o pré-tratamento com indometacina (10 mg/kg, *p.o.*), controle positivo do teste, inibiu em 59% o número de contorções acumuladas ($23,4 \pm 1,3$).

O pré-tratamento com os extratos hidroalcoólicos **EBOH-G**, **EBOH-F** e **EBOH-R** resultou em significativas inibições do número de contorções, indicando com esta antinocicepção, a possível presença de substâncias com atividade analgésica e/ou antiinflamatória nesses extratos.

Diante dos resultados favoráveis obtidos no teste das contorções abdominais, a realização de novos ensaios foi encaminhada, objetivando confirmar tais atividades e tentar definir os mecanismos da ação antinociceptiva.

4.5.2. Teste da placa quente

O teste da placa quente. Este modelo algésimétrico térmico (WOOLFE & MACDONALD, 1944), mede o tempo de reação do animal a um estímulo térmico. Estes ensaios são sensíveis a drogas opióides tipo morfina (JANSSEN et al., 1963), cuja atividade analgésica é mediada por receptores μ , κ e δ , distribuídos tanto periféricamente, como no sistema nervoso central (BESSON & CHAOUCH, 1987; STEIN & SHIPPENBERG, 1989).

O pré-tratamento com o **EBOH-G** (1000 mg/kg, *p.o.*) não modificou de forma significativa a reatividade dos animais ao estímulo térmico no teste da placa quente. De forma diferente, o tratamento com fentanil (0,05 mg/kg, *s.c.*), controle positivo, elevou significativamente o tempo de reação nos instantes zero ($23,2 \pm 1,8$ segundos), 30 ($15,8 \pm 2,6$ s) e 60 minutos ($13,0 \pm 2,3$ s), quando comparado ao grupo experimental controle ($7,0 \pm 0,7$; $8,5 \pm 1,1$ e $7,9 \pm 1,1$ s, respectivamente).

Neste teste, o extrato hidroalcoólico **EBOH-G** mostrou-se ineficaz, não alterando a reatividade dos animais ao estímulo térmico doloroso, tornando reduzida, a princípio, a possibilidade da participação de mecanismos de ação no sistema nervoso central, na produção da antinocicepção detectada no teste das contorções abdominais.

4.5.3. Teste da formalina

No teste da formalina, a injeção intraplantar de formaldeído em camundongos, produz reação comportamental bifásica, onde a fase inicial (0-5 minutos) resulta essencialmente de estímulo direto sobre os nociceptores; e a segunda fase (15-30 minutos) envolve um período de sensibilização durante o qual ocorre o fenômeno inflamatório (HUNSKAAR et al., 1985, 1986 e 1987).

No teste da formalina o pré-tratamento com o **EBOH-G** da *Ixora coccinea* (2000 mg/kg, *p.o.*), reduziu de forma significativa a reatividade dos animais em 69% ($40,4 \pm 21,1$ s) durante a segunda fase de nocicepção, quando comparado ao grupo experimental controle ($130,1 \pm 30,6$ s). De forma semelhante, o controle positivo desta 2ª fase (indometacina, 10 mg/kg, *p.o.*) inibiu a reatividade em 79% ($27,0 \pm 12,0$ s). Durante a primeira fase do teste (5 minutos iniciais) nenhum destes tratamentos alterou a reatividade dos animais, não sendo, portanto estatisticamente diferente do grupo controle ($128,1 \pm 9,7$ s).

Confirmando hipóteses iniciais, o **EBOH-G** apresentou acentuada antinocicepção apenas na segunda fase deste teste, o que indica a existência neste extrato de princípios que exercem atividade analgésica através de mecanismos antiinflamatórios.

4.5.4. Teste do rota-rod

Extratos Hidroalcoólicos

A administração do **EBOH-F**, do **EBOH-G** ou do **EBOH-R** (2000 mg/kg, *p.o.*) da *Ixora coccinea*, não alterou de forma significativa ($p < 0,05$) a resposta motora dos animais. No grupo controle (água), o tempo de permanência na barra giratória foi de $60,0 \pm 0,0$ s. De forma semelhante, os camundongos tratados com o **EBOH-F**, com o **EBOH-G** ou com o **EBOH-R** da *Ixora coccinea* apresentaram tempos de permanência de $60,0 \pm 0,0$, $57,5 \pm 1,8$ e $53,5 \pm 6,4$ s, respectivamente.

4.5.5. Teste do Campo Aberto

Extratos Hidroalcoólicos

Os resultados do estudo da movimentação espontânea no campo aberto corroboraram com aqueles obtidos no teste do *rota-rod*. Após o pré-tratamento com o **EBOH-R**, com o **EBOH-G** ou com o **EBOH-F** da *Ixora coccinea* (2000 mg/kg, *p.o.*), o número de cruzamentos observados foram de $75,4 \pm 9,8$, $67,6 \pm 6,1$ e $58,4 \pm 10,6$, respectivamente, não diferindo do grupo experimental controle ($71,7 \pm 14,1$ cruzamentos). Da mesma forma, permaneceram inalterados os outros comportamentos aferidos: número de cruzamentos no quadrante central (**EBOH-R**, $6,0 \pm 1,1$; **EBOH-G**, $5,1 \pm 1,1$; **EBOH-F**, $2,7 \pm 1,1$ e o veículo, $6,4 \pm 1,4$ cruzamentos), número do comportamento de *rearing* (**EBOH-R**, $44,4 \pm 4,7$; **EBOH-G**, $40,4 \pm 4,2$; **EBOH-F**, $24,3 \pm 4,6$ e o veículo, $28,1 \pm 7,5$), tempo gasto em *grooming* (**EBOH-R**, $21,3 \pm 5,8$; **EBOH-G**, $23,3 \pm 4,5$; **EBOH-F**, $19,4 \pm 5,5$ e o veículo, $12,3 \pm 2,9$ s), e o número de bolos fecais (**EBOH-R**, $1,8 \pm 0,6$; **EBOH-G**, $1,6 \pm 0,6$; **EBOH-F**, $1,3 \pm 0,6$ e o veículo, $2,4 \pm 0,7$ unidades).

Considerando que os métodos usados para avaliar a atividade antinociceptiva dependem de respostas motoras dos animais, a utilização dos testes do *rota-rod* e do campo aberto teve como objetivo excluir a possibilidade de resultados falsos positivos, caso ocorresse incoordenação motora por sedação e/ou relaxamento muscular. Estes testes demonstraram com os seus resultados a não ocorrência de tais efeitos, confirmando a especificidade dos resultados evidenciados nos testes das contorções abdominais, da placa quente e do *rota-rod*. Estes resultados excluem a possibilidade destes extratos apresentarem efetiva ação depressora ou estimulante do SNC.

Assim, o **EBOH-G** da *Ixora coccinea* possui atividade antinociceptiva quando administrada pela via oral, envolvendo, a princípio, atividade antiinflamatória. A realização de novos ensaios de atividades farmacológicas específicos permitirá a complementação desta caracterização.

5. CONCLUSÕES

O estudo fitofarmacológico de *Ixora coccinea* iniciou-se por uma escolha randômica, devido a beleza e a abundância desta planta em nossa região (incluindo o *Campus* da RURAL), e a busca de novos produtos naturais com atividade farmacológica.

Foram identificadas no extrato metanólico das flores desta espécie uma mistura de hidrocarbonetos, mistura de ácidos graxos (identificados através de seus derivados metilados), hidrocarbonetos funcionalizados, mistura de esteróides, o açúcar manitol e o triterpeno ácido ursólico, que se apresenta como componente majoritário na flor desta espécie.

No extrato hexânico das folhas de *Ixora coccinea*, foram identificados, através de seus derivados esterificados, misturas de hidrocarbonetos, sesquiterpenos, ésteres de ácidos graxos, esteróides, álcoois, além de uma mistura de triterpenos e o açúcar manitol. Já no extrato clorofórmico foi identificado um triterpeno da classe dos hopanos e também o açúcar manitol.

O estudo dos constituintes micromoleculares para os extratos hidro-alcóolicos das flores, folhas, galhos e raízes de *Ixora coccinea* Linn, mostraram como resultados mais significativos a possível presença de: esteróides e triterpenóides nas flores; esteróides, terpenóides e flavonóides nas folhas; alcalóides, catequinas, cumarinas, esteróides, terpenóides e saponinas nos galhos, e alcalóides, flavonóides, esteróides, terpenóides, taninos e saponinas nos galhos.

Os ensaios farmacológicos para a atividade antinociceptiva dos extratos hidro-alcóolicos das flores, folhas, galhos e raízes, mostraram que o extrato dos galhos evidenciou a atividade antinociceptiva, envolvendo, a princípio, atividade antiinflamatória.

Levando-se em consideração o perfil químico de flores, folhas, galhos e raízes da espécie estudada e das considerações etnobotânica e farmacológica da planta, bem como da ação biológica do ácido ursólico, a *Ixora coccinea* Linn mostra-se como uma planta potencialmente medicinal.

6. BIBLIOGRAFIA

- AKBARSHA, M.A.; Murugaian, P., *Phyther. Res.*, 14 (6), 432-435, 2000
- ALAM, M.K., *Econ. Bot.*, 46 (3), 330-335, 1992
- ANDERSON, E.F., *Econ. Bot.*, 40 (1), 38-53, 1986
- ANNAPURNA, J.; Amarnath, P.V.; Amarkumar, D.; Ramakrisna, S.V.; Raghavan, K.V., *Fitoterapia* 74 (3), 291-3, 2003
- ANÔNIMO, *The Wealth of India. Raw Materials*, Vol. V, 275, 1959
- ARSECULERATNE, S.N.; Gunatilaka, A.AL.; Panabokke, R.G., *J. Ethnopharmacol.*, 13 (3), 323-335, 1985
- ASWAL, B.s.; Bhakuni, D.S.; Goel, AK.; Kar, K.; Mehrotra, B.N.; Mukherjee, K.C., *Indian J. Exp. Biol.*, 22 (6), 312-332, 1984
- ATAL, C.K.; Srivastava, J.B.; Wali, B.K.; Chakravarty, R.B.; Dhawan, B.N.; Rastogi, R.P., *Indian J. Exp. Biol.*, 16, 330-349, 1978
- AVIRUTNANT, W.; Pongpan, A, *J. Pharm. Sci.*, 10 (3), 81-86, 1983
- BARICEVIC, D.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Simonovska, B.; Krasna, A.; Zupancic, A., *J. Ethnopharmacol.*, 75 (2-3), 125-32, 2001
- BARROSO, G.M.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária*, (3), 189-229, 1991
- BESSON, J. M., CHAOUCH, A. J., *Physiol. Rev.* 67: 67-186, 1987.
- BHAKUNI, D.S.; Dhar, M.S.; Dhawan, B.N.; Gupta, B.; Srimali, R.C., *Indian J. Exp. Biol.*, 9, 91, 1971
- BHAKUNI, D.S.; Goel, A K.; Jain, S.; Mehrotra, B.N.; Patnaik, G.K.; Prakash, V., *Indian J. Exp. Biol.*, 26 (11), 883RY-904, 1988
- BILIA, A.R.; Mendez, J.; Morelli, I., *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 71, 191-197, 1996
- BOCCHETTI, Luciana Lemos; *Origem dos Mistérios-Mistérios Antigos. Disponível em: www.misteriosantigos.com/origmisterios. Acessado em: 23/06/2004*
- BREMER, B.; Andreasen, K., *American Journal of Botany*, 87, 1731-1748, 2000
- BURKILL, I.H., *Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula Ministry of Agriculture and Cooperatives Kuala Lumpur Malaysia, volume II*, 4, 1966
- CABALION, P.; Fournet, A; Mangeney, P.; Bouqurt, A, *Fitoterapia*, 51, 89-111, 1980
- CABRERA, Maria G.; Sosa de Castro, Nélide T.; Alvarez, Roberto E., *VI jornada de Fitopatologia – Assunción, Paraguai, 06/07/2001*
- CANNON, J.R.; Dampawan, P.; Lojanapiwatna, V.; Phuriyakorn, B.; Sinchai, W.; Sirirugsa, P; Suvatabhandhu, K.; Wiriyachitra, P., *J. Sci. Soc. Thailand*, 6, 46-53, 1980
- CARBAJAL, D.; Casaco, A.; Arruzazabal, L.; Gonzalez, R.; Fuentes, V., *J. Ethnopharmacol.*, 33 (1/2), 21-24, 1991
- CHAPMAN E HALL, *Dictionary of Organic Compounds*, 5ª edição, 1982
- CHATTOPADHYAY, D.; Maiti, K.; Kundu, A.P.; Chakraborty, M.S.; Bhadra, R.; Mandal, S.C.; Mandal, A.B., *J. Ethnopharmacol.*, 77 (1), 49-55, 2001
- CHAUHAN, J.S.; Kumar, S.; Chaturvedi, R., *Curr. Sci.*, 51, 1069-1070, 1982
- CHAUHAN, J.S.; Kumar, S.; Chaturvedi, R., *Phytochemistry*, 23 (10), 2404-2405, 1984
- CHAUHAN, J.S.; Vidypati, T.J., *Indian Journal of Chemistry*, 53B (9), 992-994, 1996
- CHERNOV, H. I.; WILSON, D. E.; FOWLER, W. F.; PLUMMER, A. J., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 167:171-178, 1967
- CURTIS, Willian; *The botanical magazine*, vol. 5, 1791. Disponível em: www.nal.usda.gov/curtis/scarixor.shtml. Acessado em 06/08/2004
- DAULATABAD, C.D.; Ankala gi, R.F., *J. Food Sci. Technol.*, 19, 112-113, 1982
- DAVE, Y.; Thomas, V., *J. Indian Bot. Soc.*, 70 (1-4), 51-54, 1991
- DEEPAK, M.; Handa, S.S., *Phyther. Res.*, 14 (6), 463-465, 2000
- DENG, D.Z.; Starck, S.R.; Hecht, S.M., *J. Nat. Prod.*, 62 (12), 1624-26, 1999
- DEVI, P., *J. Indian Bot. Soc.*, 70 (1-4), 391-392, 1991

- DHAWAN, B.N.; Patnaik, G.K.; Rastogi, R.P.; Singh, K.K.; Taandon, J.S., Indian J. Exp. Biol., 15, 208-219, 1977
- DIAZ, A.M.; Abad, M.J.; Fernandez, L.; Recuero, C.; Villaescusa, L.; Silvan, A. M.; Bermejo, P., Biol. Pharm. Bull, 23 (11), 1307-13, 2000
- DICIONÁRIO HISTÓRICO-BIOGEOGRÁFICO DAS CIÊNCIAS DA SAÚDE NO BRASIL (1832-1930). Casa de Oswaldo Cruz/ Fiocruz. Disponível em: www.dichistoriasaude.coc.fiocruz.br. Acessado em 23/06/2004
- FERNADEZ, M.A.; Alvarez, A.; Garcia, M.D.; Saenz, M.T., Farmaco, 56 (4), 335-338, 2001
- FERNADEZ, M.A.; de las Heras, B.; Garcia, M.D.; Saenz, M.T.; Villar, A., J. Pharm. Pharmacol., 53 (11), 1533-1539, 2001
- FITZPATRICK, G.; Griffith, L.; Maus, W.L., Proc. Fla. State Hort. Soc., 99, 258-260, 1986
- FRANCIS, J.K.; *Ixora coccinea* Linn; Research Forester, international Institu of Tropical Forestry, U.S. Department of Agriculture. Disponível em: www.fs.fed.us/global. Acessado em: 21/11/2003
- GEETHA, T.; Varalakshmi, P., Mol. Cell Biochem., 201 (1-2), 83-87, 1999
- GEETHA, T.; Varalakshmi, P., J. Ethnopharmacol., 76 (1), 77-80, 2001
- HENDERSHOT, L. C. and FORSAITH, J. J., Pharmacol. Exp. Ther., 125:237-240, 1959
- HERNANDEZ, P.M.; Lopez, G.R.E.; Rabanal, R.M.; Darias, V.; Arias, A., J. Ethnopharmacol., 41 (1-2), 115-119, 1994
- HONDA, T.; Gribble, G.W.; *et al.*, Planta Med. (43) 1866-1877, 2000
- HUNSKAAR, S. and HOLE, K. Pain 30: 103-114, 1987.
- ISMAILI, H.; Tortora, S.; Sosa, S.; Fkih-Tetouani, S.; Ilidrissi, A.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Aquino, R., J. Pharm. Pharmacol., 53 (12), 1645-52, 2001
- JANSSEN, P. A. J., NIEMEGERES, C. J. E.; DONY, J. G. H., Arzneim. Forsch. Drug Res. 6: 502-507, 1963
- JAIN, R.K.; Garg, V.K.; Khanduja, S.D., J. Hortic. Sci., 56 (2), 169-71, 1981
- JOHN, D., Int. J. Crude Drug Res., 22 (1), 17-39, 1984
- JOLY, A.B., Botânica-Introdução à taxonomia vegetal, 1, 12-91, 2002
- JUNIOR, V.F.V.; Pinto, A.C., Química Nova 25 (2), 273-286, 2002
- KAPADIA, Z.; Badar, Y., J. Pharm. (univ. Karachi), 5 (1), 51-54, 1988
- KARTHA, A.R.S.; Menon, K.N., Proc. Indian Acad. Sci., 17A, 11-15, 1943
- KASHIWADA, Y.; Nagao, T.; Hashimoto, A.; Ikeshiro, Y.; Okabe, H.; Cosentino, L.M.; Lee, K.H., J. Nat. Prod., 63 (12), 1619-22, 2000
- KHAN, S.S.; Chaghtai, S.A; Oommachan, M., J. Sci. Res. (Bhopal) 6, (1), 37-39, 1984
- KWACK, Beyoung-Hwa; Chung, Hae-Joon, Hanguk Wonye Hakhoe Chi, 21 (1), 91-97, 1980
- KITTUR, M.H.; Mahajanshetti, C.S.; Kaimal, T.N.B.; Lakshminarayana, G., J. Oil Thenol. Ass. India, 15 (3), 43-45, 1983
- KIUCHI, F.; Hioki, M.; Nakamura, N.; Miyashita, N.; Tsuda, Y.; Kondo, K., Shoy Akugaku Zasshi, 43 (4), 288-293, 1989
- KONG, Y.C.; Hu, S.Y.; LAU, F.K.; Che, C.T.; Yeung, H.W.; Cheung, S.; Hwang, J.C.C., Amer. J. Chinese Med., 4, 105-128, 1976
- LAKSHMAMAN, P.; Lee, C.L.; Goh, C.J., Plant. Cell. Rep., 16 (8), 572-577, 1997
- LATHA, P.G.; Panikkar, K.R., Cancer Letters 130 (1-2) 197-202, 1998
- LATHA, P.G.; Panikkar, K.R., Phytotrer. Res., 15 (4), 364-366, 2001
- LEE, K.H.; Ibuka, T.; Furukawa, H.; Kozuka, M.; Wu Ry; Hall, I.H.; Huang, H.C., J. Pharm. Sci., 69 (9), 1050-1056, 1980
- LEE, Kuo-Hsiung, Planta Medica, 308-311, 1998.
- LEE, I.; Lee, J.; Lee, Y.H.; Leonard, J., Anticancer Res., 21 (4A), 2827-33, 2001
- LORENZI, H.; Souza, H.M., Plantas Ornamentais no Brasil: Arbustivas, Herbáceas e Trepadeiras, Nova Odessa, S.P., Ed. Plantarum, p.637, 1995.
- LOUX, J. J.; SMITH, S.; SALEM, H., Arzneim Forsch. 28:1644-1647, 1978
- MAHATO, Sahshi B.; kundu, Asish P., Phytochemistry, 37 (6), 1517-75, 1994
- MAIKHURI, R.K.; Gangwar, A K., Econ. Bot., 47 (4), 354-357, 1993

- MATOS, F.J.A., Introdução à Fitoquímica Experimental, ed. EUFC, 1972
- MENON, T.V.; Pillai, N.G.K.; Pillai, K.G.B.; Kurup, P.B.; Nair, C.P.R., J. Sci. Res. Pl. Med., 1 (3), 29-31, 1980
- MIN, B. S., Planta Medica (65) 374-375, 1999
- MINQUAN, H., Phytochemistry, 29 (4), 1317-1319, 1990
- MIZUSHINA, Y.; Lida, A.; Ohta, K.; Sugawara, F.; Sakaguchi, K., Biochem. J., 350 (Pt 3) 757-63, 2000
- MONTEATH, S.A.F.A.; Echevarria, A.; Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Junior, V.F., X Jornada de Iniciação Científica (Expositor Nº 52), 2000
- MONTEATH, S.A.F.A.; Echevarria, A.; Maciel, M.A. M.; Pinto, A.C.; Junior, V.F., 23^o Reunião Anual SBQ-PN069, 2000
- MONTEATH, S.; Maciel, M. A. M.; Vanderlinde, F. A. Silveira, J. W. S.; Souza, R. H. C.; Cortes, W. S.; Júnior, V., F.V., Echevarria, A., *Revista de Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 3 (3), 61-73, 2004
- NAIR, S.C.; Panikkar, K.R., Cancer Lett, 49 (2), 121-126, 1990
- NAIR, S.C.; Panikkar, B.; Akamanch, K.G.; Panikkar, K.R., Cancer Lett, 60 (3), 253-258, 1991
- NAIR, S.C.; Panikkar, K.R.; Panikkar, B., J. Res. Edu. Ind. Med., 10 (2), 41-44, 1991
- NAPRALERT, Disponível em: nap@pcogl.pmmp.uic.edu Acessado em: 25/09/2001
- NACIONAL INSTITUTE OF ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY, disponível em: www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs. Acessado em: 30-09-2004
- NAYAK, B.S.; Udupa, A L., Fitoterapia, 70 (3), 233-236, 1999
- NEEL, P.L.; Reinert, J.A., Proc. Fla. State Hort. Soc., 88, 586-590, 1976
- NEEL, P.L., Proc. Fla. State Hort. Soc., 90, 353-355, 1978
- NEEL, P.L.; Donselman, H.M., Proc. Fla. State Hort. Soc., 90, 350-353, 1978
- NEEL, P.L., J. Am. Soc. Hortic. Sci., 104 (1), 30-32, 1979
- NIKIEMA, J.B.; Vanhaelen-Fastre, R.; Vanhaelen, M.; Fontaine, J.; De Graef, C.; Heenen, M., Phytother Res., 15 (2), 131-134, 2001
- NOVOTY, L.; Vachalkova, A.; Biggs, D., Neoplasma, 48 (4), 241-246, 2001
- OGUNLANA, E.O.; Ramstad, E., Planta Med., 27, 354-, 1975
- PANIKKAR, K.R.; Bhanumanthy, P.; Raghunath, P.N., Ancient. Sci. Life, 6, 107-108, 1986
- PATNAIK, G.K.; Prakash, V.; Indian Journal Exp. Biol., 26 (11), RY-904, 1988
- PRETSCH, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W., Tablas para la Elucidación Structural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos; ed. Lhambra, 1982
- PINTO, A.C.; Braga, W.F.; Rezende, C.M.; Garrido, F.M.S.; Junior, V.F.V.; Bergter, L.; Patitucci, M.L.; Antunes, OAC., J. Braz. Chem. Soc. 11 (4), 355-360, 2000
- POKROVSKII, A.G.; Il'icheva, T.N.; Proniaeva, T.R.; Chernov, S.V.; Shul'ts, E.E.; Tolstikov, G.A., Dokl Akad Nauk, 369 (3), 414-415, 1999
- RAUCH, F.D.; Yamakawa, R.M., Hort. Science, 15 (1), 97, 1980
- REDDY, K.R.; Rao, J.V.S.; Das, V.S.R., Indian J. Exp. Biol., 17 (8), 813-815, 1979
- REDDY, K.R.; Rao, J.V.S., Indian J. Exp. Biol., 18 (5), 495-499, 1980
- REDDY, K.R.; Rao, J.V.S.; Das, V.S.R., Indian J. Exp. Biol., 19 (3), 256-260, 1981
- REDDY, M.B.; Reddy, K.R.; Reddy, M.N., Int. J. Crud Drug Res., 27 (3), 145-155, 1989
- REENA, Z.; Sudhakaran, N.C.R., Velayudha, P.P., Indian J. Pharm. Sci., 56 (4), 129-132, 1994
- ROWLEY, F.A., Journal of Apicultural Research, 15, (1), 19-22, 1976
- RYU, S.Y.; Oak, M.H.; Yoon, S.K.; Kim, T.S.; Kim, K.M., Planta Med., 66 (4), 358-360, 2000
- SALEEM, M.; Alam, A.; Arifin, S.; Shah, M.S.; Ahmed, B.; Sultana, S., Pharmacol. Res., 43 (2), 127-134, 2001
- SALGARE, S.A.; Chakraborty, D., Res. J. Chem. Environ., 1 (1), 79-80, 1997
- SANTARÉM, E.; Produtos naturais são alvo da biotecnologia. Disponível em: www.aesetorial.com.br/alimentos/artigos. Acessado em: 11/07/2004

- SASIDHARAN, V.K., *Acta Pharm. (Zagreb)*, 47 (1), 47-51, 1997
- SAXENA, H.O, *Lloydia*, 38 (4), 346, 1975
- SEIDL, Peter; Ivanissvich, A.; Vieira, C.L.; *Ciência Hoje*, vol. 26, Nº 154, pág. 6-10, outubro de 1999
- SING, S.P., *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 2 (5), 167-168, 1979
- SINGH, M.M.; Chowdhury, S.R.; Kulshreshtha, D.K.; Kamboj, V.P., *Contraception*, 48 (2), 178-191, 1993
- SMOLENSKI, S.J.; Silinis, H.; Farnsworth, N.R., *Lloydia*, 38, (5), 411-441, 1975
- STEIN, C., MILLAN, M. J., SHIPPENBERG, T. S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 1269-1275, 1989
- TAKEDA, Y.; Nishimura, H.; Inouye, H., *Phytochemistry*, 14, 2647-2650, 1975
- TIKKU, S.; Sindhu, R.S.; Bhartiya, R.K., *Indian J. For.*, 13 (2), 112-114, 1990
- TJIA, Benny O., *U.S. Appl.*, 231, 129, 1988
- TRAORE-KEITA, F.; Gasquet, M.; Di Giorgio, C.; Ollivier, E.; Delmas, F.; Keita, A.; Dumbo, O.; Balansard, G.; Timon-David, P., *Phytother. Res.*, 14 (1), 45-47, 2000
- UMAPATHI, P.M.; Das, V.S.R., *Indian J. Exp. Biol.*, 17 (8), 816-817, 1979
- UNPUBLISHED DATA. NACIONAL CANCER INSTITUTE ANON, *Nat. Cancer Inst. Central Files*, 1976
- VILLEGAS, C.A; Catabay, A, *Asian J. Pharm.* 8, 104, 1986
- VIMALA, D.C.; Nagarajan, S.; Alam, M.; Susan, T.; Joy, S., *Indian J. Exp. Biol.*, 35 (12), 1310-1314, 1997
- WALL, M.E.; Wani, M.C.; Hughes, T.J.; Taylor, H., *J. Nat. Prod.*, 51 (5), 866-873, 1988
- WASUWAT, S., *Research Report. A S. R.C.T.*, Nº 1 on Research Project 17, 22PP, 1967
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D., *J. Pharmacol. and Exp. Therap.*, 80, 300-7, 1944.
- WWW.GEOCITIES.COM/TATICO-2000/NOMES-IM.HTM. Acessado em: 09-08-2003

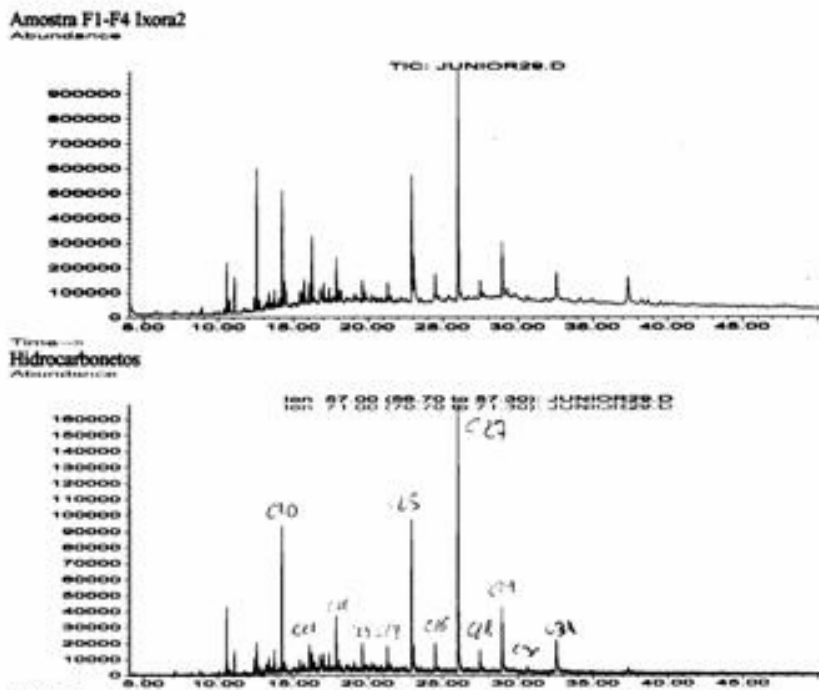


Figura 24- CG-MS para a mistura de hidrocarbonetos de M-1

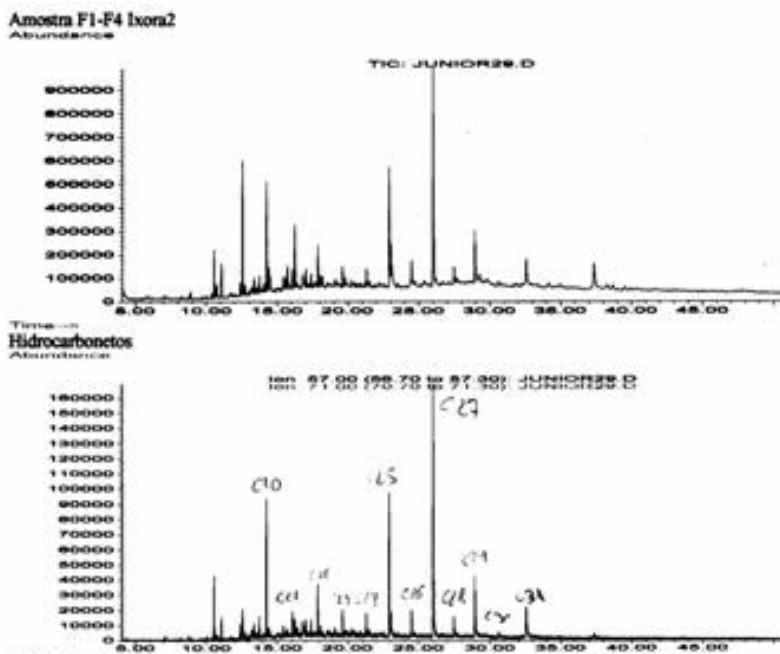


Figura 25- CG-MS para a mistura de ácidos graxos metilados de M-2

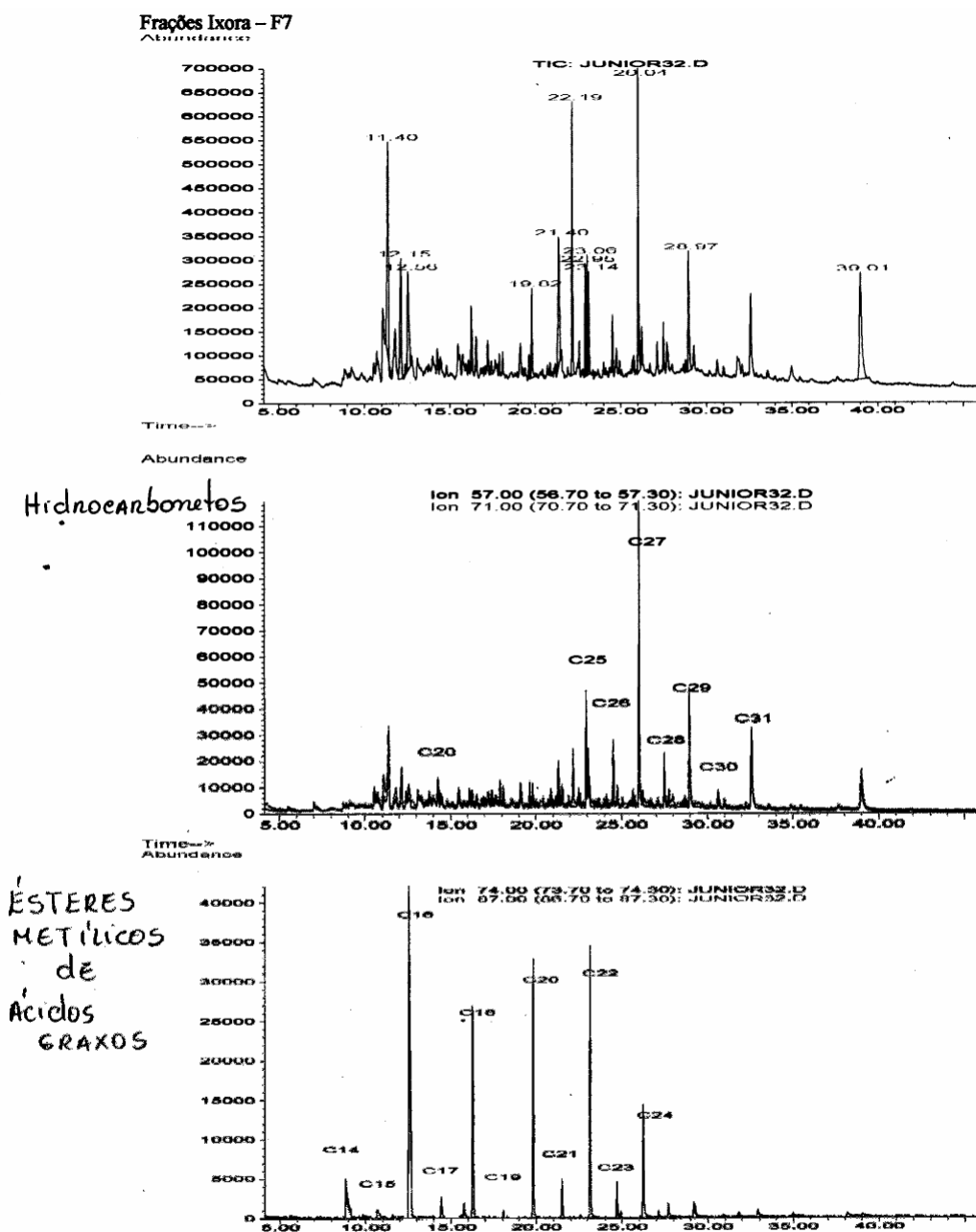
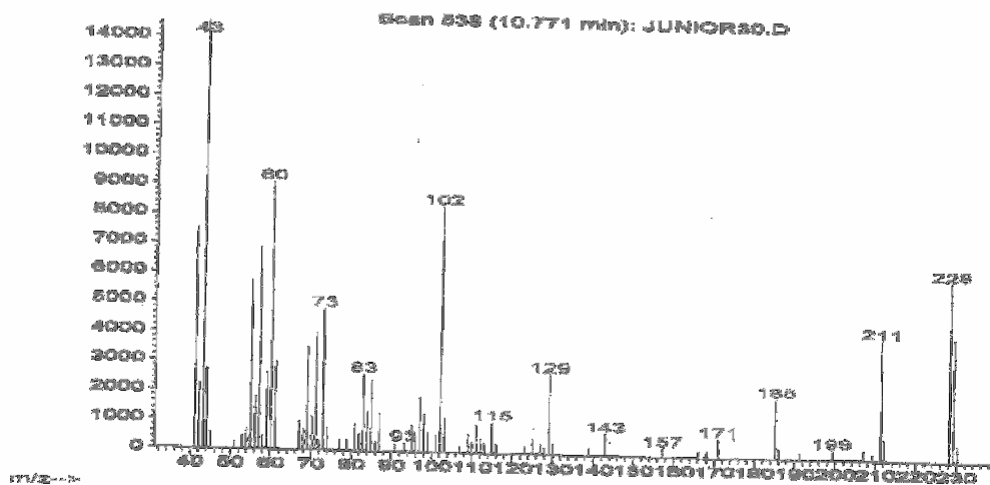
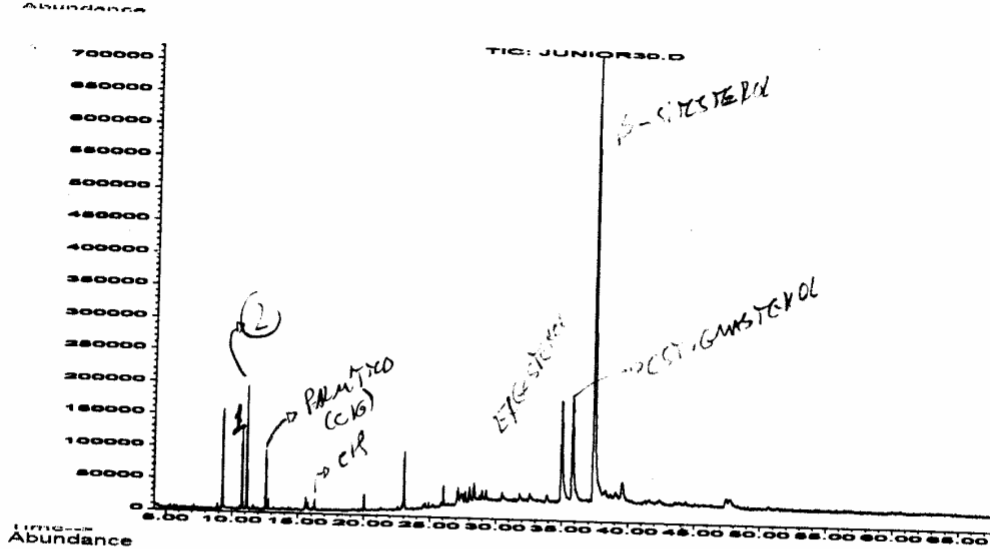


Figura 26- Ampliação dos espectros correspondentes de M-1 e M-2

Amostras Ixora – Segunda coluna
 F10-F17
 Junior30



1-methylethyl tetradecanoate
 Match Quality : 91
 Molecular Weight : 270.26
 Molecular Formula: C17H34O2

Figura 27- CG-EM do tetradecanoato de isopropila de M-3

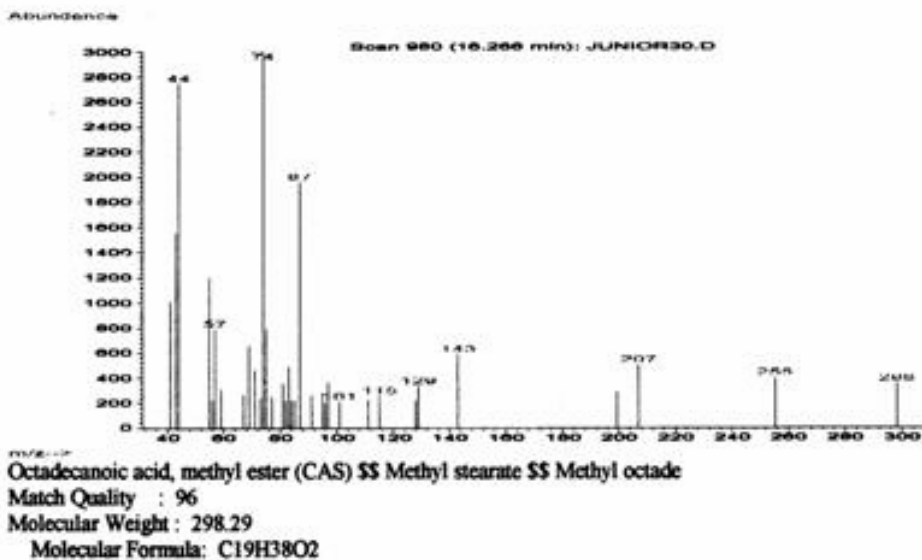


Figura 29: CG-EM do estearato de metila de M-3

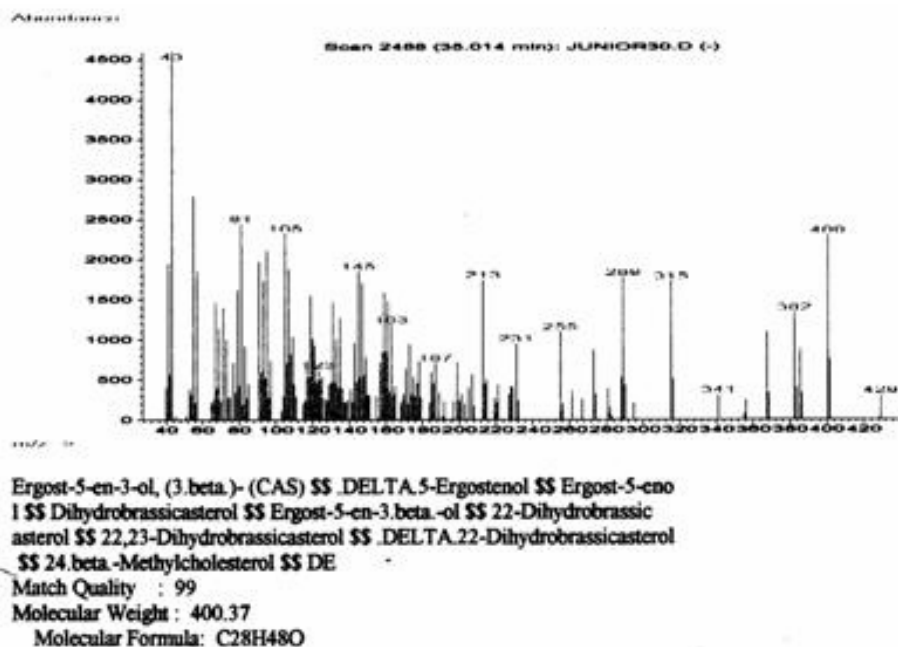
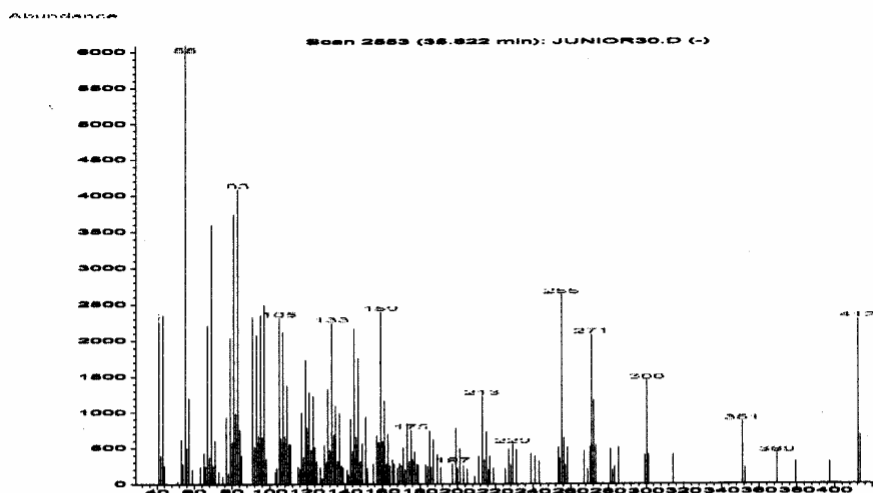


Figura 30- CG-EM do ergosterol e campesterol de M-4



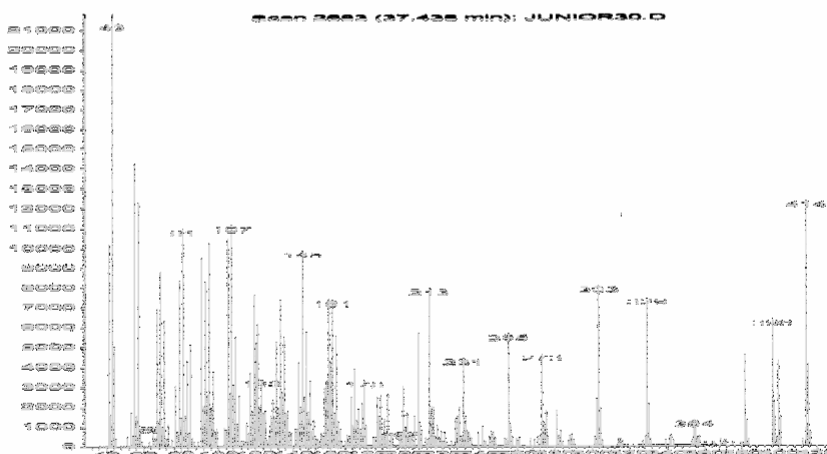
Stigmasta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E)- (CAS) Stigmasterol Stigmasterin
 terin Stigmasterol Stigmasta-5,22-dien-3.beta.-ol (24S)-5,22-Stigmastadien-3.beta.-ol
 Stigmasta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.)- DELTA.5,22-Stigmastadien-3.beta.-ol

Match Quality : 95

Molecular Weight : 412.37

Molecular Formula: C₂₉H₄₈O

Abundance



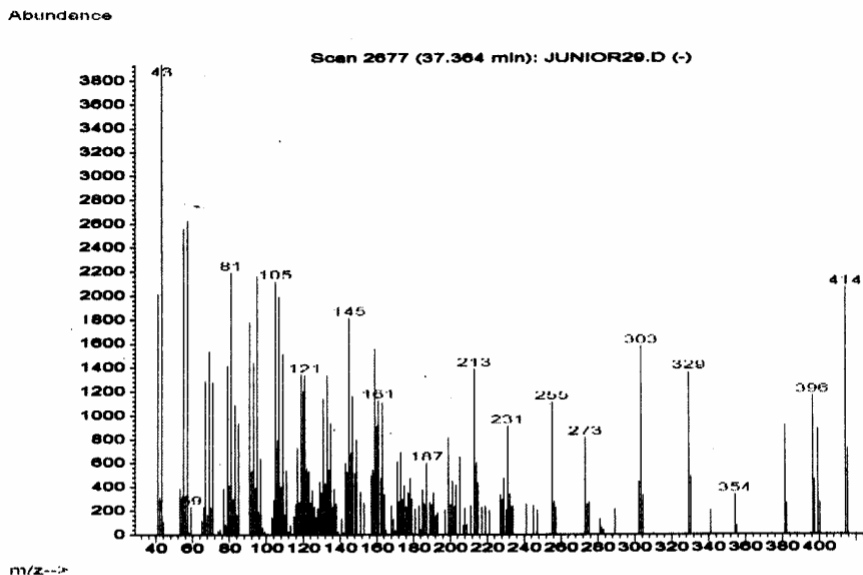
Stigmat-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS) Fucosterol 24S-STIGMAST-5-EN-3.BETA.-OL
 gamma.-Stosterol Fucosterol, beta.-dihydro- Stigmat-5-en-3.beta.-ol, (24S)-
 24.beta.-Ethyl-5-cholesten-3.beta.-ol beta.-Dihydrofucosterol 22,23

Match Quality : 99

Molecular Weight : 414.39

Molecular Formula: C₂₉H₅₀O

Figura 31- CG-EM do estigmasterol e do fucosterol De M-4



Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS) \$\$ Clionasterol \$\$ 24S-STIGMAST-5-EN-3.BETA.-OL \$\$.gamma.-Sitosterol \$\$ Fucosterol, .beta.-dihydro- \$\$ S tigmast-5-en-3.beta.-ol, (24S)- \$\$ 24.beta.-Ethyl-5-cholesten-3.beta.-ol \$\$.beta.-Dihydrofucosterol \$\$ 22,23

Match Quality : 99

Molecular Weight : 414.39

Molecular Formula: C₂₉H₅₀O

Figura 32- CG-EM do β -sitosterol e colesterol de M-4

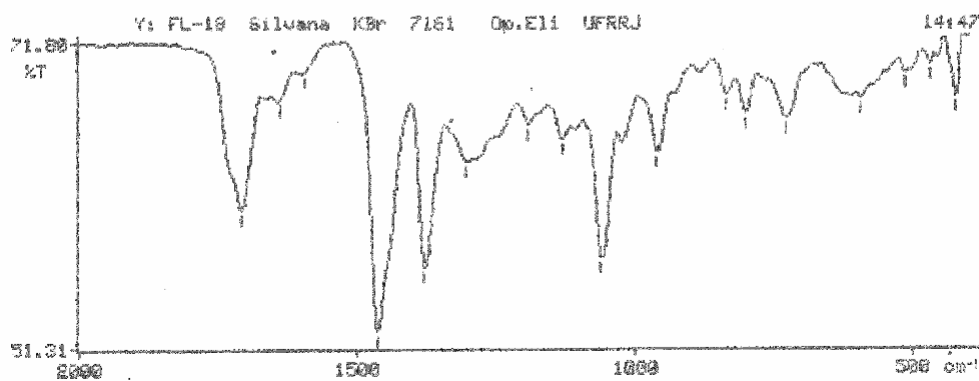
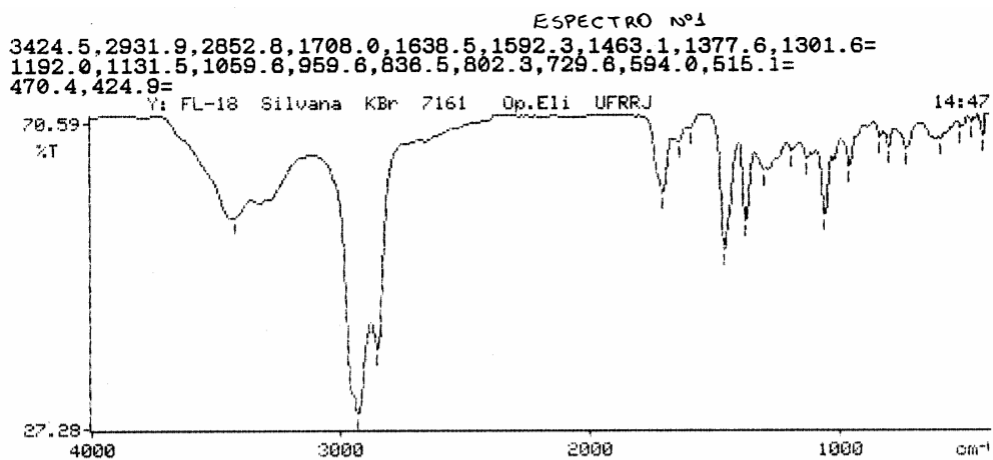


Figura 33- Espectro na região do infravermelho para os esteroides de **M-4**

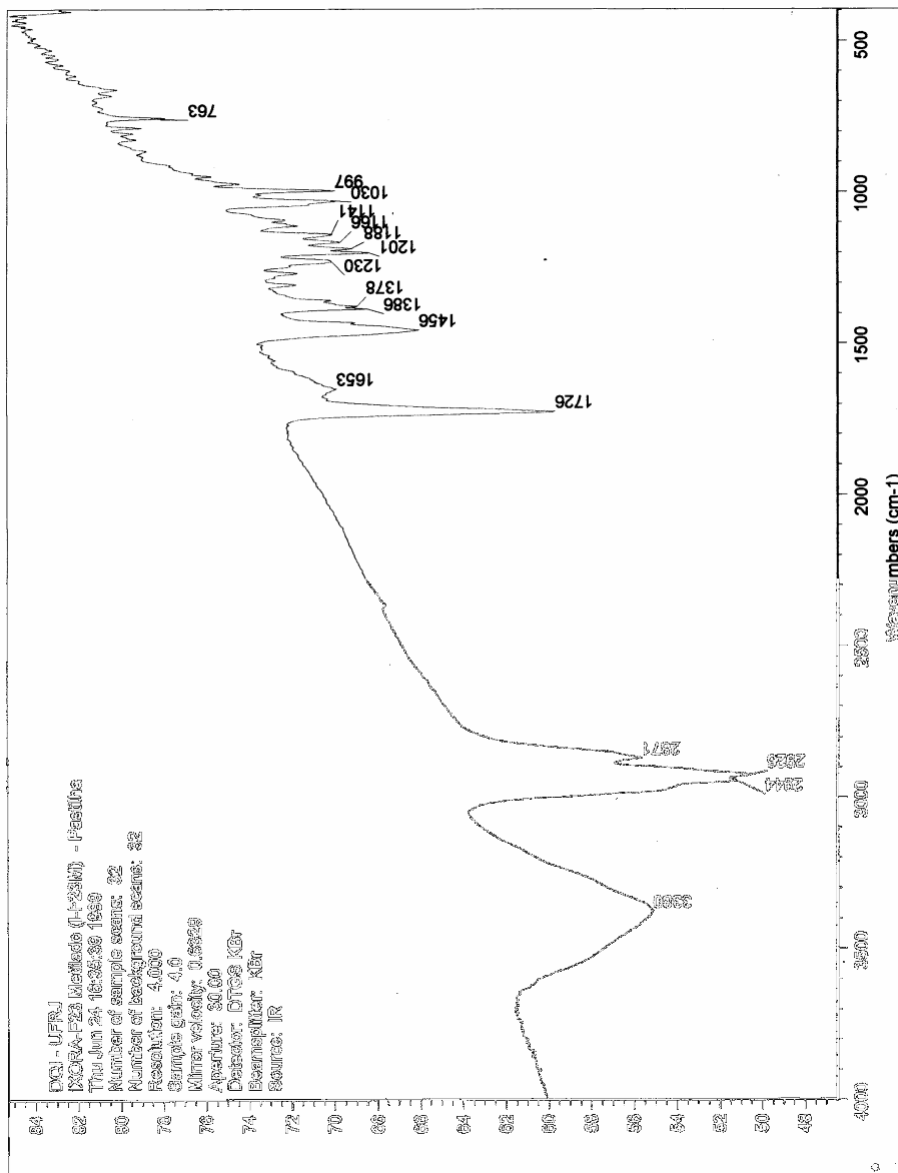


Figura 34- Espectro na região do infravermelho do ursolato de metila (S-1 metilado)

Triterpeno Ixora

Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, methyl ester, (3.beta.)- (CAS) \$\$ Methyl ursolate \$\$ Ursolic acid methyl ester

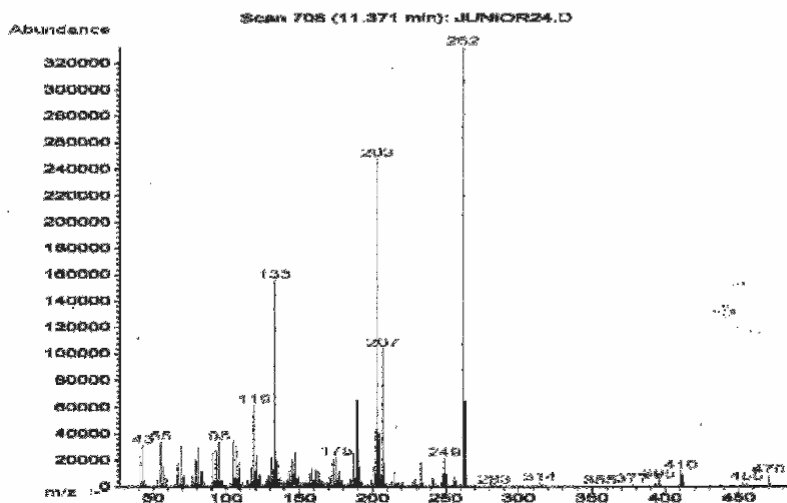
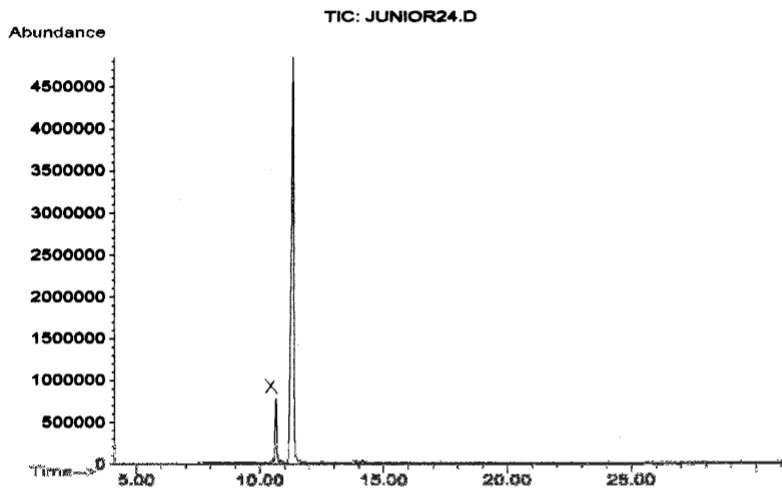


Figura-35- CG-EM do ursolato de metila (S-1 metilado)

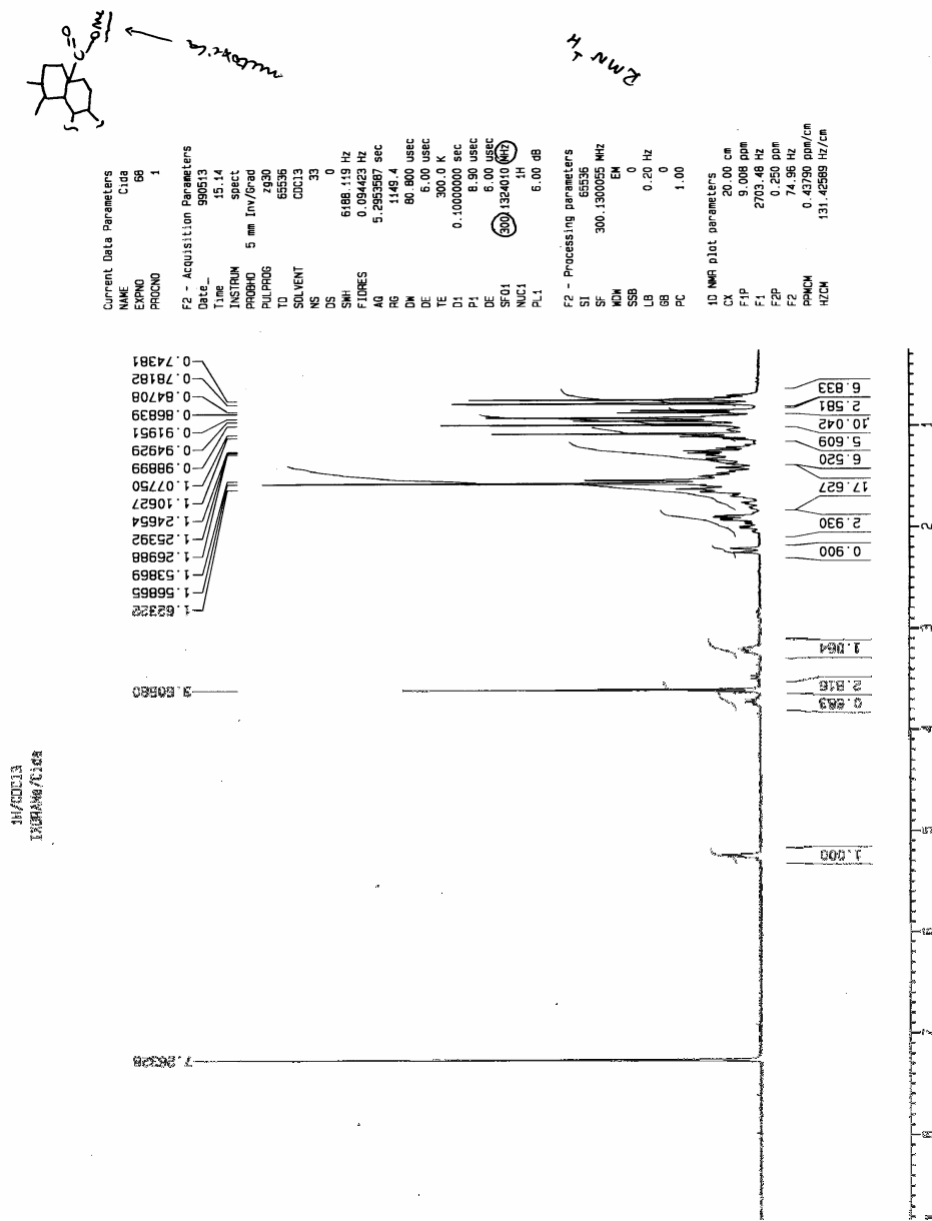
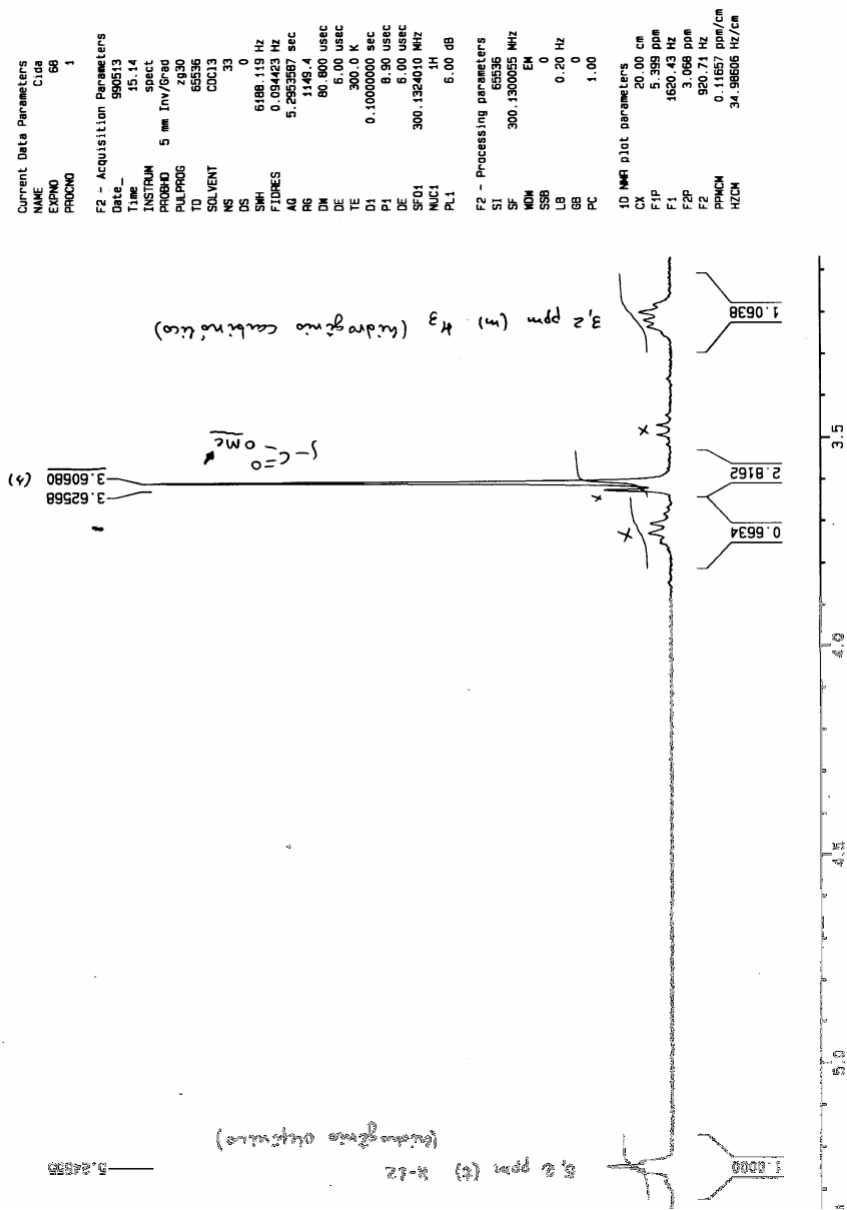


Figura-36- Espectro de RMN ^1H para o ursolato de metila (S-1 metilado)

8310/8410/01
E101/01



Continuação da **Figura-37**, com a ampliação do espectro de 1H
 na faixa de 3,0 - 5,5 ppm (**S-1** metilado)

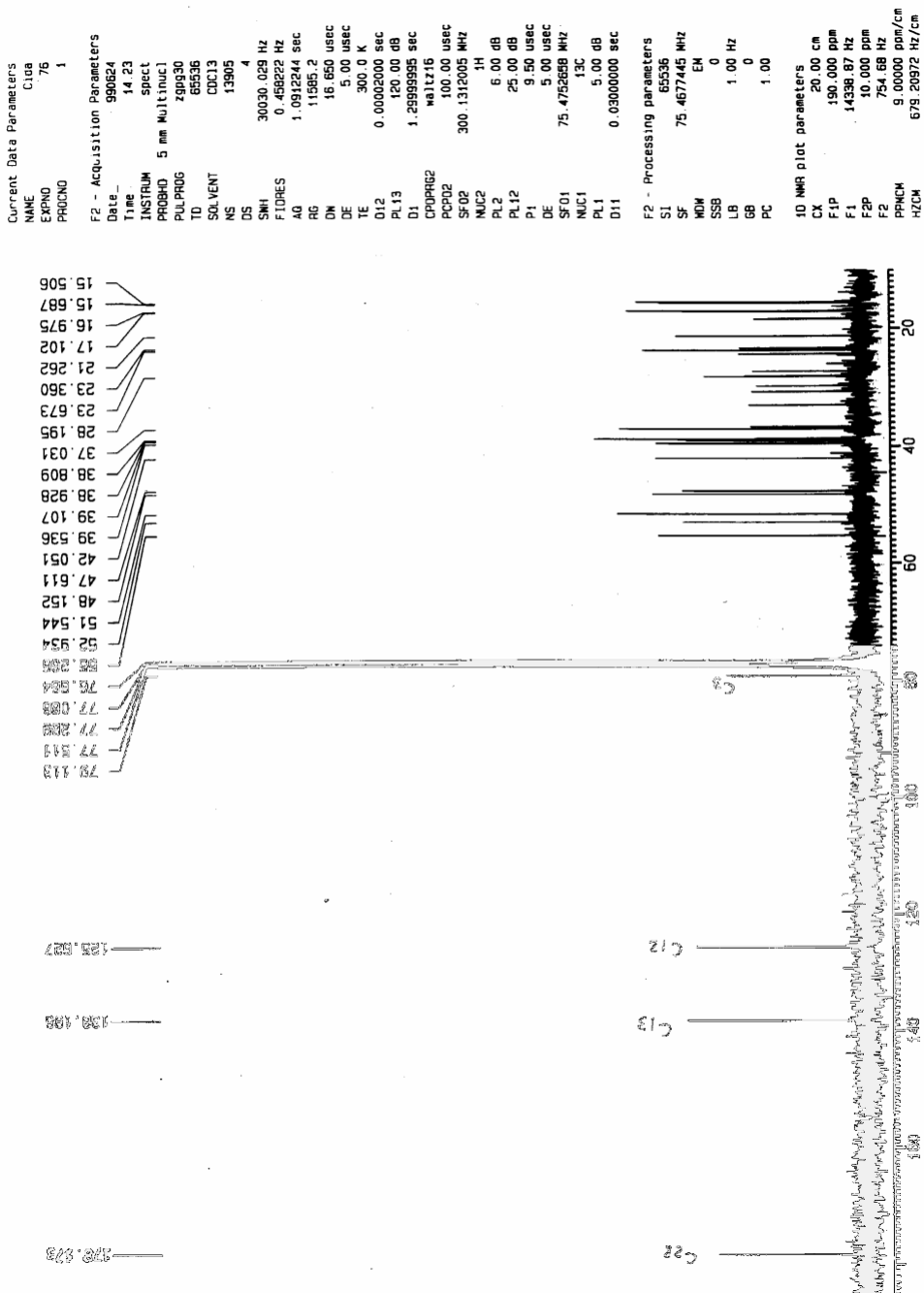
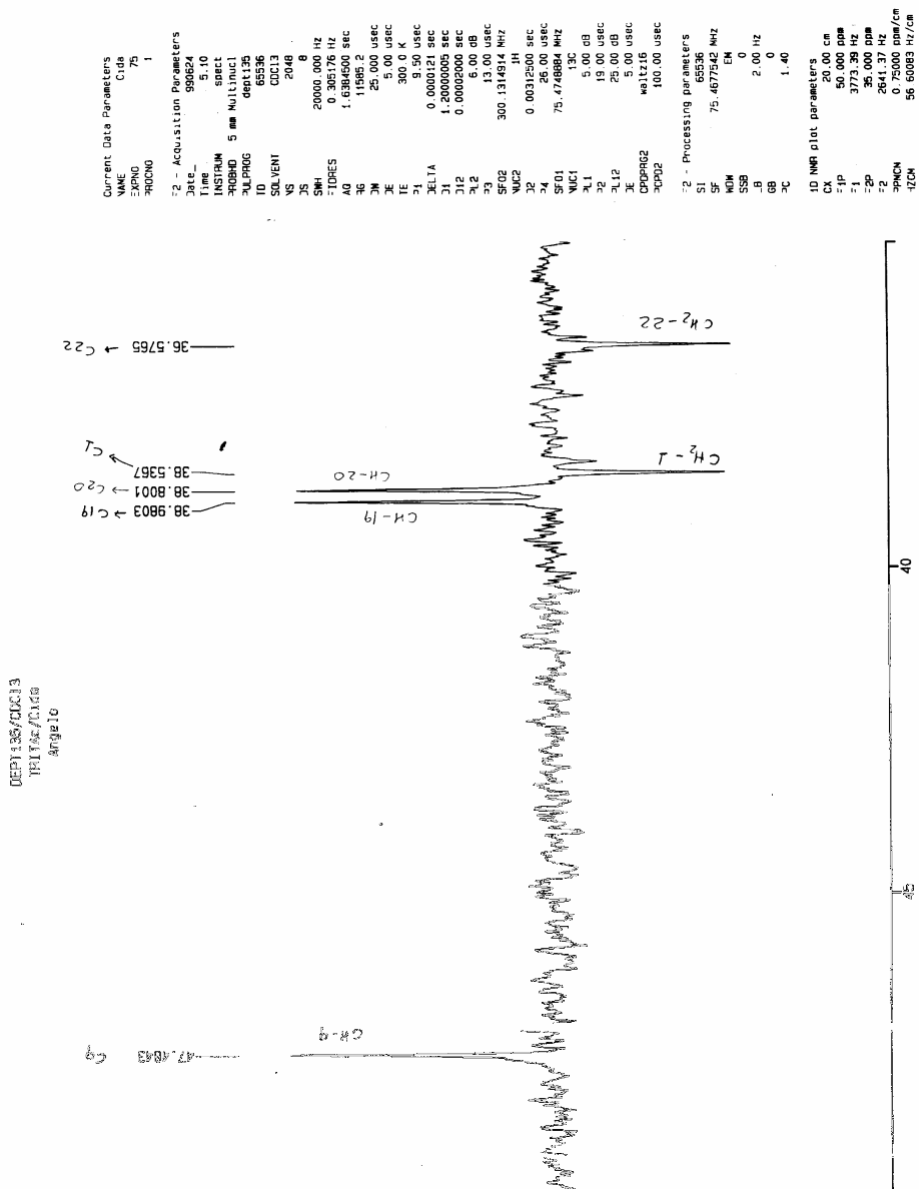


Figura-37- Espectro de RMN de ^{13}C para o ursolato de metila (S-1 metilado)



Continuação da **Figura-37**, com o espectro de DEPT 135 - RMN de ^{13}C na faixa de 35 - 50 ppm do ursolato de metila (**S-1** metilado)

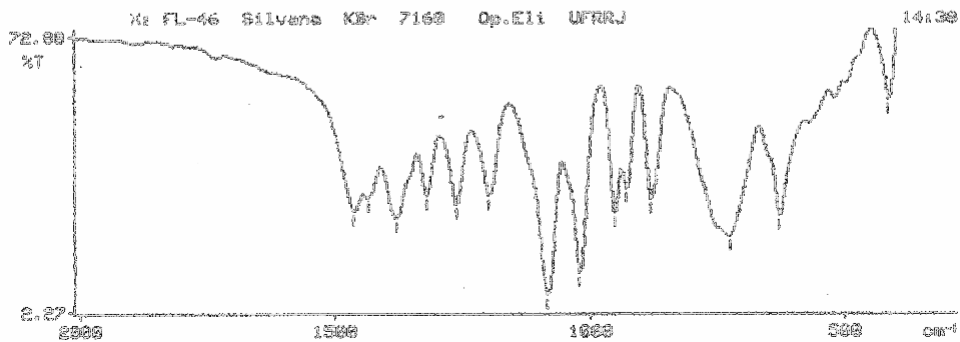
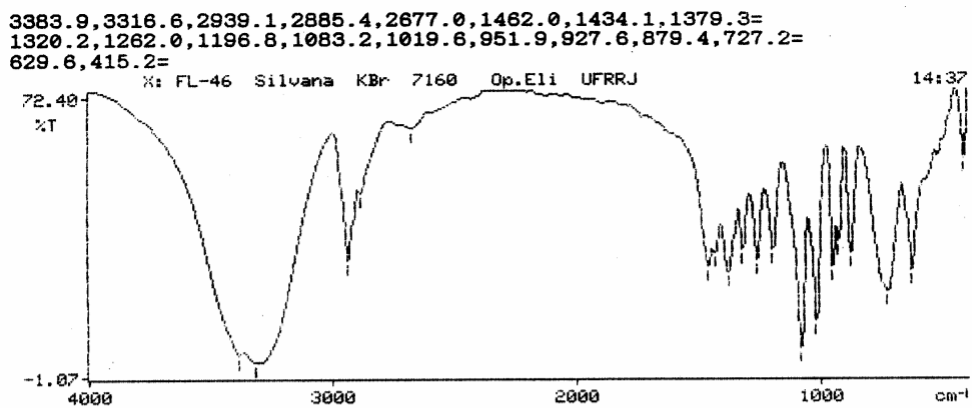


Figura -38- Espectro na região do infravermelho do açúcar manitol (S-2)

Current Data Parameters
 NAME IXORA_J5
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 990921
 Time 0.39
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Invt/Gred
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 8
 DS 0
 SWH 6009.615 Hz
 FIDRES 0.091699 Hz
 AQ 5.4926463 sec
 RG 64
 DM 83.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.1000000 sec
 P1 8.90 usec
 DE 6.00 usec
 SF01 300.1318007 MHz
 NUC1 1H
 PL1 6.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1300034 MHz
 WDW EN
 SSB 0
 LB -0.40 Hz
 GB 0.3
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 10.077 ppm
 F1 3024.38 Hz
 F2P -0.236 ppm
 F2 -70.39 Hz
 PH0CM 0.51557 ppm/cm
 HZ0CM 154.79659 Hz/cm

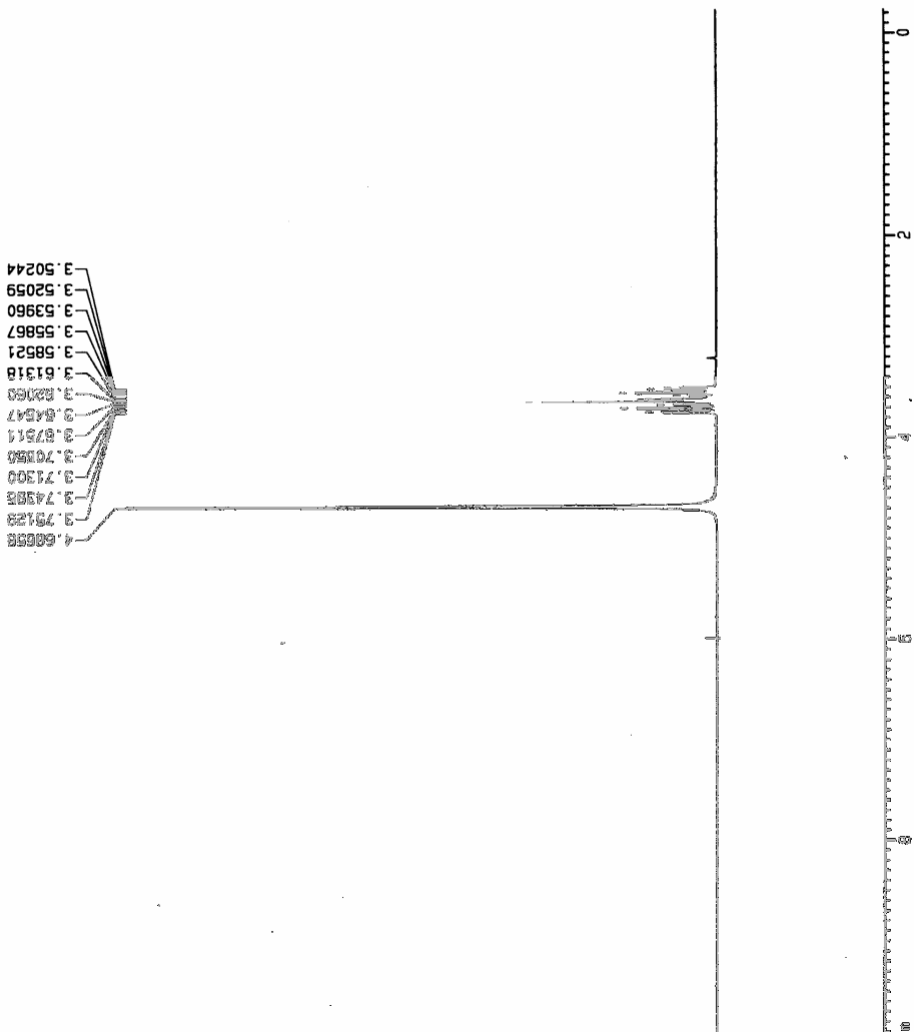


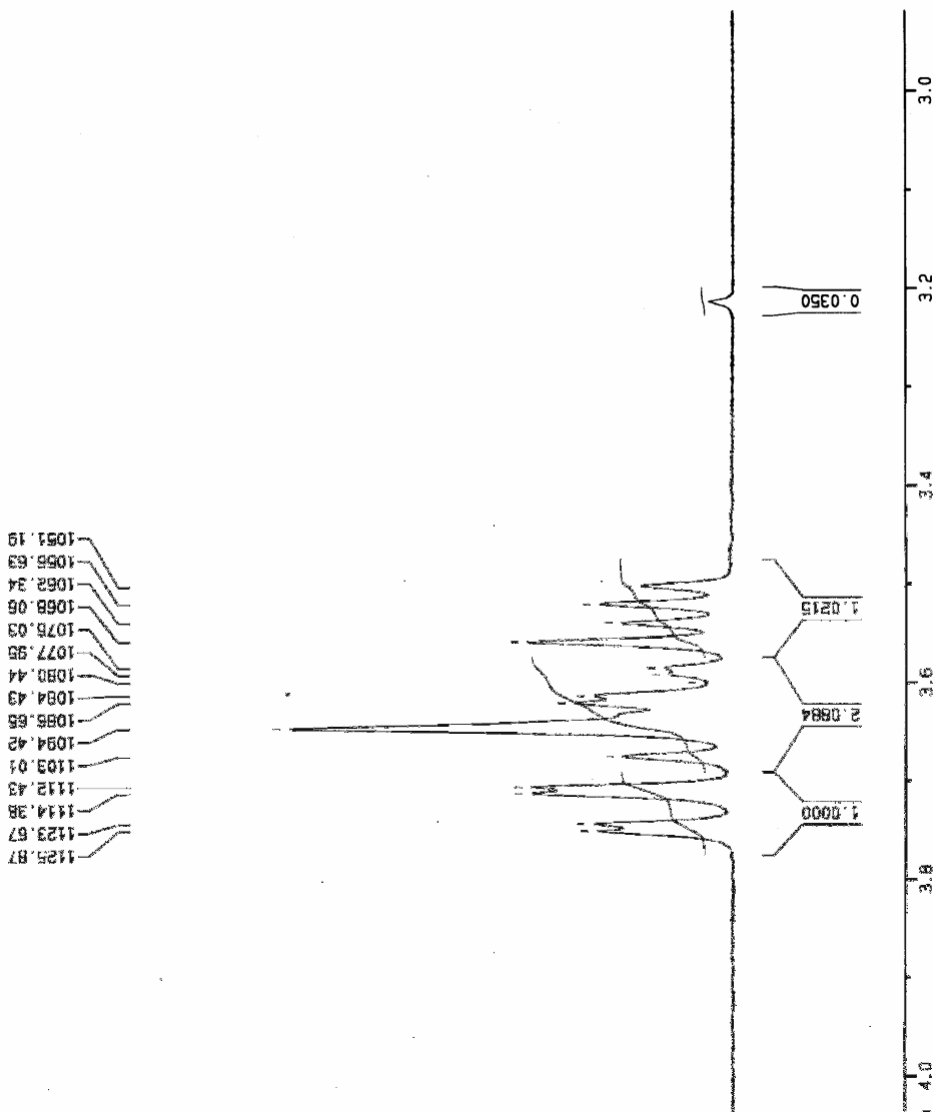
Figura -39- Espectro de RMN de ^1H do manitol (S-2)

Current Data Parameters
 NAME IXORA_FS
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 990921
 Time 0.39
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Inv/6rad
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 8
 DS 0
 SWH 6009.615 Hz
 FIDRES 0.091689 Hz
 AQ 5.4526453 sec
 RG 64
 DM 83.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.1000000 sec
 P1 8.90 usec
 DE 6.00 usec
 SF01 300.1318007 MHz
 NUC1 1H
 PL1 6.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1300034 MHz
 MDW EM
 SSB 0
 LB -0.40 Hz
 GB 0.3
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1F 4.064 ppm
 F1 1219.67 Hz
 F2P 2.919 ppm
 F2 875.94 Hz
 PPMCM 0.05726 ppm/cm
 HZCM 17.18652 Hz/cm



Continuação da **Figura-39**, com a ampliação do espectro de ^1H na faixa de 3,0 - 4,0ppm do manitol (**S-2**)

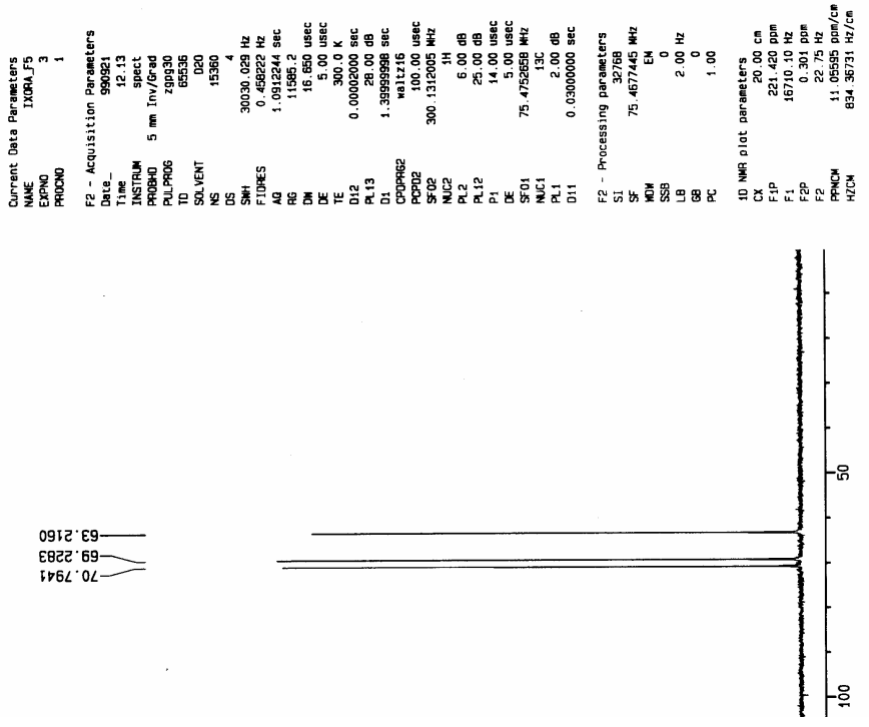
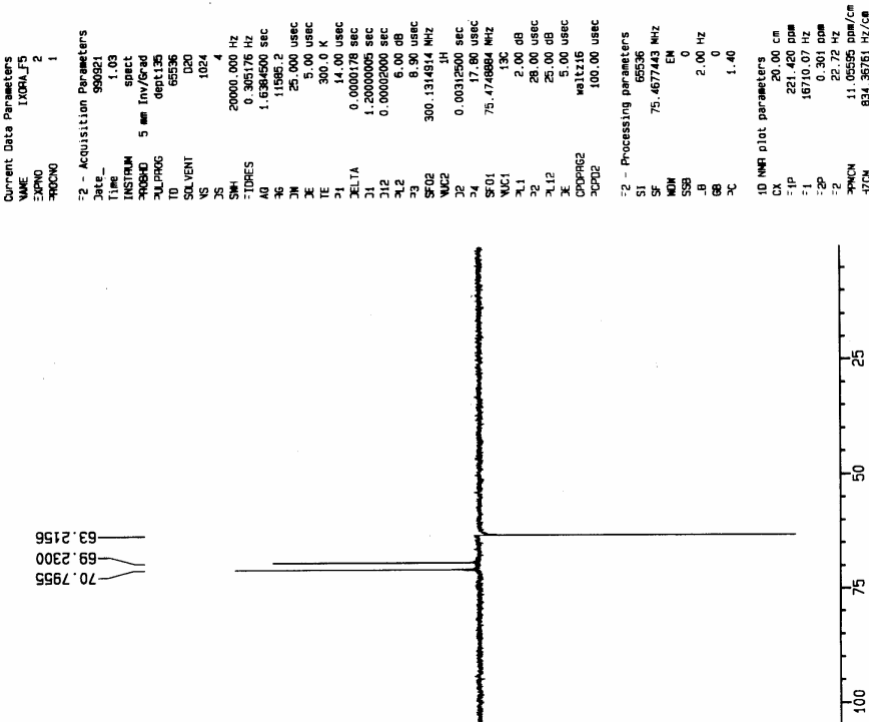


Figura -40- Espectro de RMN de ¹³C do manitol (S-2)



Continuação da Figura-40, com o espectro de DEPT- 135 - RMN de ¹³C do manitol (S-2)

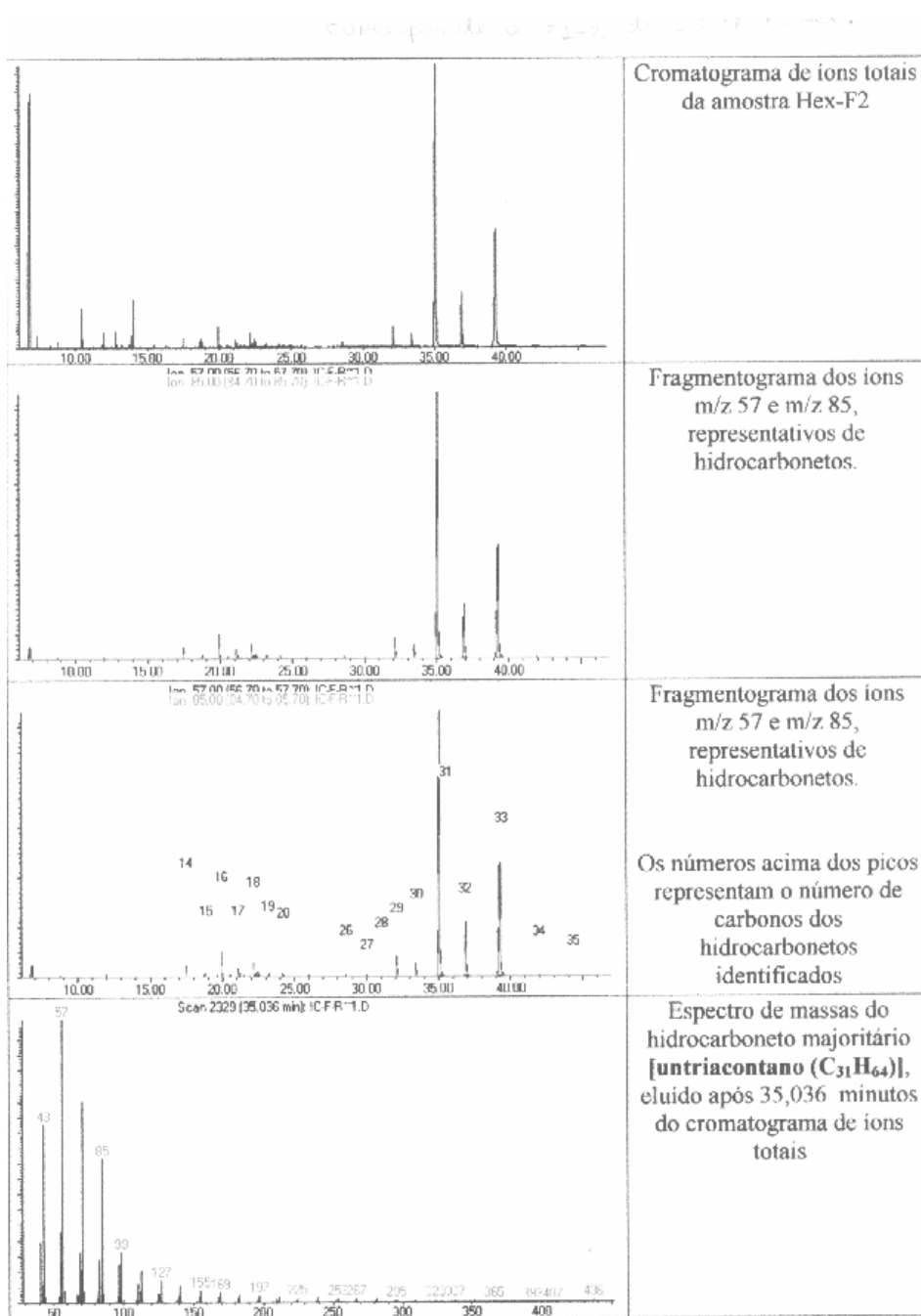


Figura 41- CG-EM da mistura de hidrocarbonetos de M-5

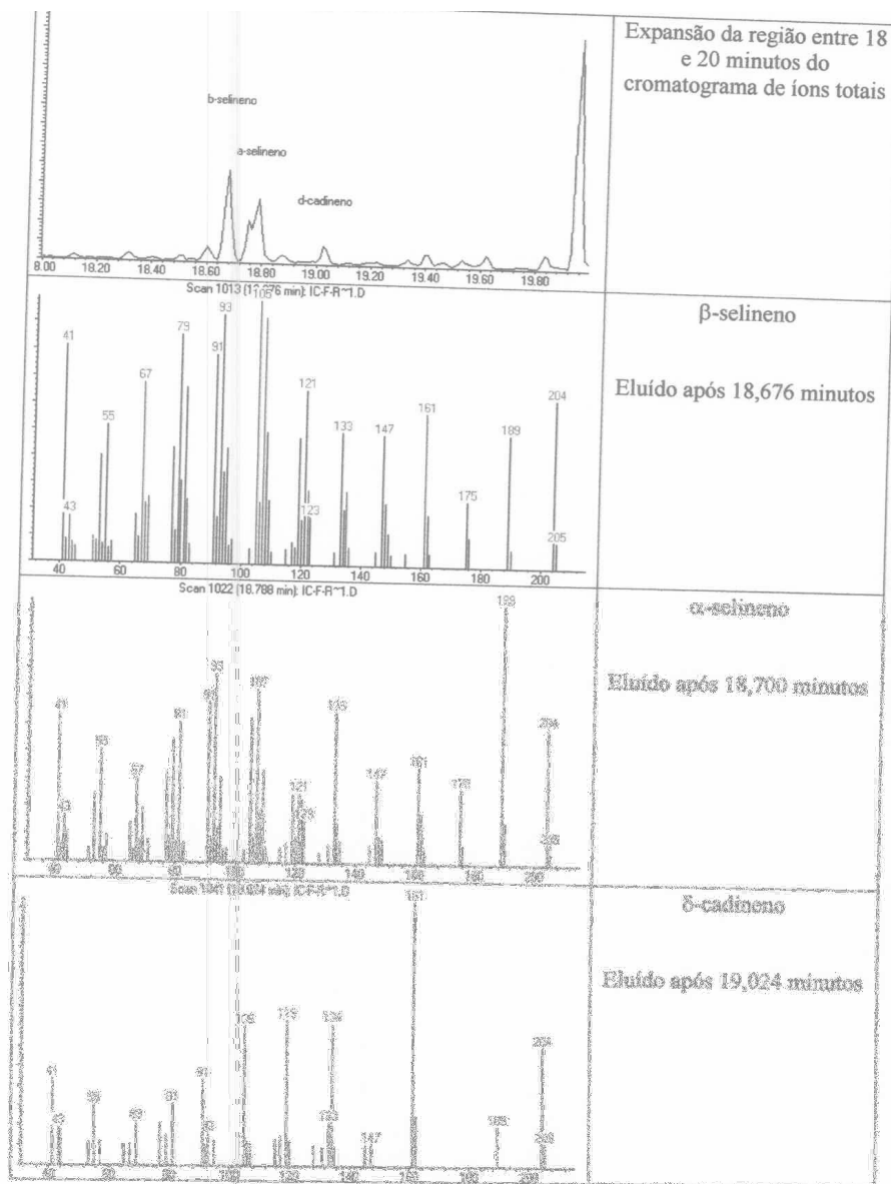


Figura 42- CG-EM da mistura de sesquiterpenos de M-5

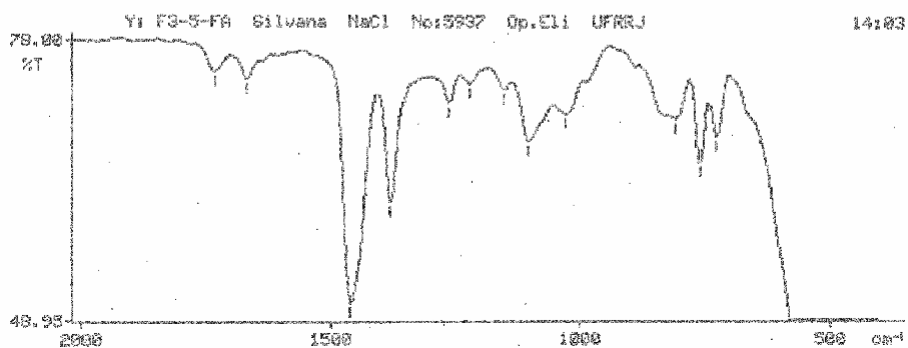
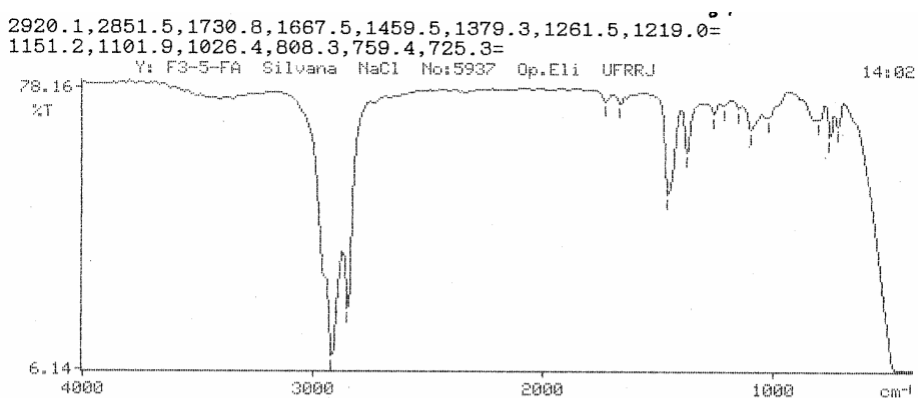


Figura 43- Infravermelho dos metabólitos de **M-6**

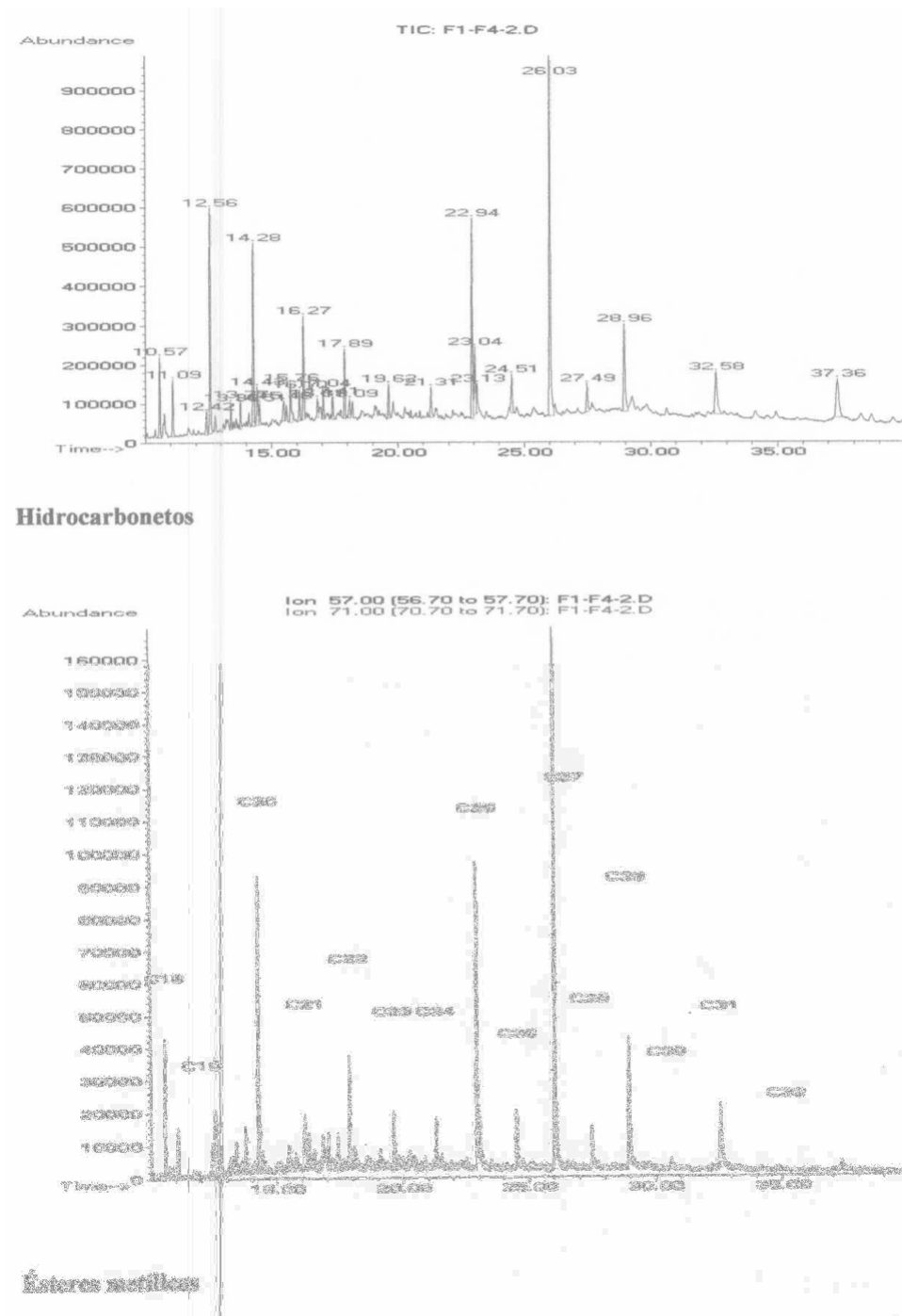


Figura 44- CG-EM da mistura de hidrocarbonetos e ésteres metílicos de M-6

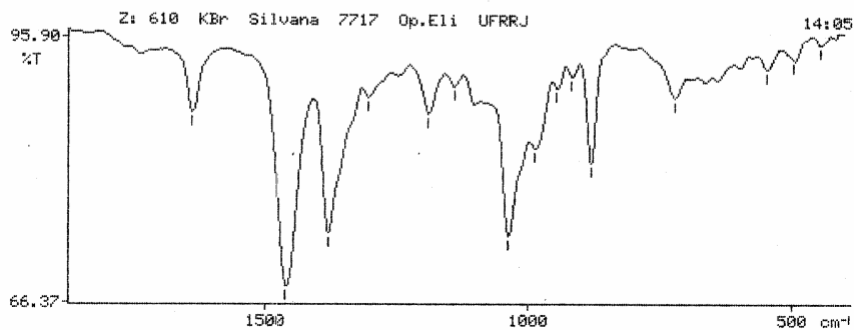
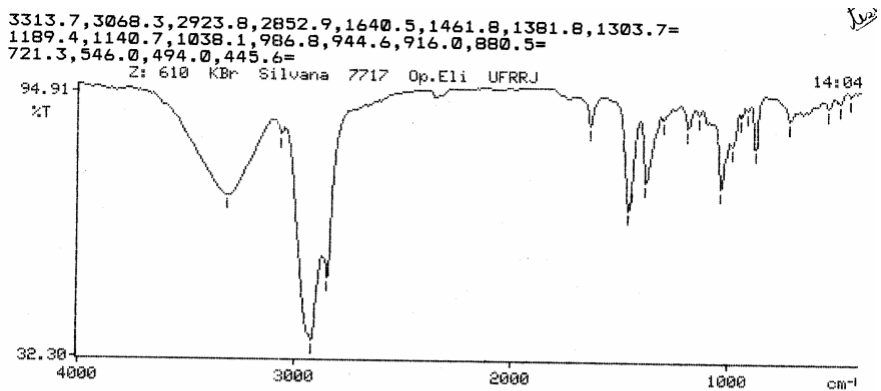


Figura 45- Infavermelho dos metabólitos isolados de M-7

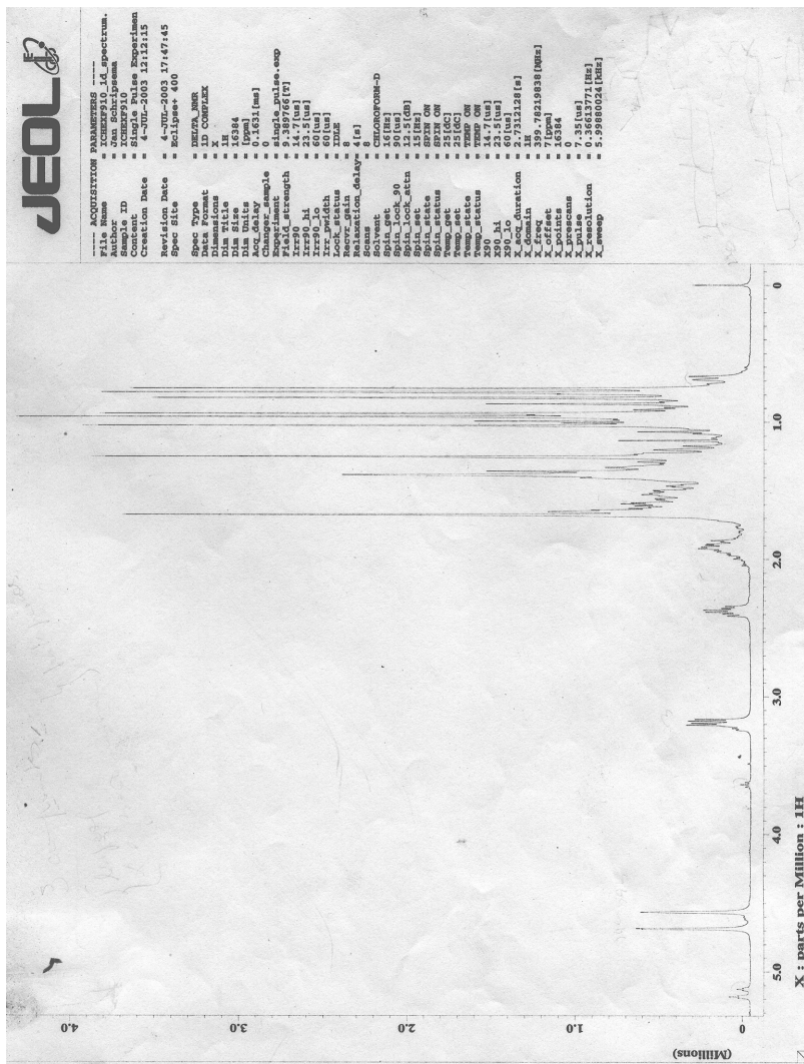
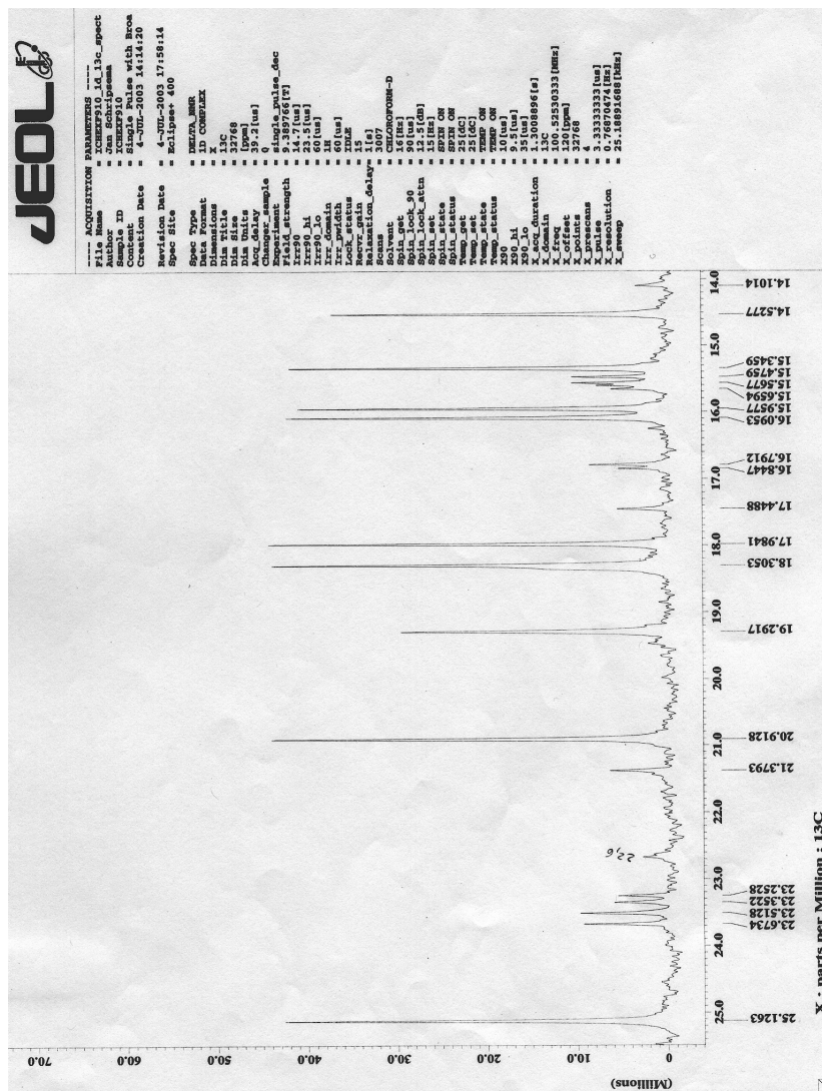
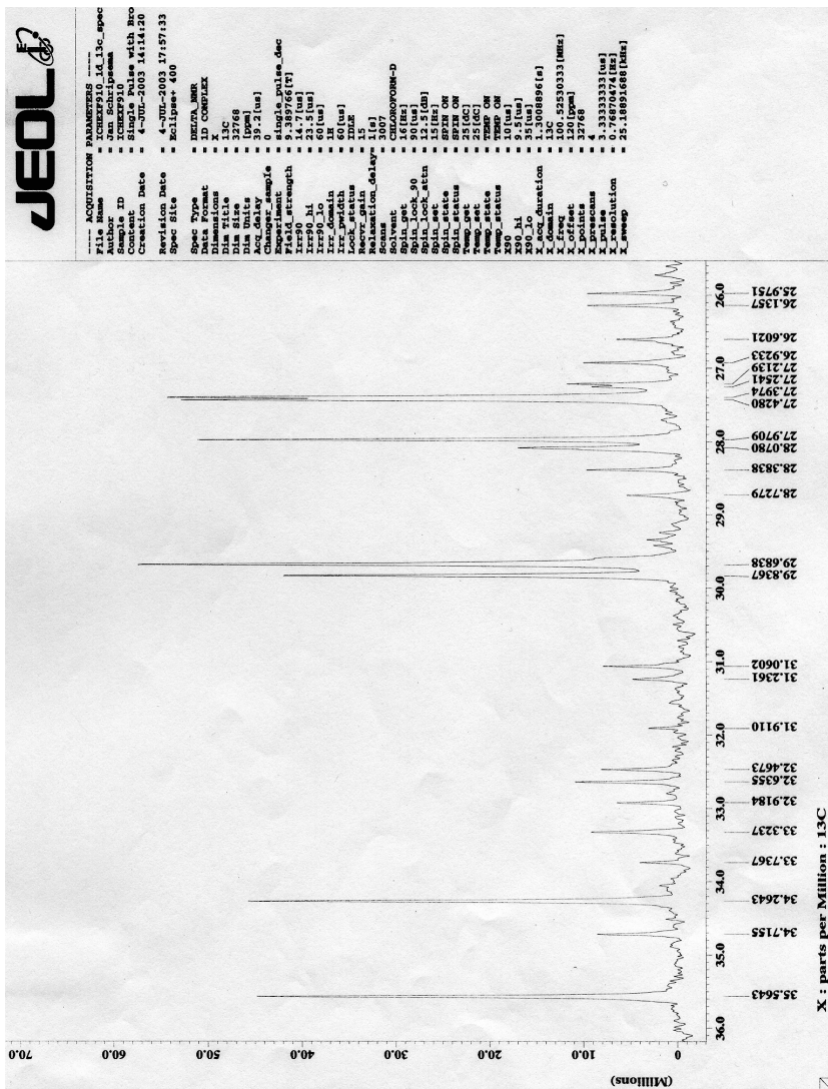


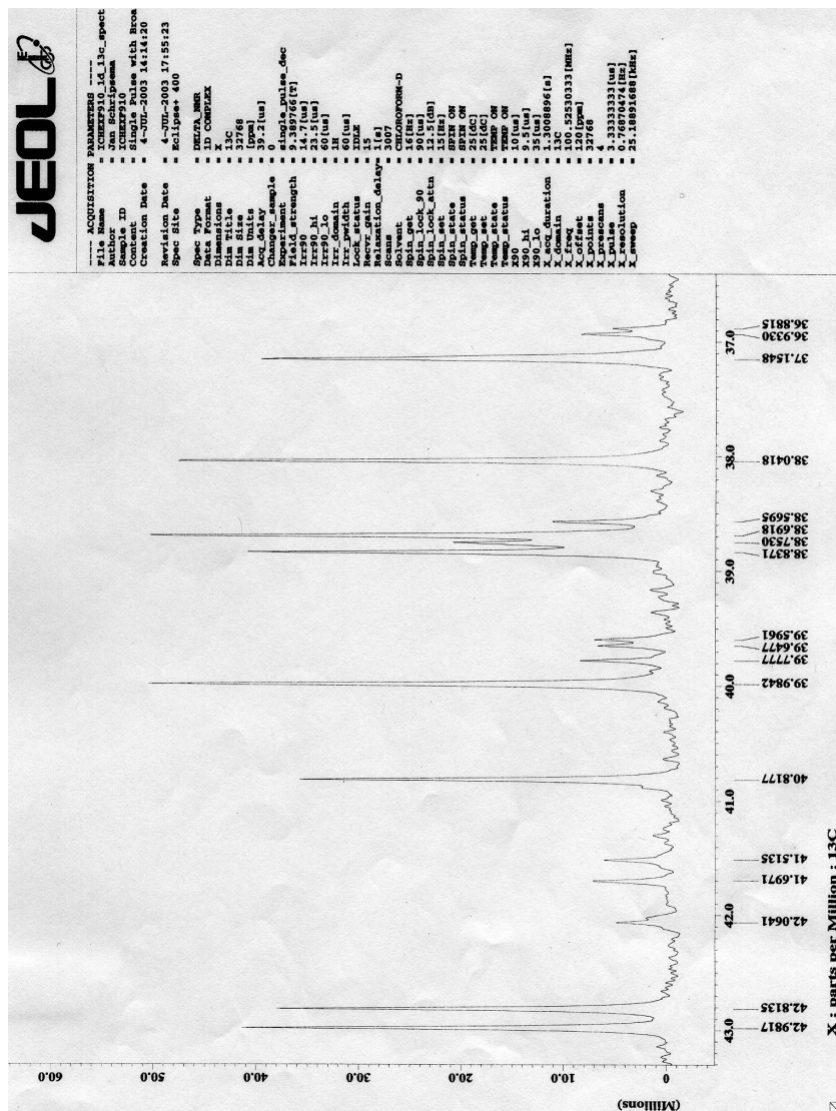
Figura 46- Espectro de RMN de ^1H para M-7



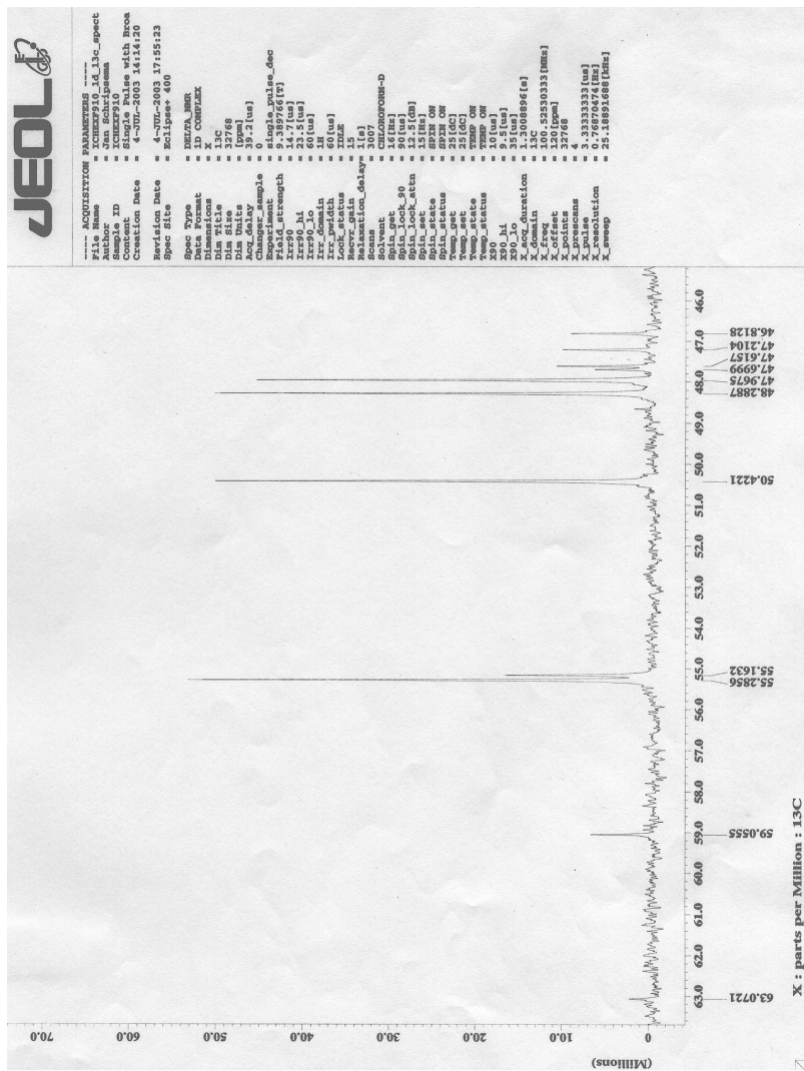
Continuação da **Figura 47**, com ampliação do espectro de RMN de ^{13}C para a faixa de δ 25,12-14,10 dos metabólitos de **M-7**



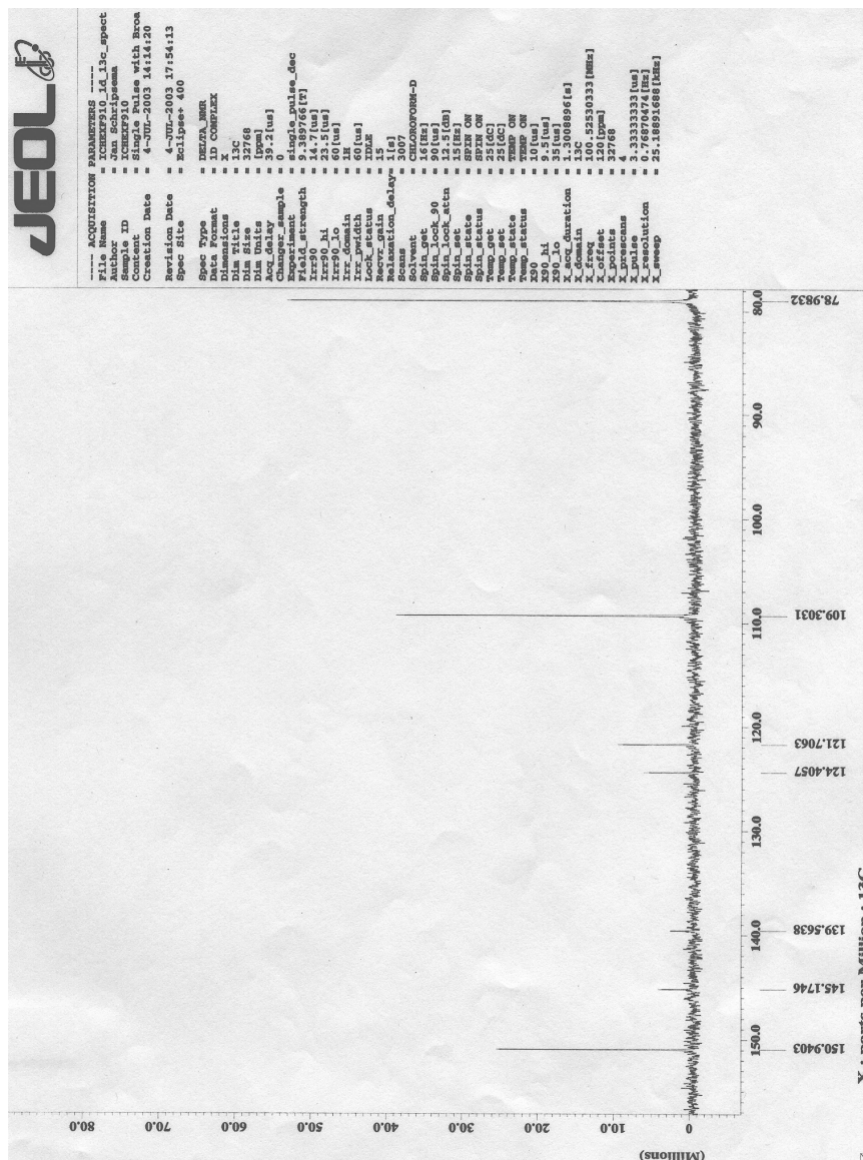
Continuação da **Figura 47**, com ampliação do espectro de RMN de ^{13}C para a faixa de d 35,56-25,97 dos metabólitos de **M-7**



Continuação da **Figura 47**, com ampliação do espectro de RMN de ^{13}C para a faixa de d 42,98-36,88 dos metabólitos de **M-7**



Continuação da **Figura 47**, com ampliação do espectro de RMN de ^{13}C para a faixa de d 63,07-46,81 dos metabólitos de **M-7**



Continuação da **Figura 47**, com ampliação do espectro de RMN de ^{13}C para a faixa de δ 150,94-78,98 dos metabólitos de **M-7**

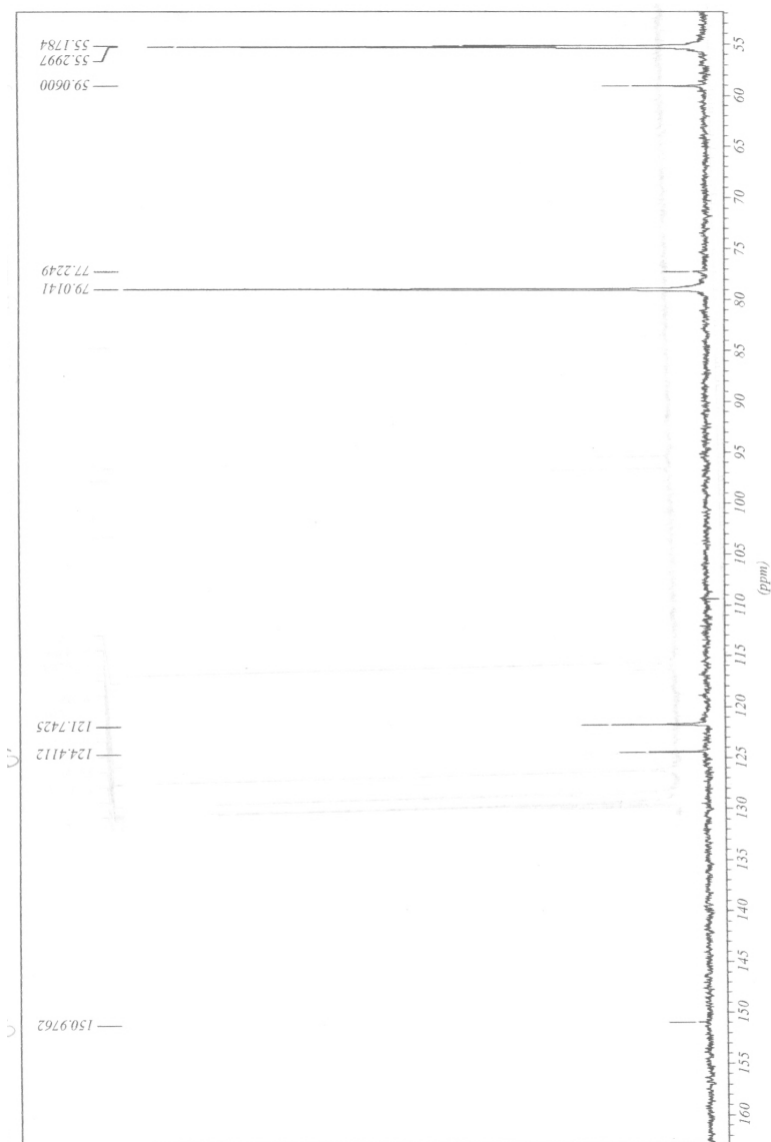
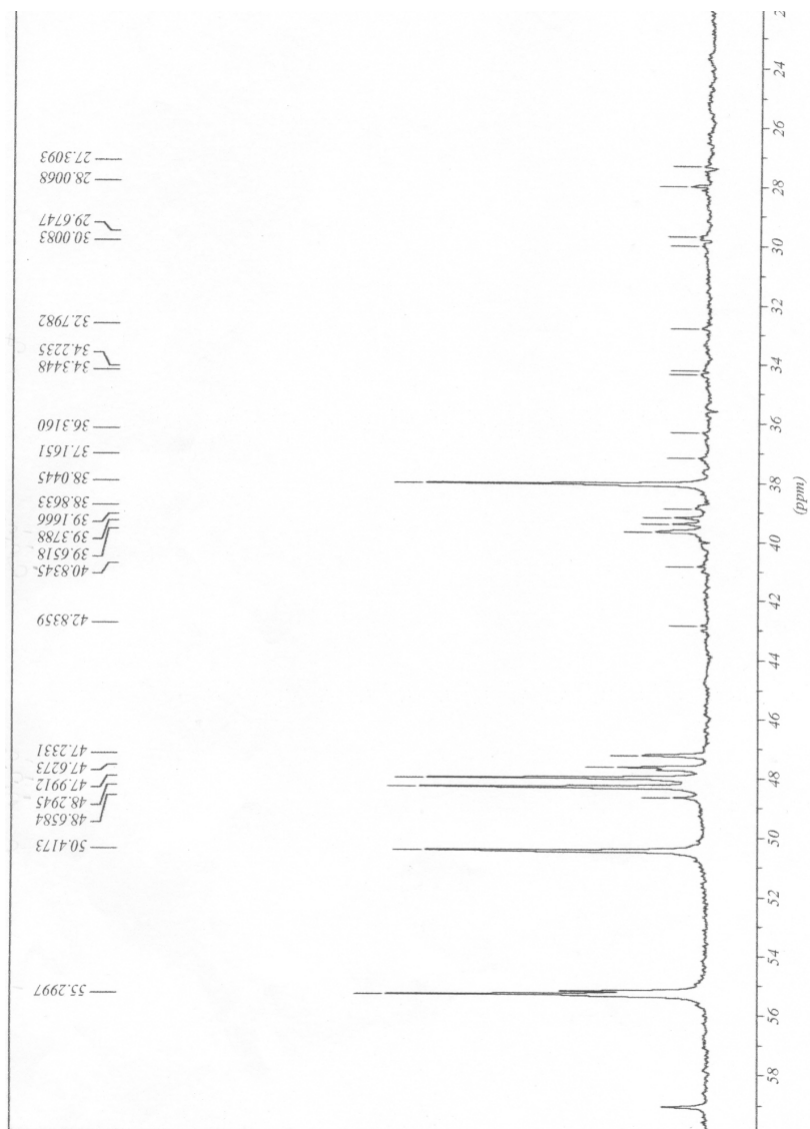


Figura 48- Espectro de DEPT 90 - RMN de ^{13}C dos metabólitos isolados de **M-7** na faixa de d 150,97-55,17



Continuação da **Figura 48**- Espectro de DEPT 90 - RMN de ^{13}C dos metabólitos isolados de **M-7** na faixa de d 55,29-27,30

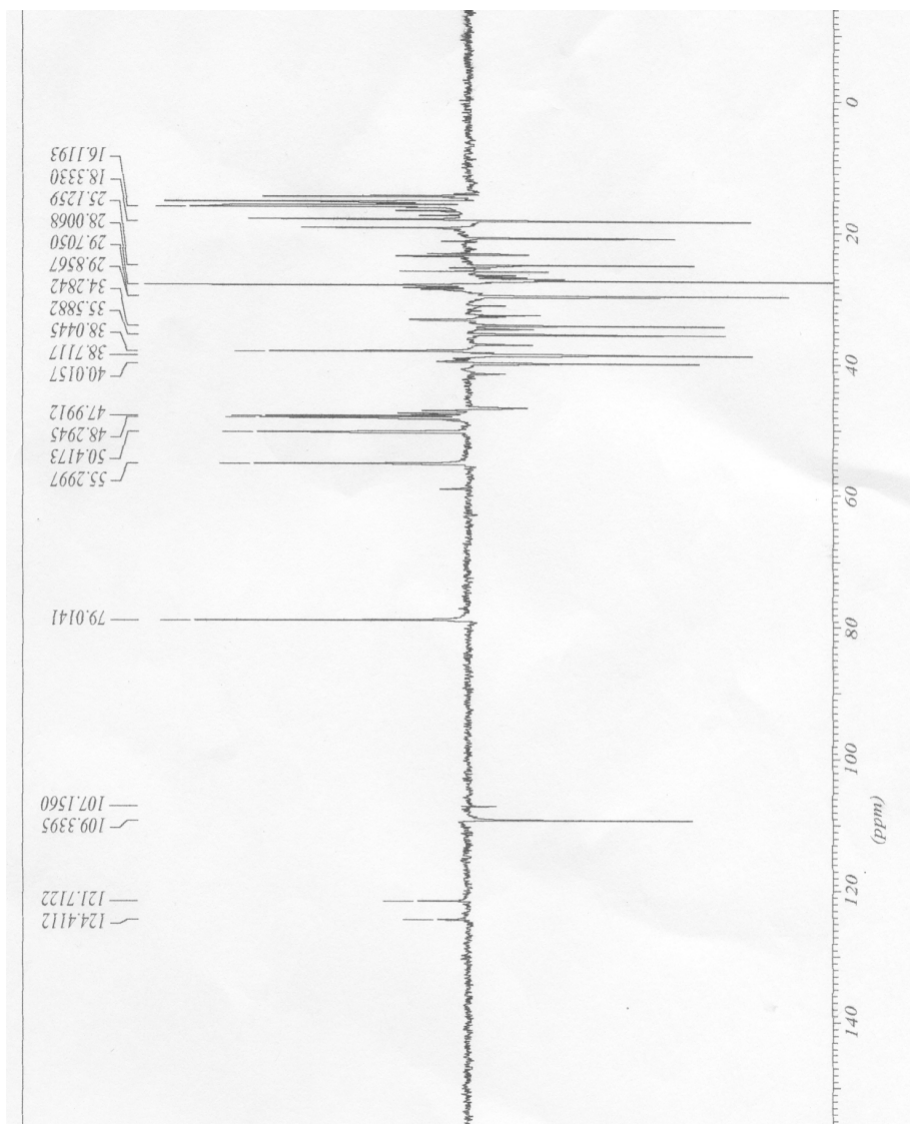
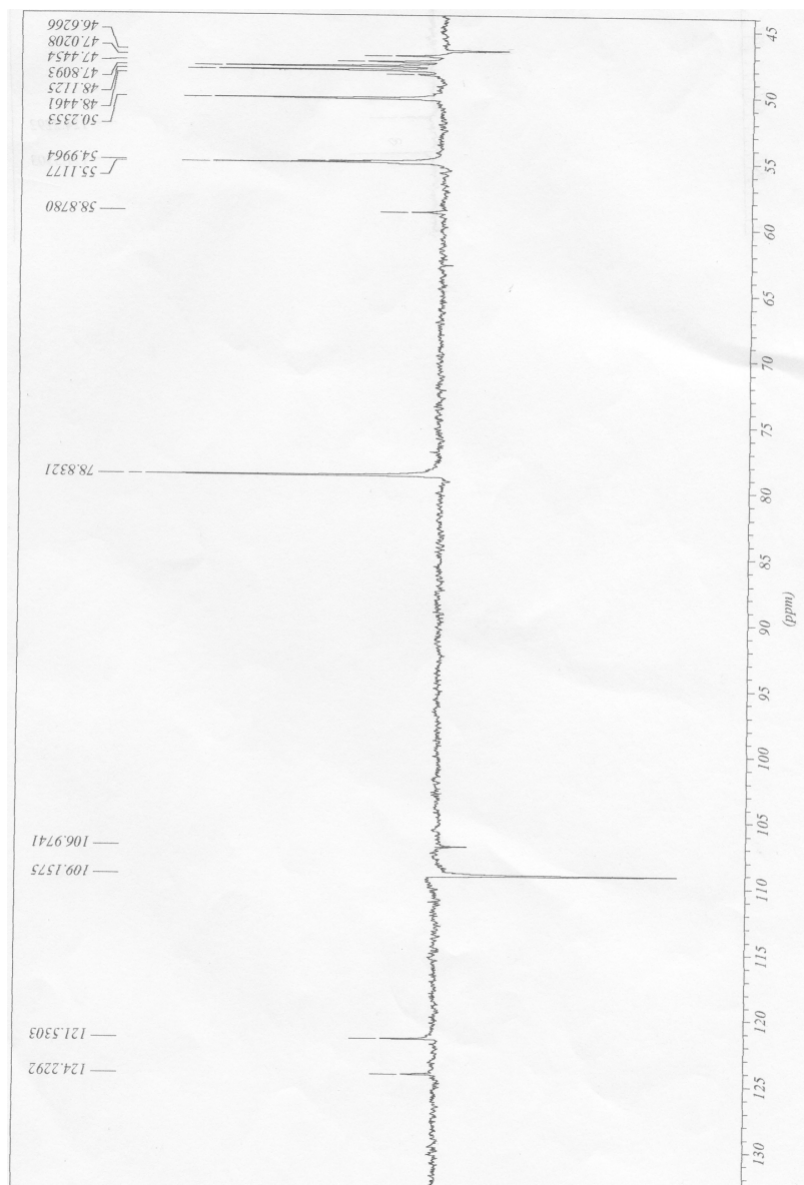
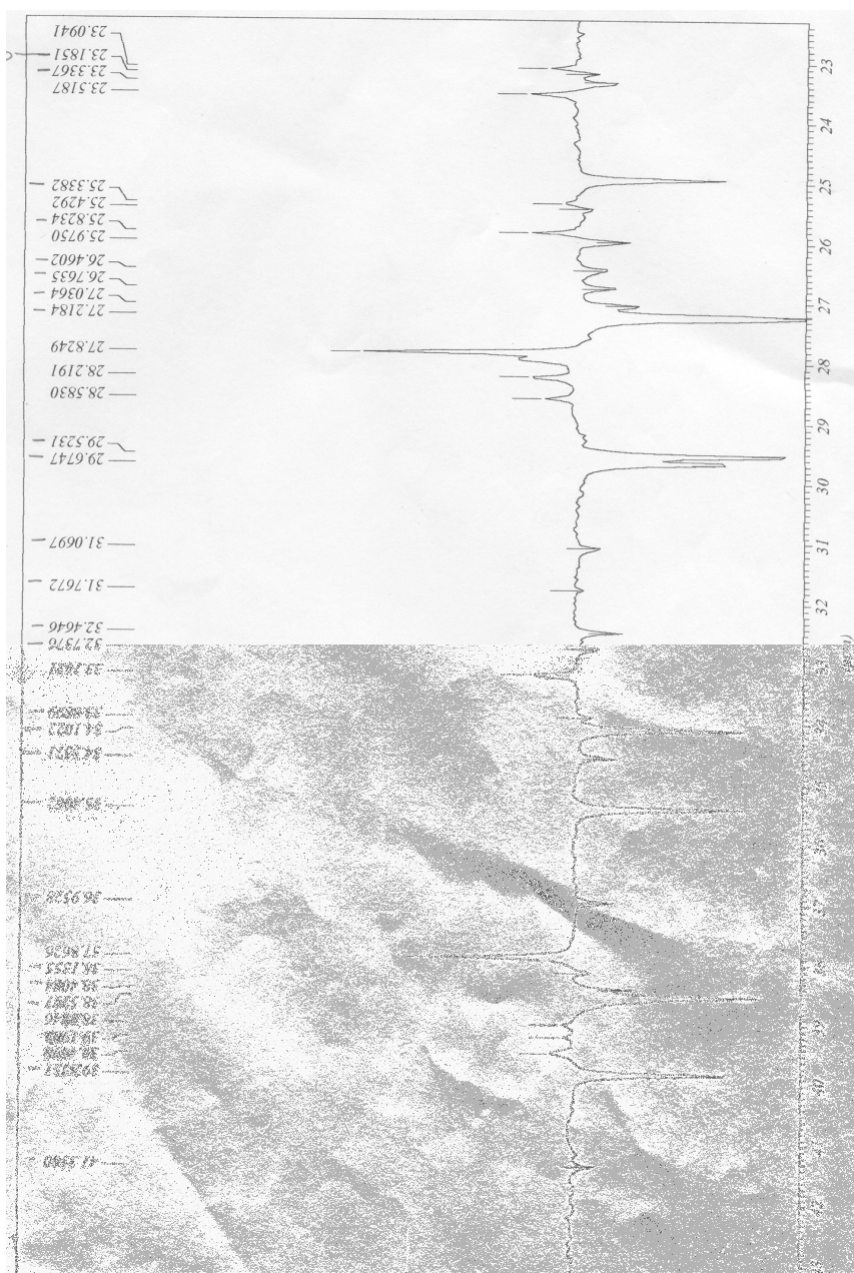


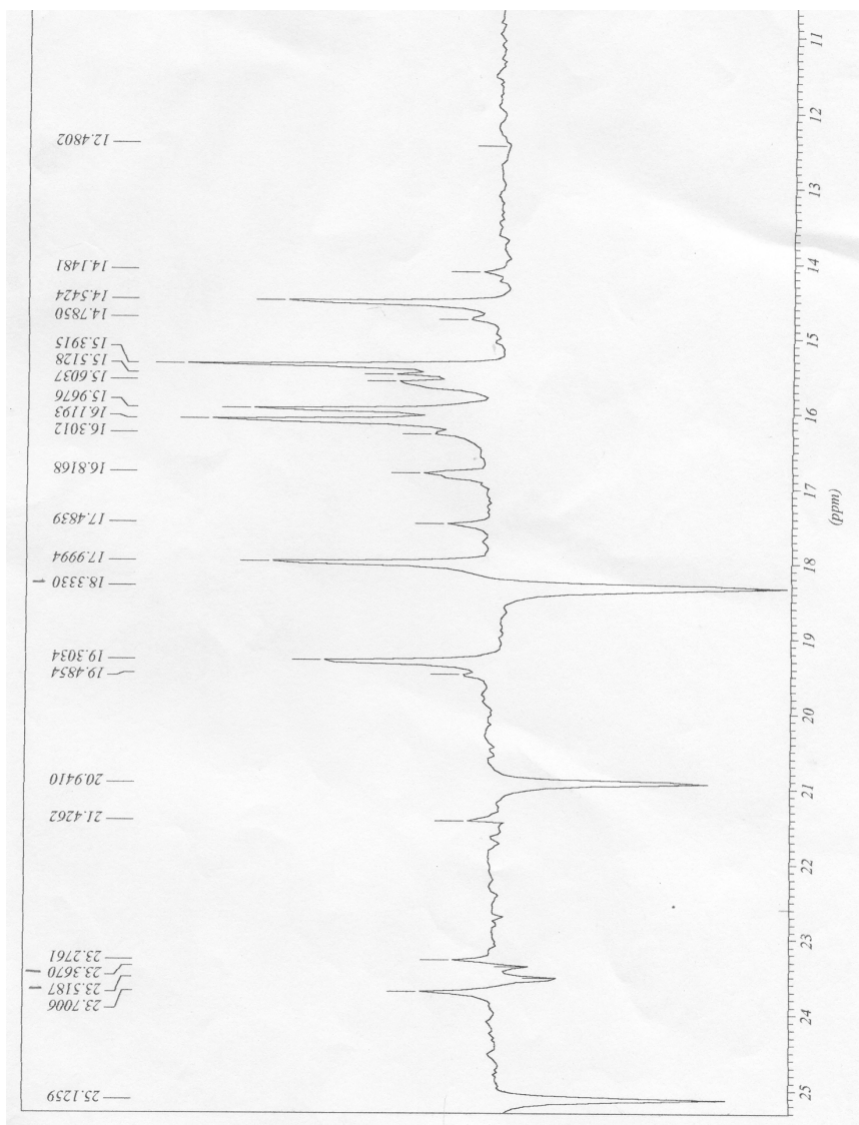
Figura 49- Espectro de DEPT 135 - RMN de ^{13}C dos metabólitos isolados de **M-7** na faixa de δ 124,41-16,11



Continuação da **Figura 49**, espectro de DEPT 135 - RMN de ^{13}C dos metabólitos isolados de **M-7** com ampliação na faixa de d 124,22-46,62



Continuação da **Figura 49**, espectro de DEPT 135 - RMN de ^{13}C dos metabólitos isolados de **M-7** com ampliação na faixa de δ 41,35-23,09



Continuação da **Figura 49**, espectro de DEPT 135 - RMN de ^{13}C dos metabólitos isolados de **M-7** com ampliação na faixa de d 25,12-14,14

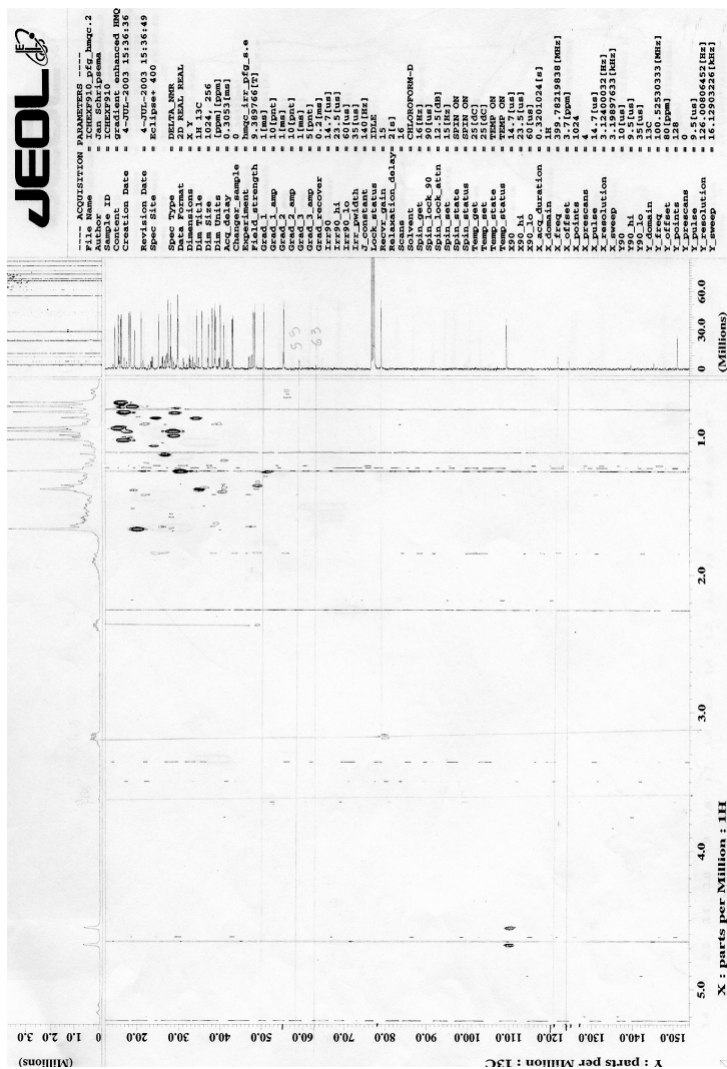


Figura 50- Espectro de HMQC dos metabólitos isolados de **M-7** com a correlação de ^1H e de ^{13}C na faixa de δ 5,0-0 e 150,0-0, respectivamente.

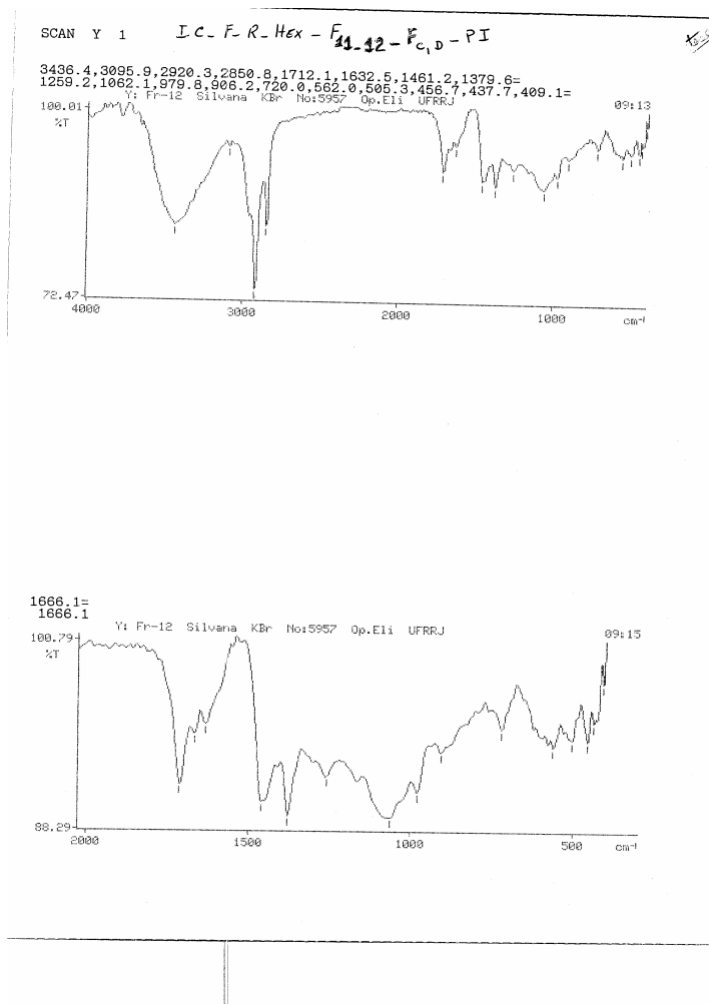


Figura 51- Espectro na região do infravermelho para a mistura M-8

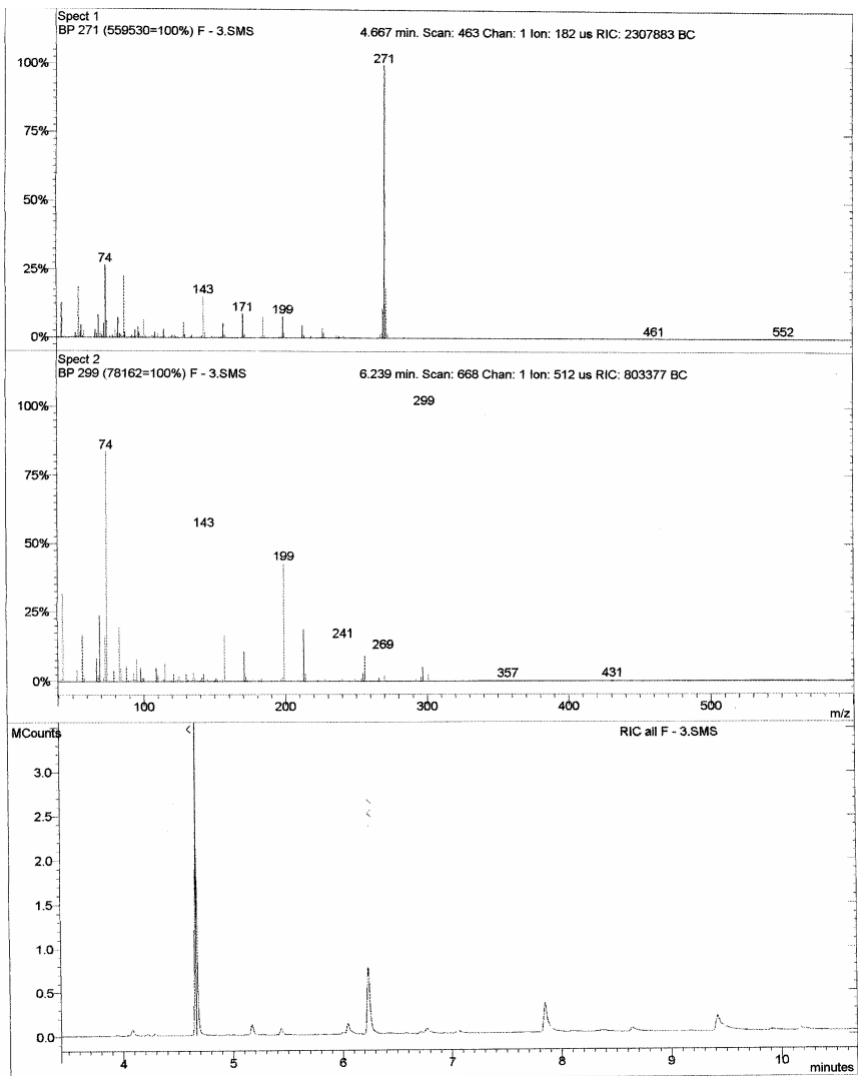
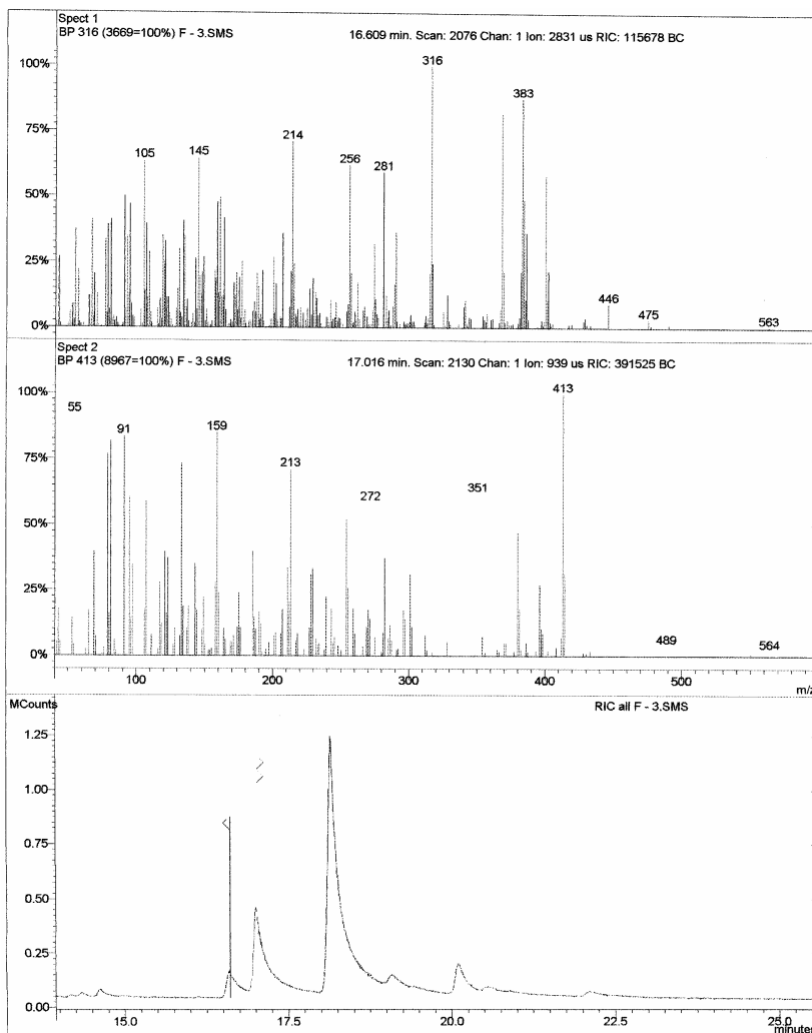


Figura 52- CG – EM dos metabólitos de M-8



Continuação da **Figura 52**, CG – EM dos esteróides de **M-8**

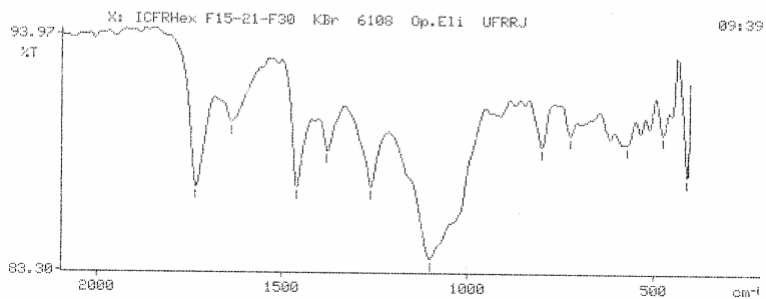
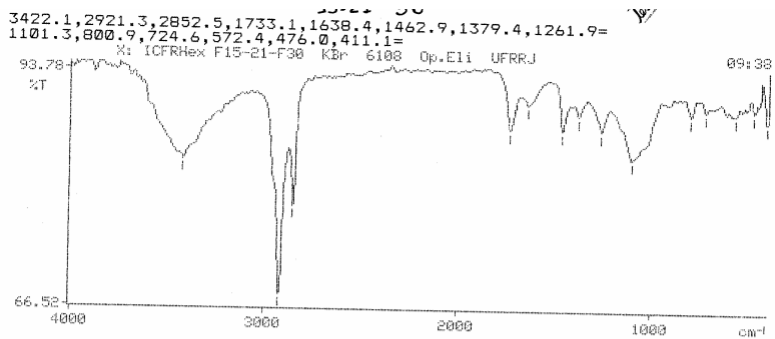


Figura 53- Espectro na região do infravermelho de **M-9**

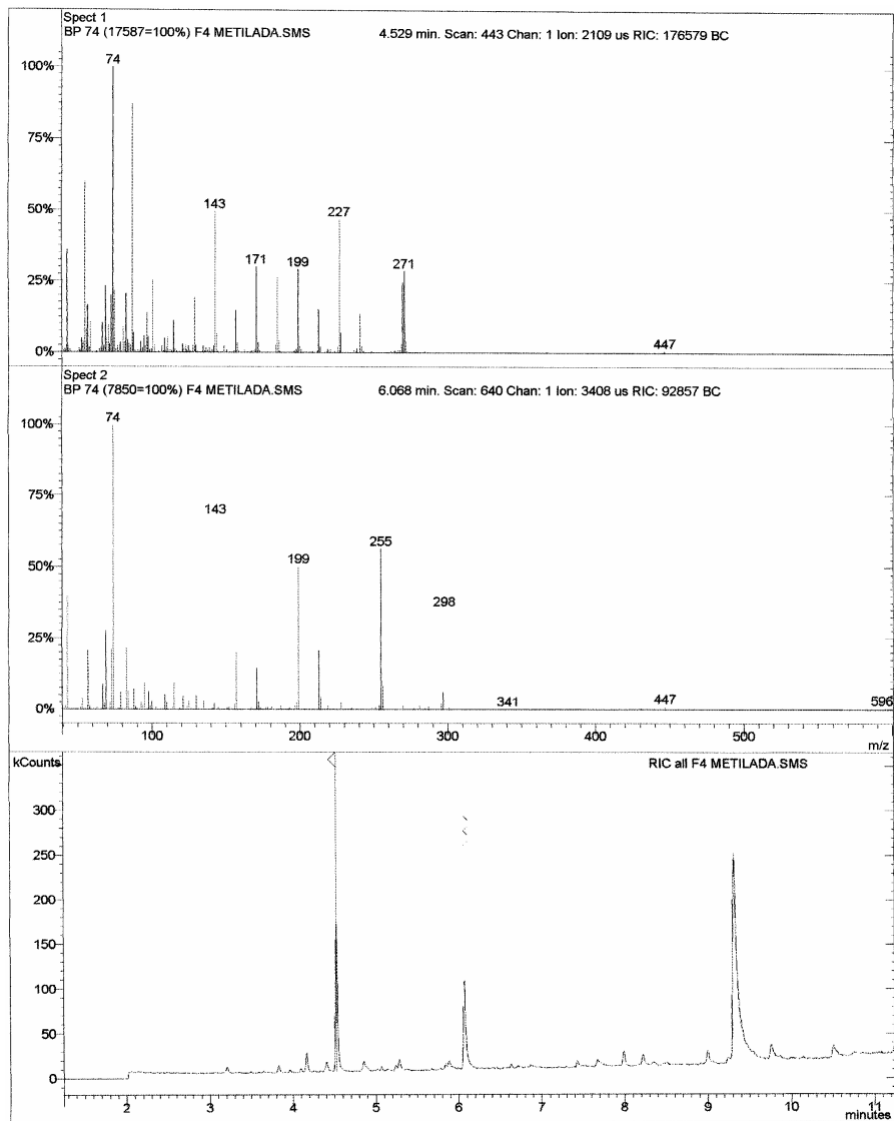


Figura 54- CG – EM dos esteróides de **M-9**

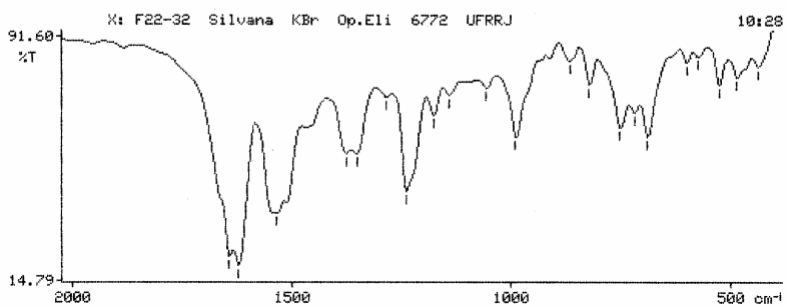
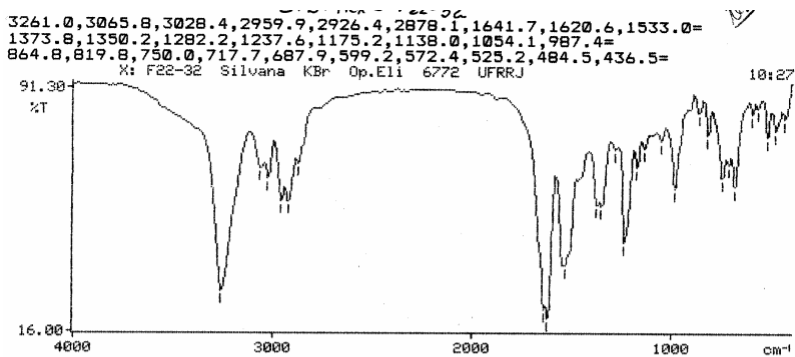


Figura 55- Espectro na região do infravermelho para os metabólitos de M-10

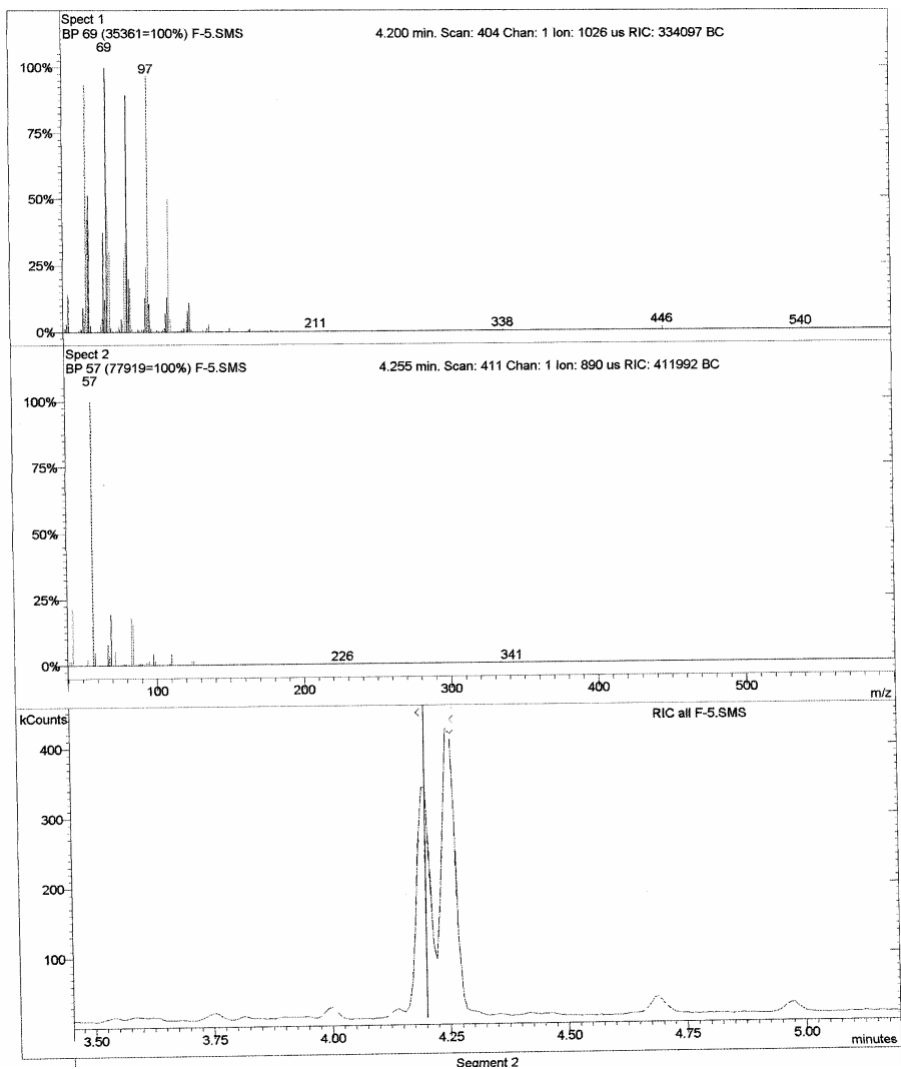


Figura 56- CG-EM da mistura de álcoois isolados de **M-10**

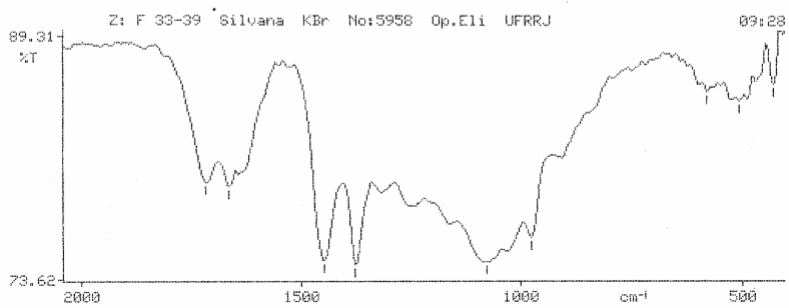
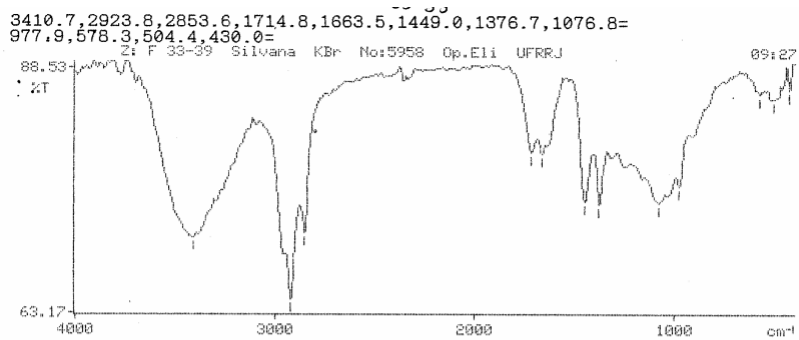


Figura 57- Espectro na região do infravermelho para os metabólitos de **M-11**

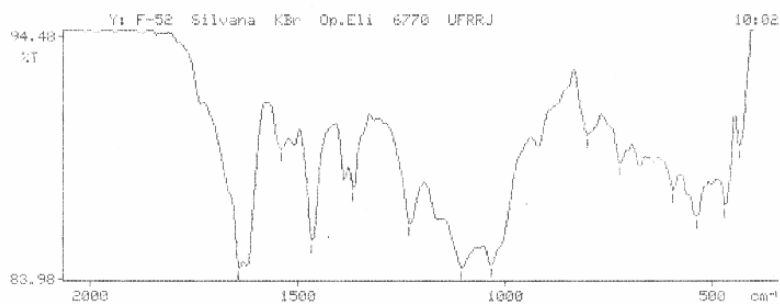
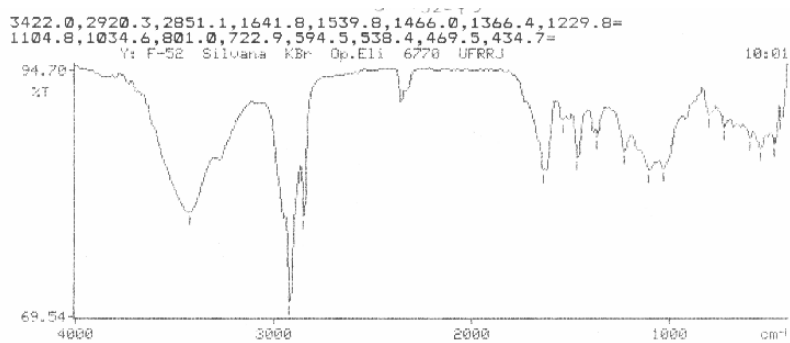
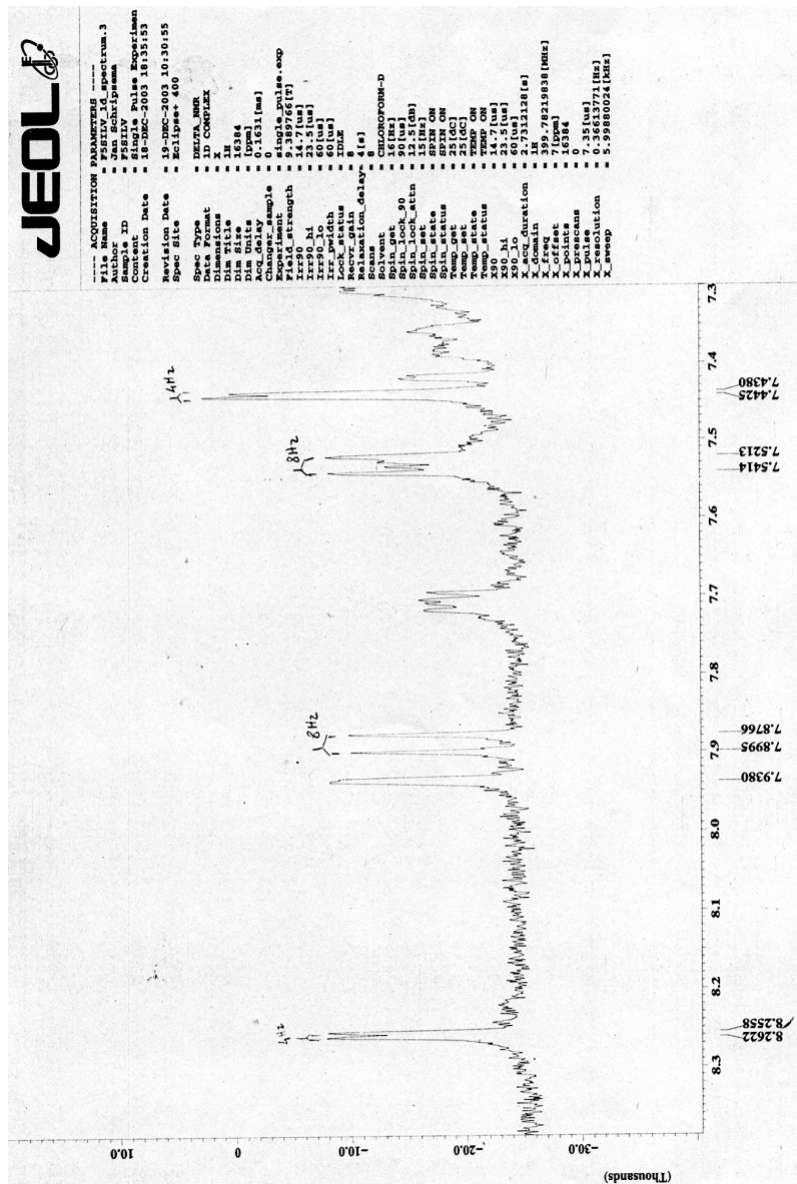
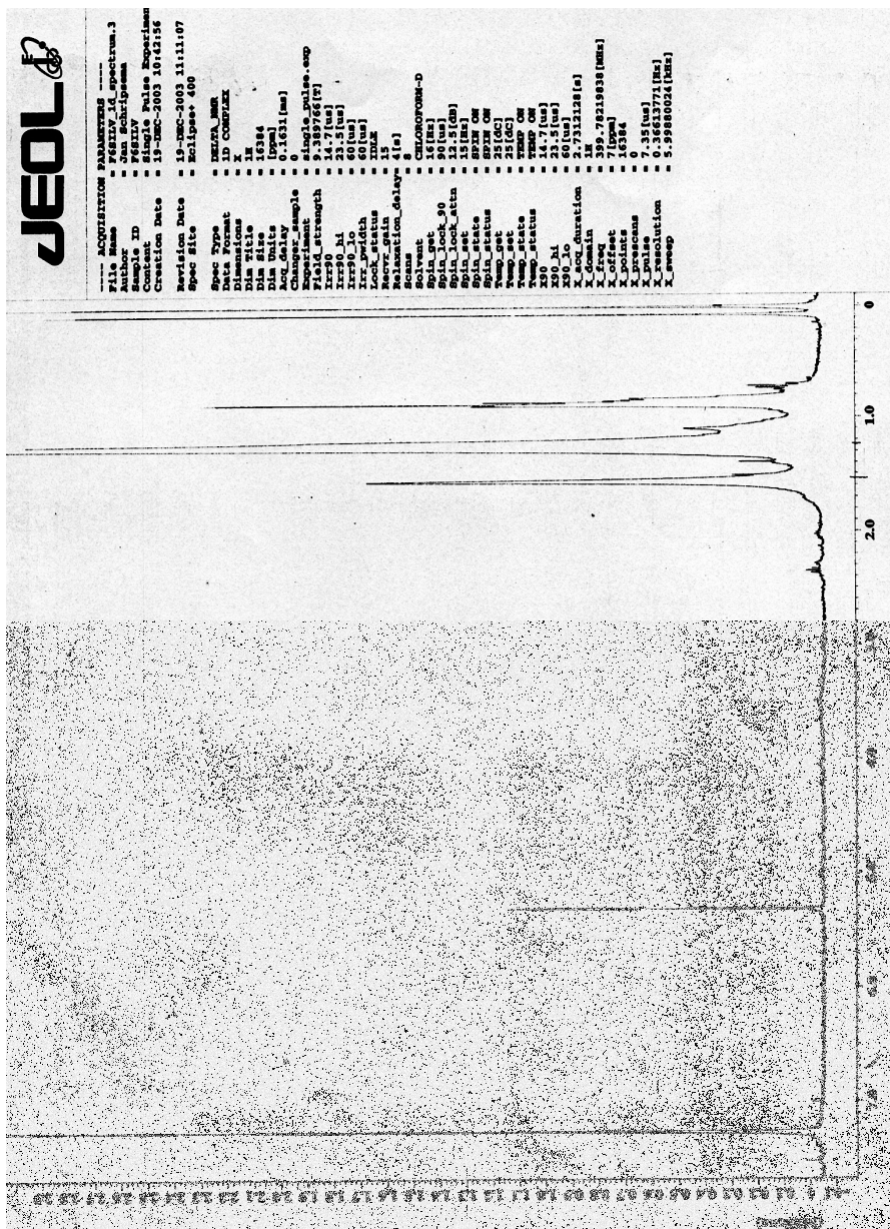


Figura 58- Espectro na região do infravermelho para o metabólito S-3



Continuação da **Figura 59**, com a ampliação do espectro de RMN de ^1H na faixa de δ 8,26-7,43 para o metabólito **S-3**



Continuação da **Figura 59**, com a ampliação do espectro de RMN de ^1H na faixa de δ 7,0-0,0 para o metabólito **S-3**

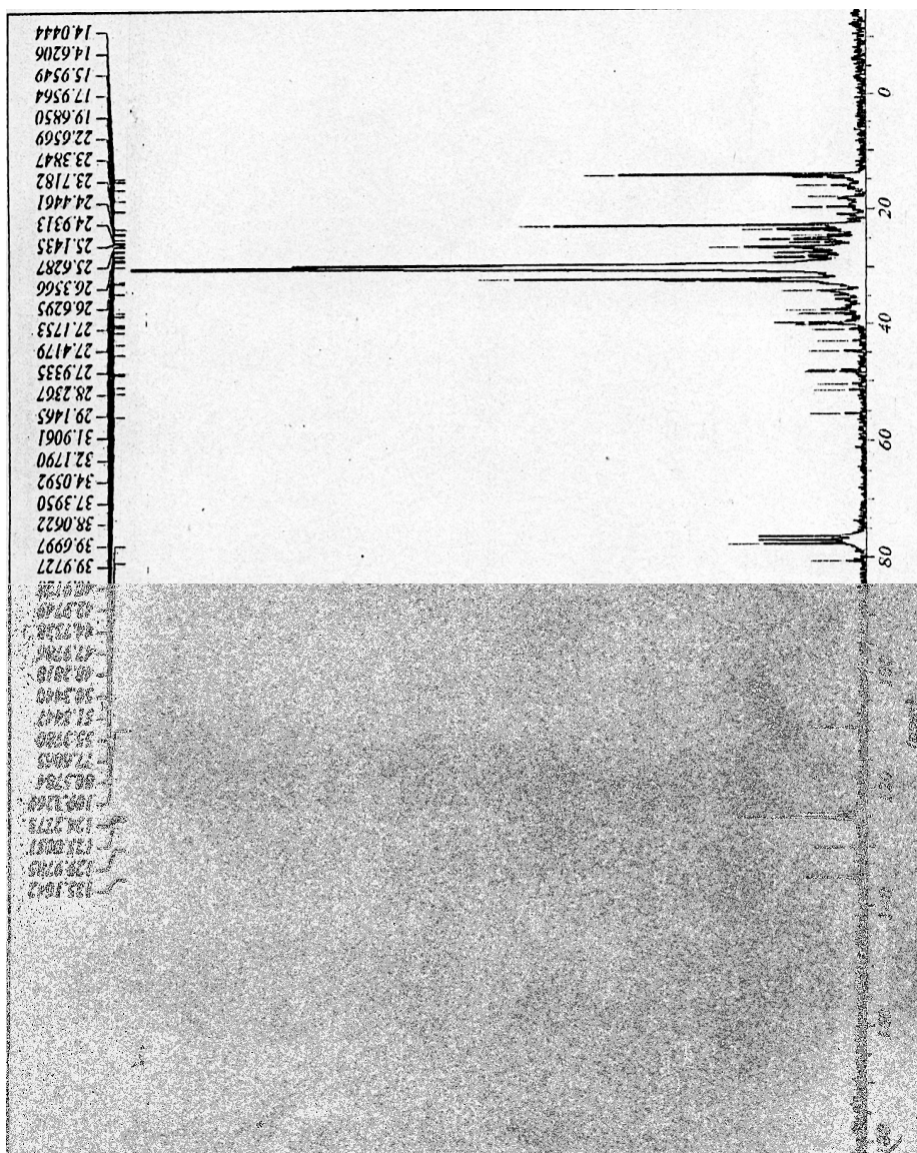
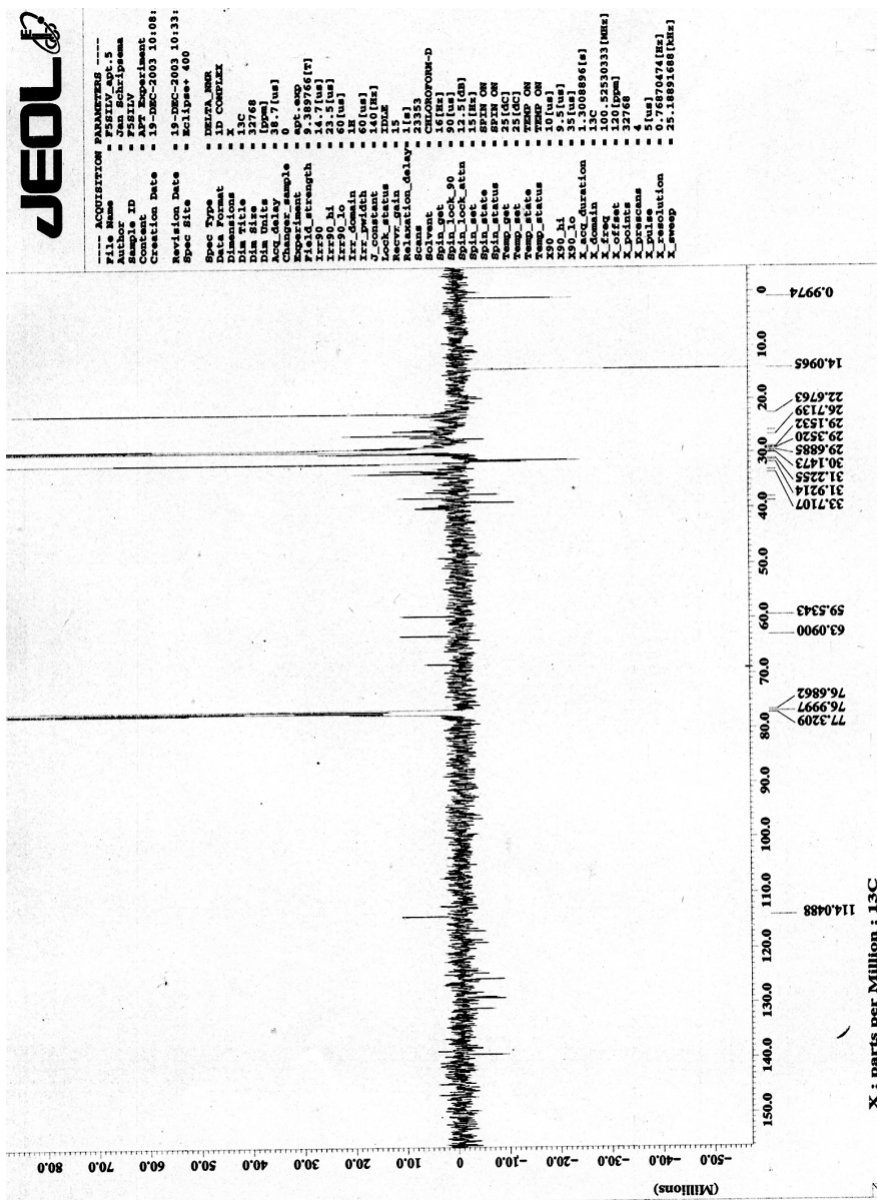
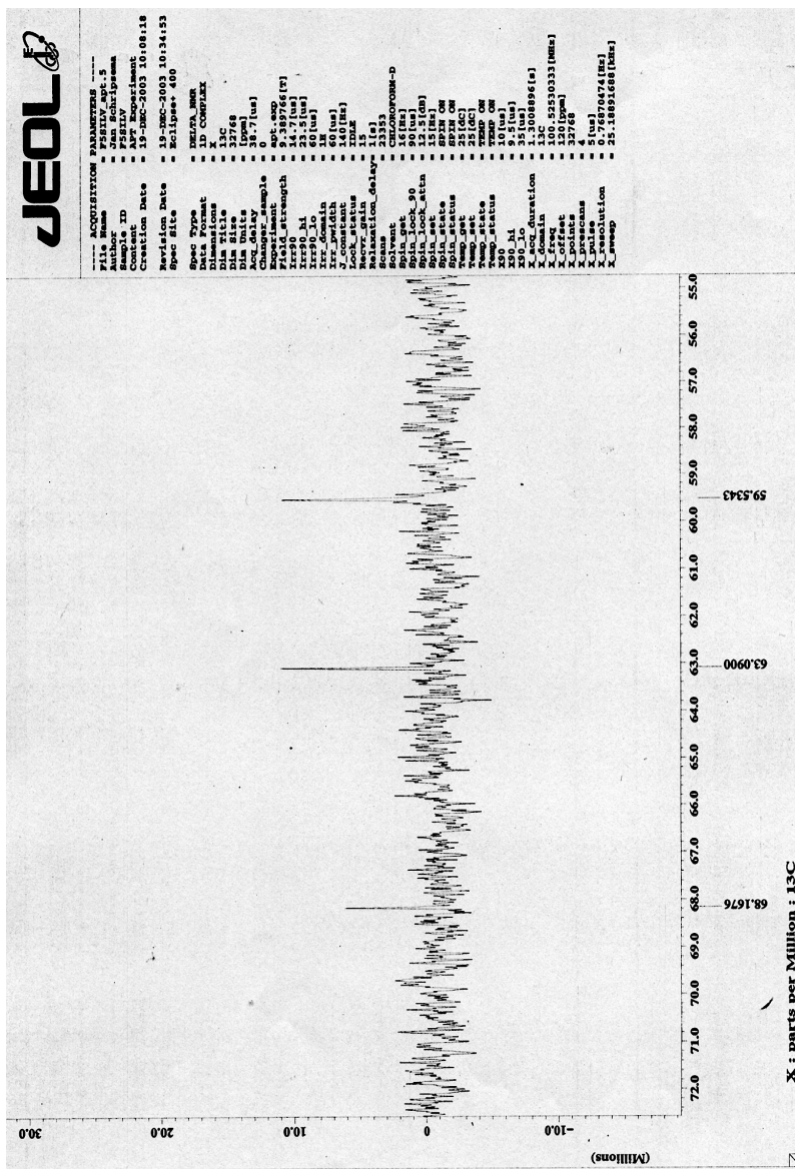


Figura 60- Espectro de RMN de ^{13}C para o metabólito S-3



Continuação da **Figura 60**, com ampliação do espectro de APT- RMN de ^{13}C , na faixa de δ 114,04-0,99 para o metabólito **S-3**



Continuação da **Figura 60**, com ampliação do espectro de APT- RMN de ^{13}C , na faixa de d 68,16-59,53 para o metabólito **S-3**

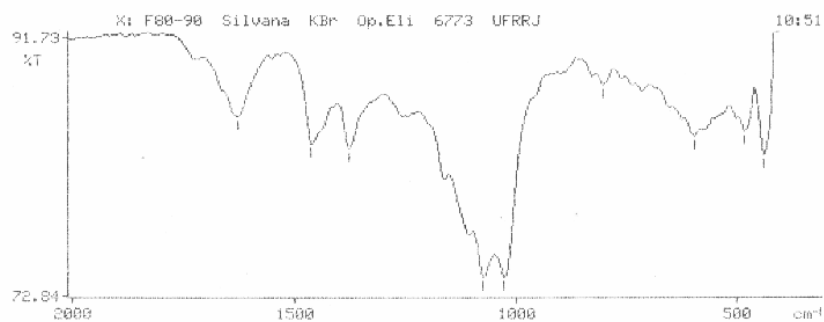
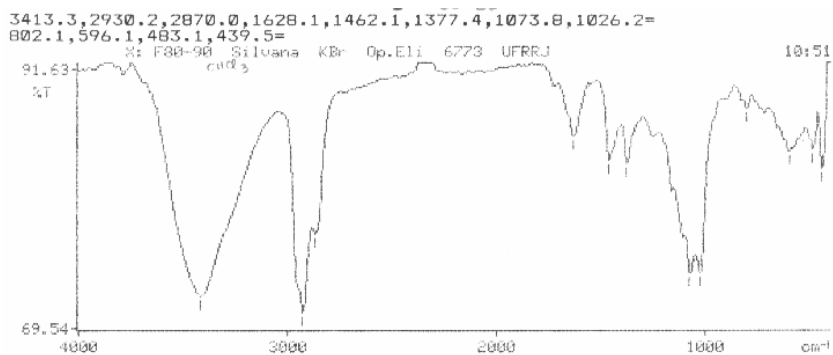


Figura 61- Espectro na região do infravermelho para o metabólito S-2