

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO  
DAS ESPÉCIES *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl  
(Verbenaceae) E *Pleurothyrium bahiense* (Meissner) Barroso  
(Lauraceae)**

**PIERRE ANDRÉ DE SOUZA**

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO  
DAS ESPÉCIES *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl  
(Verbenaceae) E *Pleurothyrium bahiense* (Meissner) Barroso  
(Lauraceae)**

**PIERRE ANDRÉ DE SOUZA**

**Sob Orientação do Professor  
Dr. Anselmo Alpande Moraes  
e Co- orientação da Professora  
Dr<sup>a</sup> Gilda Guimarães Leitão (NPPN-UFRJ)**

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

Seropédica, RJ  
novembro de 2004

De Souza, Pierre André

Estudo fitoquímico e farmacológico das espécies *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) e *Pleurothyrium bahiense* (Meissner) Barroso (Lauraceae).- Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Ciências Exatas 2004.

155 f.:il.

Orientador:

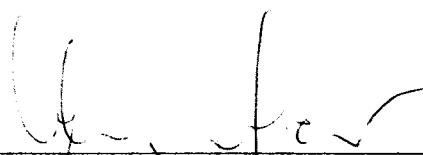
I Anselmo Alpande Moraes. II Co-orientador: Gilda Guimarães Leitão. III. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Exatas. IV. Doutor em Química Orgânica e Doutora em Ciências.

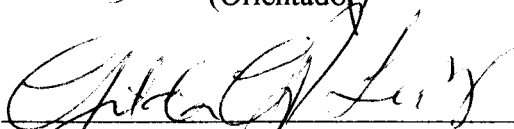
**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO  
DAS ESPÉCIES *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl  
(Verbenaceae) E *Pleurothyrium bahiense* (Meissner) Barroso  
(Lauraceae)**

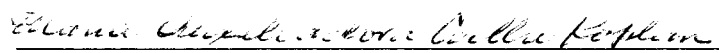
**PIERRE ANDRÉ DE SOUZA**

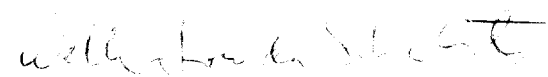
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica,  
área de Concentração em Fitoquímica, como requisito parcial para obtenção do grau de  
Magister Scientiae, em Química Orgânica


DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/11/2004

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Anselmo Alpanse Morais (UFRRJ)  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Gilda Guimarães Leitão (UFRJ-NPPN)  
(Co-orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan (UFRJ-NPPN)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Wellington da Silva Côrtes (UFRRJ)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Helena Regina Pinto Lima (UFRRJ) (Suplente)

## Agradecimentos

- Aos meus pais, João e Noeli, responsáveis pela imprescindível base de minha educação, para que pudesse caminhar tornando-me um ser humano cada vez mais integrado e consciente pela busca, mesmo que utópica, da perfeição. E as minhas duas belas irmãs, Janice e Janine, pela oportunidade do crescimento, concedida pela lei cármica do cosmos pela vivência no seio familiar.
- Ao meu tio-avô, o químico e pesquisador alemão Alfred Nünch, pelo exemplo profissional e humanitário (*in memoriam*).
- Aos “Mestres” com carinho: meus mais sinceros agradecimentos aos professores da UFRRJ e do Departamento de Pós-graduação em Química Orgânica pela postura, em todos os momentos, de honestidade e profissionalismo à minha pessoa durante minha passagem pela Rural, em especial aos professores: Dr. João Batista, Dra. Rosane, Dr. Carlos Maurício, Dr. Aurélio, Dr. Vitor, Dr. José Carlos, Dra. Sônia, Dr. Anselmo, Dra. Áurea, Dr. Moya, Dr. Generoso Chagas, Dr. Wellington e a Dra. Eliza Helena.
- Ao prof. Anselmo pelo apoio inicial, pelas inúmeras horas-aula, e a toda a sua família (sua esposa Ângela e seus filhos Allan e Alex pela paciência) por toda ajuda recebida.
- À “vovó” Darcila, seu filho prof. Dr. Ricardo e família, pela amizade ofertada
- À inesquecível “Jú”, uma das razões que sustentaram minha alma por muito tempo aqui, longe de casa, de ver realizado com todo esmero este trabalho.
- Aos amigos sinceros do curso de Pós-graduação pela honestidade de suas amizades, caráter e profissionalismo, num meio repleto de inautenticidade, estendidos a minha pessoa, e que levo na insustentável leveza de meu *Ser*, como fonte eterna de inspiração: ao amigo Cleber Bomfim, Walber, Rodney, Welinson, Bauer, Silvana, Adriano (estagiário), Tatiana, Cleonice, Cristian (pela grande ajuda na UENF), Ari, Ildomar, a Lizandra (UFRJ) e ao Carlos (UFRJ).

- Aos técnicos e funcionários do ICE-DQ pela amizade e exemplo de profissionalismo: Eli, Maurício, Fábio (o “mestre” vidreiro), Aldir, Rui, Gil e a Dona Véra.
- À doutoranda Ivi e ao técnico Marcos (UFRJ), pelo aprendizado e pela grande ajuda nos testes antimicrobianos.
- Ao professor Dr. Jan Schiripsema (UENF) e ao técnico Roberto, pela valiosa ajuda profissional na obtenção dos espectros de RMN, bem como, ao técnico Francisco (NPPN-UFRJ). O profissionalismo de todos vocês me ajudou a concretizar e materializar toda a labuta de meus passos, em busca desta tese.
- Ao professor e conterrâneo catarinense Dr. Zonta (UFRRJ) pelas valiosas correções, quanto ao tema “análise de solos” presentes neste trabalho. E ao professor Gervásio, pela identificação dos solos analisados. Ao Dr. Espindola (EMBRAPA), pela valiosa ajuda quanto a realização das análises de solo.
- À professora Dra. Eliza Helena por toda a sua ajuda. Um verdadeiro exemplo de profissionalismo à Universidade e amor a educação.
- À CAPES, pela bolsa concedida.
- Às Nações Indígenas do Alto Xingu-MT: Xavante e Kurã Bakairí. Por terem sido, desde minha primeira ida em suas reservas, estimuladores de meus passos na ciência pela busca de minhas respostas. Das inúmeras incógnitas, agraciadas pela oportunidade ímpar da vivência com seus xamãs e raizeiros, no dia a dia de suas magníficas culturas.
- À professora Inês e ao professor Rogério pela grande ajuda na obtenção da amostra da espécie *P. bahiense*.
- E a todos os meus algozes, deixo aqui registrado o meu “D” de Determinação. Porque “*nada é mais forte que a determinação*” (Brahma Kumaris).

## Agradecimentos Especiais

Por mais que me esforçasse em procurar materializar em palavras eloqüentes tudo o que gostaria de dizer a vocês, estas não expressariam de forma condigna, a grandeza singela do respeito de meus sentimentos que sustento, guardo e que levarei cultivado no lado esquerdo de meu peito pelo tempo que for permitido trilhar por esta efêmera passagem terrena. Pois tais sentimentos, não se restringem ao cárcere do papel.

- À professora e orientadora Dra. Gilda Guimarães pela sua postura profissional, repleta de seriedade e respeito ao meu profissionalismo, conspecta em todos os momentos de sua orientação na conquista desta importante etapa de minha vida. Pela preciosa contribuição à lapidação de meu espírito, inserido no universo instigante da ciência.
- Ao valor da preciosa amizade, aqui conquistada, de dois grandes amigos: Cleber Bomfim e Walber C. Melo. Que muito me ajudaram, de forma abnegada e sempre repleta de despreendimentos. Sem a ajuda de vocês dois, minha passagem por aqui, seria incomensuravelmente muito mais difícil, e os desafios, mais árduos de serem superados. Muito obrigado!
- Ao meu pai, pelo incentivo e apoio em cada passo dado na busca de minhas conquistas. A minha família, por tudo!! E ao meu avô João (*in memoriam*).
- À amiga e estagiária Ana Rosa (UFRJ), meu braço esquerdo no laboratório, pela ajuda e competência profissional sempre constantes.

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará, assim, uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”*

*( A. Einstein. Físico alemão)*

*“O espírito científico, fortemente armado com seu método, não existe sem a religiosidade cósmica”*

*( A. Einstein.)*

*“Aventurar-se, causa ansiedade,...mas deixar de arriscar-se é perder a si mesmo...Aventurar-se no sentido mais amplo, é precisamente tomar consciência de si mesmo”*

*(Kiernkergaaid. Filósofo Holandês)*



## Índice

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 1.1     | Produtos Naturais.....   | 1  |
| 1.2     | Cromatografia Contracorrente (CCC).....  | 3  |
| 1.2.1   | Vantagens da Técnica de Cromatografia Contracorrente (CCC).....  | 6  |
| 1.2.2   | Sistema de Solventes em CCC .....  | 7  |
| 1.3     | Solos Ácidos: Alumínio (Al) e Flúor (F), e os Fitoterápicos .....  | 9  |
| 1.4     | Antioxidantes e Radicais Livres .....  | 11 |
| 1.5     | Bactérias e Atividade Antimicrobiana .....   | 13 |
| 1.6     | A Inflamação .....   | 15 |
| 1.7     | Aspectos Gerais das Espécies Estudadas.....  | 16 |
| 1.7.1   | A Família Lauraceae .....  | 16 |
| 1.7.1.1 | Importância Medicinal da Família Laureceae .....   | 18 |
| 1.7.1.2 | Principais Classes de substâncias .....  | 20 |
| 1.7.2   | <i>Pleurothyrium bahiense</i> (Meissner) Barroso .....   | 20 |
| 1.7.3   | A Família Verbenaceae.....   | 21 |
| 1.7.3.1 | Importância Medicinal das Verbenaceae .....  | 22 |
| 1.7.3.2 | Principais Classes de Substâncias.....   | 22 |
| 1.7.4   | <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. ....   | 22 |
| 2       | OBJETIVOS .....  | 26 |
| 3       | PARTE EXPERIMENTAL .....   | 27 |
| 3.1     | Materiais e Métodos .....  | 27 |
| 3.1.1   | Equipamentos e Reagentes .....   | 27 |
| 3.1.2   | Coleta e Moagem da Espécie <i>S. cayennensis</i> (Rich.) Vahl .....  | 29 |
| 3.1.3   | Identificação Botânica .....   | 30 |
| 3.1.4   | Coleta e Moagem da Espécie <i>P. bahiense</i> (Meiss) Barroso .....  | 30 |
| 3.1.5   | Identificação Botânica .....   | 30 |
| 3.1.6   | Coleta dos Solos .....   | 30 |
| 3.2     | Obtenção dos Extratos .....  | 31 |
| 3.2.1   | <i>S. cayennensis</i> (Rich.) Vahl.....  | 31 |
| 3.2.2   | <i>P. bahiense</i> (Meiss) Barroso .....   | 32 |
| 3.2.2.1 | Isolamento e Purificação dos Constituintes Isolados do Extrato Metanólico das Folhas da Espécie <i>P. bahiense</i> (Meiss) Barroso .....         | 32 |
| 3.2.2.2 | Análise das Frações do Fracionamento Cromatográfico do Extrato Metanólico de Folhas de <i>P. bahiense</i> .....                                  | 33 |
| 3.3     | Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC) .....  | 35 |
| 3.3.1   | Escolha do Sistema de Solventes.....   | 36 |
| 3.3.1.1 | Teste de Fração em Tubo de Ensaio .....  | 36 |
| 3.3.1.2 | Teste de Sistema de Solventes para Estabelecer os Degraus do Gradiente .....   | 36 |
| 3.3.1.3 | Separação dos Constituintes do Extrato em Acetato de Etila de raízes de <i>S.cayennensis</i> (Rich.) Vahl por HSCCC em Gradiente não-Linear..... | 36 |
| 3.3.1.4 | Separação dos Constituintes da Fração em Acetato de Etila de Raízes de <i>S. cayennensis</i> (Rich.) Vahl .....                                  | 37 |
| 3.4     | Testes Biológicos .....  | 39 |
| 3.4.1   | Testes de Atividade Antioxidante.....  | 39 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.4.2 | Testes de Atividade Antimicrobiana .....  | 40  |
| 3.4.3 | Testes de Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória .....  | 41  |
| 3.4.4 | Análises dos Solos das Áreas de Ocorrência das Plantas Estudadas .....  | 43  |
| 3.5   | Constituintes Químicos Isolados das Folhas de <i>P. bahiense</i> (Meiss) Barroso e das Raízes de <i>S. cayennensis</i> (Rich.) Vahl ..... | 44  |
| 3.6   | Dados Físicos e Espectroscópicos dos Constituintes de <i>S. cayennensis</i> (Rich.) Vahl. ....  | 46  |
| 3.7   | Dados Físicos e Espectroscópicos dos Constituintes de <i>P. bahiense</i> (Meiss) Barroso.....   | 48  |
| 4     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 50  |
| 4.1   | Cromatografia Contracorrente .....  | 50  |
| 4.2   | Análise Espectroscópica de RMN <sup>1</sup> H das Frações de <i>S. cayennensis</i> (Rich.) Vahl. ....                                     | 55  |
| 4.3   | Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas da Fração Acetato de Etila de <i>S. cayennensis</i> (Rich.) Vahl .....                   | 61  |
| 4.3.1 | Determinação Estrutural do Fenilpropanóide glicosilado (I) .....  | 61  |
| 4.3.2 | Determinação Estrutural do Fenilpropanóide glicosilado (II) .....   | 68  |
| 4.3.3 | Determinação Estrutural do Fenilpropanóide glicosilado (III).....   | 73  |
| 4.3.4 | Determinação Estrutural do Iridóide glicosilado (IV) .....  | 77  |
| 4.4   | Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas de <i>Pheurothyrium bahiense</i> (Meiss) Barroso .....                                   | 84  |
| 4.4.1 | Determinação Estrutural do Esteróide glicosilado (PB.1).....  | 84  |
| 4.4.2 | Determinação Estrutural do Flavonóide glicosilado (PB.2) .....  | 92  |
| 4.4.3 | Determinação Estrutural do Derivado (PB.2.1).....   | 105 |
| 4.5   | Atividade Antioxidante.....   | 111 |
| 4.6   | Atividade Antimicrobiana .....  | 119 |
| 4.7   | Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória .....  | 123 |
| 4.8   | Análises dos Solos das Áreas Endêmicas das Plantas Estudadas .....  | 127 |
| 5     | Conclusão .....   | 131 |
| 6     | BIBLIOGRAFIA .....  | 133 |

## Índice de Tabelas

|  |     |
|--|-----|
| TABELA 1: ALGUMAS CLASSES DE PRODUTOS NATURAIS QUE PODEM SER ISOLADOS VIA CCC .....  | 9   |
| TABELA 2: USO ETNOMEDICINAL DE DE <i>S. CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL.....  | 24  |
| TABELA 3: FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO EM COLUNA DO EXTRATO METANÓLICO COM SEUS<br>RESPECTIVOS SISTEMAS DE SOLVENTES.....  | 33  |
| TABELA 4: SISTEMAS DE SOLVENTES EMPREGADOS NO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA. 36   |     |
| TABELA 5: ANÁLISE DE SOLO DA ESPÉCIE <i>P. BAHIENSE</i> (MEISS) BARROSO. ....  | 43  |
| TABELA 6: ANÁLISE DE SOLO DA ESPÉCIE <i>P. BAHIENSE</i> (MEISS) BARROSO. ....  | 43  |
| TABELA 7: ANÁLISE DE SOLO DA ESPÉCIE <i>S. CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL .....  | 43  |
| TABELA 8: ANÁLISE DE SOLO DA ESPÉCIE <i>S. CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL .....  | 44  |
| TABELA 9: DADOS ESPECTRAIS DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD ? PPM, HZ) E DE <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD) DA<br>SUBSTÂNCIA I, EM COMPARAÇÃO COM DADOS ESPECTRAIS DA LITERATURA <sup>A;B</sup> .....   | 65  |
| TABELA 10 DADOS ESPECTRAIS DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD ? PPM, HZ) E DE <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD)<br>DA SUBSTÂNCIA II EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA <sup>A;B</sup> .....  | 71  |
| TABELA 11: DADOS ESPECTRAIS DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD ? PPM, HZ) E DE <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD)<br>DA SUBSTÂNCIA I, EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA <sup>A;B</sup> .....   | 75  |
| TABELA 12: DADOS ESPECTRAIS DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD ? PPM, HZ) E DE <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD)<br>DA SUBSTÂNCIA IV EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA <sup>A</sup> .....   | 81  |
| TABELA 13: DADOS DE RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, PIRIDINA- <i>d</i> <sub>5</sub> , PPM, HZ) E <sup>13</sup> C (100 MHz, PIRIDINA- <i>d</i> <sub>5</sub> ) DA<br>SUBSTÂNCIA PB.1 E COMPARADOS COM VALORES CITADOS NA LITERATURA (CDCl <sub>3</sub> ) <sup>A</sup> .....   | 87  |
| TABELA 14: DADOS RESULTANTES DE EXPERIÊNCIA DE 1D E 2D, <sup>1</sup> H X <sup>13</sup> C HETCOR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )<br>( <sup>1</sup> J), E HMBC- <sup>N</sup> JCH <sub>N</sub> =2,3 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) COM PB.1 .....  | 88  |
| TABELA 15: DADOS DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , PPM, HZ) E <sup>13</sup> C (50 MHz, , DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) DA<br>SUBSTÂNCIA PB.2 COMPARADOS COM VALORES CITADOS NA LITERATURA. <sup>A,B</sup> .....  | 97  |
| TABELA 16: DADOS RESULTANTES DE EXPERIÊNCIA DE 1D E 2D, RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , PPM, HZ),<br><sup>13</sup> C (50 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), <sup>1</sup> H X <sup>13</sup> C HETCOR ( <sup>1</sup> J), ( <sup>1</sup> H X <sup>1</sup> H - COSY) E HMBC- <sup>N</sup> JCH <sub>N</sub> =2,3 (400<br>MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) COM PB.2..... | 98  |
| TABELA 17: DADOS DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> , PPM, HZ) E <sup>13</sup> C (50 MHz, , CDCl <sub>3</sub> ) DA SUBSTÂNCIA<br>PB.2.1 COMPARADOS COM VALORES CITADOS NA LITERATURA. <sup>A</sup> .....  | 108 |
| TABELA 18: : ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>S. CAYENNENSIS</i> E <i>P. BAHIENSE</i> COM DPPH. 115  |     |
| TABELA 19: ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE DAS SUBSTÂNCIAS PURAS DE <i>S. CAYENNENSIS</i> COM DPPH. ....   | 117 |
| TABELA 20: ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE COM DPPH DOS EXTRATOS E DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS. ....  | 118 |
| TABELA 21: TESTE DE DISCO DE DIFUSÃO DE ÁGAR-ÁGAR (HALO DE INIBIÇÃO; MM) E CONCENTRAÇÃO<br>MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI; MG/ML) DAS ESPÉCIES <i>S. CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL S E <i>P. BAHIENSE</i><br>(MEISS) BARROSO.....   | 122 |
| TABELA 22: Nº DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS ACUMULADAS (C.A.A) POR 30 MIN EXPRESSOS COMO MÉDIA<br>± E.P.M E PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DAS CONTORÇÕES COM RELAÇÃO AO CONTROLE NEGATIVO. ....  | 125 |
| TABELA 23: TEMPOS DE REAÇÃO DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES GRUPOS AO ESTÍMULO NOCICEPTIVO DA<br>PLACA QUENTE EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M.....   | 125 |
| TABELA 24: MÉDIA ± E.P.M DAS DIFERENÇAS DE PESO (MG) OBTIDAS NOS DISTINTOS GRUPOS TRATADOS.<br>.....   | 126 |

## Índice de Figuras

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 1: ÚLCERA SACRAL CAUSADA POR CONTAMINAÇÃO HOSPITALAR VIA <i>S.AUREUS</i><br><i>P.AERUGINOSA</i> , E <i>S.PYOGENES</i> .....  | 15  |
| FIGURA 2: ERISPELA CAUSADA POR <i>S.PYOGENES</i> .....  | 15  |
| FIGURA 3: INFLORESCÊNCIA DA TRIBO PERSEEAE NEES. ....   | 18  |
| FIGURA 4: INFLORESCÊNCIA <i>S. CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL.....  | 25  |
| FIGURA 5: FLOR ES E RAMOS <i>S. CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL.....   | 25  |
| FIGURA 6: HÁBITO <i>S CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL. ....  | 25  |
| FIGURA 7: INFLORESCÊNCIA <i>P. BAHIENSE</i> (MESS.) BARROSO. ....   | 25  |
| FIGURA 8: FRAÇÃO 38-46 (PB-1) – CRISTAIS ACICULIFORMES. ....  | 34  |
| FIGURA 9: FRAÇÃO 47-48 (PB-2): PRECIPITADO NA FORMA DE FLOCOS. ....   | 35  |
| FIGURA 10: AS LETRAS S E I REPRESENTAM, RESPECTIVAMENTE, A FASE SUPERIOR E<br>INFERIOR DE CADA SISTEMA DE SOLVENTE EMPREGADO. ....  | 51  |
| FIGURA 11: AS LETRAS S E I REPRESENTAM, RESPECTIVAMENTE, A FASE SUPERIOR E<br>INFERIOR DE CADA SISTEMA DE SOLVENTE EMPREGADO. ....  | 52  |
| FIGURA 12: ARILPROPANÓIDES ISOLADOS POR CCC. ....   | 54  |
| FIGURA 13: IRIDÓIDES GLICOSILADOS ISOLADOS POR CCC. ....  | 54  |
| FIGURA 14: TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM DPPH EM TUBOS DE ENSAIO. ..  | 114 |
| FIGURA 15: TESTE ANTIMICROBIANO COM 5 MG DOS EXTRATOS E FRAÇÕES COM OS<br>VALORES DOS RESPECTIVOS HALOS DE INIBIÇÃO. ....   | 120 |
| FIGURA 16: TESTE ANTIMICROBIANO COM 1 MG DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO<br>ACEOT COM SEUS RESPECTIVOS HALOS DE INIBIÇÃO. ....   | 121 |
| FIGURA 17: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS DO NÚMERO DE CONTORÇÕES<br>ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO 1,2% , PARA DIFERENTES GRUPOS<br>TRATADOS. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M * P < 0,01, ** P < 0,05 E<br>*** P < 0,001. .... | 125 |
| FIGURA 18: TEMPO DE REAÇÃO DOS ANIMAIS DOS DISTINTOS GRUPOS NAS FASES DE PRÉ E<br>PÓS- TRATAMENTO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M * P < 0,001 E ** P < 0,01. ...   | 126 |
| FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DIFERENÇAS DE PESO ENTRE AS ORELHAS NOS<br>DIFERENTES GRUPOS. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M * P < 0,0001.<br>.....   | 126 |

## Índice de Esquemas

|  |     |
|--|-----|
| ESQUEMA 1: METODOLOGIA UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>S. CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL .....                          | 31  |
| ESQUEMA 2: PROCESSO DE SEPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DO EXTRATO EM ACOET DE RAÍZES DE <i>S. CAYENNENSIS</i> (RICH.) VAHL POR HSCCC.....        | 38  |
| ESQUEMA 3: OBTENÇÃO DOS IRIDÓIDES E ARILPROPANÓIDES GLICOSILADOS PUROS, POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE COM UTILIZAÇÃO DE GRADIENTE ..... | 54  |
| ESQUEMA 4: HÍBRIDOS DE RESSONÂNCIA .....   | 112 |
| ESQUEMA 5: RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA (DPPH) .....   | 113 |

## Índice de Espectros

|   |     |
|---|-----|
| ESPECTRO 1: ESPECTRO FRAÇÃO HEXANO (200 MHz, D <sub>2</sub> O).....   | 58  |
| ESPECTRO 2: ESPECTRO FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (200 MHz, D <sub>2</sub> O).....  | 58  |
| ESPECTRO 3: ESPECTRO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (200 MHz, D <sub>2</sub> O).....   | 59  |
| ESPECTRO 4: ESPECTRO DA FRAÇÃO BUTANÓLICA (200 MHz, D <sub>2</sub> O).....  | 59  |
| ESPECTRO 5: ESPECTRO FRAÇÃO 51-56 (200 MHz, CDO <sub>3</sub> D).....  | 60  |
| ESPECTRO 6: ESPECTRO FRAÇÃO 57-64 (200 MHz, CDO <sub>3</sub> D).....  | 60  |
| ESPECTRO 7: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H ESPECTRO RMN <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA I (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD)<br>.....   | 66  |
| ESPECTRO 8: EXPANSÃO (τ <sub>H</sub> 3,2- 4,1 PPM) DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA I.<br>(200MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....   | 66  |
| ESPECTRO 9: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C (APT: CH <sub>3</sub> , CH PARA BAIXO; CH <sub>2</sub> , C PARA CIMA) DA<br>SUBSTÂNCIA I. (200MHz, CD <sub>3</sub> OD).....                         | 67  |
| ESPECTRO 10: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA I. (50MHz, CD <sub>3</sub> OD).....  | 67  |
| ESPECTRO 11: EXPANSÃO (τ <sub>H</sub> 20- 82 PPM) DO ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA I.<br>(200MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....   | 68  |
| ESPECTRO 12: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA II. (200MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....  | 72  |
| ESPECTRO 13: EXPANSÃO (τ <sub>H</sub> 3,2- 4,1 PPM) DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA II.<br>(200MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....   | 72  |
| ESPECTRO 14: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA II. (50MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....  | 73  |
| ESPECTRO 15: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA III (200MHz, CD <sub>3</sub> OD).....   | 76  |
| ESPECTRO 16: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA III (200MHz, CD <sub>3</sub> OD).....  | 76  |
| ESPECTRO 17: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C (APT) DA SUBSTÂNCIA III (200MHz, CD <sub>3</sub> OD).....  | 77  |
| ESPECTRO 18: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA IV. (200MHz, CD <sub>3</sub> OD).....   | 82  |
| ESPECTRO 19: EXPANSÃO (τ <sub>H</sub> 1,5- 2,7 PPM) DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA IV.<br>(200MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....   | 82  |
| ESPECTRO 20: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA IV. (50MHz, CD <sub>3</sub> OD).....   | 83  |
| ESPECTRO 21: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C (APT: CH <sub>3</sub> , CH PARA BAIXO; CH <sub>2</sub> , C PARA CIMA) DA<br>SUBSTÂNCIA IV. (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....                      | 83  |
| ESPECTRO 22: ESPECTRO RMN <sup>1</sup> H DE PB.1 (400 MHz, PIRIDINA-D <sub>5</sub> ).....   | 89  |
| ESPECTRO 23: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA PB.1 (100 MHz, PIRIDINA-D <sub>5</sub> ).....  | 89  |
| ESPECTRO 24: ESPECTRO <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C HMBC ( <sup>2</sup> J; <sup>3</sup> J), REGIÃO (1,0-5,0 x 10,0-140,0) PPM DE PB.1<br>(400 MHz, PIRIDINA-D <sub>5</sub> ).....            | 90  |
| ESPECTRO 25: ESPECTRO <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C HMBC ( <sup>2</sup> J; <sup>3</sup> J), REGIÃO DE EXPANSÃO (0,5-2,2 x 10,0-60,0)<br>PPM DE PB.1 (400 MHz, PIRIDINA-D <sub>5</sub> )..... | 91  |
| ESPECTRO 26: ESPECTRO DE IV DA SUBSTÂNCIA PB.2 .....  | 99  |
| ESPECTRO 27: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DE PB.2 (200 MHz, DMSO-D <sub>6</sub> ).....  | 100 |
| ESPECTRO 28: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DE PB.2 (200 MHz, DMSO-D <sub>6</sub> ).....   | 101 |
| ESPECTRO 29: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C (APT: CH <sub>3</sub> , CH PARA BAIXO; C, CH <sub>2</sub> PARA CIMA) DE<br>PB.2 (400 MHz, DMSO-D <sub>6</sub> ).....                               | 101 |
| ESPECTRO 30: ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H (HETCOR, 200 MHz,<br>DMSO-D <sub>6</sub> ) DE PB.2.....   | 102 |
| ESPECTRO 31: ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR <sup>1</sup> H – <sup>1</sup> H (COSY, 200 MHz, DMSO-<br>D <sub>6</sub> ) DE PB-2.....  | 103 |
| ESPECTRO 32: ESPECTRO <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C HMBC ( <sup>2</sup> J; <sup>3</sup> J), REGIÃO (1,0-8,0 x 15-185,0) PPM PB-2(400<br>MHz, DMSO-D <sub>6</sub> ).....                      | 104 |
| ESPECTRO 33: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DE PB.2.1 (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....  | 109 |
| ESPECTRO 34 ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DE PB.2.1 (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....   | 110 |
| ESPECTRO 35: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DE PB.2.1 (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....   | 110 |

## Índice de Abreviaturas

AA = Atividade antioxidante

AcOEt = Acetato de Etila

APT = Attached Proton Test

BuOH = Butanol

c.a = contorções abdominais

c.a.a = contorções abdominais acumuladas

CC= Cromatografia em coluna

CCC = Cromatografia Contracorrente

CCD = Cromatografia em camada delgada

CCP= Cromatografia em camada preparativa

EC<sub>50</sub> = Concentração necessária para produzir metade de um efeito máximo estimado em 100%

EBPB = Extrato Bruto *Pleurothyrium bahiense*

CHCl<sub>3</sub> = Clorofórmio

cm<sup>-1</sup> = Centímetro recíproco (unidade de energia de número de onda)

CMI = Concentração Mínima Inibitória

COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H = Homonuclear Correlation Spectroscopy

*d* = Dupleto

d.i = Diâmetro interno

*dd* = Duplo dupleto

DMSO-*d*<sub>6</sub> = Dimetilsulfóxido deuterado

DPPH = Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila

e.p.m = Erro padrão da média

g = grama

HETECOR = Heteronuclear Correlation Spectroscopy

HMBC = Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC = Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HSCCC = High Seep Counter-current Chromatography

Hz = Hertz (unidade de energia)

i.p = Intra peritonal

**IV = Infravermelho**

**kg = Quilograma**

***m* = Multipleteo**

**MeOH = Metanol**

**mg = Miligrama**

**p.f = Ponto de fusão**

***per os* (p.o) = oral**

**ppm = Parte por milhão**

**RMN <sup>13</sup>C = Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13**

**RMN <sup>1</sup>H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio**

***t* = Tripleto**

**UV = Ultravioleta**

**d = Deslocamento química (ppm)**

**? = Comprimento de Onda no Máximo de Absorção**

**µg = Micrograma**

**? = Constante de acoplamento (medida em Hertz)**



## Resumo

Essa dissertação envolveu o estudo fitoquímico e farmacológico (atividade antiinflamatória, antinociceptiva, antimicrobiana e antioxidante), e análise de solos das áreas de coleta de ocorrência endêmica das espécies *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Raízes) e *Pleurothyrium bahiense* (Meiss) Barroso (Folhas). A espécie *S. cayennensis* foi coletada em Florianópolis na região do canto dos Araçás, e a espécie *P. bahiense* foi coletada no Rio de Janeiro na região do Maciço da Pedra Branca.

Os arilpropanóides glicosilados e iridóides glicosilados das raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl foram isolados da fração acetato de etila, por meio de cromatografia contracorrente (CCC), com gradiente de polaridade. A escolha de um gradiente não-linear, utilizando-se o sistema de solventes bifásico EtOAc: BuOH: H<sub>2</sub>O, em quatro etapas, A – X = 0.05, B – X = 0.2, C – X = 0.5 e D – X = 1.0 teve o BuOH (X) aumentado gradativamente por sua maior afinidade com a fase orgânica, por ser este sistema comumente usado para substâncias polares. Obteve-se desse fracionamento o isolamento de 6 substâncias puras: verbascosídeo (I), isoverbascosídeo (II), martinósídeo (III), ipolamiida (IV) e outros dois iridóides em fase de identificação.

A fração metanólica das folhas da espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso, por cromatografia em coluna de gel de sílica, conduziu ao isolamento de um esteróide:  $\beta$ -sitosterol glicosilado (PB.1), e um flavonóide glicosilado (PB.2): Apigenina-7-*O*-neohesperidosídeo.

Essas substâncias foram identificadas e suas estruturas elucidadas por meio de técnicas espectroscópicas de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e IV. Bem como técnicas bidimensionais (2D) de RMN observando-se a constante de acoplamento de uma ligação (<sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H – HOMOCOSY, <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C HETCOSY), <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C HMBQC <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> e duas ou três ligações (<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C HMBC).

## ABSTRACT

The present dissertation reports the phytochemical and pharmacological/biological study of the roots from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl and the leaves from *Pleurothyrium bahiense* (Meiss) Barroso.

Glycosylated phenylpropanoids and iridoids were isolated from the ethyl acetate extract from the roots of *S. cayennensis* (Rich.) Vahl by step gradient countercurrent chromatography (CCC). The chosen gradient utilized a stepwise increase of the butanol ratio in a normal phase separation, utilizing a biphasic EtOAc:BuOH:H<sub>2</sub>O solvent system, 1:X:1, in four steps: A – X = 0.05, B – X = 0.2, C – X = 0.5 and D – X = 1.0. The sequential increase of BuOH in the organic phase of the CCC solvent system, and wash-off of stationary phase allowed the isolation of 6 pure compounds: martinosite, isoverbascoside, verbascoside, ipolamiide, and two other iridoid glycosides, which structure is being investigated. These compounds covered a far wider span of polarities than could have been achieved by more conventional isocratic CCC.

The metanolic extract of the leaves from *Pleurothyrium bahiense* had led to the isolation of one steroid: glycosylated  $\beta$ -sitosterol (PB.1), and one glycosylated flavonoid: Apigenin –7-O-neohesperidoside.

These compounds were identified by their <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C and infra-red. The 2D heteronuclear NMR techniques for observing coupling through one bond (<sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H – HOMOCOSY, <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C HETCOSY), <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C HMQC <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> and two or three bonds (<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C HMBC)- COLOC.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Produtos Naturais

O uso terapêutico dos assim chamados “produtos naturais”, por terem suas origens no empirismo de fontes vegetais, animais, e mesmo de minerais, é tão remoto quanto o nascimento das primeiras civilizações humanas. Onde inicialmente, as principais fontes na produção de drogas como recursos “medicamentosos” remediadores dos males físicos e ou “espirituais” do homem, tiveram como matérias primas tais artefatos. Tendo em seus esculápios silvícolas (xamãs), feiticeiros, médicos curandeiros das cortes europeias ou mesmo nas primeiras universidades do “velho mundo”, os produtores alquímicos das primeiras poções “mágicas medicamentosas” manufaturadas.

A partir de 1970, o mundo passou a mostrar um desencanto pela ciência acadêmica e suas realizações, o que levou as pessoas a revalorizar tudo o que se costuma designar como “natural”. Com isso, observa-se hoje uma tendência, em uma significativa parcela da população, de se confiar mais em recursos medicamentosos oriundos de plantas do que remédios sintéticos provenientes de indústrias farmacêuticas. Tal tendência não se restringe apenas à fração de leigos da sociedade, números cada vez mais crescentes de médicos, farmacêuticos, biólogos, dentistas, veterinários etc., estão interessados em conhecer mais sobre os produtos naturais e entusiasticamente dispostos a fazer usos dos medicamentos que antigamente eram mais comuns, como os chás, extratos, tinturas etc. Atualmente, a medicina pelas plantas está se libertando de seu caráter empírico original e de sua aura misteriosa cuidadosamente mantida por muitos empiristas (Salatino A.1996).

Segundo Benedum (Schulz, V. *et al.* 2002), quando consideramos que a história da fitoterapia clássica atravessa mais de dois mil anos, dos tempos antigos aos modernos, é razoável assumir que muitas das plantas medicinais usadas durante aquele período não apenas têm ações específicas como também estão livres de efeitos colaterais perigosos. Caso contrário, elas não teriam sido passadas adiante com tanta confiança através de tantas épocas e culturas. Seria leviano considerar a experiência coletiva de mais de 50 gerações de médicos e pacientes como um “efeito placebo” (Schulz, V. *et al.* 2002).

Tal afirmação é reforçada por bases estatísticas, já que aproximadamente 25% das drogas prescritas mundialmente vêm de plantas medicinais, existindo atualmente em uso 121 substâncias ativas. Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela

Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente originárias de plantas medicinais, e um número ainda significativo provém de drogas sintéticas obtidas de substâncias precursoras de origem natural. Atualmente, a fitoterapia em relação ao mercado mundial gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares, onde cerca de 80% das pessoas no mundo utilizam plantas medicinais para curar suas enfermidades (Shu, Y. 1998).

O desenvolvimento de pesquisas em cima de matérias terapêuticas originárias de plantas requer um estudo multidisciplinar, envolvendo ciências básicas como a botânica (etnobotânica), agronomia, química e farmacologia, incluindo aí a toxicologia. Qualquer estudo envolvendo substâncias naturais farmacologicamente ativas depende, sobretudo da integração destas ciências (Verpoorte, R. 1989).

O uso potencial de plantas como fonte de novas drogas medicamentosas ainda é parcamente explorada, pela lamentável falta de interação entre indústria e universidade. Estima-se que já tenham sido devidamente estudadas para uso médico somente 5.000 espécies de plantas dentre as 250.000-500.000 mil espécies de plantas existentes no planeta (Salatino, A. 1996). O que é preocupante mediante a explosão do uso empírico das plantas medicinais quase sem critérios, justo pela toxidez que uma planta medicinal pode vir a conter pela dosagem e pelo tempo empregados em seu consumo. Devemos ter sempre em mente uma séria premissa: a mesma planta medicinal que cura pode matar!

Outro importante fator que é deixado de lado, lamentavelmente por pura displicência, por aqueles que procuram direcionar seus estudos fitoquímicos e farmacológicos à luz da etnomedicina (medicina popular), quanto ao uso dos chás como um profilático “medicamentoso” é o ambiente físico em que estas plantas medicinais se encontram. Enfocando aí, o tipo de solo em que estes organismos são expostos além de fatores de estresse ambiental, sejam estes caracterizados por fatores físicos ou abióticos do tipo: intensidade de luz, variação de temperatura, deficiência ou excesso de nutrientes, pH, salinidade, metais como alumínio (Al) e halogênios como flúor (F), disponibilidade de água, e com fatores bióticos como competição por espaço, predação, interações entre os diferentes organismos, etc.

Plantas comumente usadas pela medicina popular, como no caso da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) e recomendada pelo Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas pelo seu elevado potencial farmacêutico (Johns, A E; Hammer, M.L.A 1993), devem ser estudadas sob todos os seus aspectos. Visando a

padronização de seu extrato, quando de interesse farmacológico, para fins de utilidade pública à população de baixa renda.

As espécies dessa família são muito conhecidas por suas atividades biológicas, com crescente número de trabalhos de pesquisa com resultados relevantes, que vão desde atividade citotóxica à atividade antimicrobiana em seus extratos (Brito, N.R.S.1992). Em específico, para a espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, amplamente distribuída em todo solo brasileiro, e de uso corriqueiro na medicina popular (Johns, A E; Hammer, M.L.A 1993).

Por fim, o avanço dos métodos cromatográficos à luz da tecnologia nas últimas décadas, cada vez mais perspicazes à otimização de separações e isolamentos de metabólitos especiais de plantas, possibilitou após suas determinações estruturais bem como testes farmacológicos e toxicológicos preliminares, o emprego mais imediato à comercialização pelas indústrias farmacêuticas. Entre tais métodos, que levam a bons rendimentos de substâncias isoladas de extratos vegetais, associados à rapidez de suas purificações temos a cromatografia contracorrente (CCC).

Para melhor entendimento dos resultados, este trabalho de dissertação de tese foi abordado com tópicos específicos, que, em linhas gerais, colocam de forma mais sucinta o tema cromatografia contracorrente (CCC) como uma visão geral, em destaque, em relação as técnicas cromatográficas usuais em laboratório, no isolamento e purificação de substâncias naturais, dentre outras, extraídas do reino vegetal.

Tópicos especiais foram introduzidos sobre a relação entre solos ácidos e alumínio, situando o assunto como uma imprescindível discussão na área de plantas medicinais e saúde, procurando correlacioná-los quanto aos resultados expostos na tese, assim como os temas atividade antioxidante, antimicrobiana, avaliações antinociceptivas e antiinflamatórias.

## **1.2 Cromatografia Contracorrente (CCC)**

O surgimento da técnica de cromatografia contracorrente (CCC) pode ser datado a partir de 1934, quando Cornish e colaboradores delinearão o primeiro protótipo com uma coluna locular de CCC voltada para a purificação de vitaminas solúveis em óleo. O ressurgimento de aparelhos de CCC mais aprimorados, quanto a sua eficiência e a multiplicidade de separações em diversos tipos de amostras e análises, foi desenvolvido por Yto e colaboradores em 1966, no Japão. Estes novos aparelhos chamados de

cromatografia contracorrente planetária consistiam, como ainda o é na atualidade, de bobinas revestidas por tubos de teflon enrolados em espiral como colunas (Conway, W.D. 1991).

A cromatografia contracorrente é uma técnica cromatográfica de partição líquido-líquido (CLL), operando com a ausência de um suporte sólido por adsorção da fase líquida estacionária na matriz porosa, como se observa comumente na cromatografia em coluna de gel de sílica (Conway, W. D. 1991).

Esta técnica cromatográfica de fração líquido-líquido formará duas fases imiscíveis, na qual a fase estacionária selecionada de um dos líquidos será retida no aparelho contracorrente, quando em funcionamento, pela força centrífuga, o que justifica o nome da técnica como cromatografia de fração líquido-líquido centrífuga (CPC), também conhecida pela sinonímia de cromatografia contracorrente centrífuga (CCCC). Existem aparelhos com mais de uma coluna que comportam volumes diferentes, e que podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto, aumentando-se assim o seu volume total (Conway, W. D. 1991).

Para tornar o aparelho com um mínimo de atrito interno, discos de metal como contrapesos do lado oposto ao da coluna e com a mesma distância desta até o eixo central, são colocados, podendo-se aí, tanto adicionar quanto retirar esses contrapesos, de acordo com o sistema de solventes utilizado. O aparelho estará balanceado quando houver um mínimo de vibração possível (Conway, W. D. 1991).

A CCC de fração planetária tem esse nome porque realiza dois movimentos giratórios semelhantes aos movimentos translacional e rotacional de um planeta, onde a coluna espiral gira em torno do seu próprio eixo ao mesmo tempo em que gira em torno do eixo central (Foucault, A. P., Chevolut, L. 1998).

Essa técnica rapidamente vem demonstrando ser uma ferramenta de trabalho imprescindível, como método de separação e purificação de substâncias, em suas aplicações tanto quantitativas como analíticas nos laboratórios de pesquisa. De modo que, o maior interesse desta técnica, em particular, está sendo o da separação de componentes bioativos tanto de extratos brutos de plantas (para as mais diversas classes de substâncias), incluindo aí o fracionamento de extratos lipofílicos e hidrofílicos, fermentação microbiana, bem como o de organismos marinhos (Hostettmann, K. *et al.* 1990).

A técnica de CCC apesar de ter sido o maior progresso em empreendimentos cromatográficos durante os últimos 30 anos, ainda necessita, em relação aos parâmetros envolvidos no comportamento cromatográfico, estudos que requerem maiores

esclarecimentos (Ito, Y. *et al.* 1999). Por causa da ausência de um suporte sólido, ambas as fases imiscíveis dos solventes são submetidas, quando introduzidas na coluna, a forte agitação e mistura por difusão molecular, exercida pela força centrífuga do movimento da bobina no aparelho de CPC. De modo que, o transporte axial do soluto na fase estacionária não pode ser ignorado, como fator de contribuição ao isolamento das substâncias no soluto. Apesar do comportamento cromatográfico ser influenciado, longitudinalmente, ao longo da coluna, pela forte mistura exercida nas fases estacionária e móvel em que a transferência de matéria (soluto) ocorre de uma fase a outra, sem intermitências, os fenômenos que envolvem a dispersão (longitudinal e axial) de matéria das fases devem ser, ambas, analisadas à parte (Kostanian, E. A. 2002).

A fração da fase estacionária ( $S_F$ ) retida na coluna correspondente à percentagem do volume da fase estacionária retida em uma coluna de CCC, em relação ao volume total que esta coluna venha a comportar, é um dos parâmetros mais importantes desta técnica. Sendo este, o ponto chave tido como escopo da eficiência de uma coluna, seguido pela capacidade de retenção do soluto bem como o isolamento de suas substâncias puras (Ito, Y. *et al.* 1999). Ainda que o valor de  $S_F$  mude com os parâmetros envolvidos em CCC como a velocidade de rotação da coluna, a velocidade de fluxo ( $F_c$ ) da fase móvel sobre a fase estacionária, o volume e a concentração da amostra, será o parâmetro  $F_c$ , dentre os citados, o que destacadamente irá influenciar o comportamento cromatográfico em contracorrente. Por conseguinte, os níveis de retenção da fase estacionária ( $S_F$ ) diante de uma dada velocidade de fluxo da fase móvel oferecem, de forma inequívoca, um prognóstico seguro da eficiência da aplicação do sistema de solventes empregado em CCC (Ito, Y. *et al.* 1999).

Apesar da técnica referir-se geralmente ao processo no qual uma das duas fases líquidas é mantida como fase estacionária, por meio de forças tanto gravitacionais quanto centrífugas, enquanto a outra flui longitudinalmente sobre a sua superfície na coluna, o termo *contracorrente* que induz a pensar que ambas as fases fluiriam numa coluna em uma mesma direção, porém, em sentidos opostos, só foi aplicado na aparelhagem de cromatografia centrífuga planetária de bobina com múltiplas camadas (MLCPC, abreviação em inglês) (Conway, W. D. 1991).

O avanço mais recente na técnica de cromatografia centrífuga é conhecida com o nome de “cromatografia contracorrente de alta velocidade” (HSCCC, abreviatura em inglês), onde a fase móvel é injetada no equipamento em alta velocidade rotacional,

enquanto a fase estacionária acaba sendo retida em uma coluna em espiral através de uma elevada velocidade rotacional, mantida apenas pela força centrífuga. Disto resulta que, o tempo de separação das substâncias numa dada amostra torna-se muito otimizado, fruto de uma fração eficiente (Hostettmann, K *et al.*1990). Dentre os aparelhos de bobina rotacional são encontrados os que exibem ou não movimento planetário em torno de seu eixo central. A técnica de HSCCC utiliza uma coluna em espiral de várias camadas que descreve um movimento planetário. O número de pratos teóricos desse tipo de cromatografia depende do tamanho da coluna (para HSCCC semi-preparativa: coluna de 130 metros com diâmetro interno de 1,6 mm. Velocidade: 0-1000 rpm; para HSCCC analítica: coluna de 50 m e diâmetro interno de 0,85 mm. Velocidade: 0-2000 rpm), da velocidade de fluxo de bombeamento, da quantidade de amostra e, principalmente, da escolha do sistema de solventes (Berthod, A. 2002)

As principais técnicas de cromatografia contracorrente em uso são: (1) cromatografia contracorrente de gotas (DCCC, abreviatura em inglês); (2) cromatografia contracorrente centrífuga de gota (CDCCC, abreviatura em inglês), também chamada de cromatografia contracorrente de fração centrífuga (CPC); (3) cromatografia contracorrente centrífuga planetária de bobina com múltiplas camadas (MLCPC, abreviatura em inglês); e (4) cromatografia contracorrente de rotação locular (RLCC, abreviatura em inglês) (Conway, W. D. 1991).

### **1.2.1 Vantagens da Técnica de Cromatografia Contracorrente (CCC)**

Os métodos de fração líquido-líquido em contracorrente possuem importantes e destacadas vantagens em relação aos procedimentos habituais de isolamento e purificação de produtos naturais, como, por exemplo, a cromatografia em coluna. Entre eles, destaca-se o isolamento de produtos polares (Hostettmann, K *et al.*1990). Entretanto, algumas limitações do uso do CCC devem ser mencionadas. Entre elas, a própria escolha do sistema de solventes pode ser um fator limitante no sucesso do isolamento das substâncias de um extrato vegetal.

As razões que conduzem à eficiência desta técnica cromatográfica seguem abaixo (Hostettmann, K *et al.*1990); (Conway, W. D. 1991):

- Não requerem suporte sólido como matriz adsorvedora, evitando assim a decomposição ou mesmo a adsorção irreversível de substâncias



polares na interface líquido/sólido, como ocorre em coluna de gel de sílica

- Há total recuperação da amostra (extrato bruto ou fração) injetada
- O tempo de separação pode ser otimizado, visto que a fase móvel pode ser injetada a velocidades elevadas no aparelho de CCC
- Não ocorre formação de emulsão
- Por não haver contato com o ar, a amostra não corre o risco de sofrer oxidação
- A técnica é compatível com substâncias com diversos pesos moleculares, indo desde íons de pequenas dimensões a macromoléculas, como proteínas
- O número empregado de sistemas de solventes bifásicos é, potencialmente, diversificado conforme a amostra empregada
- Sistemas de solventes não-aquosos podem ser utilizados para substâncias pouco polares, que podem sofrer decomposição em cromatografia de coluna em gel de sílica
- As colunas são feitas de teflon (PTFE, politetrafluoretileno) ou aço inox, materiais duráveis, não havendo de imediato a necessidade de substituição. Representando grande economia perante outras técnicas cromatográficas

### 1.2.2 Sistema de Solventes em CCC

A escolha correta do sistema de solventes na cromatografia contracorrente é de suma importância, como passo inicial para o sucesso da separação de substâncias (Marston, I. A., Hostettmann. 1990). A separação das diferentes substâncias (com polaridades distintas) que frequentemente compõem a amostra é determinada pelo coeficiente de fração ( $K$ ) do soluto, característica intrínseca deste, num dado sistema bifásico. Dessa forma a amostra estudada deve estar bem distribuída entre as duas fases imiscíveis do sistema de solventes bifásico, facilitando assim a separação das substâncias (Conway, D.W. 1990).

Ainda que muitos sistemas bifásicos já tenham sido descritos na literatura científica (Abbot P.T., Kleiman R, 1991), não há meios concretos para que em última instância, ao menos, *a priori*, seja selecionado um dado sistema de solventes em relação a outro sem

que seja factível de prévia experimentação. A não ser é claro, que a(s) substância(s) ou mesmo uma certa classe de substâncias a serem separados via CCC sejam muito similares ao da literatura, tendo aí seu sistema de solventes tomado como padrão. Caso contrário, haverá na certa a dificuldade inicial da escolha do sistema de solventes a ser vencida antes de sua aplicação no aparelho contracorrente (Abbot P.T., Kleiman R. 1991).

Procurando minimizar esta dificuldade inicial, listas de sistemas de solventes obtidos pela literatura científica, referente ao assunto, usados em CCC na separação de certas classes de substâncias ou mesmo de substâncias em específico, são, freqüentemente, agrupadas em substâncias que vão das menos polares as mais polares, referentes à fase superior ou móvel do sistema. Sem, no entanto, apresentarem uma dimensão exata da polaridade das fases dos sistemas empregados (Abbot P.T., Kleiman R. 1991), (Foucault, P. A., Dekker, M. 1999), (Marston, I. A., Hostettmann, K. 1990).

Como forma alternativa, o clássico sistema ternário de solventes clorofórmio: metanol: água, em que o metanol será o solvente miscível com o sistema bifásico (de solventes imiscíveis) clorofórmio: água, ou mesmo um sistema quaternário menos polar como n-hexano: acetato de etila: metanol: água podem ser escolhidos como ponto de partida nas análises cromatográficas preliminares. E as proporções de cada solvente no sistema, mudadas até que a distribuição aparentemente equivalente do soluto entre as duas fases seja obtida. O primeiro tipo de sistema citado acima, normalmente, produz uma retenção da fase estacionária na coluna podendo levar a resultados promissores. Este sistema acaba ainda fornecendo uma diferença de densidade considerável entre suas fases, pelo excessivo aumento da tensão interfacial entre elas. O clorofórmio, como terceiro solvente, faria interagir de modo mais eficiente o sistema imiscível. Tais sistemas são, conseqüentemente, empregados com certa freqüência no isolamento de produtos naturais na cromatografia centrífuga de fração (Marston, I. A., Hostettmann, K. 1990).

Outra alternativa, comumente empregada, porém, com um número mais restrito de sistema de solventes ternários, é aquela ao qual um sistema bifásico é formado por um solvente imiscível (água) em presença de outros dois solventes miscíveis (butanol e acetato de etila). O que melhor representa este sistema é a mistura ternária acetato de etila: butanol: água, para substâncias polares, aplicado tanto em sistemas isocráticos quanto com gradientes. Todas as substâncias polares mais solúveis em água do que em acetato de etila, e que sejam mais solúveis em butanol do que em água, podem ser isolados usando-se o BuOH, como gradiente (Foucault, A. P., Dekker, M. 1999).

A tabela 1 mostra apenas de forma ilustrativa algumas classes de substâncias de produtos naturais de espécies vegetais, que podem vir a ser isoladas pelas técnicas de cromatografia contracorrente (CCC).

**Tabela 1: Algumas classes de produtos naturais que podem ser isolados via CCC**

| <b>Classes de substâncias &amp; Aparelhos de CCC</b>                                    | <b>Sistemas de Eluentes</b>                               | <b>Proporções (%)</b> | <b>Referência</b>                             |
|---|---|-----------------------|---|
| <b>Flavonóides (HSCCC)</b>  | <b>CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O</b>           | <b>4: 3: 2</b>        | <b>Zhang <i>et al.</i>, 1998</b>              |
| <b>Flavonóides Glicosilados (HSCCC)</b>   | <b>CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O</b>           | <b>33: 40: 27</b>     | <b>Slacanin <i>et al.</i>, 1989</b>           |
| <b>Saponinas e Glicosilados: Iridóides, Xantonas, Flavonoides, Antraquinonas (DCCC)</b> | <b>EtOAc-H<sub>2</sub>O ® EtOAc-i-BuOH-H<sub>2</sub>O</b> | <b>Gradiente</b>      | <b>Vanhaelen &amp; Vanhaelen-Faster, 1988</b> |
| <b>Ester de Iridóides glicosilados (DCCC)</b>   | <b>CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O: n-PrOH</b>   | <b>9: 12: 8: 1</b>    | <b>Hostettman &amp; Marston, 1984</b>         |
| <b>Alcalóides (HSCCC)</b>   | <b>n-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O</b>                     | <b>4: 1: 5</b>        | <b>Hostettman &amp; Marston, 1984</b>         |
| <b>Alcalóides (DCCC)</b>  | <b>n-BuOH:Me<sub>2</sub>CO:H<sub>2</sub>O (HSCCC)</b>     | <b>8: 1: 10</b>       | <b>Quetin- Leclercq <i>et al.</i> 1988</b>    |
| <b>Taninos (HSCCC)</b>  | <b>CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O: n-BuOH</b>     | <b>10: 10: 6: 1</b>   | <b>Hostettman &amp; Arston 1984</b>           |
|   | <b>n-BuOH-0,1M NaCl</b>                                   | <b>1: 1</b>           | <b>Putman &amp; Butler, 1985</b>              |

### 1.3 Solos Ácidos: Alumínio (Al) e Flúor (F), e os Fitoterápicos

O alumínio (Al) é o metal em maior abundância (8%) presente na crosta terrestre. As maiores reservas de alumínio ocorrem na forma de gibbsita Al(OH)<sub>3</sub>, forma mais comum de hidróxido de alumínio nos solos, ou silicatos de alumínio, formas não fitotóxicas aos seres vivos (Zonta E, 2003). Já em solos ácidos (pH < 5), presentes em cerca de 40% na superfície terrestre, e 70% dos solos potencialmente cultiváveis do mundo, o Al se solubiliza na forma de um complexo com a água em sua espécie fitotóxica Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>+3</sup>, convencionalmente chamado Al<sup>3+</sup> (Zonta, E. 2003), (Wong, M.H *et al.* 2003).

Quanto ao aspecto da correlação planta/alumínio com a saúde humana, a relação entre solos ácidos e a concentração de metais nocivos à saúde, destacando aí o alumínio (Al) e mesmo o halogeneto flúor (F<sup>-</sup>), por formar complexos com o alumínio, deve ser aludido como um dado imprescindível ao estudo da utilização de fitoterápicos. Não tornando assim limitado, o estudo de uma planta medicinal somente quanto aos seus aspectos farmacológicos e fitoquímicos.

Especificamente, no Brasil, a toxidez por Al é também um problema intrínseco dos solos e representa 60% do território brasileiro cultivado ou com potencial para atividade agrícola, excetua-se destes, as áreas que podem ainda por uso inadequado, se tornarem ácidas e as áreas com problemas somente de deficiência de Ca e Mg. O montante de solos brasileiros que podem ser considerados ácidos pode alcançar valores de até 84% (Zonta E, 2003).

Quanto aos efeitos fisiológicos de alumínio de flúor na saúde humana, há indícios de haver uma estreita relação entre a doença neurogênica de Alzheimer (neste caso, apenas em pessoas com idade acima de 65 anos), e de fluorese ósseas e dentárias frente o uso prolongado de infusos de plantas contidas em solos ácidos. Tendo-se sempre em mente a relação dose/uso prolongada do chá (Wong, M.H *et al.* 2003). Tais morbidades acabam sendo corroboradas pelo consumo de água e de alimentos ao longo da vida, onde estes dois elementos químicos se encontram comumente presentes (Wong, M.H *et al.* 2003).

O alumínio além de interferir na divisão celular da raiz principal e das raízes laterais do vegetal, aumenta a rigidez da parede celular, reduz a replicação do DNA, altera as proteínas de transporte na membrana e desfavorece a atividade de muitas enzimas. Na parte aérea, os sintomas de toxidez do alumínio não são facilmente identificáveis. Nas folhas, estes se assemelham à deficiência de fósforo, retardando o crescimento global da planta, o que pode levar a ocorrência de folhas pequenas, escuras e com maturidade precoce, além do encurtamento dos talos (Taylor, J.G *et al.* 2000).

Em síntese, plantas afetadas por Al também apresentam sintomas de deficiência de nutrientes, tais como P, Ca, Mg, K e Mo, devido à interferência do Al nos processos de absorção, transporte e uso destes nutrientes. Particularmente, é na raiz que se verifica o principal sintoma de toxidez e maior sinal de danos, sendo que a inibição do crescimento longitudinal é utilizada para discriminar espécies e variedades tolerantes das demais. O engrossamento das raízes, tanto principais como laterais, também é um sintoma comum, porém menos discriminatório que a avaliação do comprimento. Além destes sintomas também pode haver falhas na ramificação das raízes, ou alterações nos padrões de ramificação (Zonta, E. 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda como padronização máxima de Al (alumínio) e F (flúor), respectivamente, na água potável (0,2 e 0,5) mg/l e de (5 e 1,3-2,0) mg/dia, na absorção diária destes elementos por adulto. Já que o Al acaba sendo excreta pelas fezes e pela urina, de modo que este metal não infira diretamente na saúde humana (Wong, M.H *et al.* 2003).

#### 1.4 Antioxidantes e Radicais Livres

No século XX, na década de 70, pesquisadores descobriram que os radicais livres são formados em organismos aeróbios em condições normais e patológicas. Esta descoberta abriu um vasto campo de estudo acerca das fontes e dos mecanismos de produção, além de estudos sobre os efeitos e, principalmente, sobre as formas de prevenção contra a ação dos radicais livres (Halliwell, B. 1989)

São vários os fatores que podem potencializar a produção dos radicais livres. Entre eles, a toxidez de herbicidas, antibióticos e poluentes do ar, os raios UV e raios-x, além do consumo de álcool e cigarro. Desde que os efeitos dos radicais livres no organismo começaram a ser conhecidos, muitos estudos foram desenvolvidos para encontrar maneiras de prevenir sua ação. Como forma de conter o efeito deletério dos radicais livres, eliminando-os, surgem os mecanismos não enzimáticos de defesa da célula pela presença de substâncias conhecidas como antioxidantes. Tais substâncias, como as vitaminas (em especial as vitaminas E e C) e a enzima glutadiona (GSH), por exemplo, retardam ou previnem a deterioração, dano ou destruição provocados pela oxidação celular (Halliwell, B. 1989).

A maioria dos radicais livre, por serem espécies químicas com um elétron desemparelhado, é constituída por estruturas extremamente reativas e instáveis. Para tornarem-se estáveis eles capturam elétrons de outra molécula, transformando-a em um outro radical. Este é o início de uma reação em cadeia que pode ser lesiva para várias estruturas celulares. Entre tais lesões, a do DNA, fruto do acúmulo de lesões genômicas não reparadas, o que pode aumentar a probabilidade do desenvolvimento de câncer. A senescência, pela degenerescência celular, pode estar relacionada a estes eventos (Halliwell, B. 1989).

De forma geral, os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio estão relacionados, como causa ou consequência, com todas as enfermidades degenerativas crônicas, o que abrange cerca de 95% das patologias observadas em pessoas acima de 35 anos (Halliwell, B. 1989). Após o conhecimento da etiologia bioquímica de radicais livres para as doenças degenerativas crônicas surgiram inúmeros estudos referentes ao uso de substâncias antioxidantes como forma de tratamento e até mesmo de prevenção dessas enfermidades (Halliwell, B. 1989).

Entretanto, os antioxidantes exógenos são eficazes para o tratamento de algumas, mas não todas as condições associadas com danos oxidativos *"in vivo"*. Isso faz que a procura por novas substâncias candidatas a drogas úteis para o tratamento de tais doenças seja necessário (Halliwell, B. 1989). Com a introdução do extrato de *Ginkgo biloba* na terapêutica ortomolecular, o interesse pela busca de novos extratos de plantas e mesmo de suas substâncias isoladas com atividade antioxidante tornou-se grande (Gold, E.P *et al.* 2003).

Os mecanismos mais conhecidos de produção de radicais livres envolvem: a enzima xantina desidrogenase/oxidase, presente no endotélio de capilares da maioria dos tecidos celulares; a enzima NADPH citocromo P-450 redutase, presente principalmente na membrana do retículo endoplasmático de hepatócitos e cadeias de transporte de elétrons, presentes na membrana mitocondrial. Acredita-se que este último mecanismo seja o responsável pela produção da maior parte dos radicais livres no organismo (Gordon, M. H. 1996), (Halliwell, B. 1989).

A degradação de carboidratos, lipídios e proteínas que ingerimos processa-se através de oxidação, sendo seus elétrons recebidos por coenzimas. A etapa final do processo é feita na mitocôndria pela cadeia de transportes de elétrons, que os transfere das coenzimas para o oxigênio, com concomitante síntese de ATP a partir de ADP e Pi (fosfato inorgânico) (Gordon, M. H. 1996), (Halliwell, B. 1989). Nesta reação, cerca de 95% do oxigênio que consumimos são convertidos à água. Se em algum passo da cadeia de transporte de elétrons ocorrer o “vazamento” de elétrons, estes podem ser capturados por moléculas de oxigênio circulantes. Quando o oxigênio receber um elétron a mais, este, se transforma no ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), um poderoso radical livre. E se o ânion superóxido for reduzido por mais um elétron, ocorre a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A captação de um elétron adicional rompe a molécula de  $H_2O_2$ , produzindo ânion hidroxila ( $OH^-$ , pouco reativo) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ , uma das espécies de radicais mais reativas) (Gordon, M. H. 1996), (Halliwell, B. 1989).

Os elétrons que podem ser adicionados ao peróxido de hidrogênio promovendo a formação do radical hidroxila, provêm tanto da captura de elétrons que escapam da cadeia de transporte de elétrons, bem como dos íons  $Fe^{2+}$  e  $Cu^+$ , principais fontes de elétrons para a formação do radical hidroxila. Este radical, assim como outros radicais, tais como o peroxila ( $ROO^{\cdot}$ , menos reativos e mais seletivos em suas reações) e o alcoxila ( $RO^{\cdot}$ , na ordem de 2 a 3 vezes menos reativos que os radicais hidroxila, e, conseqüentemente, mais

seletivos que este) atacam os componentes lipídicos das membranas, provocando a formação de lipoperóxidos (Gordon, M. H. 1996).

As propriedades da membrana, especialmente a permeabilidade e a capacidade de transporte ficam alteradas. A alteração do lisossoma, organela membranosa que contém diversos tipos de enzimas hidrolíticas coadjuvantes da digestão intracelular, leva à liberação de suas enzimas que podem destruir a célula (Gordon, M, H. 1996), (Halliwell, B.1989).

## 1.5 Bactérias e Atividade Antimicrobiana

Imediatamente após a descoberta das sulfonamidas e da penicilina, diversos organismos patogênicos foram imediatamente testados, de forma empírica nos pacientes, frente à suscetibilidade destas drogas. O método clássico usado pelos microbiologistas ao testarem os agentes antimicrobianos, *in vitro*, foi a diluição de culturas bacterianas em tubos de ensaio, fornecendo um resultado quantitativo do agente empregado, necessário à inibição do crescimento de um dado microorganismo em específico (Ellen, B. *et al.* 1990).

Os organismos que geralmente são encontrados em feridas infeccionadas e abscessos são as bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, Streptococci microaeróbicos, bacilos gram-negativos, micróbios aeróbicos como as *Pseudomonas sp (Pseudomonas aeruginosa)* e bactérias anaeróbicas. *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa* são organismos que também estão envolvidos em lesões sistêmicas com lesões cutâneas.

Bactérias do tipo *Streptococcus* estão entre os agentes etiológicos de faringites, celulites, febre escarlatina, erisipelas, piodermites, febre puerperal entre outras infecções purulentas. Dentre tais infecções, *S. pyogenes* pode ser o único patógeno atuante, como também estar agindo em conjunto com outras bactérias, particularmente, *S. aureus*, no impetigo (uma forma de pioderma). Em termos de morbidade e mortalidade em humanos, em todo o mundo, o papel patológico de *S. pyogenes*, principalmente em crianças, está na ocorrência de febre reumática aguda e pos-streptococcal glomerulonefritis (tipo de febre renal que pode ser letal). Certos microorganismos, como as bactérias, são considerados como os agentes etiológicos de muitas doenças como as do trato respiratório, por exemplo, responsáveis por fatores de virulência expressos pelo hospedeiro (Ellen, B. *et al.* 1990).

Aproximadamente dois terços de infecções em nosocômios envolve um único patógeno, enquanto que em torno de 20 % destas infecções abrangem uma gama de

múltiplos patógenos. Aproximadamente 85% das infecções hospitalares possuem sua origem em patógenos ocasionados por bactérias aeróbicas e 7% por fungos. As bactérias patogênicas que mais frequentemente causam infecções hospitalares podendo levar a óbito seus pacientes, são representadas pela *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa* (Fig.1) e (Fig.2). O que as torna ainda mais perigosas é o fato de serem, juntamente com tantos outros inúmeros patógenos, resistentes a exposição de muitos agentes antimicrobianos, como os antibióticos.

Em certos casos, um agente antimicrobiano que demonstra uma fraca atividade *in vitro* contra um organismo patogênico é usado em pacientes com bons resultados; o efeito oposto pode, obviamente, ocorrer. Isto, por causa dos fatores de respostas imunológicas intrínsecas, que estão envolvidas no hospedeiro, como uma resposta a sua infecção frente ao agente antimicrobiano, como um antibiótico, por exemplo, que pode ou não atuar de forma eficiente no hospedeiro.

O termo antibiótico é definido como sendo um processo químico efetuado por um microorganismo que inibe o crescimento de outros organismos. Certos agentes antimicrobianos possuem atividade bactericida, causando danos irreversíveis na bactéria. Outros agentes, entretanto, são conhecidos como bacteriostáticos, inibindo o crescimento, mas não a morte da bactéria. Em alguns casos, certas drogas que são em primeiro momento bacteriostáticas podem ser bactericidas contra tipos específicos de organismos. Quando um agente apresenta propriedades bactericidas *in vitro* com uma concentração mínima bactericida (CMB), também conhecida como concentração mínima letal (CML), tal resultado torna-se mais promissor do que resultados que espelhem a concentração mínima inibitória CMI (MIC, sigla internacional em inglês) deste agente. Visto que o MIC requer uma quantidade bem maior do agente antimicrobiano para matar a bactéria do que meramente inibir seu crescimento, oferecendo assim tolerância ao agente antimicrobiano. Os MICs e MBCs de um agente antimicrobiano podem ser determinados para qualquer micróbio passível de crescimento em um meio líquido (Ellen, B *et al* 1990).

Os métodos empregados para tal procedimento são os de difusão de bactérias em disco de hidrogel agár-ágar de Mueller-Hinton e o de diluição de caldos de meio de cultura bacteriana pelo método de padronização de Mcfarland.





**Figura 1: Úlcera sacral causada por contaminação hospitalar via *S.aureus*, *P.aeruginosa*, e *S.pyogenes* (Ellen, B et al. 1990)**



**Figura 2: Erisipela causada por *S.pyogenes* (Ellen, B et al. 1990)**

Enterobacteriaceae, *Aeromonas*, *Acinetobactérias*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, Enterococci, nonenterococcal streptococci e *Listeria monocytogenes* podem ser, inicialmente, testadas na presença de agentes antimicrobianos pelos métodos anteriormente citados.

O protocolo completo para a realização desses métodos é encontrado em publicações no Comitê Nacional de Padrões de Laboratórios Clínicos (NCCLS), M7- A2 (Ellen, B et al. 1990).

## **1.6 A Inflamação**

A inflamação representa um processo fisiopatológico fundamental para eliminar estímulos lesivos ao organismo *in vivo*. Uma característica marcante desse processo é o seu caráter padronizado, ou seja, independente da natureza do estímulo causador da lesão (físico, químico ou biológico). Observa-se inicialmente, dilatação e engurgitamento dos vasos da área afetada, principalmente capilares e arteriolas, com aumento do fluxo sanguíneo. Esses fenômenos determinam o aparecimento de um eritema (rubor congestivo da pele, por via de regra temporária, que desaparece momentaneamente à pressão do dedo) localizado e aumento da temperatura na área. Numa etapa seguinte, ocorre extravassamento de plasma e proteínas plasmática para o tecido intersticial com desenvolvimento de edema (de forma geral, acúmulo anormal de líquido em espaço intersticial extracelular). Fenômenos subsequentes constituem migração leucocitária e atividade fagocitária por células competentes (Lapa, J.A et al. 2001)

Todas essas alterações descritas anteriormente são acompanhadas de dor na área afetada. Esse caráter estereotipado originou o conceito de mediação química da resposta inflamatória, segundo o qual as alterações fisiopatológicas desencadeadas pelo estímulo lesivo são a expressão das ações farmacológicas de substâncias endógenas liberadas, ou ativadas, no decorrer do processo. Dentre os mediadores identificados no processo inflamatório, encontram-se: aminas vasoativas (histamina), eicosanóides (metabólitos do ácido araquidônico- prostaglandinas e leucotrienos), fator ativador de plaquetas, citocinas (interleucinas), cininas plasmáticas (bradicinina), radicais livres, entre outros. É notório que um único sinal inflamatório pode ser produzido por um conjunto de mediadores agindo independente e sinergicamente, e que um mesmo mediador pode ser ativo em diferentes etapas da resposta inflamatória. As ações dos mediadores inflamatórios são essencialmente locais (Lapa, J.A *et al.* 2001).

Vários modelos *in vivo* são utilizados na pesquisa de substâncias com atividade analgésica/antiinflamatória. Em geral, a estereotipia da gênese dos sinais e sintomas da inflamação serve de base para o ensaio dessas substâncias. Dentre os parâmetros normalmente avaliados estão edema, alteração de permeabilidade vascular, migração leucocitária, febre e dor. Essas técnicas de avaliação são gerais e independem da substância a ser testada. Apesar de, na maioria das vezes, não se chegar a um mecanismo de ação definitivo da substância ou extrato da planta testado, esses modelos experimentais são de grande importância e representam o ponto de partida para a caracterização farmacológica de novas substâncias capazes de interferir com o curso inflamatório (Lapa, J.A *et al.* 2001).

## **1.7 Aspectos Gerais das Espécies Estudadas**

### **1.7.1 A Família Lauraceae**

A família Lauraceae, representada por árvores e arbustos, exceção feita ao gênero *Cassytha*, um parasita herbáceo, é formada por aproximadamente 50 gêneros com 2.500 - 3.000 espécies. Apresenta-se amplamente distribuída através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, o que a torna evidenciada nos trópicos Americanos e Asiáticos, possuindo ainda um número considerável de espécies na Austrália e na ilha de Madagascar, embora o continente Africano seja parcamente representado por esta família (Werff, H. Van der., Richter, H.G. 1996).

As Lauraceae são consideradas uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta. Tal fato se deve às suas características morfológicas e anatômicas que as aproxima de outras famílias como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae. Em geral, a maioria das espécies dessa família, são também chamadas pela sinonímia de “canela” (Marques, C. A. 2001). Os primeiros registros relativos à utilização das espécies desta família são originários da Grécia antiga, datando de 2.800 a.C. Isso influenciou o nome de muitos gêneros que fazem uma alusão àquela época. *Laurus* L., por exemplo, vem do celta “lauer” que significa verde ou ainda “laus” que significa louvor e o gênero *Phoebe*, tem o seu nome relacionado ao deus Apolo. Outras espécies utilizadas desde a Grécia antiga são as pertencentes ao gênero *Cinnamomum* Schaeffer, que significa “caneleira” em grego (Marques, C. A. 2001). Apesar de sua destacada importância econômica, além da medicinal, em relação a outras famílias, as Lauraceae são a respeito de sua classificação e número de espécies, pouco conhecidas (Marques, C. A. 2001).

Quanto ao tipo de inflorescência as Lauraceae são classificadas em três tribos distintas. A primeira tribo apresenta como característica uma inflorescência racemosa, em que suas flores no ramo parecem um cacho de uva. Cada flor apresenta uma pequena bráctea que se acha inserida junto à haste que sustenta a flor (pedicelo). As brácteas sejam elas dispostas de maneira oposta em forma de cruz, decussadas, ou alternadas, acabam exercendo um papel de proteção a inflorescência. Como exemplo a esta tribo podemos citar os gêneros *Litsea*, *Lindera*, *Laurus* e *Sassafrás* (Werff, H. Van der., Richter, H.G. 1996).

A segunda tribo, conhecida como Perseeae Nees (Fig.3), apresenta um tipo de inflorescência (paniculado-cimoso) na forma de um cacho substância, no qual os ramos vão decrescendo da base para o ápice, razão por que assume forma aproximadamente piramidal. Sua inflorescência é definida, cujo eixo tem crescimento limitado e termina por uma flor, sucedendo o mesmo aos eixos secundários, que partem do principal, assumindo um aspecto que lembra como ornato, capacetes e elmos. As flores laterais do cimo são estritamente opostas. O gênero que mais figura nesta tribo pertence ao neotropical, entre eles, pode-se citar o *Ocotea*, *Nectandra*, *Aniba*, *Licaria*, *Pleurothyrium*; e alguns do gênero neotropical/asiático como *Persea*, *Cinnamomum*, *Phoebe*, e *Dehaasia* (Werff, H. Van der., Richter, H.G. 1996).



Figura 3: Inflorescência da tribo Perseeae Nees (Werff, H. V., Richter, H.G. 1996).

A terceira tribo, conhecida como *Cryptocaryeae* Nees, é formada por uma inflorescência mais ou menos paniculado-cimosa. Justo porque em uma primeira análise, poder-se-ia dizer que sua inflorescência em muito se assemelha a segunda tribo já citada. O que as diferencia é que esta última não apresenta, a rigor, em sua inflorescência, aspecto cimoso. As flores laterais do “cimo” não são totalmente opostas, e as flores podem ainda surgir, individualmente, ao longo do eixo da haste da inflorescência.

As folhas da inflorescência (bráctea), quase sempre se apresentam de forma modificada, de dimensões reduzidas e coloração viva, embora também as haja verdes. A localização das brácteas, nesta tribo, ao longo dos pedicelos é variável. De modo que, às vezes, pode surgir apenas uma bráctea, bem como duas delas alternadas ou mesmo opostas uma a outra: entretanto, observações mais acuradas são necessárias. Fazem parte desta tribo, o gênero *Beilschmiedia*, *Cryptocarya*, *Endiandra*, *Potomeia*, e *Triadodaphne* (Werff, H. Van der., Richter, H.G. 1996).

### 1.7.1.1 Importância Medicinal da Família Lauraceae

Na medicina popular, as Lauraceae apresentam utilização variada, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças (Marques, C. A. 2001). Algumas espécies amazônicas pertencentes aos gêneros *Nectandra* Rol. ex Rottb., *Licaria* Aubl. e *Aniba* Aubl, revelam a presença de substâncias químicas denominados neolignanas. Segundo Gottlieb e colaboradores, a atividade citotóxica (antitumoral) dos extratos destas espécies se deve à presença das neolignanas (Gottlieb, R.O et al 1978).

A espécie *Nectandra rodiaei* Schomb, da flora brasileira, possui ação antipirética e tônica, utilizada pela ciência popular através de tintura, extrato aquoso, vinho ou elixir. *Nectandra pichurim* (H.B.K) Mez, espécie que se encontra distribuída desde o México até a região Centro-Oeste do Brasil, é usada contra cólicas e disfunções gástricas. Na Farmacopéia Brasileira, encontram-se ainda as espécies *Cinnamomun zeylanicum* e *C. cássia*, usadas contra resfriados. Sendo que a casca, destas espécies, são consideradas abortivas, o que restringem seus usos (Marques, C. A. 2001).

O gênero *Ocotea* apresenta o maior número de espécies medicinais desta família. Os frutos de *Cryptocaria moschata* Nees et Mart, popularmente conhecida como “nóz-moscada”, são utilizados na contenção das disfunções/dores estomacais (Marques, C. A. 2001). As folhas de *O. aciphylla* (Nees) Mez são utilizadas como tônico e estomáquico, enquanto a casca é usada como anti-reumática e depurativa do sangue. Estudos etnobotânicos mencionam o uso desta espécie por índios do Xingu no Estado do Mato Grosso, onde a folha, por apresentar propriedades narcóticas, é utilizada para enrolar o *cigarro* do xamã em suas metodologias de cura, conforme a cultura da Nação Indígena que a utiliza (Emmerich. M., Senna,L.M. 1985).

A espécie *O. spectabilis* (Meissn.) Mez, é considerada um tônico devido à característica adstringente tanto da casca quanto da raiz. A casca e as folhas de *O. pulchella* Mart. são consideradas estomáquicas, emenagogas e tônicas do útero; já a casca de *O. teleiandra* (Meissn.) Mez, é usada contra “dores no peito” e as folhas, usadas como sudoríferas. *O. indecora* Schott. É utilizada como sudorífera, anti-reumática e até antisifilítica, devido as propriedades do óleo essencial obtido da casca que é geralmente extraído do caule ou da raiz. *O. guianensis* Aubl, espécie típica da Amazônia, é empregada pela população local contra abscessos. *O. cymbarum* e *Licaria puchury-major* Kosterm, possuem atividade antiinfeciosa comprovada contra o desenvolvimento em humanos de parasitas ancilostomídeo, da família dos helmintos (Marques, C. A. 2001).

O gênero *Aniba*, também merece destaque na família Lauraceae. A espécie *A. riparia* (Nees) Mez, por exemplo, típica da região amazônica, possui atividade antibiótica comprovada contra *Cândida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiela pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. As espécies de *A. canellita* (H.B.K) Mez, *A. duckei* Kosterm e *A. hastmanniana* (Nees) Mez, também possuem atividade bloqueadora no desenvolvimento do ancilostomídeo humano, devido a ação do óleo essencial que é extraído do lenho e da casca (Marques, C. A. 2001).

A espécie *Persea cordata* (Vell.) Mez é uma espécie da flora catarinense cuja atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* foi comprovada devido à ação antibacteriana do extrato obtido com acetato de etila, o que ratifica o seu uso popular no tratamento de feridas cutâneas (Marques, C. A. 2001).

Estas seriam apenas algumas, dentre a gama de espécies medicinais da Família Lauraceae, retentoras de inúmeras propriedades fitoterápicas, que foram aqui reportadas apenas como uma alusão medicinal a esta importante Família.

### 1.7.1.2 Principais Classes de substâncias

Segundo um trabalho de revisão quimiossistemática de Gottlieb e colaboradores, a família Lauraceae apresenta um perfil químico ainda incompleto pelos poucos trabalhos fitoquímicos existentes nesta família. De modo geral, é composta por alcalóides benzilisoquinolínicos, arilpropanóides, lignanas, neolignanas, nitroderivados, ésteres derivados de ácido benzóico, pironas, flavonóides, benzofenonas, ácidos graxos, alcenos e alcinos de cadeia longa, monoterpenos e sesquiterpenos (Gottlieb, R. O *et al.* 1972). As espécies da família Lauraceae produzem, preferencialmente, substâncias da via metabólica do ácido chiquímico (Gottlieb, R. O *et al.* 1972).

### 1.7.2 *Pleurothyrium bahiense* (Meissner) Barroso

A família Lauraceae, como já mencionado, a respeito de sua classificação e número de espécies, ainda é pouco conhecida ou incompleta. Dentre estas espécies, encontra-se o gênero *Pleurothyrium*. Dados mais recentes referem-se a uma classificação e devida identificação de 40 espécies, das quais 19 foram descritas como sendo novas no gênero das Lauraceae neotropicais (Werff, K. Van der. 1993).

Espécies como *P. bahiense* (Meissner) Barroso = *Urbanodendron bahiense* (Meissner) (Figura 7, pág. 25), Rohwer; *P. chrysothyrsus* Meissner = *Rhodostemonodaphne* e *P. cowanianum* C. K Allen = *Rhodostemonodaphne kunthiana* (Ness) Rohwer; *P. ferrugineum* Meissner = *Ocotea arnottiana* (Ness) van der Werff, *P. glandulosum* (Lundell) Lundell = *Nectandra* e *P. velutinum* Meissner = *Ocotea calophylla* Mez, não apresentam descrição botânica, segundo a literatura consultada, por estarem seus dados (esterilidade e frutos) ainda incompletos.

O gênero *Pleurothyrium* é composto, geralmente, por árvores que variam de 5 a 35 metros em altura, sendo encontradas numa extensão territorial que vai da Guatemala a Bolívia, bem como a região do Brasil meridional, exceção feita aos países de El Salvador e as Guianas. O gênero é mais bem representado em países como o Peru, Equador, Colômbia e Brasil sendo que suas espécies são, freqüentemente, encontradas em baixas elevações.

Há muito pouca informação das espécies deste gênero quanto ao uso econômico. Na região do Peru central, a madeira, tida como de boa qualidade, é usada como artefato na construção civil. Já na Colômbia, a madeira de muitas destas espécies, é usada na construção de embarcações como canoas, por exemplo. Mas, por serem as espécies deste gênero pouco comuns dificultado assim sua localização, e por apresentarem em sua maioria portes de médio a baixo, em altura, são sob o ponto de vista econômico pouco importantes.

No Brasil, as espécies de *Pleurothyrium*, com exceção de *P. amplifolium*, são comumente encontradas acima da bacia amazônica, onde somente uma ou duas espécies forma localizadas nas proximidades do centro de Manaus. Essas espécies, em sua maioria, são conhecidas por se encontrem na região mais baixa e úmida das florestas ou nas proximidades do sopé de montanhas, como nos Andes, apesar de ser ainda pobre o conhecimento do habitat deste gênero (Werff, K. Van der. 1993).

### **1.7.3 A Família Verbenaceae**

A família Verbenaceae é composta por plantas herbáceas, arbustivas ou arvoretas pequenas, de folhas interirias, de disposição alterna ou oposta. As flores, geralmente pequenas, estão reunidas em densas inflorescências vistosas (Dias-Filho, M.B. 1994).

Segundo Cronquist, a família comporta em torno de 2600 espécies reunidas em 100 gêneros com distribuição pantropical, com rara ocorrência em regiões temperadas. Já para Moldenke, a família apresenta cerca de 3435 espécies, reunidas em 76 gêneros (Futuro, D. 1997). Sendo o maior gênero o *Clerodendron*, em torno de 400 espécies, seguido por *Verbena* e *Vitex* com 250 espécies, *Lippia* e *Premna* com 200 e *Lantana* com 150 espécies. Segundo Barroso, na flora brasileira, estão presentes 22 gêneros e aproximadamente 296 espécies (Futuro, D. 1997).

### 1.7.3.1 Importância Medicinal das Verbenaceae

Segundo Menezes, a família Verbenaceae apresenta um interesse popular voltado para doenças do trato gastrointestinal (27%), inflamatórias (15%), dermatológicas (11%), neurológicas (9%), do trato genito-urinário (9%), virais (8%) e antiofídico (7%) (Menezes, F.S. 1994).

A família Verbenaceae engloba espécies aromáticas, importantes produtoras de óleos essenciais. Dentre suas espécies oleíferas destaca-se *Verbena officinalis* L., amplamente usada como sedativa, analgésica, anti-reumática e febrífuga. O uso desta espécie reporta a épocas remotas, quando os gregos usavam-na como panacéia aos diversos males do corpo. Já as espécies do gênero *Lantana*, por serem muito aromáticas e melíferas, acabaram sendo muito requisitadas em infusões e xaropes no combate a bronquites, afecções catarrais e asma (Futuro, D. 1997).

### 1.7.3.2 Principais Classes de Substâncias

A família verbenácea é caracterizada por apresentar substâncias que vão de monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, esteróides, flavonóides, quinonas, arilpropanóides glicosilados, lignanas, neolignanas, estilbenos, pseudoalcalóides, secoiridóides glicosilados, iridóides a iridóides glicosilados. As espécies desta família possuem suas substâncias produzidas, preferencialmente, pela via metabólica do ácido acético (Menezes, F.S. 1994), (Junior, P. 1990).

### 1.7.4 *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.

Em língua vernácula *S. cayennensis* (Rich.) Vahl. (Figuras 1, 2 e 3) é conhecida como: gervão-azul, gervão-roxo, rincão, rinchão, gervão, vassourinha-de-botão, gervão-do-campo, gervão-legítimo, erva-gervão, aguarapondá, mocotó, verbena-falsa, chá-do-brasil, ervão, orgibão, uregão, urgevão, verbena e aguarapondá (Lorenzi, H., Matos, A. J. F. 2002), (Corrêa, P. 1984).

Tendo como sinóníma: *Abena cayennensis* (Rich.) Hitchc., *Lippia cylindrica* Scheele, *Stachytarpheta australis* Moldenke, *Verbena cajannensis* Rich., *Verbena dichotoma* Ruiz & Pav., *S. hirta* Kunth, *S. dichotoma* (Ruiz & Pav.) Vahl., *S. umbrosa*



Kunth., *S. veronicaefolia* Cham., *Valerianoides cayennensis* (Rich.) Kuntze (Lorenzi, H., Matos, A J.F. 2002), (Johns, A E., Hammer, M. L.A. 1993).

*S. cayennensis* (Rich.) Vahl é um subarbusto anual ou perene, ereto, muito ramificado, de 70-100 cm de altura, com inflorescências terminais espigadas, com poucas flores de cor azul. Os ramos mais jovens podem possuir uma coloração arroxeadada, pigmentação que pode se estender, aos pecíolos. As folhas são de formato elíptico ou abovado. As flores estão reunidas em espigas terminais, possuindo de 10 a 40 cm de comprimento, glabras ou com poucos pêlos. O fruto é seco, do tipo biauquênio (Lorenzi, H., Matos, A J.F. 2002), (Dias-Filho, M.B. 1994).

É nativa do Brasil, onde cresce em beira de matas e em áreas sob distúrbio, sendo considerada como “planta daninha” quando cresce onde não é desejada. Ocorrem no Brasil outras espécies deste gênero com propriedades e usos medicinais semelhantes. As mais usadas são *S. jamaicensis* Vahl e *S. elatior* Schrad (Lorenzi, H., Matos, A J.F. 2002), (Futuro, D. 1997).

É uma planta amplamente utilizada pela medicina tradicional brasileira na forma de infusos, como tônico estomacal e estimulante das funções gastrintestinais, contra febres, dispepsia, como diurético e emoliente, para problemas hepáticos crônicos, incluindo a hepatite e, para promover a transpiração. Possui uma longa história de uso como anti-helmíntico, sendo esta propriedade, documentada pela primeira vez em 1898 (Lorenzi, H., Matos, A J. F. 2002).

Em uso externo, as partes aéreas (folhas e flores), são indicadas pelos índios raizeiros da Nação Indígena Kurã Bakairí do Xingu, Estado do Mato Grosso, na forma de cataplasma contra feridas, contusões e afecções da pele (eczema e erisipela) (De Souza, P.A. 1998). As raízes são usadas na medicina popular como cicatrizante e como atenuantes de dores reumáticas (Corrêa, P. 1984). A tabela 2 indica ainda seu uso de forma mais abrangente (Johns, A E. 1993).

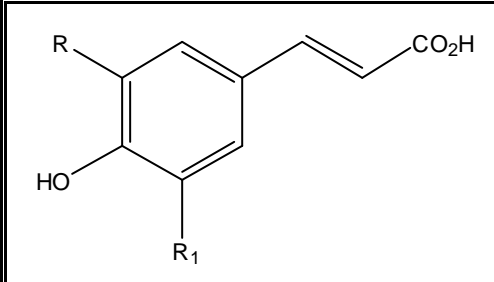
Tabela 2: Uso Etnomedicinal de de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl.

| Uso               | Formas de Uso | Partes da Planta | Preparo      | País     |
|-------------------|---------------|------------------|--------------|----------|
| Emenagoga         | Oral          | Toda planta      | Infusão      | Colômbia |
| Anti-inflamatória | Oral          | Toda planta seca | Decocção     | Brasil   |
| Analgésica        | Oral          | Desconhecido     | Decocção     | Brasil   |
| Emenagoga         | Oral          | Desconhecido     | Infusão      | Brasil   |
| Emenagoga         | Oral          | Toda planta seca | Infusão      | Colômbia |
| Laxativa          | Oral          | Folhas           | Inespecífico | Brasil   |
| Anti-hemorroidal  | Oral          | Folhas           | Inespecífico | Brasil   |
| Diurético         | Oral          | Desconhecido     | Desconhecido | Brasil   |

Segundo Henriques (Henriques, T.A *et al.* 1998), testes farmacológicos dos extratos etanólicos e nbutanólico das folhas secas do gervão, apresentaram resultados promissores quanto à atividade antiinflamatória e antinoinceptiva, não apresentando efeitos tóxicos agudos, *in vivo*, em altas doses, conforme procedimentos metodológicos prescritos pelos padrões da Farmacopéia Internacional. Lima-Landman e colaboradores, demonstraram após testes farmacológicos do extrato aquoso das partes aéreas do gervão-roxo, atividade antiácida/anti-ulceral pela inibição da secreção do suco gástrico, além de efeito laxativo (Lima-Landaman, R.T. M. *et al.* 1997).

Os arilpropanóides glicosilados, presentes na espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, derivam, biossinteticamente, da fenilalanina, e possuem anel aromático, ligado a uma cadeia lateral de três átomos de carbono (Dewick, M.P. 1997). Dessa classe de substâncias, as relacionadas ao ácido cinâmico, exceto os ácidos hidroxicinâmicos, de rara ocorrência, existem em, praticamente, todas as plantas superiores. Nas folhas de angiospermas a presença de ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico representam, respectivamente, 49%, 63%, 48% e 32% . A classe destas substâncias é indicada na tabela 3 (Toledo, J.B. 1991); (Dewick, M.P. 1997).

Tabela 3: Arilpropanóides

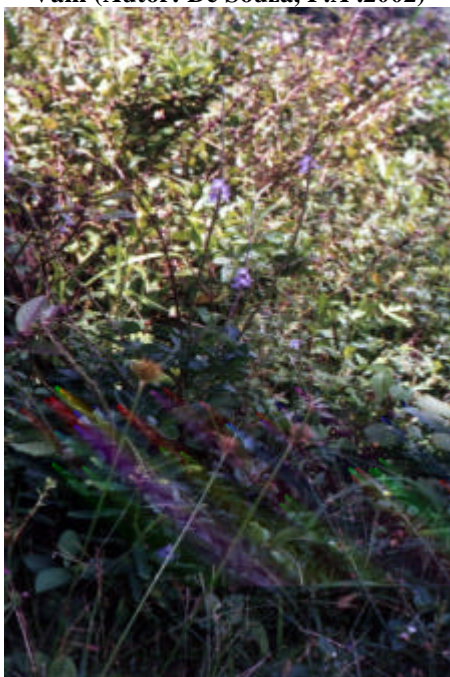
|  | Substâncias      | Estruturas                   |
|---|------------------|------------------------------|
|   | Ácido caféico    | 1 (R=OH; R <sub>1</sub> =H)  |
|   | Ácido p-cumárico | 2 (R=R <sub>1</sub> =H)      |
|   | Ácido ferúlico   | 3 (R=OMe; R <sub>1</sub> =H) |
|   | Ácido sinápico   | 4 (R=R <sub>1</sub> =OMe)    |



**Figura 4: Inflorescência *S. cayennensis* (Rich.) Vahl (Autor: De Souza, P.A .2002)**



**Figura 5: Flores e ramos *S. cayennensis* (Rich.) Vahl (Autor: De Souza, P.A .2002).**



**Figura 6: Hábito *S. cayennensis* (Rich.) Vahl (Autor: De Souza, P.A .2002).**



**Figura 7: Inflorescência *P. bahiense* (Mess.) Barroso (Autor: De Souza, P. A. 2004).**

## 2 OBJETIVOS

Esta Dissertação de Tese de Mestrado teve como objetivos:

- O estudo fitoquímico da fração metanólica das folhas da espécie *Pleurothyrium bahiense* (Meiss) Barroso.
- O estudo farmacológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico das folhas da espécie *Pleurothyrium bahiense* (Meiss) Barroso, procurando ampliar o parco conhecimento medicinal deste gênero na família Lauraceae.
- O estudo fitoquímico biodirigido (testes farmacológicos), com cromatografia contracorrente (CCC), do extrato etanólico das raízes da espécie *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., (Verbenaceae) de sua(s) substância(s) ativa(s) da(s) fração/frações mais preeminente(s).
- O aprendizado de técnicas cromatográficas de isolamento, purificação e de identificação de metabólitos especiais, como as técnicas modernas e comuns uni (1D) e bidimensionais (2D) de elucidação estrutural.

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Materiais e Métodos

#### 3.1.1 Equipamentos e Reagentes

As partes aéreas e raízes dos materiais estudados foram trituradas em moinho elétrico, dotado de duas facas em hélice com lâminas opostas e peneira de granulometria de 5 mm, (marca Vencedora - Máq. Agrícolas Ltda - MOD. V.611 N° 60482 série VF 1A02).

Utilizaram-se para a realização das extrações, partições, testes de atividade antioxidante e antimicrobiano, bem como os sistemas cromatográficos empregados, solventes do grau P. A (Merck, Grupo Químico e Vetec).

A eliminação dos solventes foi realizada em evaporador rotatório (marca BUCHI, modelo RP-2), equipado com banho de aquecimento, à pressão reduzida.

Nas separações cromatográficas em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 (Merck ou Vetec) com tamanho de partícula variando de 70 a 230 mesh (0,063-0,2 mm) como suporte. Para CCDA (cromatoplaça em camada delgada analítica) utilizou-se gel de sílica G e/ou H com espessura de 0,25 mm, e para CCDP gel de sílica GF<sub>254</sub> com espessura de 4,00 mm.

- Cromatoplaça em camada delgada preparativa (CCDP): foram suspensas em 130 ml de água destilada 0,5-1,2 gramas de amido, 3,0 gramas de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 3,0-4,0 gramas de gel de sílica. A suspensão foi então submetida a aquecimento em placa quente, brandamente agitada com bastão de vidro, espalhando-a logo em seguida de forma uniforme sobre a placa de vidro previamente colocada num molde de 4 mm de espessura, e previamente desengordurada com água, detergente e acetona comercial. Utilizou-se nesta última etapa, espalhador da marca Quieft.

Cromatoplaças gel de sílica 60 F<sub>254</sub> sobre alumínio (0,2 mm de espessura, Merck), foram igualmente usadas na análise cromatográfica em camada fina para ambas as espécies vegetais estudadas.

A revelação das placas, em primeiro momento, após a eluição das amostras em seus respectivos sistemas de solventes, foi realizada sob irradiação UV a 254 e 360 nm em

aparelho Model ENF-260 C SPECTROLINE 115 v - 60 Hz, Spectronics Corporation, sendo em seguida reveladas em uma cuba de vidro saturada com vapores de iodo.

A visualização das substâncias nas cromatoplasmas foi realizada, além da detecção via radiação ultravioleta, por reveladores químicos do tipo vanilina (revelador geral) e Folin-Ciocalteu (Merck Sharp-Dhome; revelador de substâncias fenólicas). Esta última, em presença de chapa de aquecimento.

- Vanilina – 3g Vanilina são solubilizadas em 135 ml H<sub>2</sub>O destilada e etanol, respectivamente. À solução, resfriada em banho de gelo, é adicionada, paulatinamente, em 30 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Folin-Ciocalteu – O reagente de Folin é solubilizado em H<sub>2</sub>O destilada na razão 1: 3. As placas cromatográficas são borrifadas, primeiramente, com solução aquosa Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, secas, para serem em seguida, borrifadas com o reagente de Folin.

Adotou-se como critério de pureza no isolamento de substâncias purificadas e pré-purificadas por cromatografia em coluna e em HSCCC, a obtenção de uma única mancha sobre placas de gel de sílica, variando-se por três vezes o sistema de eluentes, bem como através da nitidez do ponto de fusão.

Os pontos de fusão (p.f) foram determinados em bloco de Kofler com microscópio, e sem correção de valores.

A Cromatografia contracorrente (CCC) foi realizada em um aparelho Multilayer Coil Separator – Extractor (P.C.Inc., Potomac, MD, USA) – NPPN-UFRJ - equipado com uma bobina intercambiável com tubo PTFE (80 ml; 1,68mm d.i) e com uma bomba de fluxo contínuo Dynamax SD-200 (Rainin, Woburn, MA, USA) para a introdução do sistema de solventes no cromatógrafo. A amostra estudada, fração acetato de etila, extrato etanólico das raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, foi aplicada no sistema cromatográfico por meio de uma válvula de injeção equipada com um “loop” de 5 ml. As frações foram coletadas, após a cromatografia contracorrente, em tubos de vidros de 18 cm de comprimento, previamente arrumados e numerados em um coletor de frações automatizado da marca Dynamax FC-1.

As amostras, antes de serem injetadas no aparelho de cromatografia contracorrente foram previamente solubilizadas, em seus respectivos solventes, com a ajuda de ultra-som em aparelho Ultrasonic Cleaner (Thornton Unique Modelo: USC-1400). Os sistemas de solventes usados tanto na fase móvel quanto na fase estacionária, antes de serem injetados

no aparelho contracorrente foram submetidos ao mesmo aparelho de ultra-som, visando degaseificação dos mesmos. Os testes de atividade antioxidante dos extratos brutos, Frações e substâncias isoladas foram monitorados em aparelho de UV-visível a 518 nm em aparelho Model ENF-260 C SPECTROLINE 115 v - 60 Hz, Spectronics Corporation, da Central Analítica do NPPN-UFRJ.

As amostras de solos foram analisadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, no município de Seropédica-RJ. O método utilizado foi o preconizado pelo Manual de Métodos de Análise de Solo (Bloise, M.R *et al.* 1979).

Para os métodos de atividade antinociceptiva e antiinflamatória foram utilizados camundongos SW-55 (20-35 g), de criação própria do Departamento de Ciências Fisiológicas-UFRRJ.

A determinação estrutural das substâncias isoladas, foi realizada através dos métodos instrumentais espectroscópicos de ressonância magnética nuclear unidimensionais (1D) de hidrogênio (RMN<sup>1</sup> H e COSY H,H) e carbono (RMN <sup>13</sup>C, APT) e técnicas bidimensionais (2D) (HETCOR e HMQC). Os espectros uni (1D) e bidimensional (2D) foram obtidos, respectivamente, em espectrômetros: Varian-Gemini, operados a 200 MHz para o hidrogênio e 50 MHz para o carbono (NPPN-UFRJ); Jeol Eclipse modelo JNM-GX com os campos de 400 MHz para hidrogênio e 100 MHz para o carbono no Laboratório de Ciências Químicas – LCQUI- Setor de Química de Produtos Naturais - (UENF-RJ).

Todos os solventes (clorofórmio, metanol, piridina e DMSO) utilizados na solubilização das substâncias analisadas, eram deuterados utilizando o próprio solvente como referência interna. Os valores de deslocamento químico foram referidos em unidades adimensionais  $\delta$ , representados por partes por milhão (ppm) da frequência aplicada e as constantes de acoplamento (*J*) foram medidas em Hertz (Hz). As áreas relativas aos sinais de absorção foram obtidas por integração eletrônica.

### **3.1.2 Coleta e Moagem da Espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl**

A espécie foi coletada na região da comunidade do Canto dos Araçás, na vegetação ciliar da Lagoa da Conceição em Florianópolis-SC, entre 8 e 9 horas da manhã, por Pierre André De Souza e João Francisco De Souza, em abril de 2002. As folhas, flores, galhos, e raízes foram secos em local sombreado e arejado. Posteriormente, as partes aéreas e raízes foram separadas e trituradas em moinho elétrico, dotado de duas facas em hélice com

lâminas opostas e peneira de granulometria de 5 mm, (marca Vencedora - Máq. Agrícolas Ltda - MOD. V.611 N° 60482 série VF 1AO2).

Obtiveram-se como materiais vegetal seco e triturado 167, 8 gramas de raízes e 400 gramas de partes aéreas (folhas e ramos).

### **3.1.3 Identificação Botânica**

A espécie *S. cayennensis* (Rich) Vahl, foi identificada pela Prof<sup>a</sup> Inês M. Oliveira da Silva, do Departamento de Botânica da UFRRJ. Uma amostra do material, na forma de exsicata, foi depositada no Herbário da UFRRJ - RJ sob o número de registro RBR 5979.

### **3.1.4 Coleta e Moagem da Espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso**

A espécie em questão foi primeiramente coletada no topo da Serra do Camorim (Maciço da Pedra Branca) município do Rio de Janeiro, em fevereiro de 1997, pelo botânico Dr. Rogério Ribeiro de Oliveira, da Pontifca Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ).

Uma segunda coleta foi realizada no mesmo mês no ano de 2004, pelo autor e pelo Dr. Rogério Ribeiro de Oliveira, objetivando estudos farmacológicos.

As partes aéreas deste material (folhas e ramos) foram secas em local sombreado e arejado, sendo em seguida triturados em moinho elétrico. Obtiveram-se 1000 gramas das partes aéreas, secas e trituradas.

### **3.1.5 Identificação Botânica**

A espécie *Pleurothyrium bahiense* (Meiss) Barroso, foi identificada pelo botânico Dr. Rogério Ribeiro de Oliveira (número 2.168) e encontra-se depositada sob o número de registro 42314 no Herbário da FEEMA-GUA.

### **3.1.6 Coleta dos Solos**

Amostras de solo (10, 20 e 30 cm de profundidade) dos locais de coleta, das duas espécies estudadas foram armazenadas cada qual em sacos plásticos, logo após terem sido coletadas.



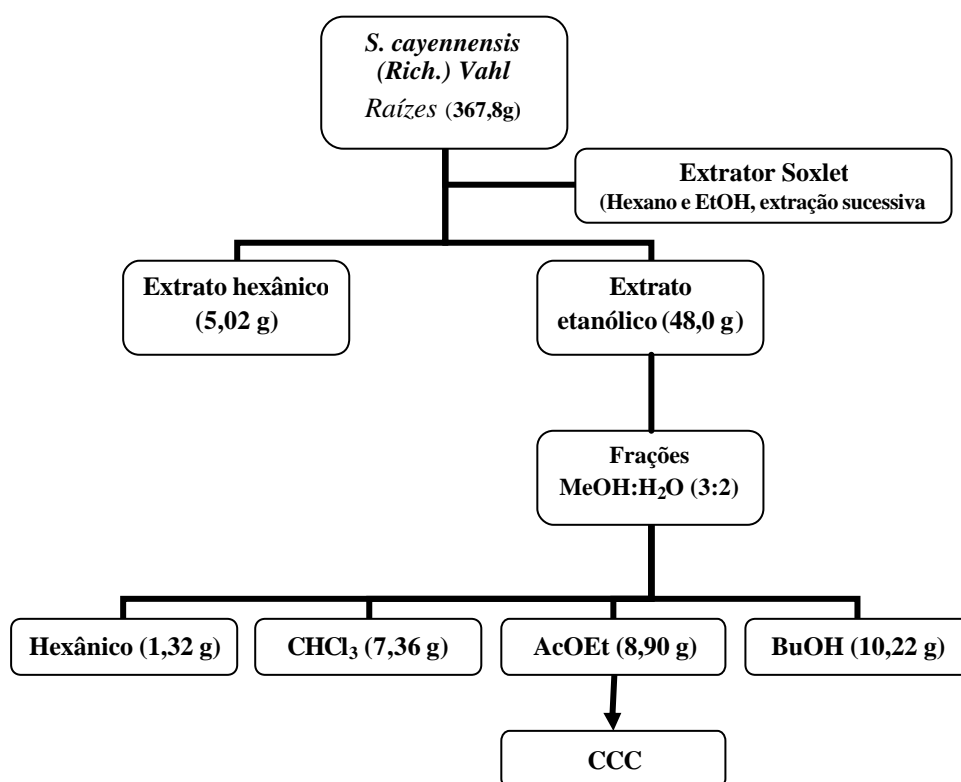
Foram escolhidos quatro pontos distintos e próximos de cada uma das espécies, circunscrevendo a dimensão de seus galhos ou ramos. Após a coleta, essas amostras foram colocadas à sombra, em local ventilado, para secagem e posterior análise.

As análises de fertilidade, pH e metais de seus respectivos solos, foram realizadas no Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia – CNPAB, na EMBRAPA, situado no município de Seropédica - RJ, nas proximidades do Campus da UFRRJ.

### 3.2 Obtenção dos Extratos

#### 3.2.1 *S. cayennensis* (Rich.) Vahl

As raízes moídas da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl (367,8 g) foram colocadas num aparelho de extração contínua do tipo Soxlet durante, aproximadamente, uma semana com hexano (3L), e em seguida metanol (3L). O extrato bruto hexânico rendeu 5,02g. O extrato MeOH (48,00g) foi ressuspensionado em MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2) e particionado com solventes de polaridade crescente. Obtiveram-se 4 frações: hexânica (1,32g), clorofórmica (7,36g), acetato de etila (8,90g) e butanólica (10,22g) (Esquema 1, pág 312).



Esquema 1: Metodologia utilizada para obtenção dos extratos e Frações de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl

### **3.2.2 *P. bahiense* (Meiss) Barroso**

O extrato metanólico das partes aéreas (folhas) da espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso, fornecido pronto para o autor, foi cedido por seu orientador principal (Prof. Dr. Anselmo A Morais).

As partes aéreas da segunda coleta da espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso, após serem pulverizadas, foram acondicionadas em recipientes de vidro âmbar, e suas substâncias extraídas com a mistura de solventes H<sub>2</sub>O: EtOH na razão 7:3. Obtiveram-se 74,0 gramas de material, após destilação dos solventes sob pressão reduzida.

#### **3.2.2.1 Isolamento e Purificação dos Constituintes Isolados do Extrato Metanólico das Folhas da Espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso**

O extrato metanólico de folhas de *P. bahiense* (Meiss) Barroso foi fracionado em coluna de cromatografia (60,0 cm de altura; 3,5 cm de diâmetro) de gel de sílica (140,0 g), usando-se como eluentes: clorofórmio:acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila: metanol e metanol.

As 101 frações recolhidas em erlenmeyer de 250 ml cada, após destilação dos solventes sob pressão reduzida a vácuo, foram analisadas por CCDA e reveladas por vapores de iodo e/ou pela solução de vanilina, e reunidas conforme a semelhança cromatográfica.

**Tabela 4: Fracionamento cromatográfico em coluna do extrato metanólico com seus respectivos sistemas de solventes**

| <b>Frações</b> | <b>Sistemas de Eluentes</b>   | <b>Proporções (%)</b> |
|----------------|-------------------------------|-----------------------|
| 1 - 3          | Clorofórmio: Acetato de etila | 80:20                 |
| 4 - 8          | Clorofórmio: Acetato de etila | 70:30                 |
| 9 - 14         | Clorofórmio: Acetato de etila | 50:50                 |
| 16 - 21        | Acetato de etila: Clorofórmio | 60:40                 |
| 22-27          | Acetato de etila: Clorofórmio | 70:30                 |
| 28 - 30        | Acetato de etila: Clorofórmio | 80:20                 |
| 31 - 37        | Acetato de etila: Clorofórmio | 90:10                 |
| 38-42          | Acetato de etila              | 100                   |
| 43-46          | Acetato de etila: Metanol     | 90:10                 |
| 47-48          | Acetato de etila: Metanol     | 85:15                 |
| 49 -55         | Acetato de etila: Metanol     | 70:30                 |
| 56 - 75        | Acetato de etila: Metanol     | 65:35                 |
| 76 - 80        | Acetato de etila: Metanol     | 40:60                 |
| 81-86          | Acetato de etila: Metanol     | 30:70                 |
| 87 -95         | Acetato de etila: Metanol     | 10:90                 |
| 96-101         | Metanol                       | 100                   |

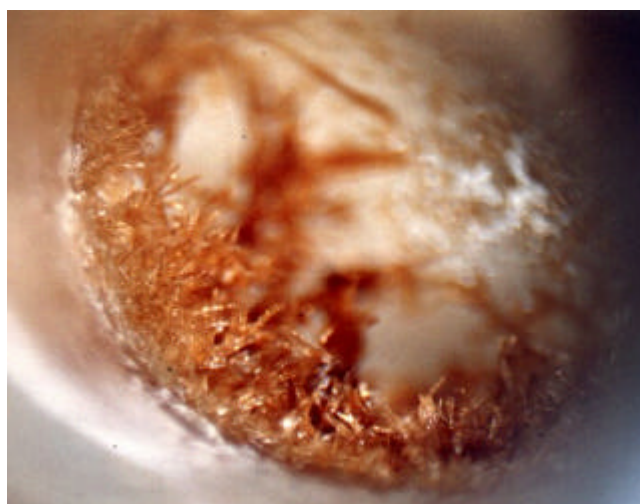
### **3.2.2.2 Análise das Frações do Fracionamento Cromatográfico do Extrato Metanólico de Folhas de *P. bahiense* (Meiss) Barroso**

Algumas das frações reunidas (Tabela 4) foram submetidas aos processos de purificação mais comumente utilizados, entre eles: CC (cromatografia em coluna), CDP (cromatografia em placa preparativa) de 2 e 4 mm e recristalização, fornecendo como substância majoritária um flavonóide glicosilado, um esteróide glicosilado e sais (não identificados).

#### **Fração 38-46 (200mg):**

Esta fração apresentou cristais aciculares, imersos em material de aspecto oleoso de coloração tendendo ao amarelo-escuro ( Figura 8). Tratamento com metanol a quente propiciou a parcial solubilização dos cristais, dificultando sua separação. Tentativas de purificação por recristalização em acetona, metanol ou mesmo a mistura de

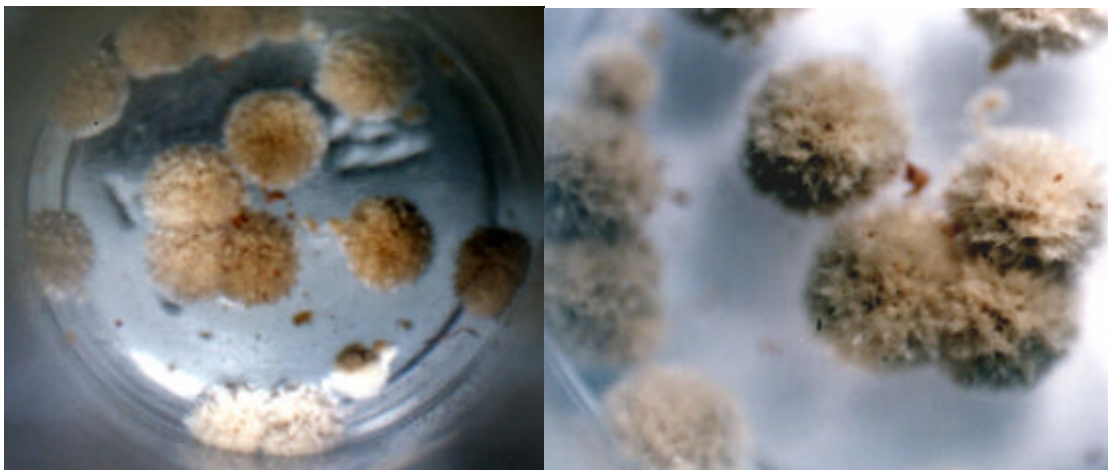
ambos não conduziram ao resultado esperado. Essa fração reunida foi então submetida a novo fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica, utilizando-se hexano, clorofórmio: hexano (8:2), acetato de etila, acetato de etila:metanol (7:2) e metanol, como eluentes. Recolheram-se 20 frações (~10 ml) que após análise por CCDA, as frações 7-10 e 11-20 foram reunidas e codificadas com o nome de (PB.1). Esta fração foi deixada em repouso e na ausência de luz. Após a evaporação do solvente a fração PB.1, solúvel em piridina, apresentou cristais incolores aciculiformes (70,0 mg), que através das análises espectrais, pôde-se caracterizar a substância como um esteróide glicosilado.



**Figura 8:** Fração 38-46 (PB-1) – cristais aciculiformes (Autor: De Souza, P.A 2003).

**Fração 47- 48 (1,50 g):**

Esta fração de coloração amarela, solúvel em água destilada, metanol à quente, piridina e DMSO, apresentou, após a evaporação do solvente, precipitado arredondado, peculiar na forma de flocos, conforme visualização na Figura 9. A mesma substância foi obtido nas frações 49-55 e 56-75 que, após serem reunidas receberam o código PB 2. Sob a ótica das análises espectrais, pôde-se caracterizar a substância como um flavonóide glicosilado.



**Figura 9: Fração 47-48 (PB-2): Precipitado na forma de flocos (Autor: De Souza, P.A 2003).**

### **Acetilação de PB 2 (PB 2.1):**

A diminuição da polaridade desta substância foi feita com uma alíquota (200 mg) de amostra submetida a acetilação. A amostra foi solubilizada em piridina (2,0 ml) e anidrido acético (3,0 ml). Em seguida, a solução foi mantida sob agitação magnética por 5 horas, e deixada em repouso à temperatura ambiente na ausência de luz por 24 horas, e após, em ambiente refrigerado. Logo após, a mistura reacional foi vertida em água destilada refrigerada (4 ml) e extraída com clorofórmio (4 x 10 ml). A fase clorofórmica foi tratada com uma solução de 10% de ácido clorídrico, lavada com água destilada refrigerada (objetivando a retirada da piridina) e seca com sulfato de sódio anidro. A destilação, à pressão reduzida, forneceu o derivado acetilado, na forma de cristais aciculiformes (99,90mg).

O derivado acetilado obtido (Fração PB 2.1), analisado através de CCD sobre gel de sílica, utilizando-se três sistemas diferentes de eluentes, mostrou apenas uma única mancha. Este resultado indicou que o processo de acetilação foi eficiente.

### **3.3 Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC)**

A fração acetato de etila das raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl do extrato MeOH, foi submetida à cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC).

### 3.3.1 Escolha do Sistema de Solventes

#### 3.3.1.1 Teste de Fração em Tubo de Ensaio

Alguns miligramas do material da fração acetato de etila foram inicialmente solubilizadas em dois tubos de ensaio por agitação manual, respectivamente, com os sistemas de solventes AcOEt: H<sub>2</sub>O (1:1) e BuOH: H<sub>2</sub>O (1:1)(Figura 10, pág.51). Após a fração no sistema bifásico, aplicações de iguais volumes, tanto da fase superior quanto da inferior, foram feitas sobre placas cromatográficas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub>. As placas foram colocadas em uma cuba de vidro, e eluidas apenas com a fase orgânica do sistema de solventes: AcOEt: Acetona: H<sub>2</sub>O (25: 8: 5), Figura 10, pág 51.

#### 3.3.1.2 Teste de Sistema de Solventes para Estabelecer os Degraus do Gradiente

Em seguida, procedeu-se aos testes das proporções de BuOH em sistema de fração líquido-líquido, em tubos de ensaio, com os sistemas de solvente: AcOEt: BuOH: H<sub>2</sub>O (1:X:1, X= 0,2; 0,5 e 1,0) (Figura 11, pág 52). As etapas do gradiente deste sistema ficaram estabelecidas como: AcOEt: BuOH: H<sub>2</sub>O (1:X:1), X = 0,05; 0,2; 0,5 e 1,0.

#### 3.3.1.3 Separação dos Constituintes do Extrato em Acetato de Etila de Raízes de *S.cayennensis* (Rich.) Vahl por HSCCC em Gradiente não-Linear

A tabela 5 exemplifica a utilização dos sistemas de eluentes em gradiente de polaridade crescente empregado no contracorrente.

**Tabela 5: Sistemas de solventes empregados no fracionamento da fração acetato de etila.**

| <b>Etapas do Gradiente</b> | <b>AcOEt (ml)</b> | <b>BuOH (ml)</b> | <b>H<sub>2</sub>O (ml)</b> |
|----------------------------|-------------------|------------------|----------------------------|
| <b>A (Tubos 0-16)</b>      | <b>1,0</b>        | <b>0,05</b>      | <b>1,0</b>                 |
| <b>B (Tubos 17-32)</b>     | <b>1,0</b>        | <b>0,2</b>       | <b>1,0</b>                 |
| <b>C (Tubos 33-41)</b>     | <b>1,0</b>        | <b>0,5</b>       | <b>1,0</b>                 |
| <b>D (Tubos 42-54)</b>     | <b>1,0</b>        | <b>1,0</b>       | <b>1,0</b>                 |

### 3.3.1.4 Separação dos Constituintes da Fração em Acetato de Etila de Raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl

Um grama dos 8,90 gramas da fração em acetato de etila foi submetida à cromatografia contracorrente no aparelho Multilayer Coil Separator – Extractor, da P.C.InC., com o sistema de solventes AcOEt: BuOH: H<sub>2</sub>O (1: x: 1), x = 0,05; 0,2; 0,5; 1,0 em gradiente não-linear, em 4 etapas, em uma coluna de 80 ml. A fase aquosa foi usada como fase estacionária e a orgânica como fase móvel num fluxo de 2,0 ml/min. Após a fase estacionária ter sido bombeada para dentro da coluna no sentido cabeça → calda, completando-a, iniciou-se a rotação do aparelho a 835 rpm. A fase móvel foi então bombeada para dentro da coluna, até que todo o excesso da fase estacionária fosse deslocado, o que foi verificado quando apenas a fase móvel começou a ser eluída da coluna, chamado de “front do solvente”. Anotou-se então, o volume do excesso da fase estacionária eluída pela coluna (17 ml), para o cálculo do rendimento de retenção desta fase.

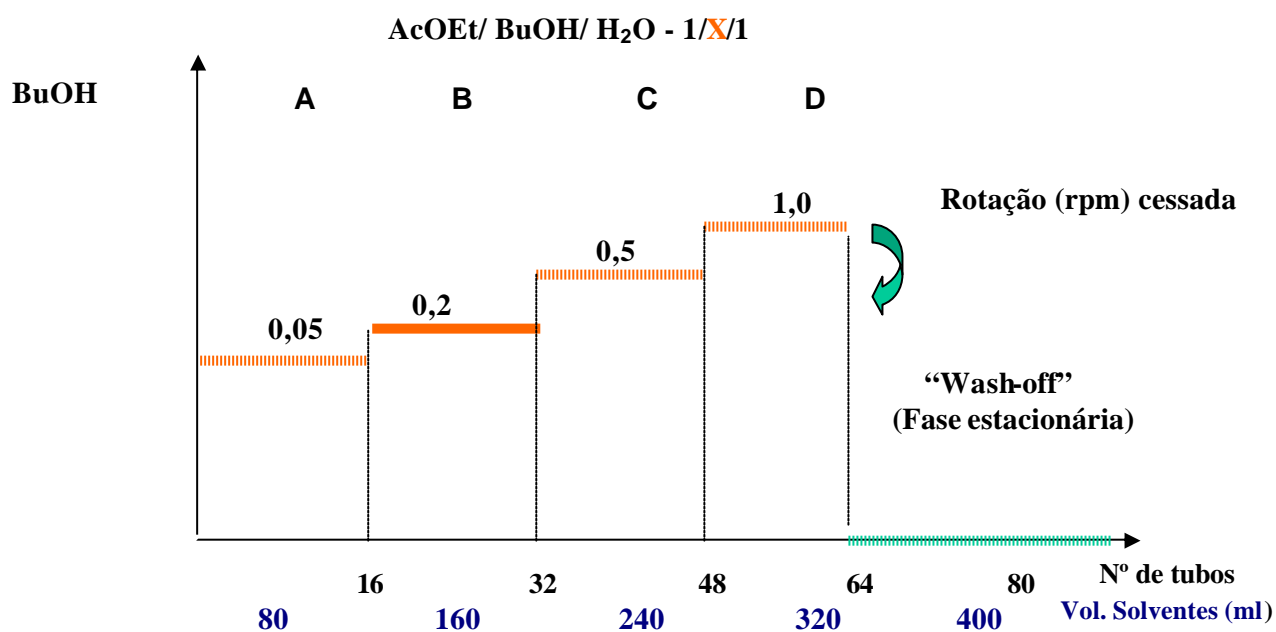
Nesse ponto, o *equilíbrio* da coluna foi atingido, quando então se pôde injetar a amostra no aparelho contracorrente, solubilizada em 2,5 ml da fase superior (fase móvel) e 2,5 ml da fase inferior (fase estacionária), com uma seringa de 5 ml acoplando-a em uma válvula de injeção.

Frações de 5 ml cada foram recolhidas em 16 tubos de ensaio, para cada degrau ou etapa do gradiente, perfazendo um total de 79 tubos (incluindo com a rotação cessada do aparelho “Wash-off”). Após o recolhimento de 80 ml da etapa A (tubos 1-16), a rotação do aparelho foi cessada e a fase móvel (orgânica) do sistema de solventes da etapa B (tubos 17-32) foi bombeada (80 ml) para o interior da coluna, reiniciando imediatamente a rotação até 835 rpm. Coletados mais 80 ml (totalizando 160 ml de solventes em uso) em frações de 5 ml, a rotação do sistema foi novamente cessada e a fase móvel (orgânica) da etapa C (tubos 33-42) do sistema de solventes foi bombeada para o interior da coluna, reiniciando a rotação do aparelho até 835 rpm. Procedimento análogo foi aplicado para a etapa D (tubos 34-54).

Ao final dessa última etapa (tubo 54), a rotação do aparelho foi desligada e toda a fase estacionária retirada da coluna. O esquema 2 exemplifica este procedimento. As frações obtidas no processo cromatográfico (Esquema 2) foram reunidas de acordo com suas semelhanças cromatográficas em CCD (Figura 12 e Figura 13, pág. 54), utilizando

como eluente a fase orgânica do sistema de solventes AcOEt: Acetona: H<sub>2</sub>O (25: 8: 5). As frações puras foram enviadas para espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

• Obs: A espiral da coluna tem duas extremidades, uma designada como “cabeça” e a outra como “cauda”, dependendo do sentido da rotação da espiral. De acordo com a fase que está sendo usada como fase móvel a entrada da coluna será por uma ou outra extremidade. Cada aparelho tem a sua especificação. No aparelho do NPPN-UFRJ, se a fase superior for a fase móvel então a entrada será na extremidade “cabeça” e a saída na extremidade “cauda”.



Esquema 2: Processo de separação das substâncias do extrato em AcOEt de raízes de *S.cayennensis* (Rich.) Vahl por CCC



### 3.4 Testes Biológicos

#### 3.4.1 Testes de Atividade Antioxidante

Avaliações quanto à atividade antioxidante dos extratos brutos das espécies *P. bahiense* (Meiss) Barroso (hidroalcolico) e *S. cayennensis* (Rich.) Vahl (etanólico e hexânico, e das Frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica do extrato etanólico) foram realizadas pelo método fotocolorimétrico do DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) (Mensor, L.L *et al.* 2001) (Figura 14, pág. 114).

Este método baseia-se na redução deste radical livre. Avaliações com as substâncias puras isoladas sob o mesmo procedimento fotocolorimétrico, da fração que apresentou os resultados mais proeminentes, foram igualmente realizadas.

Para os ensaios, foram preparadas soluções etanólicas de 10 mg de material, de cada amostra, e diluindo-as, posteriormente, em balões volumétricos de 10 ml (1,0 mg/ml). A partir das soluções estoque (1,0 mg/ml), de cada amostra, procedeu-se às diluições em etanol com as concentrações finais de 250, 125, 50, 25, 12,5, 5 e 2,5 µg/ml. Uma alíquota de 2,5 ml de cada uma destas soluções foi retirada e adicionada a um tubo de ensaio, com 1ml de solução de DPPH (0,3 mM), em triplicata.

Após esta última etapa, passados exatos 30 minutos a temperatura ambiente, onde as reações aconteceram, iniciou-se a leitura das amostras (A) em espectrofotômetro a 518 nm (comprimento de onda de máxima absorção do radical DPPH). Utilizou-se como controle de leitura uma solução com 1 ml de DPPH e 2,5 ml de etanol (C). Etanol (1,0 ml) mais 2,5 ml de solução amostra foi usado como branco (B). Os valores de absorvância foram convertidos em Atividade Antioxidante percentual (AA%) usando a fórmula abaixo:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{(ABS_A - ABS_B) \times 100}{ABS_C} \right\}$$

Os valores de EC50 (Concentração necessária para produzir metade de um efeito máximo estimado em 100%) foram calculados por regressão linear, onde a abscissa representa a concentração das amostras e a ordenada representa o percentual de redução de DPPH para três testes em separado. Os resultados foram expressos como a média aritmética dos três ensaios, com desvios-padrão calculados (Tabela 19, pág. 115; Tabela 20, pág. 117; Tabela 21, pág. 118).

### 3.4.2 Testes de Atividade Antimicrobiana

#### Método de Difusão em Disco e de Diluição em Caldo de Crescimento Bacteriano

Avaliações quanto à atividade antimicrobiana dos extratos brutos das espécies *P. bahiense* (Meiss.) Barroso (Extrato hidroalcolico da segunda coleta) e *S. cayennensis* (Rich.) Vahl (etanólico e hexânico) e das Frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica do extrato etanólico foram realizadas, inicialmente, pelo método de difusão em discos, e posteriormente, pelo método da diluição em caldo, objetivando achar a concentração mínima inibitória (CMI) da(s) substância(s) isolada(s) do(s) extrato(s) ativo(s) (Ellen, B. *et al.* 1994).

Cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15422) e *Streptococcus pyogenes* (75194) foram utilizadas na turvação de 0,5 da escala de Mcfarland ( $10^7$ - $10^8$ - UFC- Unidades Formadoras de Colônias). Estas foram inicialmente colocadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro tendo como meio de cultura agár-ágar de Müeller-Hinton (contendo 4 mm de espessura). Em seguida, sob fluxo laminar, 50,0 mg de cada amostra foram solubilizadas com 1000 µl de seus respectivos solventes. Com uma micropipeta, 100 µl (5,0 mg/ml) de cada amostra foram colocados sobre a superfície de sete discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, em cada uma das placas. Após esta etapa, as cepas utilizadas foram incubadas por um período de 18 a 24 horas a uma temperatura de 37° C (Ellen, B. *et al.* 1994).

As amostras que apresentaram halos inibitórios sobre as cepas tiveram seus diâmetros medidos com régua, tomando-se como padrão o antibiótico Cloranfenicol (também conhecido como Cloromicetina). Posteriormente, utilizando-se 10,0 mg das substâncias isoladas da fração acetato de etila do extrato etanólico de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, estas, foram novamente expostas ao mesmo procedimento de diluição e método a uma dosagem de 1,0 mg/ml. (Figura 15, pág.120; Figura 16, pág.121).

As substâncias que demonstraram efeitos mais promissores sobre as bactérias susceptíveis a esta última dosagem, tiveram suas substâncias isoladas submetidas ao método da CMI (Concentração Mínima Inibitória) em sete tubos de ensaio. Para isto, uma solução com 20,0 ml (solução com uma concentração de  $10^6$ - $10^7$  UFC, número de bactérias no ápice da doença no organismo infectado) de THB (Todd Hewitt Broth) como meio de cultura de crescimento para as bactérias foi preparada, sob fluxo laminar,

retirando-se 20 µL desta solução e acrescentando-se em seguida 20,0 µL da cepa da bactéria teste. Logo após, 1 ml desta solução foi colocada em cada um dos oito tubos de ensaio (em duplicatas). Um dos oito tubos (o oitavo tubo), da duplicata, foi inoculado apenas com a cepa de bactéria (1,0 ml) como forma de controle ao teste, enquanto que os outros sete tubos foram inoculados com 1,0 ml da solução contendo a substância com a cepa bacteriana. Do primeiro tubo, 60,0 µL de sua solução foi retirada e menosprezada, acrescentando-se 60,0 µL da amostra (substância teste) após ser solubilizada com 300,0 µL de MeOH. Deste tubo, retirou-se, em seguida, 1,0 ml de sua solução, acrescentando-a ao segundo tubo e assim sucessivamente neste processo de diluição seriada das substâncias testadas, até o sétimo tubo.

A inibição do crescimento da(s) colônia(s) de bactéria(s) foi determinada por comparação visual da turbidez. Este padrão foi representado por um tubo inoculado com a bactéria, sem a substância teste, comportando a concentração específica da cepa de bactérias em suspensão, como controle ao crescimento da(s) cepa(s) testada(s) com a(s) substância(s).

O tubo padrão foi preparado pelo método de Mcfarland (padrão 0,5 de Mcfarland), por meio de uma mistura aquosa em salina fisiológica estéril contendo 1,175% de solução aquosa de  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  com solução de 1% de HCl, que precipitará formando uma solução de turbidez reprodutível .

Após incubação por 18 Hs, os tubos foram examinados visando à observação da turbidez como forma indicativa do crescimento ou da inativação do microrganismo patogênico. A menor concentração da substância, que inibiu o crescimento da(s) bactéria(s), foi designada como o CMI (ou MIC, sigla internacional em Inglês) do agente antimicrobiano testado (Ellen, B. *et al.* 1994).

### **3.4.3 Testes de Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória**

Foram utilizados camundongos SW-55 (20-35 g), para os testes envolvendo atividade antinociceptiva e antiinflamatória, com grupos de 6 animais, e separados conforme o tratamento recebido. Os animais foram submetidos aos experimentos sempre no período de 8 – 18 h, e com um jejum prévio de no mínimo 12 horas antes da realização de cada teste experimental. O extrato hidroalcoólico da segunda coleta das folhas de *P.*

*bahiense* (Meiss.) Barroso, foi solubilizado utilizando água filtrada como veículo. Para a administração de todas as soluções usou-se a proporção de 0,01 ml/g.

A atividade antinociceptiva foi avaliada pelos métodos das contorções abdominais (Koster, R., *et al.* 1959) e (Hendershot, L.C *et al.* 1959), e da placa quente (Woolfe, G., *et al.* 1944). No método das contorções abdominais (c.a) os animais foram separados em 4 grupos e tratados, por gavagem, com: água (controle negativo), indometacina 10,0 mg/kg, EBPB 1,0 g/kg e EBPB 2,0 g/kg. Aos 60 minutos pós-tratamento foi administrado ácido acético diluído em salina (1,2%; i.p) e determinou-se o número de contorções acumuladas por 30 minutos (c.a.a).

No método da placa quente, os animais foram separados em 7 grupos e submetidos a estímulo nociceptivo antes e após o tratamento com salina (NaCl 0,9%, controle negativo, *per os*, p.o), água (controle negativo, p.o), fentanil (0,3 mg/kg, subcutânea, *s.c.*, controle positivo), EBPB (1,0 g/kg, p.o) e EBPB (2,0 g/kg, p.o), medindo-se, individualmente, o tempo de reação dos animais ao estímulo térmico na placa aquecida a  $55 \pm 1$  °C. Neste método considera-se como reação ao estímulo térmico o ato do animal levantar e/ou lambe ou morder as patas. O tempo máximo de contato com a placa foi de 30 s, para evitar lesões nas patas dos animais. Estes grupos tiveram seus efeitos comparados para fins de se avaliar a presença de propriedades antinociceptivas para os extratos em estudo, e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m) dos tempos de reação ou como % de atividade antinociceptiva, em relação ao observado para o grupo controle nos respectivos tempos.

A atividade antiinflamatória foi avaliada pelo método do edema de orelha (Schiantarelle, P., *et al.* 1982). Foram utilizados 6 grupos de animais, sendo estes previamente tratados, por via oral (p.o), com água (controle negativo); dexametasona 0,5 mg/kg (controle positivo); EBPB 1,0 g/kg e EBPB 2,0 g/kg. Uma hora após os tratamentos foram aplicados, topicamente, 10,0  $\mu$ l de óleo de cróton (2,5% v/v em acetona) no pavilhão auricular direito e o mesmo volume de acetona no pavilhão auricular esquerdo de cada animal. Após sacrifício por deslocamento cervical dos animais, foram retirados 6 mm de diâmetro de cada orelha e pesados em balança analítica. O edema induzido pelo óleo de cróton foi medido pela diferença de peso entre as duas orelhas de cada animal e os resultados representados como média  $\pm$  e.p.m das diferenças de peso dentro de cada grupo.

A avaliação comparativa entre os grupos controle positivo ou EBPB, com seu controle negativo para a determinação da significância estatística, bem como o cálculo dos valores médios e do erro padrão foi feita pelo software GraphPad Prism 3.0 e os métodos

estatísticos utilizados foram One-way ANOVA e t-student para um valor de  $P < 0,05$  como critério mínimo de significância. Entende-se como P, o valor da significância estatística dos resultados obtidos.

### 3.4.4 Análises dos Solos das Áreas de Ocorrência das Plantas Estudadas

*P. bahiense* (Meiss) Barroso. (Município Rio de Janeiro - “Bacia” de Jacarepaguá-RJ)

Tabela 6: Análise de solo da espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso.

| Identificação da amostra (cm) | Registro no Laboratório | pH em água 1:2,5 | mol/dm <sup>3</sup> |         |     |     | mg/dm <sup>3</sup> |    |
|-------------------------------|-------------------------|------------------|---------------------|---------|-----|-----|--------------------|----|
|                               |                         |                  | Al                  | Ca + Mg | Ca  | Mg  | P                  | K  |
| 0-10                          | 2650                    | 4,7              | 1,6                 | 3,5     | 1,8 | 1,7 | 3                  | 77 |
| 10-20                         | 2651                    | 4,6              | 1,8                 | 3,0     | 0,9 | 2,1 | 2                  | 67 |
| 20-30                         | 2652                    | 4,8              | 1,5                 | 3,0     | 1,2 | 1,8 | 3                  | 67 |

Tabela 7: Análise de solo da espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso.

| Identificação da amostra (cm) | Registro Laboratório | Carbono % g/kg | Mat. Orgân. % g/kg | Nitrogênio % g/kg |
|-------------------------------|----------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| 0-10                          | 2650                 | 11,7           | 20,2               | 1,652             |
| 10-20                         | 2651                 | 11,7           | 20,2               | 1,352             |
| 20-30                         | 2652                 | 11,7           | 20,2               | 1,414             |

*S. cayennensis* (Rich.) Vahl (Município Florianópolis – SC)

Tabela 8: Análise de solo da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl

| Identificação da amostra (cm) | Registro no laboratório | pH em água 1:2,5 | mol/dm <sup>3</sup> |         |     |     | mg/dm <sup>3</sup> |    |
|-------------------------------|-------------------------|------------------|---------------------|---------|-----|-----|--------------------|----|
|                               |                         |                  | Al                  | Ca + Mg | Ca  | Mg  | P                  | K  |
| 0-10                          | 121                     | 5,3              | 1,3                 | 2,0     | 1,1 | 0,9 | 2                  | 42 |
| 10-20                         | 122                     | 5,1              | 1,6                 | 1,4     | 0,7 | 0,7 | 2                  | 25 |

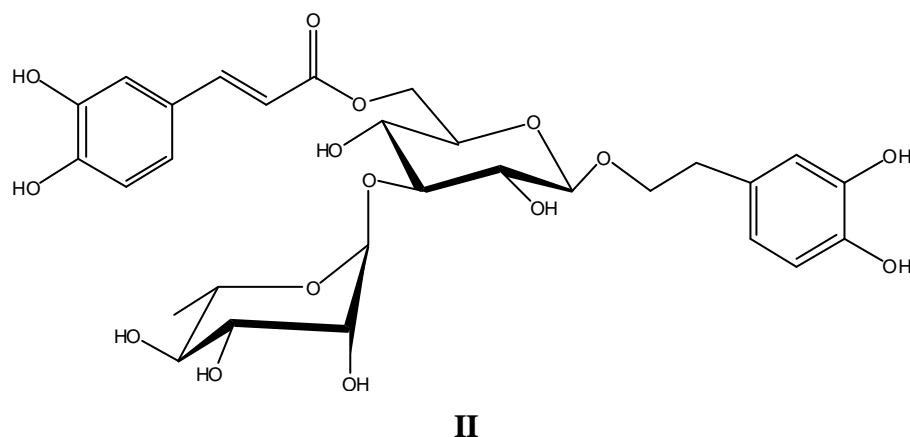
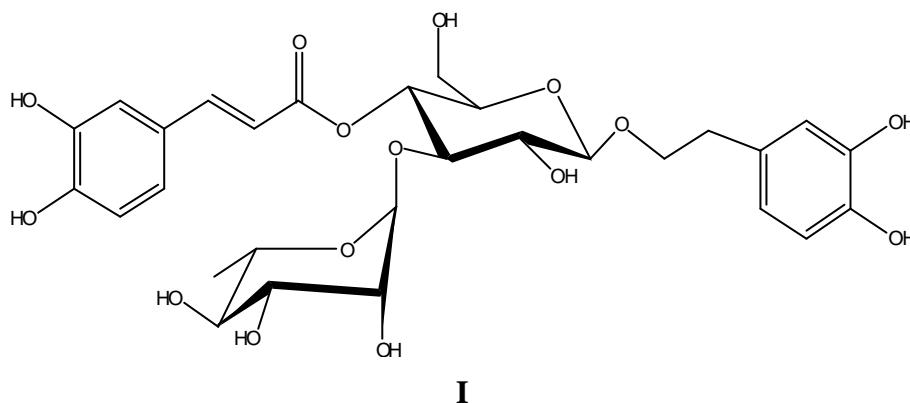
Tabela 9: Análise de solo da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl

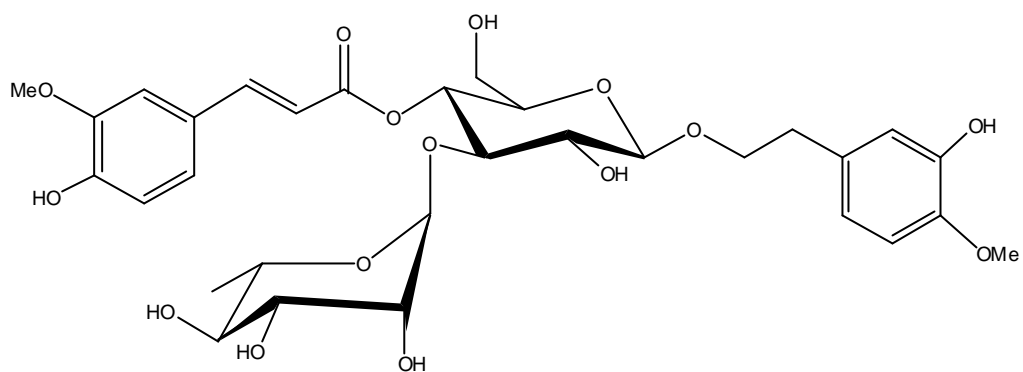
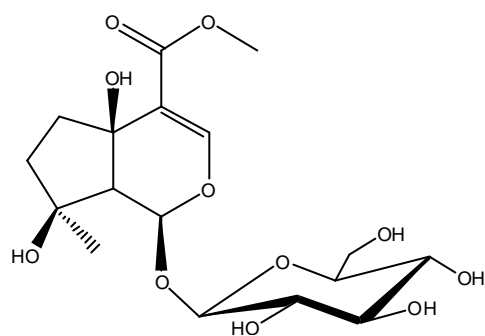
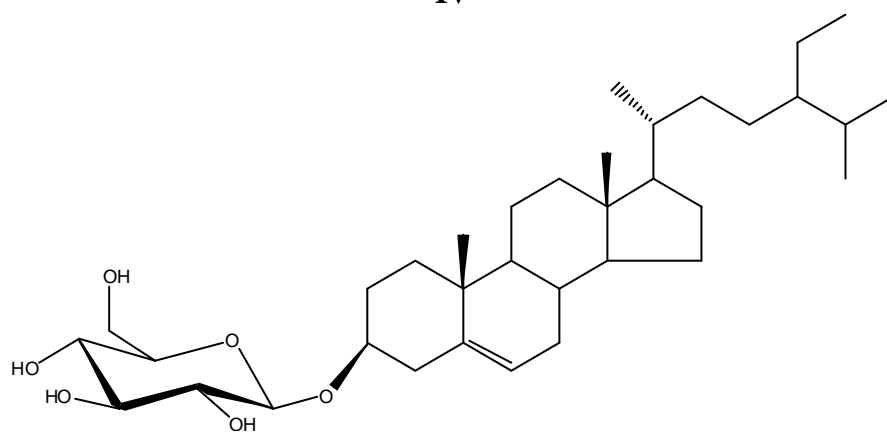
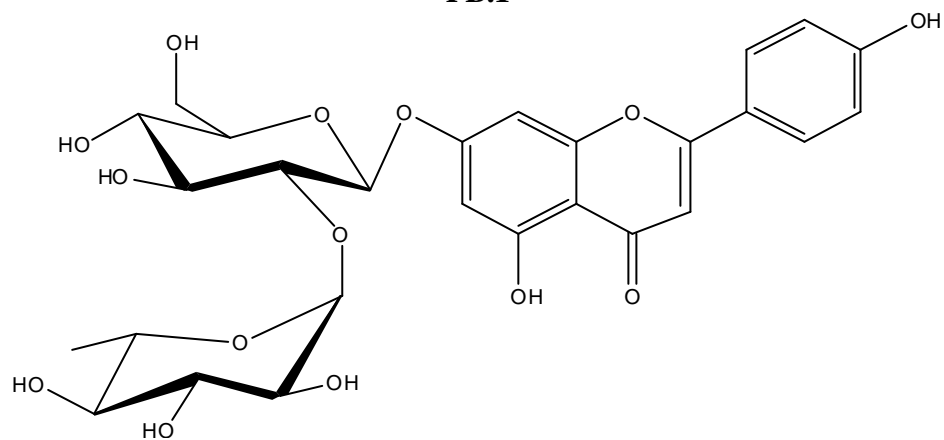
| Identificação da amostra (cm) | Registro laboratório | Carbono % g/kg | Mat. Orgân. % g/kg | Nitrogênio % g/kg |
|-------------------------------|----------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| 0-10                          | 121                  | 7,8            | 13,4               | 0,945             |
| 10-20                         | 122                  | 6,0            | 10,3               | 0,730             |

Obs: A unidade que expressa os valores de Al, Ca + Mg, Ca, Mg (m Eq/100 cm<sup>3</sup>) foi substituída por mol/dm<sup>3</sup>, e a que expressa K e P (ppm) por mg/dm<sup>3</sup>, visando a atender o padrão internacional de unidades de medidas, não havendo necessidade de fator de conversão.

### 3.5 Constituintes Químicos Isolados das Folhas de *P. bahiense* (Meiss) Barroso e das Raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl

Obtiveram-se como resultado, quanto ao isolamento e caracterização das substâncias isoladas no estudo da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, três arilpropanóides glicosilados (I, II, III) e um iridóide glicosilado (IV) (dois outros iridóides se encontram em fase de identificação). Para a espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso, da fração metanólica, foram isolados um esteróide glicosilado (PB.1) e um flavonóide glicosilado (PB.2).



**III****IV****PB.1****PB.2**

### 3.6 Dados Físicos e Espectroscópicos dos Constituintes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl.

Verbascosídeo (I),  $\beta$ -3',4'-diidroxifeniletil-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-4-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo), C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>14</sub>. Substância amorfa de coloração acastanhado escuro, solúvel em metanol e água.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Hz, d): 6,70 (*d*, *J* = 1,8; H-2); 6,67 (*d*, *J* = 8,0; H-5); 6,56 (*d*, *d*, *J* = 8,0; 1,8; H-6); 2,80 (*t*, *J* = 7,1; H-7); 3,70 (*d*, *J* = 9,5; H-8); 4,05 (*d*, *J* = 9,5; H-8); 7,03 (*d*, *J* = 1,8; H-2'''); 6,78 (*d*, *J* = 8,0; H-5'''); 6,96 (*dd*, *J* = 8,4; 1,8; H-6'''); 6,28 (*d*, *J* = 15,7; H-7'''); 7,60 (*d*, *J* = 15,7; H-8'''); 4,38 (*d*, *J* = 7,7; H-1'); 3,32 (*dd*, *J* = 4,0; 3,6; H-2'); 3,84 (*t*, *J* = 9,1; H-3'); 4,90 (*t*, *J* = 9,3; H-4'); 3,43 (*t*, *J* = 8,4; H-5') 3,72; 3,42 (*m*; H-6a'; H-6b'); 5,21 (*d*, *J* = 1,6; H-1'); 3,60 (*t*, *J* = 2,9; H-2''); 1,10 (*d*, *J* = 5,8; H-6''). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Hz, d): 131,4 (C-1); 117,0 (C-2); 145,8 (C-3); 144,4 (C-4); 116,3 (C-5); 121,2 (C-6); 36,3 (C-7 a); 72,1 (C-8 b); 127,4 (C-1'''); 115,2 (C-2'''); 146,5 (C-3'''); 149,5 (C-4'''); 116,5 (C-5'''); 123,1 (C-6'''); 114,5 (C-8'''); 147,9 (C-7'''); 168,2 (COO); 103,9 (C-1'); 75,7 (C-2'); 81,6 (C-3'); 70,2 (C-4'); 75,9 (C-5'); 62,2 (C-6'); 102,8 (C-1''); 72,0 (C-2''); 71,9 (C-3''); 73,6 (C-4''); 70,4 (C-5''); 18,3 (C-6'').

Isoverbascosídeo (II),  $\beta$ -3,4-diidroxifeniletil-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo), C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>. Precipitado amorfo de coloração acastanhado escuro, solúvel em metanol e água.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD Hz, d): 6,65 (*d*, *J* = 2,0; H-2); 6,76 (*d*, *J* = 8,1; H-5'''); 6,89 (*dd*, *J* = 8,3; 2,0; H-6''', H-6'''); 2,76 (*t*, *J* = 7,4; H-7); 3,60-3,74 (*m*; H-8); 6,62 (*d*, *J* = 8,0; H-5); 6,52 (*dd* *J* = 8,0; 2,0; H-6); 7,56 (*d*, *J* = 15,9; H-7'); 6,27 (*d*, *J* = 15,9; H-8'); 4,32 (*d*, *J* = 7,8; H-1'); 3,23 (*d*, *J* = 6,2; H-2'); 3,54 (*t*, *J* = 8,6; H-3'); 3,43 (*t*, *J* = 9,6; H-4'); 3,70 (*dd*, *J* = 9,4; 1,7; H-5'); 4,48 (*dd*, *J* = 11,9; 1,8; H-6'); 4,34 (*dd*, *J* = 11,9; 7,8; H-6'); 5,29 (*d*, *J* = 1,5; H-1''); 3,66; 3,78 (*dd*, *J* = 1,1; 9,2; H-2''); 3,70 (*dd*, *J* = 9,4; 3,1; H-3''); 3,80 (*dd*, *J* = 3,5; 9,4; H-4''); 3,68 (*dd*, *J* = 6,2; 9,4; H-5''); 1,23 (*d*, *J* = 6,2; H-6'').

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Hz, d): 131,3 (C-1); 116,3 (C-2); 146,1 (C-3); 144,6 (C-4); 117,0 (C-5); 121,2 (C-6); 36,6 (C-7); 72,2 (C-8); 127,6 (C-1'''); 115,0 (C-2'''); 146,7 (C-3'''); 149,6 (C-4'''); 116,5 (C-5'''); 123,1 (C-6'''); 114,7 (C-8'''); 147,2 (C-7'''); 169,1



(COO); 104,3 (C-1'); 75,3 (C-2'); 83,8 (C-3'); 70,0 (C-4'); 75,7 (C-5'); 64,6 (C-6'); 102,6 (C-1''); 72,4 (C-2''); 72,3 (C-3''); 73,9 (C-4''); 70,3 (C-5''); 17,8 (C-6'').

Martinosídeo (III), (3-hidroxi-4-metoxil-β-feniletóxil-O-α-L-ramnopiranosil-(1? 3)-4-O-feruloil-β-D-glicopiranosídeo), C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>O<sub>14</sub>. Substância de aspecto xaroposo de coloração amarela acastanhada escura, solúvel em metanol, acetona e água.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD Hz, d): 6,72 (*d*, *J* = 1,7; H-2); 6,81 (*d*, *J* = 8,0; H-5); 6,67 (*dd*, *J* = 8,0; 1,9; H-6, H6); 2,81 (*t*, *J* = 7,5; H-7a); 3,74 (*dd*; *J* = 6,8; H-8); 7,19 (*d*, *J* = 1,5; H-2'''); 6,81 (*dd* *J* = 8,1; 1,8; H-5'''); 7,08 (*dd*, *J* = 8,4; 1,6; H-6'''); 6,37 (*d*, *J* = 15,8; H-7'); 7,66 (*d*, *J* = 15,9; H-8'); 4,37 (*d*, *J* = 7,8; H-1'); 4,75-5,0 (*m*; H-4'); 5,19 (*d*, *J* = 1,4; H-1''); 3,80 (*s*, OCH<sub>3</sub> - 3'''); 3,87 (*s*, OCH<sub>3</sub> - 4); 3,60 (*t*, *J* = 2,9; H-2''); 3,30-4,10 (*m*, H-3''); 3,30-4,10 (*m*, H-4''); 3,30-4,10 (*m*, H-5''); 1,08 (*d*, *J* = 6,2; H-6'');

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Hz, d): 132,8 (C-1); 112,7 (C-2); 147,8 (C-3); 147,8 (C-4); 117,0 (C-5); 121,1 (C-6); 36,5 (C-7); 72,1 (C-8); 56,4 (OMe); 127,6 (C-1'''); 111,7 (C-2'''); 149,3 (C-3'''); 149,3 (C-4'''); 116,4 (C-5'''); 124,3 (C-6'''); 115,0 (C-7'''); 147,1 (C-8'''); 168,2 (COO); 56,4 (OMe); 104,1 (C-1'); 76,0 (C-2'); 81,5 (C-3'); 70,3 (C-4'); 76,1 (C-5'); 62,3 (C-6'); 102,9 (C-1''); 72,3 (C-2''); 72,0 (C-3''); 73,7 (C-4''); 70,5 (C-5''); 18,4 (C-6'').

Ipolamiida (IV), C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>. Substância amorfa de coloração amarela escura, solúvel em metanol e água.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD Hz, d): 5,80 (*s* H-1); 7,4 (*s*, H-3); 1,53 (*ddd*, *J* = 1,7; 6,8; 17,1; H-6); 2,10-2,23 (*ddd*, *J* = 2,1; 7,0; 17,4; H-7); 2,47 (*s* H-9); 1,12 (*s*, H-10); 3,72 (*s*, 3H-12); 4,58 (*d*, *J* = 7,7; H-1'); 4,48 (*d*, *J* = 7,7; H-2'); 4,26 (*d*, *J* = 7,7; H-3'); 3,36-4,0 (*m*; H-4'); 3,36-4,0 (*m*, H-5'); 3,39 (*d*, *J* = 1,8; H-6'); 3,87 (*d*, *J* = 2,2; H-6');

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Hz, d): 94,1 (C-1); 152,5 (C-3); 115,1 (C-4); 71,7 (C-5); 38,7 (C-6); 40,3 (C-7); 78,8 (C-8); 61,5 (C-9); 23,2 (C-10); 168,0 (C-11; COO); 51,7 (C-12; OMe); 99,5 (C-1'); 74,3 (C-2'); 77,3 (C-3'); 71,5 (C-4'); 78,2 (C-5'); 62,7 (C-6').

### 3.7 Dados Físicos e Espectroscópicos dos Constituintes de *P. bahiense* (Meiss.) Barroso

3 $\beta$ -D- glicopiranosil- Sitosterol (PB.1), C<sub>35</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>. Substância na forma de cristais aciculiformes incolores. Solúvel em piridina.

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, Piridina *d*<sub>5</sub>, Hz, d): 0,98; 1,71 (*dd*, *J*= 9,8; 6,6; H-1); 2,11 (*d*, *J*= 11,7; H-2); 4,28 (*m*; H-3); 2,74; 2,70 (*d,d* *J*= 4,0; 4,1; H-4); 5,34 (*d*, *J*= 5,1; H-6); 1,51 (*J*= 9,5; H-7) 1,85 (*m*; H-7); 1,97 (*d*, *J*= 12,4; H-11); 0,65 (*s*; H-18); 0,90 (*s*; H-19); 0,92 (*d*, *J*= 8,8; H-21); 5,04 (*d*, *J*= 7,7; H-1'); 4,05 (*t*, *J*= 16,1; H-2'); 3,96 (*m*; H-3'); 4,27 (*t*, *J*=10,6; H-4'); 4,30 (*t*, *J*=10,6; H-5'); 4,56; 4,40 (*dd*, *J*=2,2; 5,5; H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, Piridina *d*<sub>5</sub>, Hz, d): 37,4 (C-1); 30,1 (C-2); 78,5 (C-3), 39,2 (C-4); 104,8 (C-5); 122,8 (C-6); 31,9 (C-7); 32,1 (C-8); 50,2 (C-9); 36,8 (C-10); 21,2 (C-11); 39,8 (C-12); 42,4 (C-13); 56,7 (C-14); 24,4 (C-15); 28,4 (C-16); 56,1 (C-17); 11,9 (C-18); 19,3 (C-19); 36,3 (C-20); 19,1 (C-21); 34,1 (C-22); 26,3 (C-23); 45,9 (C-24); 29,4 (C-25); 18,9 (C-26); 19,9 (C-27); 23,3 (C-28); 12,0 (C-29); 102,5 (C-1'); 75,2 (C-2'); 78,4 (C-3'); 71,6 (C-4'); 78,0 (C-5'); 62,7 (C-6').

Apigenina -7- *O*- neo-hesperidosideo; 5,4' diidroxiflavona *O*-[  $\beta$ -7-*O*-glicopiranosil -(2''') 1''')  $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo (PB.2), C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>. Substância de coloração amarela, solúvel em metanol à quente, água, piridina e DMSO. p.f 190-195°C (substância degradada).

**IV**  $\nu^{\text{KBr}}$  (cm<sup>-1</sup>),  $\nu_{\text{OH}}$  3366; 1660; 1450; 1600; 650; 1000; 800; 860; 950; 1180; 900; 930; 755; 785; 250; 600. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Hz, d): 6,83 (*s*, H-3); 6,40 (*d*, *J*= 2,1; H-6); 6,80 (*d*, *J*= 2,1; H-8); 7,98 (*d*, *J*= 9,0; H-2', H-6'); 6,94 (*d*, *J*= 9,0; H-3', H-5'); 5,25 (*d*, *J*= 6,9; H-1''); 3,46 (*d*, *J*= 3,3; H-2''); 3,48 (*d*, *J*= 4,8; H-3''); 3,30 (*s*, H-4''); 3,44 (*d*, *J*= 8,1; H-5''); 4,74 (*d*, *J*= 16,5; H-6''); 5,12 (*s*; H-1'''); 3,71 (*d*, *J*= 4,5; H-2'''); 3,75 (*d*, *J*= 6,4; H-3'''); 3,20 (*s*, H-4'''); 3,77 (*d*; *J*= 6,4 H-5'''); 1,20 (*d*, *J*= 6,1 H-6''');

**RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Hz, d): 164,3 (C-2); 103,1 (C-3); 181,9 (C-4); 161,5 (C-5); 99,3 (C-6); 162,5 (C-7); 94,5 (C-8); 156,9 (C-9); 105,4 (C-10); 120,8 (C-1'); 128,5 (C-2', C-6'); 116,0 (C-3', C-5'); 161,0 (C-4'); 97,8 (C-1''); 77,2 (C-2''); 76,2 (C-3''); 69,6 (C-4''); 76,9 (C-5''); 60,4 (C-6''); 100,4 (C-1'''); 70,3 (C-2'''); 70,5 (C-3'''); 71,8 (C-4'''); 68,3 (C-5'''); 18,0 (C-6''').

Derivado acetilado (PB 2.1). Substância semi-cristalina solúvel em clorofórmio.

p.f: 210-216 ° C.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz, d): 6,58 (*s*; H-3); 6,70 (*d*,  $J=1,7$ ; H-6); 7,0 (*d*,  $J= 1,7$ ; H-8), 7,84 (*d*,  $J= 8,4$ ; H-2'; H-6'); 7,22 (*d*,  $J= 6,0$ ; H-3', H-5'); 5,23 (*d*,  $J= 7,6$ ; H-1''); 5,11 (*d*,  $J= 7,4$ ; H-2''); 5,36 (*t*,  $J= 9,6$ ; H-3''); 4,9-5,06 (*m*; H-4''; H-5''); 4,2 (*d*,  $J= 1,9$ ; H-6''); 5,03 (*s*; H-1'''); 4,9-5,06 (*m*; H-2'''; H-3'''); 4,60 (*d*,  $J= 6,7$ ; H-4'''); 3,80 (*d*,  $J= 6,8$ ; H-5'''); 1,23 (*s*; H-6'''); 2,42; 2,33; 2,14; 2,12; 2,04; 1,98; 1,94; 1,19 (Me (Ac)). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz, d): 161,4 (C-2); 109,3 (C-3); 176,1 (C-4); 158,3 (C-5); 98,3 (C-6); 153,1 (C-7); 98,1 (C-8); 159,7 (C-9); 112,7 (C-10); 128,5 (C-1'); 127,4 (C-2'; C-6'); 122,2 (C-3';C-5'); 150,6 (C-4'); 108,4 (C-1''); 72,2 (C-2''); 76,3 (C-3''); 68,1 (C-4''); 73,7 (C-5''); 61,8 (C-6''); 102,3 (C-1'''); 68,2 (C-2'''); 69,8 (C-3'''); 70,6 (C-4'''); 66,9 (C-5'''); 17,4 (C-6'''). 170,3; 170,0; 169,9; 169,8; 169,6; 169,5; 169,2; 168,8 (CO(Ac); 29,5(2-C); 21,0; 20,9; 20,0; 20,6; 20,5; 20,4 (Me(Ac)).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cromatografia Contracorrente

A obtenção dos arilpropanóides glicosilados (martinosídeo, isoverbascosídeo e verbascosídeo) e dos três iridóides glicolisados (um deles a ipolamiida, os outros dois em fase de identificação) pelo uso da cromatografia contracorrente, com gradiente de polaridade, foi facilitada pela pré-purificação do extrato bruto etanólico, por meio de Frações com solventes de polaridade crescente. Isto ajudou na rapidez e na facilidade do isolamento das substâncias puras já citadas da fração acetato de etila. Além do que, o uso de gradiente possui a vantagem de cobrir uma ampla janela de polaridades e de coeficientes de fração de substâncias próximas entre si.

O coeficiente de fração é uma característica intrínseca do soluto referente a um determinado sistema de solventes bifásico, de modo que, substâncias que apresentam diferentes coeficientes de fração em relação a um mesmo sistema bifásico podem ser separadas quando se encontram misturadas (Conway, D. W. 1991). Como a fração acetato de etila revelou em CCD substâncias com uma faixa de ampla polaridade, optou-se pelo uso do sistema de gradiente frente ao isocrático.

Inicialmente, a escolha do sistema de solventes a ser usado no aparelho de cromatografia contracorrente foi realizada pelo teste de fração em tubo de ensaio (pág. 36. Item 3.3.1.1), seguido pelo perfil empírico da visualização em placa cromatográfica (CCD), quanto à concentração das substâncias da amostra distribuídas entre as fases do sistema bifásico escolhido.

A escolha de um sistema de solventes bifásico apropriado por meio de eluição com gradiente em CCC pode apresentar certa dificuldade, já que qualquer mudança na composição de uma das fases de um sistema líquido bifásico pode induzir a mudanças na outra fase (Berthod, A. 2002).

A escolha deste sistema consistiu em dois solventes (AcOEt e BuOH), mais um terceiro solvente, a água, insolúvel nestes dois solventes orgânicos. Optou-se por este sistema, por ser comumente usado para substâncias polares (Foucault, A. P., Dekker, M. 1999).

Potencialmente, todas as substâncias que sejam mais solúveis em água do que em AcOEt, e que sejam mais solúveis em BuOH do que em água podem ser purificadas usando-se o sistema AcOEt: BuOH: H<sub>2</sub>O, onde a proporção de butanol varia de acordo

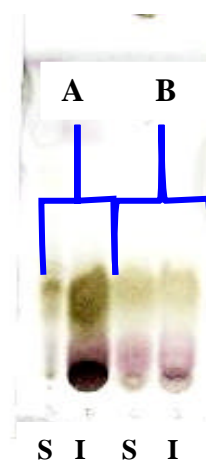
com a polaridade desejada (Foucault, A. P., Dekker, M. 1999). Pela verificação dos resultados em placas cromatográficas de gel de sílica, observou-se que as substâncias da fração AcOEt eram sensíveis a extração de pequenas concentrações de BuOH.

A primeira etapa do experimento do teste de fração consistiu em dois tubos contendo, cada qual, os sistemas AcOEt/ H<sub>2</sub>O 1:1 e BuOH/ H<sub>2</sub>O 1:1.

A distribuição uniforme de substâncias da amostra entre dois líquidos imiscíveis conforme o sistema experimentalmente usado (BuOH: H<sub>2</sub>O, sistema B, mais polar) frente ao sistema (AcOEt: H<sub>2</sub>O, sistema A, menos polar), obtido pela visualização da figura 10, em placa de CCD, revelou ser o sistema butanólico (com coeficiente de fração próximo a 1,  $K=1$ ) mais eficiente quanto à uniformidade da distribuição do soluto entre as fases do sistema bifásico. Facilitando assim a separação das substâncias presentes no solvente água. Ou seja, cerca de 90% das substâncias ficaram retidas na fase aquosa inferior do sistema com AcOEt, enquanto que 50% das substâncias ficaram distribuídas em cada fase do sistema com BuOH. Este resultado sugeriu uma polaridade elevada dessas substâncias, confirmando a maior afinidade química do BuOH em extraí-las para a fase orgânica superior.

Uma vantagem adicional deste sistema é que, de acordo com Foucault (Foucault, A. P. 1995), a composição da fase polar rica em água não varia muito quando o BuOH é adicionado, desde que este solvente passe preferencialmente para a fase rica em AcOEt.

|              |             |                    |
|--------------|-------------|--------------------|
| <b>AcOEt</b> | <b>Água</b> | <b>(Sistema A)</b> |
| <b>1</b>     | <b>1</b>    | <b>(ml)</b>        |
| <b>BuOH</b>  | <b>Água</b> | <b>(Sistema B)</b> |
| <b>1</b>     | <b>1</b>    | <b>(ml)</b>        |

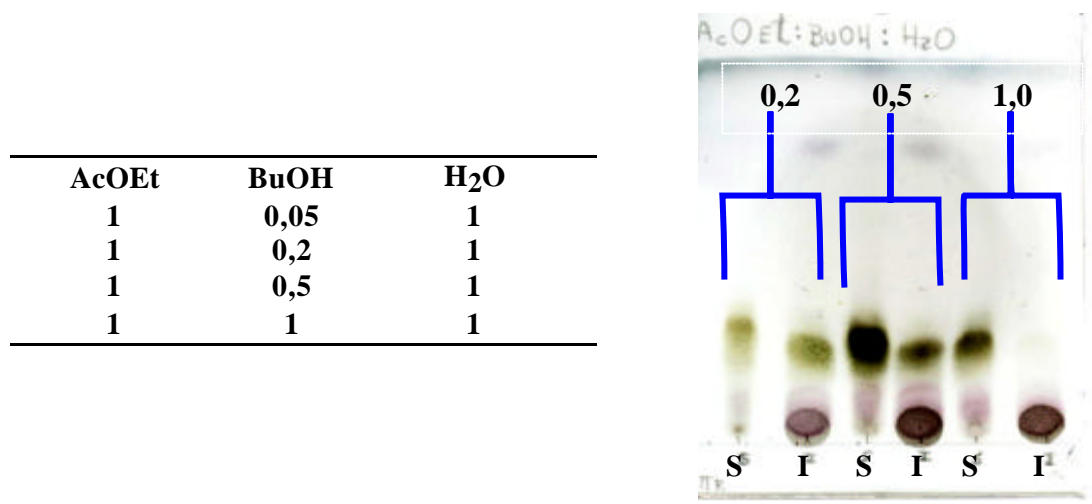


**Figura 10:** As Letras S e I representam, respectivamente, a fase superior e inferior de cada sistema de solvente empregado.

O sistema de gradiente testado após o pré-experimento analítico em tubo de ensaio pelo teste das proporções com BuOH (Figura 11), foi o estabelecido como sendo AcOEt: BuOH: H<sub>2</sub>O (1:x:1), onde  $x = 0,05; 0,2; 0,5; 1$ . Os resultados sugeriram que as substâncias

do extrato são sensíveis a pequenas concentrações de BuOH, contribuindo para a escolha desse gradiente.

Como se pode observar na figura 11, na proporção (0,2) de BuOH no sistema AcOEt: BuOH: H<sub>2</sub>O, a maioria das substâncias da fração acetato de etila encontram-se na fase aquosa inferior. Na medida que a concentração de BuOH no sistema foi aumentada (0,5), uma maior quantidade de substâncias passou para a fase orgânica superior, por ser este solvente mais solúvel em AcOEt do que em H<sub>2</sub>O.



**Figura 11:** As Letras S e I representam, respectivamente, a fase superior e inferior de cada sistema de solvente empregado.

Obteve-se desse fracionamento o isolamento de 6 substâncias puras (figuras 12 e 13; pág 54): martinósídeo (Fr 10-15; 54 mg) (sistema A), isoverbascosídeo (Fr 21; 37 mg) (sistemas B), verbascosídeo (Fr 23-29; 300mg) (sistema B), iridóide em fase de identificação (Fr 51-56; 33 mg) (sistema D), iridóide em fase de identificação (Fr 57-64; 31 mg) e ipolamiida (Fr 65-68; 85 mg) (“fase estacionária”). Obteve-se ainda a mistura de martinósídeo/isoverbascosídeo (Fr 16-20; sistema A) e isoverbascosídeo/verbascosídeo (Fr 22-23; sistema B).

As substâncias foram identificadas por análises espectroscópicas de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) e os dados obtidos comparados com os da literatura (Tabela 10, Tabela 11, Tabela 12 e Tabela 13, págs 65, 71, 75, 81).

O cálculo da fração da fase estacionária (Sf) retida dentro da coluna, foi efetuado pela equação  $Sf = V_s/V_c \times 100$ , obtendo-se o valor de 78,75%. Onde V<sub>s</sub> (volume da fase estacionária), obtida pela diferença entre o volume da coluna (V<sub>c</sub>), 80 ml, pelo “front do solvente”, 17 ml, V<sub>m</sub> (volume de fase móvel dentro da coluna) e V<sub>c</sub> (volume total da coluna). Tal valor indicou que o sistema de solventes escolhido possibilitou uma retenção

eficiente da fase estacionária na coluna, contribuindo assim para os resultados almejados na separação das substâncias.

Para o cálculo do coeficiente de fração K do sistema de gradiente empregado, o mesmo só pôde ser efetuado apenas para as amostras contidas nos tubos de 1 a 17 (fase A). Nas fases B, C e D, o cálculo do K não pôde ser efetuado devido à mudança da composição dos eluentes da fase móvel e estacionária. Para um sistema isocrático, entretanto, o K poderia ser calculado para cada substância, visto ser a composição do solvente invariável na fase móvel durante todo o processo de isolamento de substâncias de uma dada amostra.

Como forma meramente exemplificativa do cálculo do coeficiente de fração K, para uma dada substância na fase A, usaríamos a equação:  $K = V_r - V_m / V_m \cdot (1 - S_f / S_f)$ , onde:  $V_m$  = Volume da fase móvel na coluna;  $V_r$  = Volume total de retenção na coluna;  $S_f$  = % de retenção de fase estacionária na coluna, e  $V_r'$  = volume corrigido ( $V_r - V_m$ ) (Conway, D.W. 1990). Por exemplo, para a fração 13 na placa de CCD teríamos:  $V_r' = 13$ . (volume da amostra no tubo, 5ml) = 65 ml. Portanto, o K para a substância na fração 13 seria:  $K = 65 / 17 \cdot (1 - 0,7875 / 0,7875) = 0,761$ .

Como a separação de cada substância é determinada pelo seu coeficiente de fração, se negligenciarmos qualquer correção de volume morto extra na coluna (volume da bomba injetora até a coluna cromatográfica do contracorrente), podemos afirmar que a substância com coeficiente de fração igual a 1 deverá sair da coluna quando uma quantidade da fase móvel equivalente ao volume total da coluna tiver por ela passado. Então, o volume de retenção da substância com  $K=1$  será igual ao volume total da coluna. Mas se levarmos em consideração o deslocamento da fase estacionária da coluna ( $V_d$ ) e o volume morto na coluna ( $V_m$ ), teremos o volume de retenção corrigido:  $V_r' = V_r - V_m - V_d$ . Isto ajudará a prever em que frações estarão as substâncias com coeficientes de fração igual a 1, 2, 3 e assim por diante (Conway, D. W. 1991).

Podemos então concluir que a substância no tubo 13, por exemplo, com  $K= 0,761$  sairá da coluna após um volume de fase móvel quase que equivalente ao volume total da coluna ter por ela passado.

Os tubos coletores (7-8; 22-24; 26-27 e 63-74) apresentaram durante o processo de extração, as duas fases do sistema de solventes. Este fato, tido como um “sangramento” da coluna foi atribuído a perda de fase estacionária, fruto do restabelecimento do equilíbrio entre ambas as fases, de cada etapa mudada do gradiente.

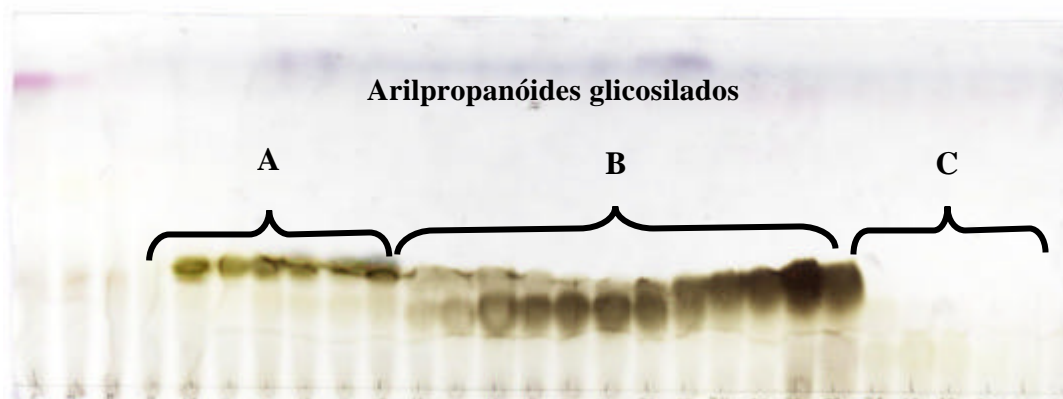


Figura 12: Arilpropanóides glicosilados isolados por CCC

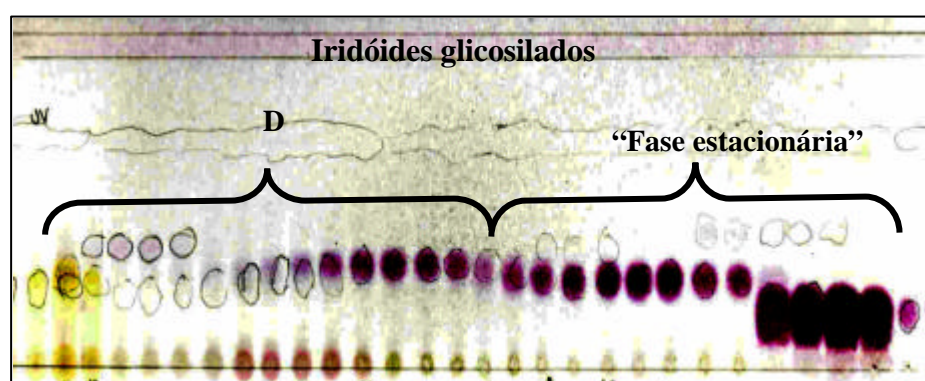
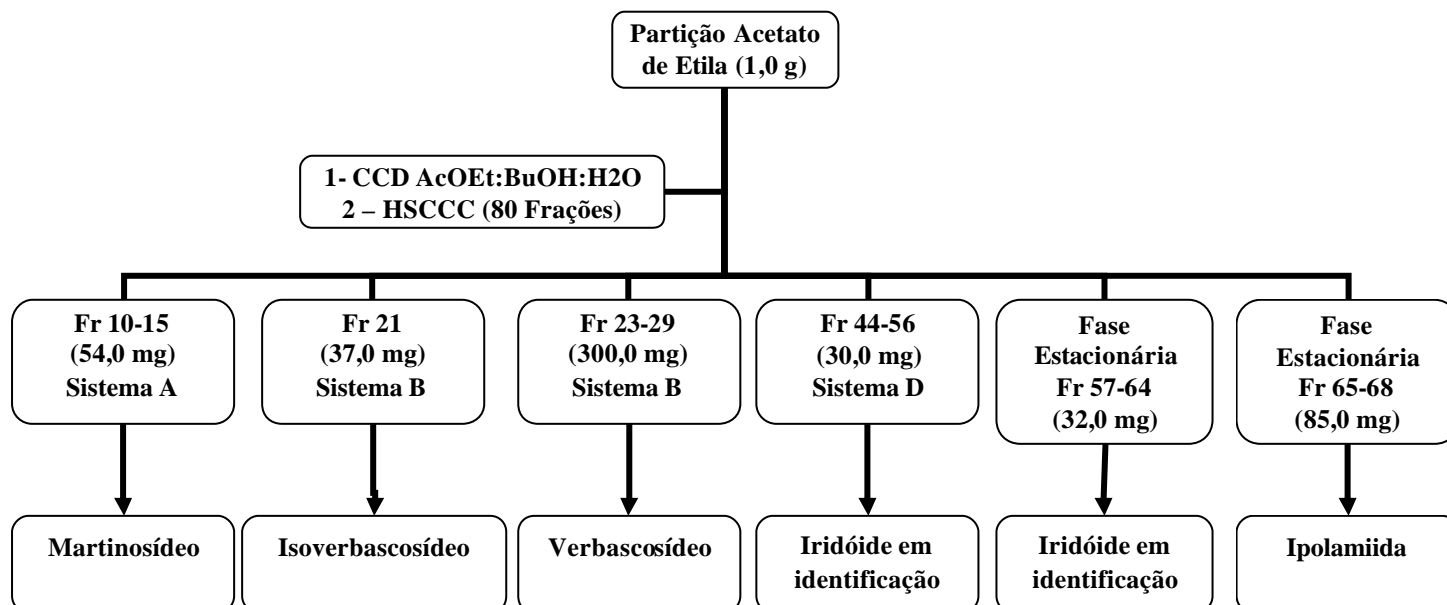


Figura 13: Iridóides glicosilados isolados por CCC



Esquema 3: Obtenção dos iridóides e arilpropanóides glicosilados puros, por cromatografia contracorrente com utilização de gradiente



#### 4.2 Análise Espectroscópica de RMN $^1\text{H}$ das Frações de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl.

As Frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica do extrato bruto etanólico da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, foram submetidas a testes preliminares de atividade antioxidante e antimicrobiana. Os resultados destes testes direcionaram ao estudo biodirigido de suas substâncias, visando o isolamento, identificação e posterior teste dos metabólitos especiais responsáveis pelas atividades citadas.

As análises dos perfis espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  destas frações, com amostras de 100 mg cada, foram realizadas após os testes biológicos citados, a fim de se identificar os sinais correspondentes das substâncias majoritárias presentes em cada fração, quando comparados aos dados da literatura consultada (Futuro, D. 1997). Esta metodologia inicial objetivou o dinamismo do trabalho quanto à seleção da(s) fração/frações de interesse, levando à purificação de suas substâncias via CCC.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração acetato de etila (Espectro 3, pág 59), foram observados os sinais que referenciam os hidrogênios aromáticos e olefínicos, encontrados nas moléculas isoladas desta fração, na região de deslocamento químico entre  $\delta$  6,0 e 7,70 ppm, como se pode observar nos espectros dos arilpropanóides glicosilados martinósídeo (Espectro 15, pág.76), verbascosídeo (Espectro 7, pág 66) e isoverbascosídeo (Espectro 12, pág.72) após o uso da cromatografia contracorrente.

Observou-se igualmente neste espectro, sinais que evidenciaram a presença de compostos com esqueleto iridoídico, entretanto, com intensidade menor que os sinais presentes dos arilpropanóides glicosilados. Indicando que esta última classe de substâncias, nesta fração, se encontra em concentrações mais elevadas que a dos iridóides.

Ainda em relação aos aril propanóides, o espectro desta fração evidenciou o sinal relativo ao tripleto em  $\delta$  2,81 ppm referente ao hidrogênio H-7''', e o dubleto em  $\delta$  1,02 ppm referente aos hidrogênios do metila C-6'' da ramnose. Os singletos entre  $\delta$  3,87 e 3,33 ppm, indicaram tanto a presença das metoxilas do anel aromático do arilpropanóide glicosilado quanto do iridóide glicosilado, assim como as hidroxilas destes e dos demais compostos já citados anteriormente.

Os sinais do espectro da ipolamiida (Espectro 18, pág. 82) são claramente observados no espectro desta fração pelo singleto em  $\delta$  1,19 ppm referente ao H10 da metila geminal a hidroxila do anel pentacíclico deste iridóide, assim como os singletos em

d 2,46 e 5,80 ppm que referenciam ainda, respectivamente, os hidrogênios H-9 e H-1 deste iridóide majoritário.

Os sinais na região entre d 5,0-5,85 ppm indicaram a presença de hidrogênios olefínicos de iridóides possuidores de ligações duplas entre os carbonos C-6-C-7, C-7-C-8 e C-8-C-10, como verificado, respectivamente, em iridóides do tipo monotropeina, 6-O-acetilscandosídeo e ugandosídeo (H-7, d= 5,86 ppm; H-8 d= 5,82 ppm; H-10 d= 5,19 ppm) (Futuro, D. 1997). Estes sinais podem ser visualizados nos espectros das frações 51-56 e 57-64 (Espectro 1, pág. 60; Espectro 6, pág.60), em fase de identificação.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração n-butanol (Espectro 4, pág. 59), apresentou uma reduzida variabilidade de substâncias expressa pelos seus sinais, quando comparado ao espectro de  $^1\text{H}$  da fração acetato de etila.

Os singletos em d 7,46; 5,80; 3,75; 2,45 e 1,12 ppm são análogos aos observados no espectro da ipolamiida (Espectro 18, pág.82) presentes na fração acetato de etila, onde esta substância foi isolada. O que induz acreditar na presença majoritária desta substância na fração n-butanólica, já que não foi observada a presença do duplo dubleto em d 4,19 ppm correspondente ao hidrogênio H6 característico do iridóide 6- $\beta$ -hidroxiipolamiida. Estes sinais diferenciam ambos os iridóides. Esta fração apresentou ainda, sinais entre d 5,0 e 5,80 ppm que podem referenciar a presença dos iridóides minoritários já mencionados, observados na fração acetato de etila.

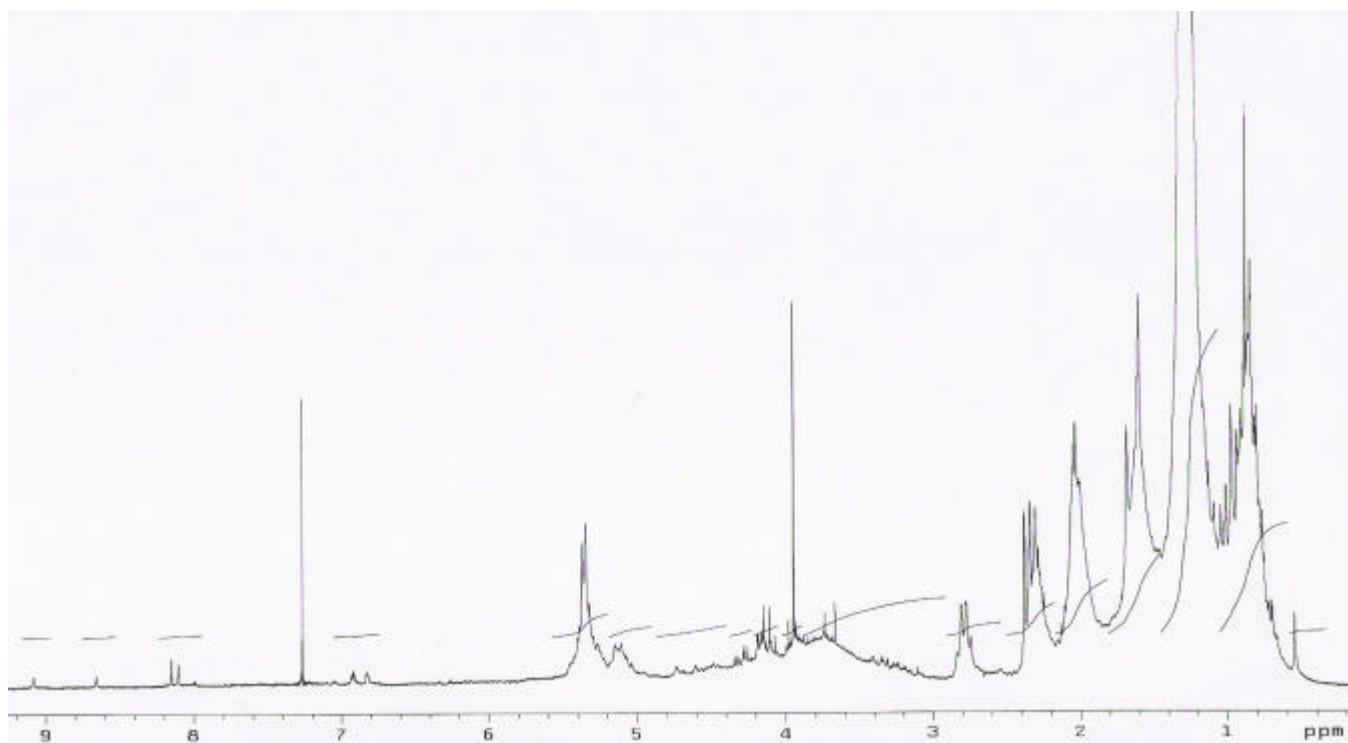
Os sinais entre d 6,20 –7,20 ppm identificam os compostos do tipo aril propanóides glicosilados com seus hidrogênios aromáticos e olefínicos no espectro. Assim como o dubleto em d 1,04 ppm referente aos hidrogênios H-6" do grupo metil, e o tripleto largo em 2,80 ppm referente ao hidrogênio H-7 da porção 3,4-diidroxifeniletla do esqueleto fenilpropanóide.

A menor intensidade destes sinais frente a maior intensidade dos sinais do iridóide do tipo ipolamiida, demonstrou ser esta fração portadora de uma maior concentração desta última classe de substâncias, como observado no espectro de  $^1\text{H}$  desta fração.

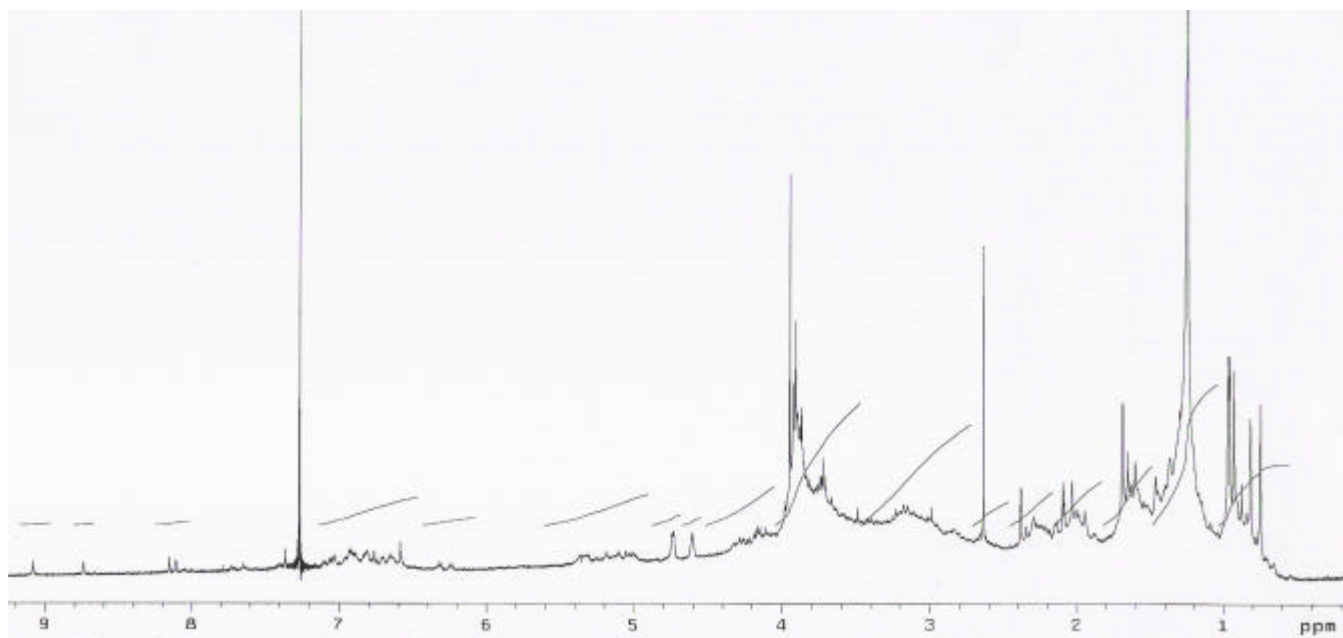
A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração hexânica (Espectro 1, pág.58) permitiu sugerir a presença de hidrogênios de metilas entre d 0,66 e 1,04 ppm, hidrogênios olefínicos em d 5,03 ppm e hidrogênios de metoxila em d 3,92 ppm que podem indicar a presença de substâncias de natureza alifática com duplas ligações e mesmo de triterpenos.

Já a fração clorofórmica apresentou em seu espectro de  $^1\text{H}$  (Espectro 2, pág.58) sinais de multipletos de prótons aromáticos e, possivelmente, de prótons olefínicos entre d

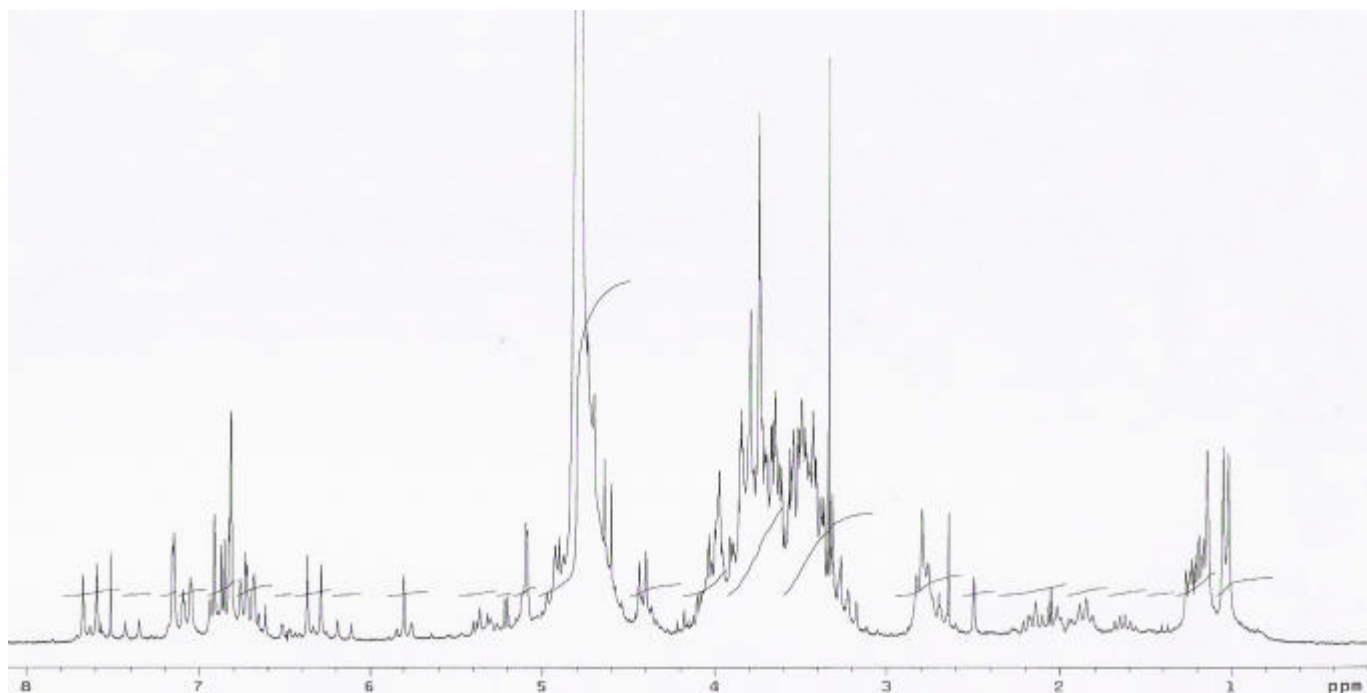
6,20 e 7,80 ppm. Entre d 0,72-1,20 ppm, contata-se a ocorrência de hidrogênios de metilas que podem pertencer a presença de substâncias de natureza alifática. Entretanto, como a amostra foi manipulada com n-butanol, pode-se notar traços deste solvente em sinais que aludem sua presença pelo grupo metílico em d 0,88 ppm (3H, *t*,  $J= 7,23$  Hz) e pelos grupos metilênicos entre d 1,30-1,70 ppm (*m*). Os sinais de dois singletos entre d 8,20-9,20 ppm e de um singlete e dubleto, respectivamente, em 8,16 e 8,10 ppm sugerem a presença de hidrogênios pertencentes a diferentes classes de substâncias, porém, com menor concentração, comparados aos iridóides e fenil propanóides já citados. Estes mesmos sinais, tidos nestas regiões, podem ser observados na fração hexânica, contudo, com menor intensidade.



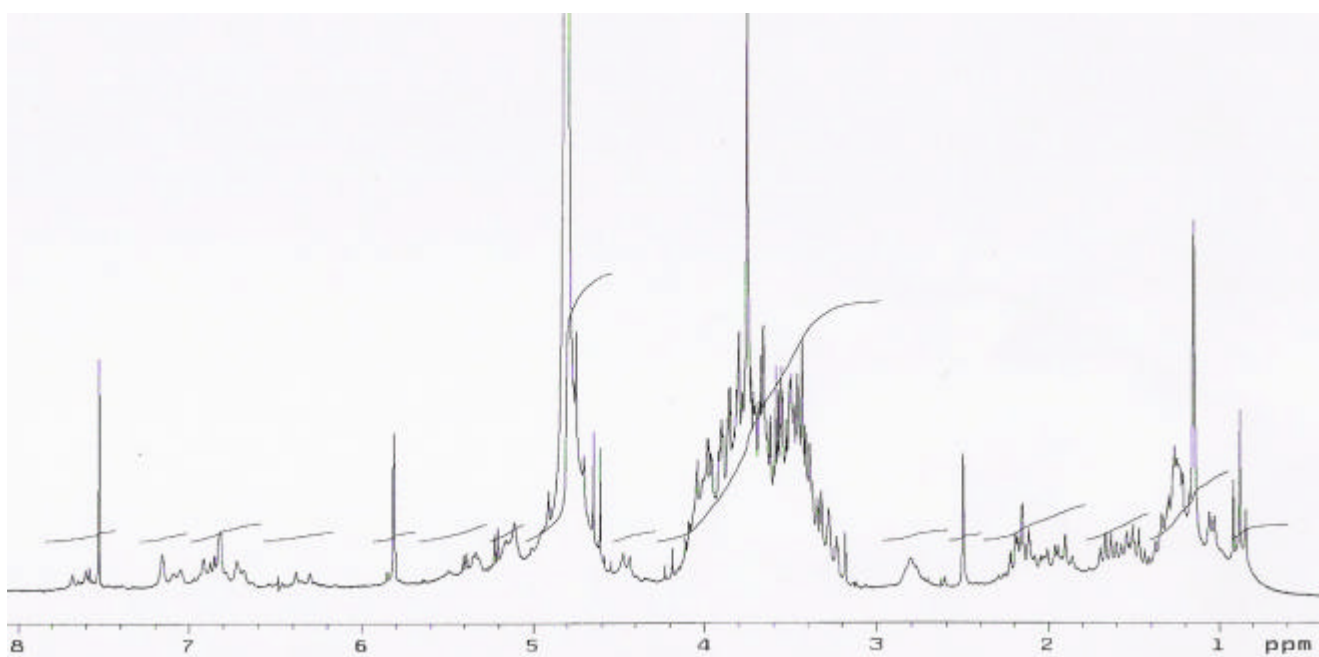
**Espectro 1: Espectro Fração Hexano (200 MHz, D<sub>2</sub>O)**



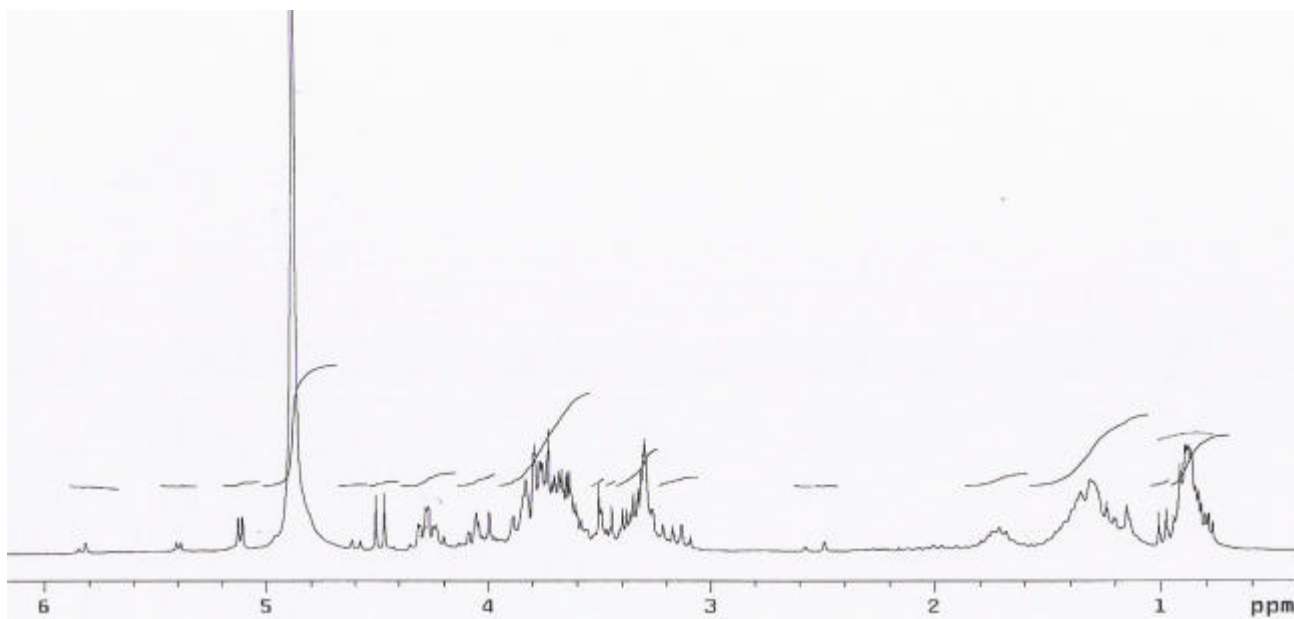
**Espectro 2: Espectro Fração Clorofórmio (200 MHz, D<sub>2</sub>O)**



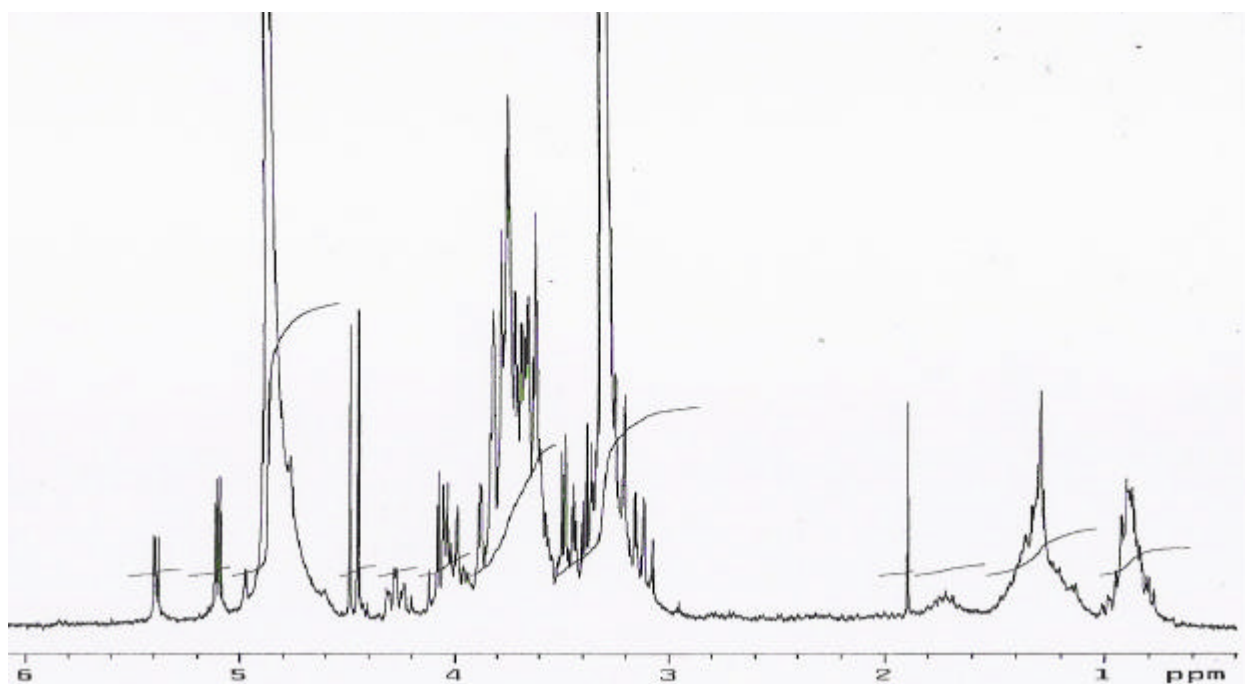
**Espectro 3: Espectro Fração Acetato de Etila (200 MHz, D<sub>2</sub>O)**



**Espectro 4: Espectro da Fração Butanólica (200 MHz, D<sub>2</sub>O)**



**Espectro 5: Espectro fração 51-56 (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**

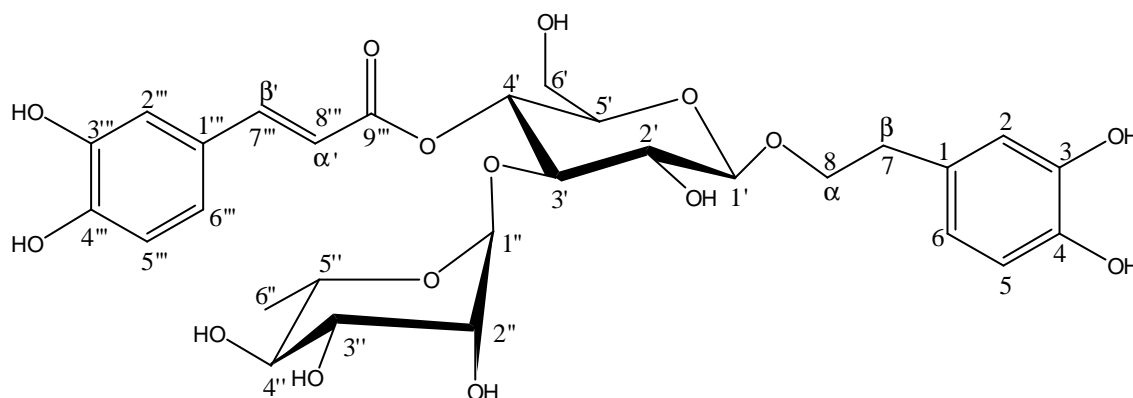


**Espectro 6: Espectro fração 57-64 (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**

### 4.3 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas da Fração Acetato de Etila de *S.cayennensis* (Rich.) Vahl

#### 4.3.1 Determinação Estrutural do Fenilpropanóide glicosilado (I)

A purificação da fração acetato de etila (Esquema 2, pag. 38) por cromatografia contracorrente (HSCCC), conduziu ao isolamento de uma substância presente no sistema B (Figura 12, pag 54) que, de acordo com as análises dos dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , demonstrou tratar-se da seguinte estrutura:



**Substância I**

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância I (Espectro 7, pág.66) foram observados sinais com dubletos de prótons vicinais *trans*-olefínicos,  $J= 12-18$  Hz, com suas respectivas constantes de acoplamentos e deslocamentos químicos em 6,28 ppm (1H,*d*, H-7''',  $J= 15,7$  Hz) e 7,60 ppm (1H,*d*, H-8''',  $J= 15,7$  Hz).

Este último sinal deslocado em campo mais baixo, comparativamente ao próton H-8''', foi atribuído pelo efeito de desblindamento ocasionado pela ressonância de seu carbono com o grupo carbonila do éster, indicado pelo espectro de carbono RMN  $^{13}\text{C}$  em 168,2 ppm (Espectro 10, pág.67). Este espectro confirmou ainda a posição desses carbonos olefínicos, em 147,9 ppm para C-8''' e 114,5 ppm para C-7'''.

Os sinais na região entre 6,54 - 7,12 ppm indicaram a presença de prótons aromáticos, conforme o valor de suas constantes de acoplamento, com duas unidades de um sistema ABC, correspondendo a dois anéis de benzeno tri-substituídos. Um deles, refere-se ao grupamento benzeno 1,3,4 –tri-substituído do 3,4-diidroxifenila, enquanto que o outro sistema foi atribuído ao grupamento 1''',3''',4''' – tri-substituído do ácido ferúlico, quando comparado aos dados da literatura consultada (Zhongjian, J. *et al.* 1991).

O padrão de substituição de ambos os anéis aromáticos nos carbonos 3''', 4''' e 3, 4, respectivamente, com seus hidrogênios em *meta* e *orto* foram identificados através de suas constantes de acoplamento ( $J$ ) e de seus substituintes: ( $\delta$  7,03 ppm,  $d$ ,  $J=1,8$  Hz, H-2''');  $\delta$  6,78 ppm,  $d$ ,  $J=8,0$  Hz, H-5''');  $\delta$  6,96 ppm,  $d,d$   $J= 8,4$  e  $1,8$  Hz, H-6'''); ( $\delta$  6,70 ppm,  $d$ ,  $J= 1,8$  Hz, H-2;  $\delta$  6,80 ppm,  $d$ ,  $J= 8,0$  Hz, H-5;  $\delta$  6,56ppm,  $d, d$ ,  $J=1,8; 8,0$  Hz, H-6).

Esses substituintes, dois grupos hidroxila (-OH), puderam ser confirmados quando comparados com os deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos di e mono-substituídos quando confrontados com os dados da literatura consultada (Tabela 10, pág. 65).

A porção glicosila foi tomada como unidade intermediária entre as porções cafeoila e 3,4-diidroxifeniletla, pelo valor dos deslocamentos químicos de seus carbonos C-1'anomérico dioximetínico -O-CH-O-C-1' em  $\delta = 103,9$  ppm, em campo baixo, e C-4' metínico em  $\delta = 70,2$  ppm.

O local da acilação no carbono metínico C-4' (Espectro 10, pág.67) deste resíduo de açúcar pôde ser confirmado através de seu valor em campo baixo quando comparado ao carbono oximetilênico C-6', 62,2 ppm, em campo alto, frente aos dados da literatura consultada (Shimomura, H. *et al.* 1987), (Agrawal, K. P. 1992) e (Tabela 10 pág, 65).

O deslocamento de C-1'anomérico, desta porção glicosila, pode ser justificado pelo aumento de sua constante de proteção para-magnética ( $\sigma_p$ ) em função da repulsão de seus elétrons mais externos, influenciados pelos elétrons de ambos os oxigênios que o ladeiam, aproximando-os assim de seu núcleo. Aumentando, portanto, para campo mais baixo, o sinal do deslocamento químico deste carbono. Os demais deslocamentos químicos dos carbonos influenciados diretamente pelo grupo -OH, foram confirmados por comparação aos dados da literatura, revelando outra unidade de açúcar na molécula conforme a região de  $\delta$  62,2 – 103,9 ppm do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 10, pág 65).

Em estruturas contendo carboidratos, como no caso desta substância, os sinais de seus prótons aparecem em uma região muito reduzida, em torno de 3,0 - 5,5 ppm, contendo comumente problemas de sobreposição de seus sinais. Justo porque, muitas constantes de acoplamento entre prótons vicinais e geminais não-anoméricos, são muito similares bem como o alcance de seus deslocamentos químicos dificultando assim suas interpretações (Agrawal, K.P. 1992).



Estes problemas de sobreposição surgem na maior parte pelos grupos metínicos ( $-CH_3$ ) e metilênicos ( $-CH_2$ ) de carbonos não-anoméricos do açúcar, ao qual possuem um deslocamento químico muito similar em diferentes resíduos de monossacarídeos (Agrawal, K.P. 1992). Esta sobreposição de sinais, na forma de multipletos, foi constatada no espectro de  $^1H$  da substância na região de 3,28 a 4,10 ppm, dificultando a precisão de sua análise (Espectro 8, pág 66).

Entretanto, através dos cálculos de deslocamentos químicos (Silverstein, M.R *et al.* 1994), conforme efeitos de substituição, para prótons de sistemas  $\alpha$  e  $\beta$  alifáticos pôde-se confirmar o acoplamento dos prótons de um tripleto em  $\delta$  2,80 ppm com  $J= 7,1$  Hz, atribuído aos hidrogênios metilênicos H7a, H7b na porção 3,4 -diidroxifenil, com os hidrogênios metilênicos H-8a, H-8b em campo mais baixo, segundo o tripleto presente em  $\delta$  3,70 ppm com  $J= 9,5$  Hz.

Na região entre 4,90 – 4,98 ppm, deste espectro, observou-se o sinal de um outro tripleto em campo alto semi-encoberto por um sinal largo próximo a esta região, ocasionado pela água presente na amostra associada ao solvente metanol deuterado. A presença deste sinal indicou ser o hidrogênio H-4' de um açúcar ligado a porção cafeoila com uma constante de acoplamento de  $J= 9,3$  Hz.

A literatura consultada (Zhongjian, J.*et al.* 1991) apresenta este tripleto em 4,90 ppm com uma constante de acoplamento de  $J= 9,3$  Hz, condizente com a faixa de valores de uma interação entre hidrogênios de ciclohexanos orientados axialmente um em relação ao outro  $J= 8-14$  Hz. No caso desta substância, H-4' interagindo axialmente com H-3' e H-5'.

Quanto à análise conformacional do próton anomérico dos açúcares, a literatura consultada (Agrawal, K.P. 1992) explicita ainda que prótons  $\alpha$ -anoméricos aparecem como um dubleto em campo baixo  $\delta$  4,80-5,30 ppm com  $J= 1,0- 4,0$  Hz; enquanto que prótons  $\beta$ -anoméricos aparecem como um dubleto entre 4,40- 4,80 ppm em torno de (6,0- 8,0 Hz) em monossacarídeos.

Portanto, a conformação  $\beta$  desse açúcar foi atribuída pelo valor da constante de acoplamento apresentado pelo sinal do dubleto,  $J= 7,7$  Hz, do hidrogênio anomérico H-1' interagindo axialmente com H-2', em  $\delta$  4,38 ppm.

Os hidrogênios metilênicos H-6a', H-6b' da glicose, por serem vicinais ao hidrogênio H-5', de um carbono quiral do anel hexacíclico, indicaram seus acoplamentos

geminais com  $J = 9,5$  Hz, com diferentes deslocamentos químicos presentes em seus dubletos em  $\delta = 3,72$  e  $3,42$  ppm.

O segundo piranosídeo da unidade do açúcar, identificado como sendo a  $\alpha$ -L-rhamnose, pôde ser caracterizado tanto pelo dubleto de seu próton anomérico H-1'', deslocado em  $\delta = 5,21$  ppm ( $J = 1,6$  Hz) com seu carbono anomérico C-1'' em  $102,8$  ppm, bem como pelo dubleto dos prótons H-6'' em  $1,10$  ppm ( $J = 5,8$  Hz) do grupo metil, C-6'' em  $18,3$  ppm (Agrawal, K.P. 1992).

Os demais valores relativos aos sinais dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e APT dos átomos de carbono da substância I (Espectro 10 e 9, pág.67) foram confrontados de acordo com os dados da literatura consultada (Zhongjian, J. *et al.* 1991), (Futuro, D. 1997), expostos na Tabela 10 (pág. 65).

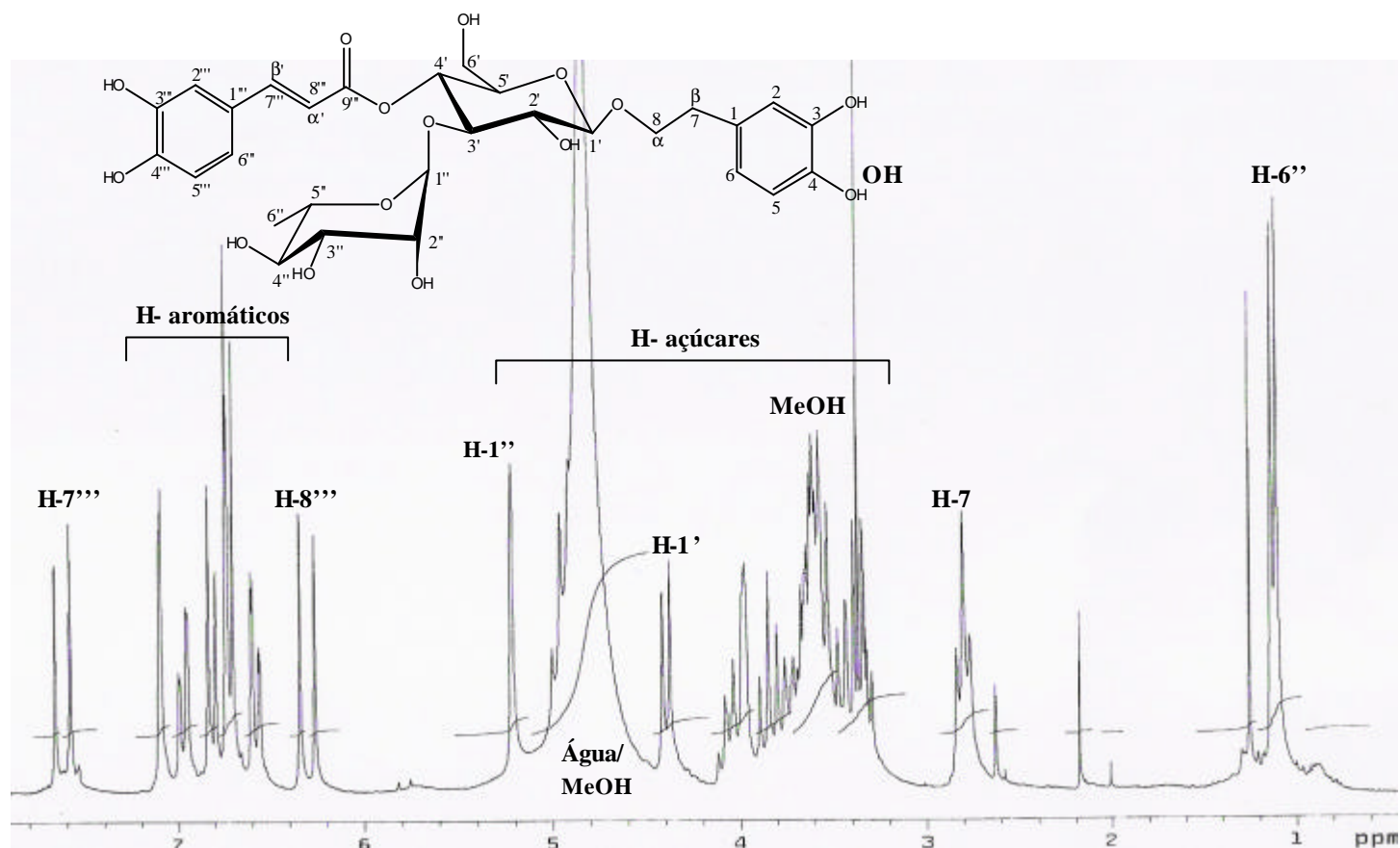
Estes dados, à luz das análises espectrométricas citadas, permitiram identificar o substância I como sendo o verbascosídeo,  $\beta$ -3',4'-diidroxifenil-etil-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-4-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

Tabela 10: Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  d ppm, Hz) e de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância I, em comparação com dados espectrais da literatura <sup>a, b</sup>

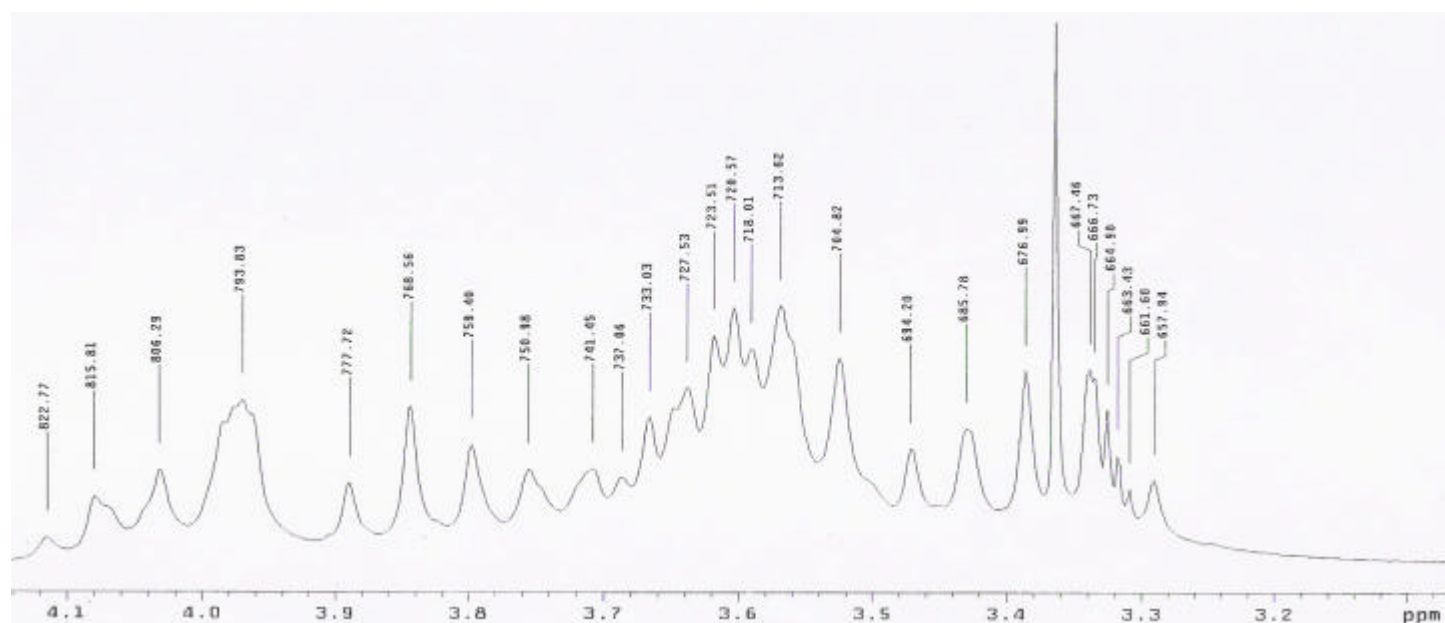
| Verbascosídeo <sup>a</sup><br>( $\text{DMSO}-d_6 + \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) |                   |                              | Verbascosídeo <sup>b</sup> |  | Substância I      |  |
|--|-------------------|------------------------------|----------------------------|--|-------------------|--|
| C  | d $^{13}\text{C}$ | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz) | d $^{13}\text{C}$          | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz)                         | d $^{13}\text{C}$ | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz)           |
| <b>3,4-diidroxifeniletíl</b>   |                   |                              |                            |  |                   |  |
| 1  | 131,5             |                              | 131,4                      |  | 131,4             |  |
| 2  | 117,5             | 6,62                         | 116,5                      | 6,68 (dp)  | 117,0             | 6,70 (d, J = 1,8)                      |
| 3  | 145,5             |                              | 146,1                      |  | 145,8             |  |
| 4  | 144,1             |                              | 146,6                      |  | 144,4             |  |
| 5  | 116,8             | 6,48 (d, J = 8,0)            | 116,3                      | 6,66 (d, J = 8,1)                                    | 116,3             | 6,67 (d, J = 8,0)                      |
| 6  | 121,6             | 6,62 (d, J = 8,0)            | 121,2                      | 6,56 (dd, J = 8,1; 1,8)                              | 121,2             | 6,56 (dd, J = 8,0; 1,8)                |
| 7  | 35,9              | 2,72 (m J = 8,0; 9,0)        | 36,5                       | 2,78 (t, J = 7,5)                                    | 36,3              | 2,80 (t, J = 7,1)                      |
| 8  | 72,0              | 3,60 (m)<br>3,88 (m)         | 72,2                       | 3,70 (dd, J = 7,5; 13,1)<br>4,04 (dd, J = 7,5; 16,8) | 72,1              | 3,70 (d, J = 9,5)<br>4,05 (d, J = 9,5) |
| <b>Cafeoil</b>   |                   |                              |                            |  |                   |  |
| 1 <sup>'''</sup>   | 127,7             |                              | 127,6                      |  | 127,4             |  |
| 2 <sup>'''</sup>   | 115,7             | 7,00                         | 115,2                      | 7,04 (d, J = 1,9)                                    | 115,2             | 7,03 (d, J = 1,8)                      |
| 3 <sup>'''</sup>   | 146,3             |                              | 146,8                      |  | 146,5             |  |
| 4 <sup>'''</sup>   | 149,3             |                              | 149,8                      |  | 149,5             |  |
| 5 <sup>'''</sup>   | 114,7             | 6,76 (d, J = 8,0)            | 117,1                      | 6,76 (d, J = 8,1)                                    | 116,5             | 6,78 (d, J = 8,0)                      |
| 6 <sup>'''</sup>   | 123,3             |                              | 123,2                      | 6,94 (dd, J = 8,6; 1,7)                              | 123,1             | 6,96 (dd J = 8,4; 1,8)                 |
| 7 <sup>'''</sup>   | 148,0             | 6,48 (d, J = 8,0)            | 114,7                      | 6,26 (d, J = 15,9)                                   | 114,5             | 6,28 (d, J = 15,7)                     |
| 8 <sup>'''</sup>   | 117,0             | 6,62 (d J = 8,0)             | 148,0                      | 7,58 (d, J = 15,8)                                   | 147,9             | 7,60 (d, J = 15,7)                     |
| COO  | 169,5             |                              | 168,6                      |  | 168,2             |  |
| <b>Glicosila</b>   |                   |                              |                            |  |                   |  |
| 1 <sup>'</sup>   | 102,4             | 4,33 (d, J = 7,5)            | 104,2                      | 4,37 (d, J = 7,8)                                    | 103,9             | 4,38 (d, J = 7,7)                      |
| 2 <sup>'</sup>   | 74,6              | 3,22 (dd, J = 7,5; 9,0)      | 76,0                       |  | 75,7              | 3,32 (dd, J = 4,0; 3,6)                |
| 3 <sup>'</sup>   | 79,1              | 3,70 (t, 9-9,5)              | 81,6                       | 3,81 (t, J = 9,3)                                    | 81,6              | 3,84 (t, J = 9,1)                      |
| 4 <sup>'</sup>   | 69,1              | 4,72 (t, 9,5)                | 70,4                       | 4,91 (t, J = 9,4)                                    | 70,2              | 4,90 (t, J = 9,3)                      |
| 5 <sup>'</sup>   | 74,6              | 3,45 (m)                     | 76,1                       |  | 75,9              | 3,43 (t, J = 8,4)                      |
| 6 <sup>'</sup>   | 60,7              | ~ 3,70; 3,45                 | 62,3                       |  | 62,2              | ~ 3,72; 3,42 (m)                       |
| <b>Rhamnosila</b>  |                   |                              |                            |  |                   |  |
| 1 <sup>''</sup>  | 101,2             | 5,03 (d, J = 1,0)            | 103,0                      | 5,18 (d, J = 1,3)                                    | 102,8             | 5,21 (d, J = 1,6)                      |
| 2 <sup>''</sup>  | 70,6              | 3,70 (dd, J = 1,0; 2,5)      | 72,0                       |  | 72,0              | 3,60 (t, J = 2,9)                      |
| 3 <sup>''</sup>  | 70,5              | 3,30 (dd, J = 2,5; 9,5)      | 72,3                       |  | 71,9              | 3,30 (m)                               |
| 4 <sup>''</sup>  | 71,8              | 3,12 (t, J = 9,5)            | 73,7                       |  | 73,6              |  |
| 5 <sup>''</sup>  | 68,8              | 3,60 (m)                     | 70,5                       | 1,12 (d, J = 5,9)                                    | 70,4              |  |
| 6 <sup>''</sup>  | 18,1              | 1,01 (d, J = 6,0)            | 18,4                       | 1,08 (d, J = 6,1)                                    | 18,3              | 1,10 (d, J = 5,8)                      |

a-(Zhongjian, J. *et al.* 1991)

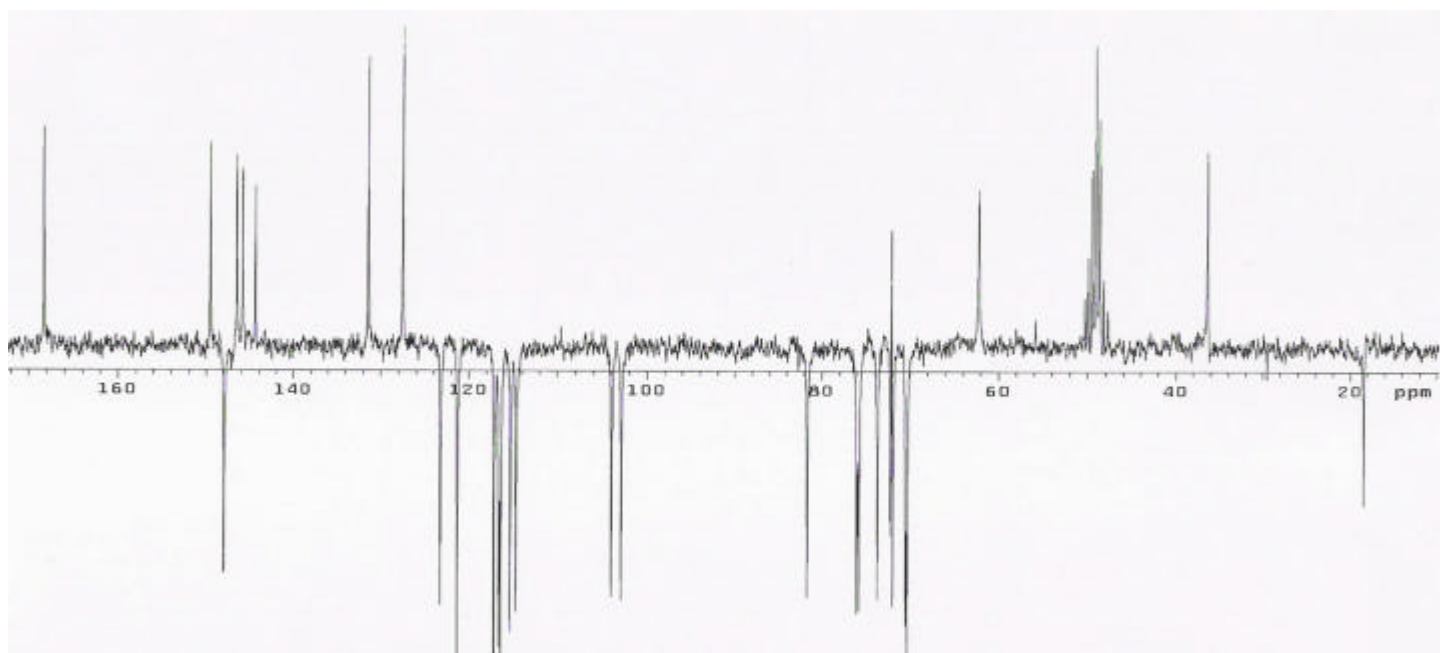
b- (Futuro, D. 1997)



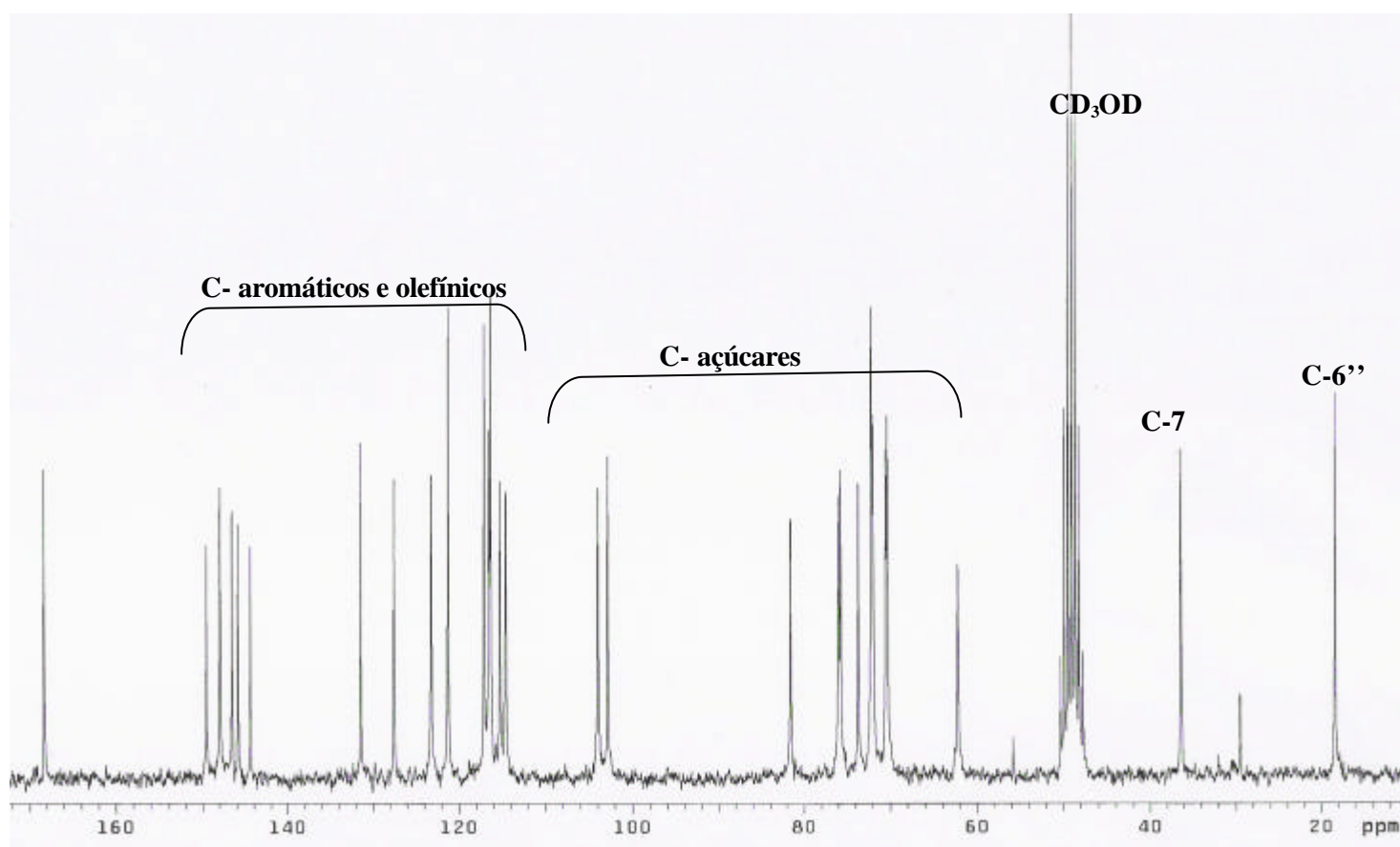
**Espectro 7: Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância I (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**



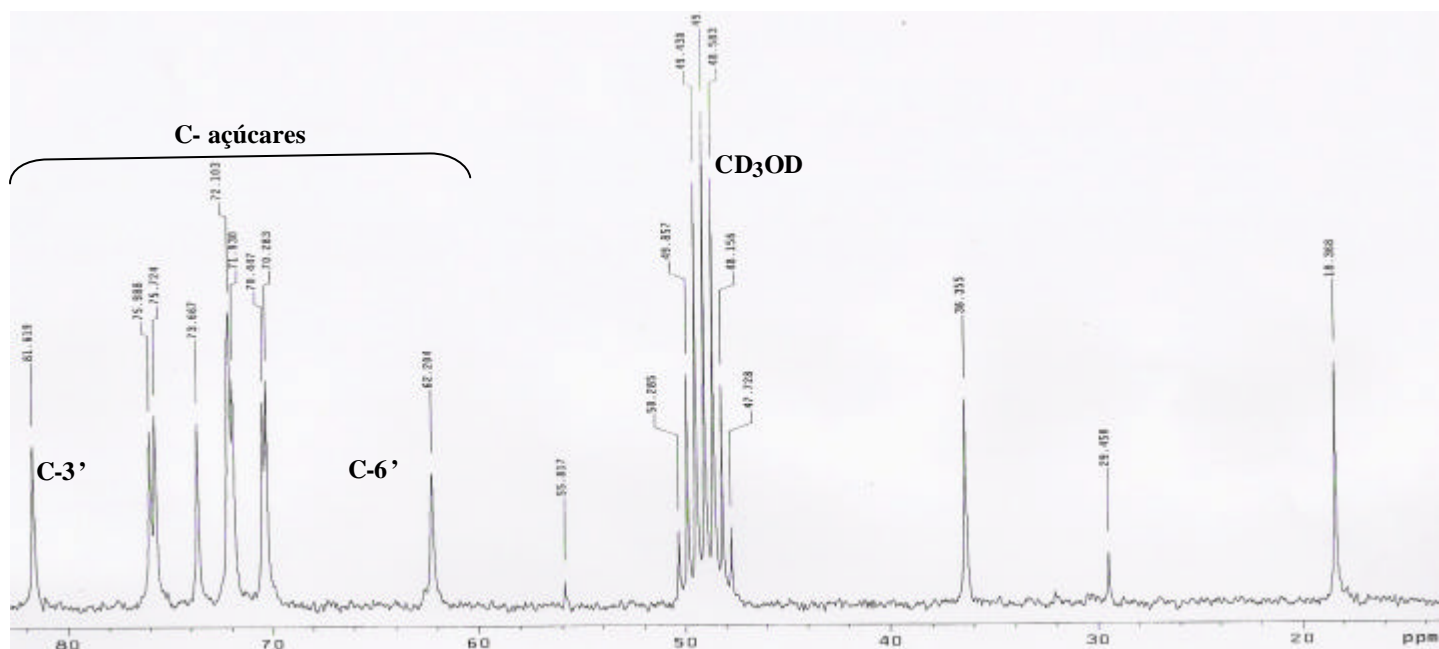
**Espectro 8: Expansão (d<sub>H</sub> 3,2- 4,1 ppm) do espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância I. (200MHz, CD<sub>3</sub>OD)**



**Espectro 9: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (APT:  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}$  para baixo;  $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}$  para cima) da substância I. (200MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



**Espectro 10: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância I. (50MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**

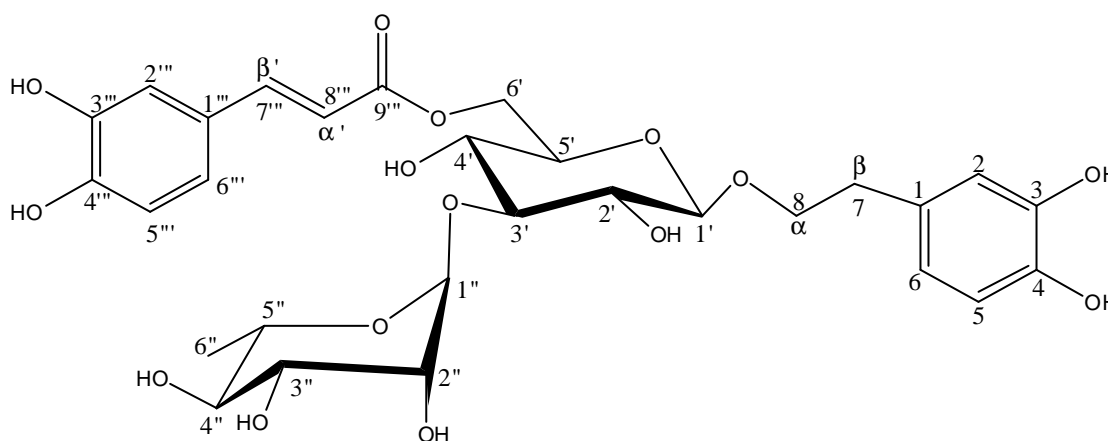


Espectro 11: Expansão (d<sub>H</sub> 20- 82 ppm) do espectro de RMN <sup>13</sup>C da substância I. (200MHz, CD<sub>3</sub>OD)

#### 4.3.2 Determinação Estrutural do Fenilpropanóide glicosilado (II)

Comparação dos sinais e deslocamentos químicos dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C da substância arilpropanoide glicosilado, Verbascosídeo, com a da substância II, (Tabela 11, pág.71), obtido do sistema B no aparelho contracorrente (Figura 12, pág 54), evidenciou a estreita similaridade entre ambos os espectros.

Tais informações direcionaram sua determinação estrutural, sugerindo a substância abaixo:



Substância II

Assim como no verbascosídeo, observou-se para a substância II as unidades do dissacarídeo (glicose e rhamnose), a do ácido cafeico, bem como a porção 3,4-diidroxifenil-etila (Tabela 11, pag 71).

O espectro de  $^1\text{H}$  MNR (Espectro 12, pág. 72 revelou, portanto, os prótons aromáticos em dois sistemas ABC: (d 7,03ppm,  $d$ ,  $J=2,0$  Hz, H-2''; d 6,76 ppm,  $d$ ,  $J= 8,1$  Hz, H-5''; d 6,89 ppm,  $d,d$ ,  $J=2,0$ ; 8,3 Hz, H-6''') para o sistema 3'', 4''; e (d 6,65 ppm,  $d$ ,  $J= 2,0$  Hz, H-2; d 6,62 ppm,  $d$ ,  $J= 8,0$  Hz, H-5; d 6,52 ppm,  $dd$ ,  $J=2,0$ , 8,0 Hz H-6), para o sistema 3,4. O sistema *trans*-olefínico apresentou sinais em: d 7,56 ppm,  $d$ ,  $J=15,9$  Hz, para o carbono C-7'' e d 6,27 ppm,  $d$ ,  $J=15,9$  Hz para o carbono C-8''.

O tripleto em d 2,76 ppm pode ser atribuído aos prótons H7 do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) da ramificação da cadeia aromática feniletila, enquanto os sinais dos dois prótons metilênicos H-8, encontram-se encobertos pelo multiplete entre d 3,60- 3,74 ppm (Espectro 13, pág.72).

O hidrogênio anomérico (H-1'') da rhamnose, bem como seu grupo metila (de seus hidrogênios equivalentes H6'') foram claramente identificados, respectivamente, como um dubleto em d 5,56 ppm ( $J=1,5$  Hz), atribuindo-se por meio deste valor a configuração a a esse açúcar, e seu outro dubleto em d 1,23 ppm ( $J=6,2$  Hz).

A constante de acoplamento  $J= 7,8$  Hz do sinal em d 4,32 ppm foi atribuída ao próton anomérico H-1' da glicose, conferindo a configuração  $\beta$  a este açúcar. Informações adicionais dos deslocamentos químicos obtidos do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostraram sinais característicos para ambos os açúcares, referentes aos carbonos C-5' d 75,70 ppm da glicose e C-5'' d 70,33 ppm da rhamnose, conforme dados da literatura (Agrawal, P.K. 1992).

Na região entre d 4,40-4,54 ppm no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , constatou-se a presença de duplos dubletos ( $J=1,8$ ; 1,6 e 11,9 Hz), atribuídos aos hidrogênios metilenos H-6'a e H-6'-b da glicose (Shimomura, H. *et al.* 1987). O que mostrou um deslocamento químico em campo mais baixo, cerca de 0,65 ppm, bem como apresentando feições de sinais diferenciados quando comparado ao espectro de próton do verbascosídeo, tomado como uma das referências em sua elucidação (Tabela 11, pág 71).

O deslocamento químico dos sinais desses hidrogênios metilênicos e do carbono C-6', 64,6 ppm, indicaram como sendo este o local da acilação da glicose ligada ao grupamento do ácido cafeico, quando comparado aos dados da literatura (Tabela 11, pág, 71).

O local desta acilação pôde ser justificado pelo deslocamento do sinal em campo um pouco mais baixo de C-6' em d 64,6 ppm quando comparado ao verbascosídeo (C-6' = 62,2 ppm) devido ao efeito de desproteção da carbonila do grupo acila ligado neste carbono. O efeito desta acilação foi observada no carbono C-3' da glicose, para campo mais baixo d 83,8 ppm, quando igualmente comparado ao verbascosídeo (C-3'= 81,6 ppm) (Tabela 11, pág 71).

Os sinais destes dois deslocamentos químicos, C-6' e C-3', no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , foram o que na verdade diferenciaram ambos os isômeros, conforme se observa nos valores da literatura (Tabela 11, pág 71). Os demais sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos açúcares, e dos hidrogênios não equivalentes H-8a e H-8b, não puderam ser determinados por causa da sobreposição de seus sinais entre d 3,30-4,44 ppm (Espectro 13, pág.72).

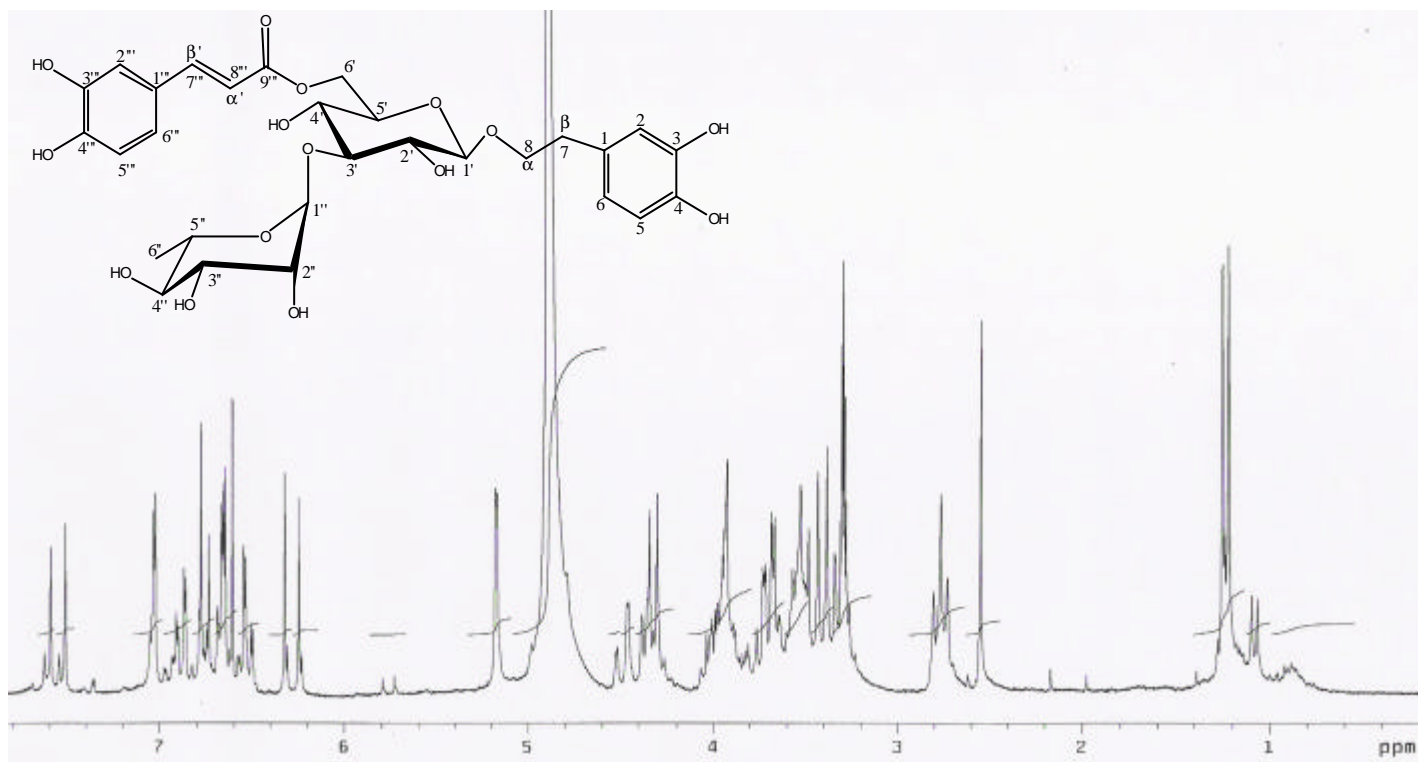
Os dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Espectros 12 e 14, pág. 72; 73) quando comparados aos dados da literatura (Tabela 11, pág. 71), identificaram a substância II como o isoverbascosídeo,  $\beta$ -3,4-diidroxifeniletíl-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.



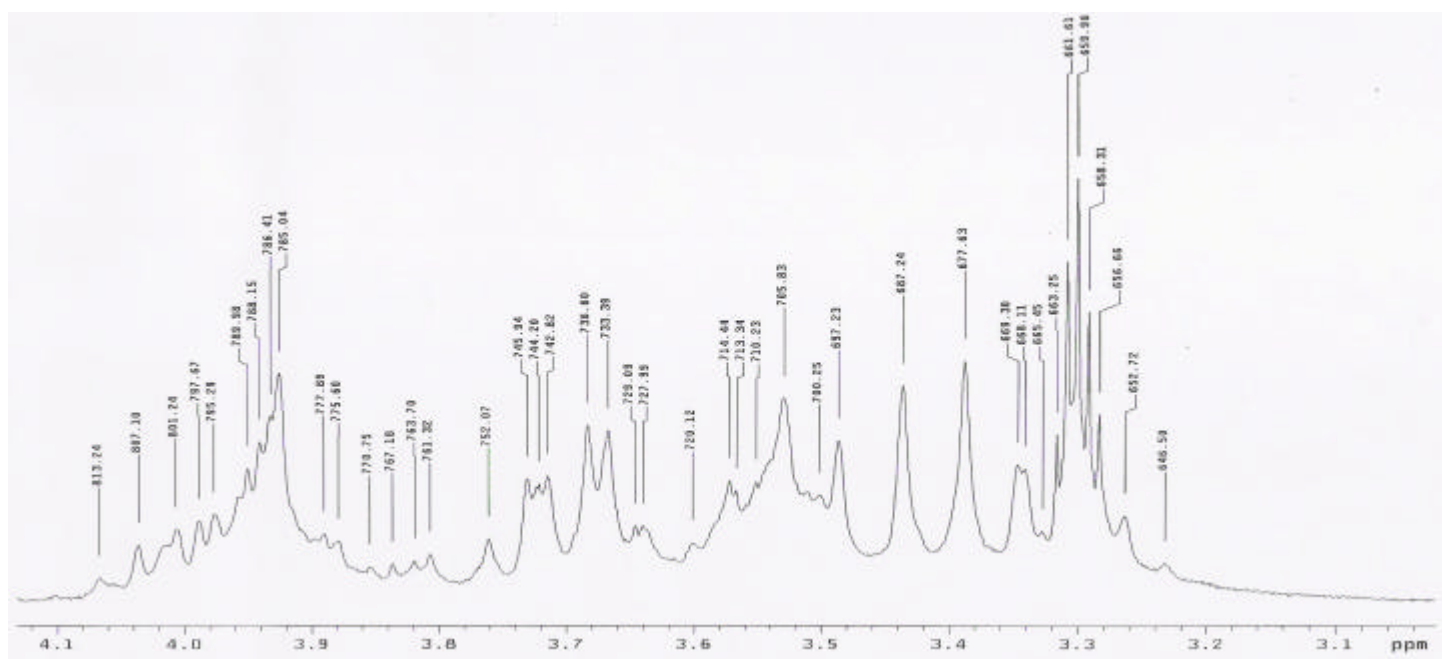
Tabela 11 Dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD d ppm, Hz) e de <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância II em comparação com dados da literatura <sup>a; b</sup>

| 2-(3,4-dihidroxifenil)-etil-(6- <i>O</i> -cafeoila)-<br>β-D-glicopiranosídeo <sup>a</sup> |                   |  | Isoverbascosídeo <sup>b</sup> |                                    | Substância II     |  |
|---|-------------------|--|-------------------------------|------------------------------------|-------------------|--|
| C   | d <sup>13</sup> C | d <sup>1</sup> H (mult., J Hz)   | d <sup>13</sup> C             | d <sup>1</sup> H (mult., J Hz)     | d <sup>13</sup> C | d <sup>1</sup> H (mult., J Hz)   |
| <b>3,4-diidroxifeniletíl</b>  |                   |  |                               |                                    |                   |  |
| 1   | 131,5             |  | 131,6                         |                                    | 131,3             |  |
| 2   | 116,4             | 6,67 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)  | 116,6                         | 6,78 ( <i>s</i> )                  | 116,3             | 6,65 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)  |
| 3   | 146,1             |  | 146,3                         |                                    | 146,1             |  |
| 4   | 144,6             |  | 144,8                         |                                    | 144,6             |  |
| 5   | 117,1             | 6,63 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)  | 117,3                         |                                    | 117,0             | 6,62 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)  |
| 6   | 121,3             | 6,53 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 2,0)  | 121,5                         | 6,53 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)  | 121,2             | 6,52 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 2,0)  |
| 7   | 36,7              | 2,72 ( <i>m</i> )  | 36,9                          | 2,77 ( <i>m</i> )                  | 36,6              | 2,76 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)  |
| 8   | 72,4              | 3,96 ( <i>m</i> , H-8 a)<br>3,71 ( <i>m</i> , H-8 b)                                 | 72,5                          |                                    | 72,2              | 3,60-3,74 ( <i>m</i> )   |
| <b>Cafeoil</b>  |                   |  |                               |                                    |                   |  |
| 1'''  | 127,7             |  | 127,9                         |                                    | 127,6             |  |
| 2'''  | 115,7             |  | 115,3                         | 7,04 ( <i>s</i> )                  | 115,0             | 7,03 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,0)   |
| 3'''  | 146,3             |  | 147,0                         |                                    | 146,7             |  |
| 4'''  | 149,3             |  | 149,8                         |                                    | 149,6             |  |
| 5'''  | 114,7             | 6,76 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)  | 116,8                         | 6,96 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,5)  | 116,5             | 6,76 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)  |
| 6'''  | 123,3             | 6,88 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2; 2,0)  | 123,4                         | 6,89 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,5)  | 123,1             | 6,89 ( <i>dd</i> <i>J</i> = 8,3; 2,0)  |
| 7'''  | 148,0             | 7,56 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)  | 147,5                         | 7,56 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,8) | 147,2             | 7,56 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)   |
| 8'''  | 117,0             | 6,28 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)   | 115,1                         | 6,29 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,8) | 114,7             | 6,27 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)   |
| COO   | 169,2             |  | 169,4                         |                                    | 169,1             |  |
| <b>Glicosila</b>  |                   |  |                               |                                    |                   |  |
| 1'  | 104,5             | 4,32 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,9)  | 104,6                         | 4,34 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,4)  | 104,3             | 4,32 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8)  |
| 2'  | 75,1              | 3,33-3,38  | 75,6                          |                                    | 75,3              | 3,23 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)  |
| 3'  | 77,9              | 3,33-3,38  | 84,1                          |                                    | 83,8              | 3,54 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 8,6)  |
| 4'  | 71,8              | 3,21 ( <i>m</i> )  | 70,2                          |                                    | 70,0              | 3,43 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,6)  |
| 5'  | 75,4              | 3,52 ( <i>m</i> )  | 75,9                          |                                    | 75,7              | 3,70 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,4; 1,7)  |
| 6'  | 64,7              | 4,49 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,9; 2,1)<br>4,30 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,9; 6,0) | 64,5                          | 4,50 ( <i>m</i> )                  | 64,6              | 4,48 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,9; 1,8) -<br>4,34 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,9; 7,8) |
| <b>Rhamnosila</b>   |                   |  |                               |                                    |                   |  |
| 1''   | -                 | -  | 102,9                         | 5,19 ( <i>s</i> )                  | 102,6             | 5,29 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,5)  |
| 2''   | -                 | -  | 72,5                          |                                    | 72,4              | 3,66; 3,78 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,1; 9,2)  |
| 3''   | -                 | -  | 72,5                          |                                    | 72,3              | ~3,70 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,4; 3,1)   |
| 4''   | -                 | -  | 74,2                          |                                    | 73,9              | 3,80 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5; 9,4)  |
| 5''   | -                 | -  | 70,6                          |                                    | 70,3              | 3,68 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,2; 9,4)  |
| 6''   | -                 | -  | 18,1                          | 1,25 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 4,8)  | 17,8              | 1,23 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)  |

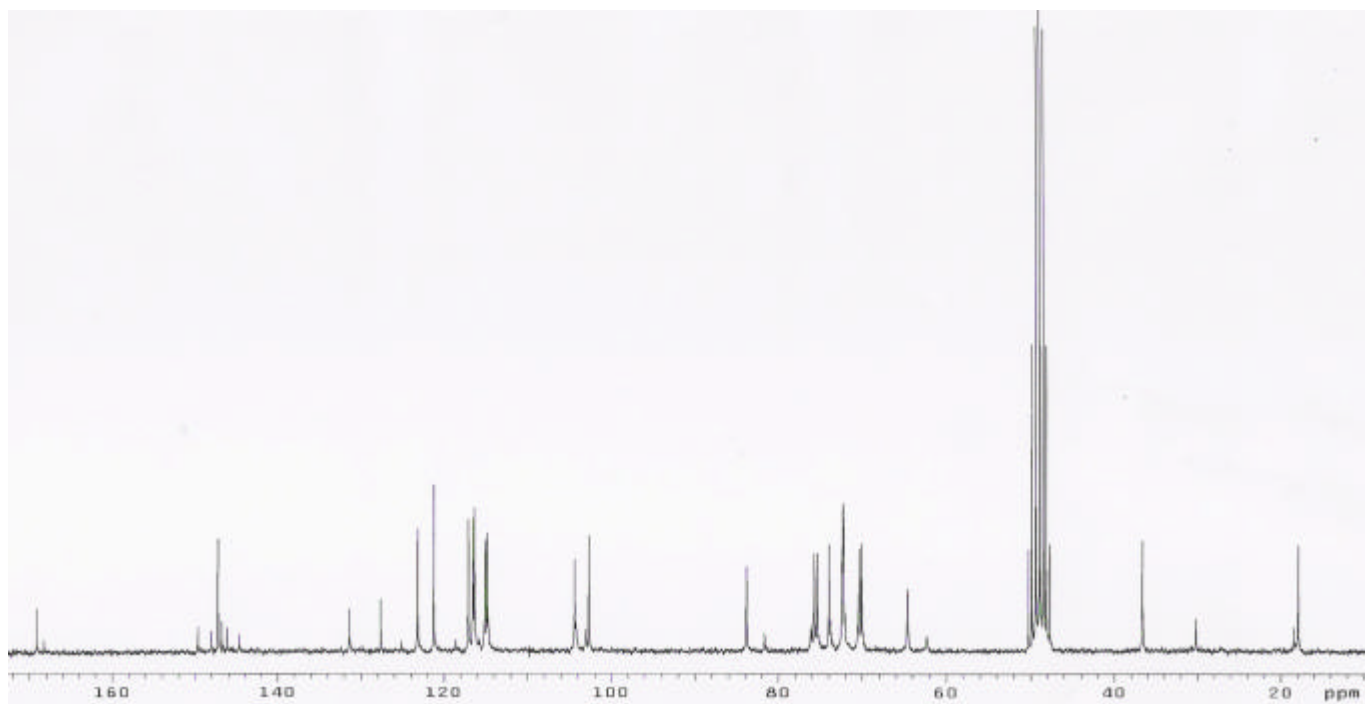
a- Shimomura, H *et al.* 1987 b- Futuro, D. 1997



Espectro 12: Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância II. (200MHz, CD<sub>3</sub>OD)



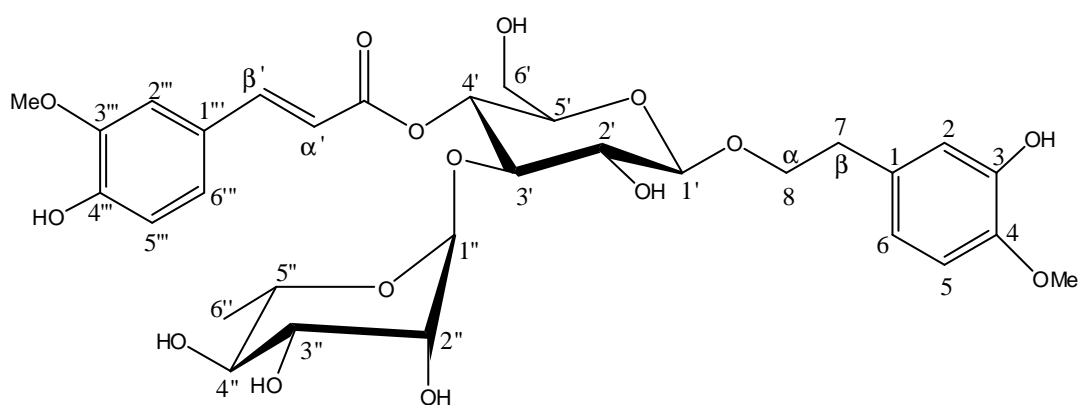
Espectro 13: Expansão ( $d_H$  3,2- 4,1 ppm) do espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância II. (200MHz, CD<sub>3</sub>OD)



**Espectro 14: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância II. (50MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**

### 4.3.3 Determinação Estrutural do Fenilpropanóide glicosilado (III)

A substância III, da fração acetato de etila (Esquema 2, pág. 38), purificada no sistema A após uso do aparelho contracorrente (CCC) (Figura 12, pág. 54), sob a ótica das análises espectrométricas de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , demonstrou tratar-se da estrutura abaixo:



**Substância III**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou 6 hidrogênios na região de aromáticos d 6,5-8,0 ppm, com constantes de acoplamento que indicaram o tipo de substituição na estrutura de ambos os anéis benzênicos. A feição desses sinais, bem como os valores de deslocamentos

químicos de ambos, corroboraram para a identificação do sistema ABC quando confrontados com os dados da literatura (Tabela 12, pág 75).

Os dois singletos com deslocamentos químicos em  $\delta$  3,87 e 3,80 ppm, sugeriram a presença de duas metoxilas (-OMe). O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 16, pág.76) confirmou o sinal desses substituintes, porém, apresentando ambos os sinais sobrepostos em  $\delta$  56,4 ppm. Os dados da literatura confirmaram ainda a posição e o tipo dos substituintes em ambos os anéis aromáticos (Tabela 12, pág 75).

Os substituintes -OH e -OMe foram localizados nos carbonos 4''', 3''' (porção feruloila) e 3, 4 (porção 3-hidroxi-4-metoxi- $\beta$ -fenil-etoxi), tendo os hidrogênios destes sistemas com seus deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos, respectivamente, em: ( $\delta$  7,19 ppm, *d*,  $J=1,5$  Hz, H-2''');  $\delta$  7,08 ppm, *dd*  $J= 1,6; 8,4$  Hz, H-6''');  $\delta$  6,81 ppm, *dd*,  $J = 1,8; 8,1$  Hz, H-5''') e ( $\delta$  6,72 ppm, *d*,  $J=1,7$  Hz, H-2;  $\delta$  6,81 ppm, *d*,  $J= 8,05$ ; H-5;  $\delta$  6,67 ppm, *dd*,  $J=1,9; 8,0$  Hz, H-6). Dois prótons olefínicos (*d*,  $\delta=7,66$  ppm H-8''', e *d*,  $\delta=6,37$  ppm H- 7''') com constantes de acoplamento  $J= 15,9$  e  $15,8$  Hz, respectivamente, indicaram um sistema AB com geometria *trans*.

A presença dos dois prótons anoméricos em  $\delta$  4,37 ppm ( $J=7,8$  Hz) e  $\delta$  5,19 ppm ( $J=1,4$  Hz), foram consistentes com as configurações  $\beta$  para a D-glicose e a para L-rhamnose, respectivamente (Agrawal, P.K. 1992)

A feição do hidrogênio H-4' foi encoberto pelo sinal largo da água e do solvente metanol presentes entre 4,75-5,0 ppm. Em 2,81 ppm o tripleto com constantes de acoplamento  $J= 7,5$  Hz indicou a presença dos hidrogênios metilênicos (-CH<sub>2</sub>) do carbono C-7, da porção 3-hidroxi-4-metoxi- $\beta$ -fenil-etoxi, interagindo com os hidrogênios metilênicos H-8a e H-8b não-equivalentes. Estes, por sua vez, acoplam com os hidrogênios H-7 como duplo dubleto em  $\delta$  3,74 ppm ( $J=6,8$  Hz) (Calis, I. *et al.* 1984).

Finalmente, em  $\delta$  1,08 ppm o dubleto com constante de acoplamento de  $J=6,2$  Hz indicou a presença dos hidrogênios do grupo metila (-CH<sub>3</sub>) de H-6'' da rhamnosila, acoplando com o hidrogênio H-5''. Os demais prótons do açúcar encontram-se sobrepostos em multipletos entre  $\delta$  3,30-4,10 ppm.

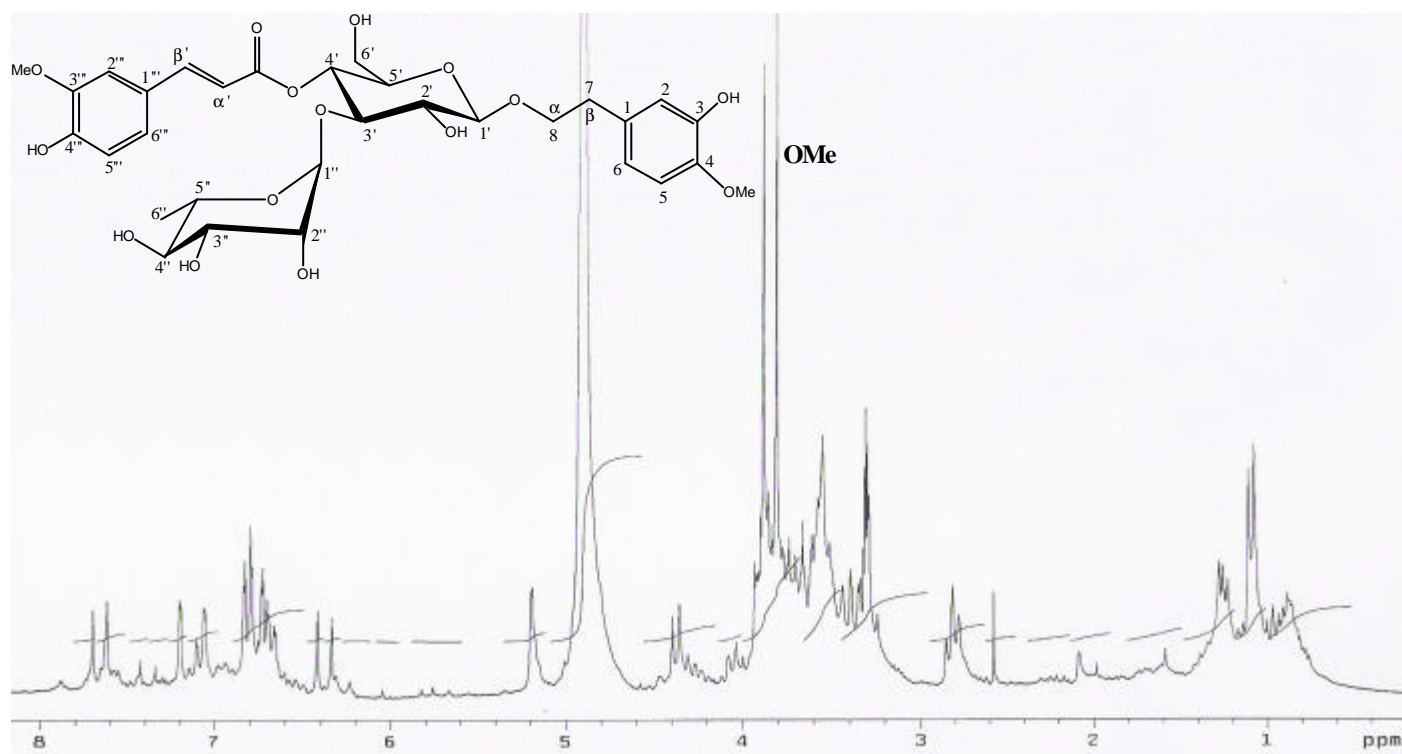
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 16, pág.76) e APT (Espectro 17, pág. 77) da substância III mostrou 35 sinais, dos quais 30 foram claramente identificados com a estrutura proposta, conforme seus assinalamentos. Os deslocamentos químicos, de seus respectivos grupos funcionais, foram devidamente confirmados quando comparados aos da literatura consultada (Tabela 12) identificando a substância como sendo o martinósídeo,

(3-hidroxi-4-metoxi- $\beta$ -feniletoksi-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-feruloil- $\beta$ -D glicopiranosídeo).

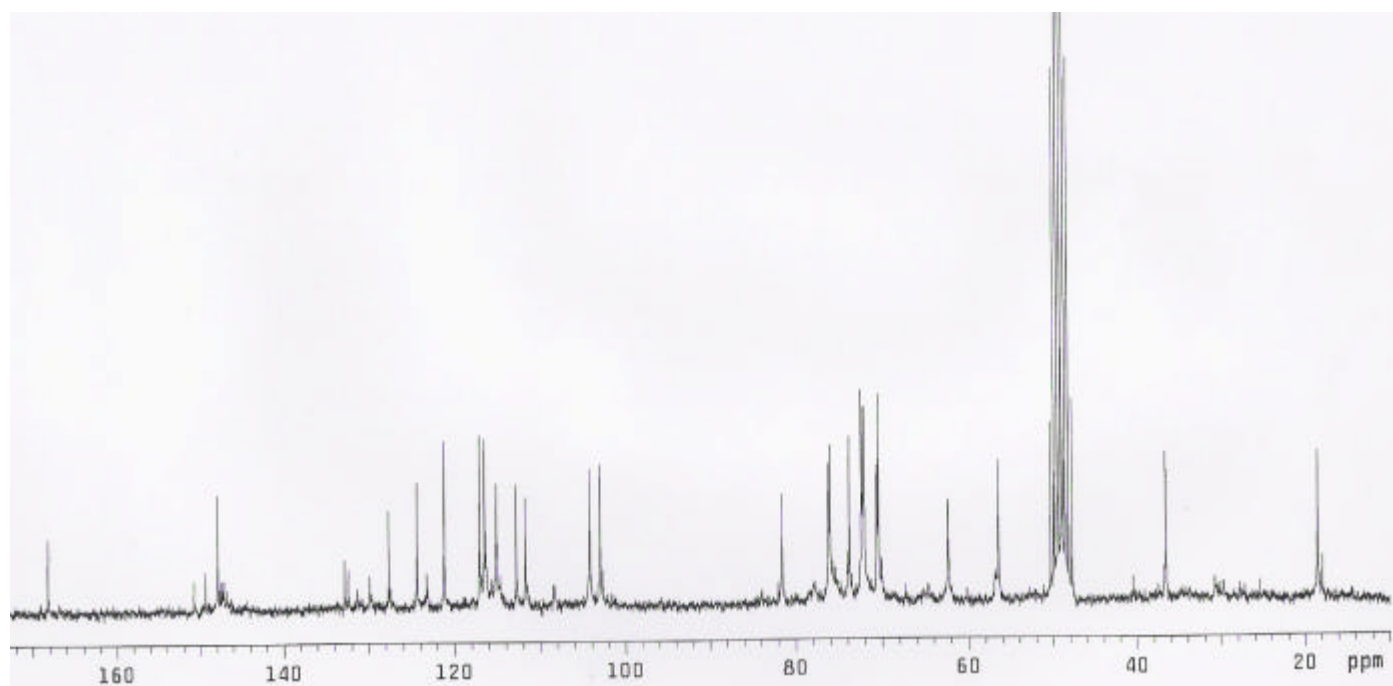
Tabela 12: Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  d ppm, Hz) e de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância I, em comparação com dados da literatura <sup>a; b</sup>

| Martinosídeo <sup>a</sup><br>( $^1\text{H}$ 300 MHz, $^{13}\text{C}$ 75 MHz; $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$ ) |                   |   | Martinosídeo <sup>b</sup><br>( $^1\text{H}$ 300 MHz, $^{13}\text{C}$ 75 MHz,<br>$\text{CD}_3\text{OD}$ ) |   | Substância III    |   |
|---|-------------------|---|--|---|-------------------|---|
| C   | d $^{13}\text{C}$ | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz)            | d $^{13}\text{C}$  | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz)            | d $^{13}\text{C}$ | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz)            |
| <b>3,4-diidroxifenilil</b>  |                   |   |  |   |                   |   |
| 1   | 132,5             |   | 132,9  |   | 132,8             |   |
| 2   | 112,4             | 6,78 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)       | 112,9  | 6,68 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)       | 112,7             | 6,72 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,7)       |
| 3   | 146,8             |   | 147,5  |   | 147,8             |   |
| 4   | 146,7             |   | 147,3  |   | 147,8             |   |
| 5   | 116,6             | 6,82 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)       | 117,1  | 6,80 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)       | 117,0             | 6,81 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)       |
| 6   | 120,4             | 6,69 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2; 2,1) | 121,3  | 6,69 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1; 2,0) | 121,1             | 6,67 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 1,9) |
| 7   | 36,1              | 2,80 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,3)       | 36,6   | 2,80 ( <i>m</i> )                       | 36,5              | 2,81 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)       |
| 8   | 72,1              |   | 72,2   | ~4,06-3,28                              | 72,1              | 3,74 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,8)      |
| OMe   | 56,6              |   | 56,2   |   | 56,4              | 3,80 ( <i>s</i> )                       |
| <b>Feruloil</b>   |                   |   |  |   |                   |   |
| 1 <sup>'''</sup>  | 127,3             |   | 127,7  |   | 127,6             |   |
| 2 <sup>'''</sup>  | 111,2             | 7,00                                    | 111,9  | 7,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9)       | 111,7             | 7,19 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,5)       |
| 3 <sup>'''</sup>  | 148,7             |   | 149,4  |   | 149,3             |   |
| 4 <sup>'''</sup>  | 150,1             |   | 150,8  |   | 149,3             |   |
| 5 <sup>'''</sup>  | 116,0             | 6,76 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)       | 116,6  | 6,82 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,3)       | 116,4             | 6,81 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1; 1,8) |
| 6 <sup>'''</sup>  | 124,1             |   | 124,4  | 7,08 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,6; 1,8) | 124,3             | 7,08 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4; 1,6) |
| 7 <sup>'''</sup>  | 147,2             | 6,48 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)       | 115,1  | 6,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 16,9)      | 115,0             | 6,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,8)      |
| 8 <sup>'''</sup>  | 115,2             | 6,62 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)       | 148,0  | 7,66 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)      | 147,1             | 7,66 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)      |
| COO   | 167,0             |   | 168,3  |   | 168,2             |   |
| OMe   | 56,2              |   | 56,6   |   | 56,4              | 3,87 ( <i>s</i> )                       |
| <b>Glicosila</b>  |                   |   |  |   |                   |   |
| 1 <sup>,</sup>  | 103,7             | 4,33 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,5)       | 104,2  | 4,38 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8)       | 104,1             | 4,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8)       |
| 2 <sup>,</sup>  | 75,8              | 3,22 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 7,5; 9,0) | 76,2   |   | 76,0              |   |
| 3 <sup>,</sup>  | 79,5              | 3,70 ( <i>t</i> , 9-9,5)                | 81,6   |   | 81,5              |   |
| 4 <sup>,</sup>  | 70,1              | 4,72 ( <i>t</i> , 9,5)                  | 70,7   | 4,92 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,4)       | 70,3              | ~4,75-5,0                               |
| 5 <sup>,</sup>  | 76,1              | 3,45 ( <i>m</i> )                       | 76,0   |   | 76,1              |   |
| 6 <sup>,</sup>  | 62,2              | ~3,70; 3,45                             | 62,4   | 4,49-4,38 ( <i>m</i> )                  | 62,3              |   |
| <b>Rhamnosila</b>   |                   |   |  |   |                   |   |
| 1 <sup>''</sup>   | 101,8             | 5,03 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,0)       | 103,0  | 5,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,7)       | 102,9             | 5,19 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,4)       |
| 2 <sup>''</sup>   | 71,9              | 3,70 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,0; 2,5) | 72,4   |   | 72,3              | 3,60 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 2,9)       |
| 3 <sup>''</sup>   | 71,3              | 3,30 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,5; 9,5) | 72,2   |   | 72,0              | 3,30-4,10 ( <i>m</i> )                  |
| 4 <sup>''</sup>   | 73,5              | 3,12 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,5)       | 73,8   |   | 73,7              | 3,30-4,10 ( <i>m</i> )                  |
| 5 <sup>''</sup>   | 69,4              | 3,60 ( <i>m</i> )                       | 70,3   | 1,12 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,9)       | 70,5              | 3,30-4,10 ( <i>m</i> )                  |
| 6 <sup>''</sup>   | 18,4              | 1,01 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0)       | 18,6   | 1,10 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)       | 18,4              | 1,08 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)       |

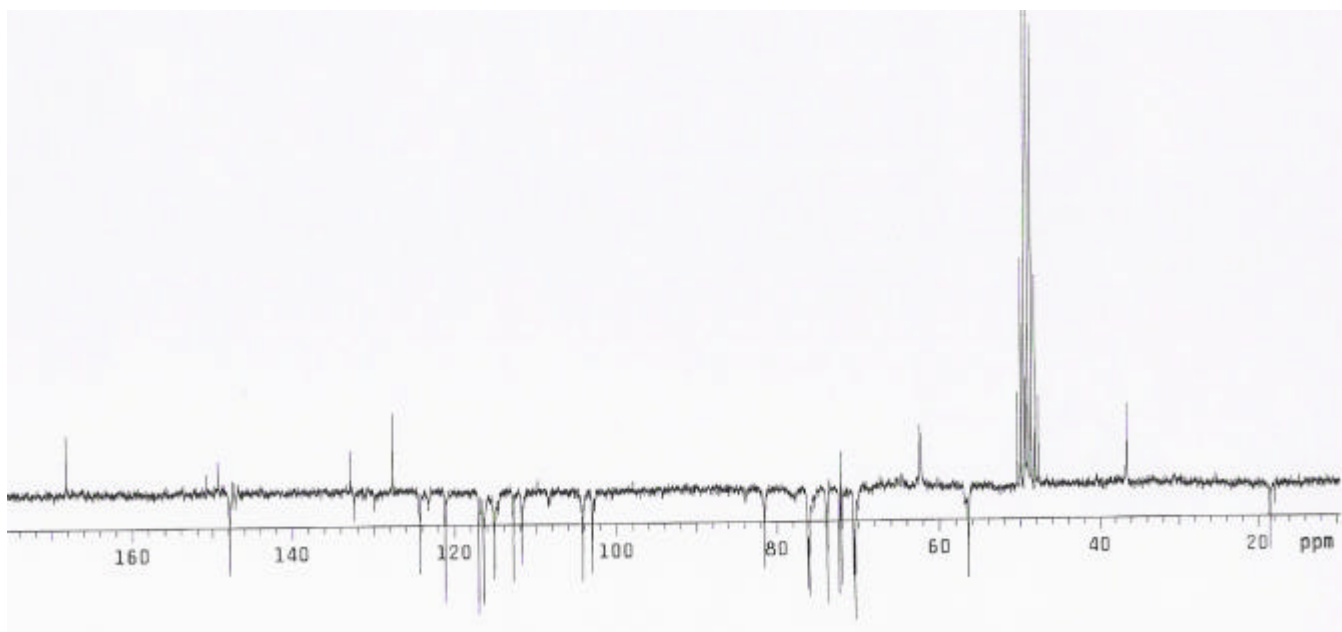
Obs: a- Kaplan, C.A.M., Leitão, G. S. 1994. b- Calis, I *et al.* 1984



Espectro 15: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância III (200MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



Espectro 16: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância III (200MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

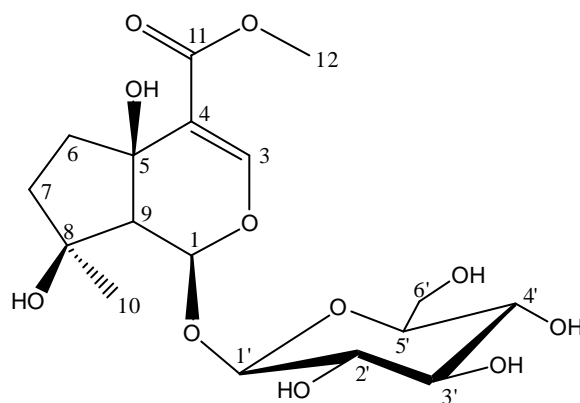


Espectro 17: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (APT) da substância III (200MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

#### 4.3.4 Determinação Estrutural do Iridóide glicosilado (IV)

A análise estrutural de uma substância da classe dos iridóides, apenas por RMN  $^1\text{H}$ , torna a interpretação e identificação para substâncias já conhecidas, por si só inviável. Por apresentar este tipo de espectro, freqüentemente, a sobreposição do acoplamento spin-spin entre seus hidrogênios, além de ser pequena a diferença do comportamento de seus sinais em ambientes químicos (solventes) diferentes, torna-se necessária à corroboração da técnica de RMN  $^{13}\text{C}$ . Justo por oferecer, esta técnica, à posição e a natureza de um substituinte no esqueleto de um dado iridóide, promovendo assim uma valiosa e rápida informação quanto a sua identificação como imprescindível ferramenta para a elucidação de sua estrutura (Junior, P. 1990).

O fracionamento da fração acetato de etila (Esquema 3, pág 54), no aparelho HSCCC forneceu uma substância presente na “fase estacionári” com o uso do aparelho contracorrente (HSCCC), após análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  confrontados com dados da literatura (Futuro, D. 1997), possibilitaram sugerir a seguinte estrutura para o monoterpene abaixo:



**Substância IV**

A análise de RMN  $^1\text{H}$  da substância IV (Espectro 18, pág.82), Tabela 13, pág 81) apresentou sinais com feição típica de um esqueleto ciclopentapireno glicosilado não-cromogênico, no caso de iridóides, possuidor de um grupo carboximetila, (-COOCH<sub>3</sub>) ligado ao carbono C-4 (Junior, P. 1990), conforme a presença do singlete em campo baixo em  $\delta$  7,41 ppm (Tabela 13, pág. 81). O valor desse deslocamento químico sugeriu a presença de hidrogênio olefínico ligado ao carbono C-3 da ligação dupla com C-4, no anel hexacíclico da substância.

Em  $\delta$  3,72 ppm constatou-se o singlete dos prótons da metoxila (-OCH<sub>3</sub>) do referido éster metílico, referente ao carbono C-12. Os outros três singletos que podem indicar uma substância com esqueleto iridoídico, são os sinais em  $\delta$  1,12 ppm, referente aos hidrogênios H-10 da metila (-CH<sub>3</sub>) geminal à hidroxila, ligados no carbono quaternário C-8 do anel pentacíclico, e o singlete em  $\delta$  5,80 ppm indicando um sinal em campo baixo do hidrogênio H-1, frente ao efeito do desblindamento exercido pela eletronegatividade tanto do oxigênio do anel hexacíclico quanto do oxigênio ligado ao carbono anomérico (C-1') do açúcar.

O singlete em 2,47 ppm refere-se ao hidrogênio H-9 ligado ao carbono terciário C-9. A existência destes dois últimos singletos (H-1) e (H-9) pode ser justificado em função do não acoplamento espacial destes hidrogênios heterotópicos, presentes em átomos de carbonos vizinhos, em sistemas rígidos como o do iridóide. Não foi observada a constante de acoplamento entre estes dois prótons vicinais *trans*, constituindo os dois singletos citados, ocorrendo em função do ângulo diedro de 90° na substância em questão (Williams, H. D., Fleming, I. 1995). Os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos



ligados aos carbonos C-6 e C-7, puderam ser indicados no espectro na região entre  $\delta$  1,5 a 2,2 ppm (Espectro 19, pág.82).

Geralmente, espectros registrados em  $D_2O$  ou  $CD_3OD$  podem tornar o sinal do próton anomérico H-1' encoberto pelo sinal do solvente ou mesmo por outros sinais. O espectro de RMN  $^{13}C$  oferece, neste caso, um método simples e inequívoco para se obter esta informação (Chaudhuri, K.R *et al.* 1980). Contudo, pequenas diferenças de deslocamento químico dos sinais referentes ao espectro de  $^{13}C$  (0,8 +/- 0,3 ppm) podem ser igualmente atestados, quando do uso destes dois solventes já citados, apesar de alguns átomos de carbono apresentarem sinais ligeiramente maiores (Chaudhuri, K.R *et al.* 1980).

Partindo-se do princípio de que a grande maioria dos glicosídeos na natureza possuem uma configuração  $\beta$ -glucose – D (+) em C-1', em que os grupos volumosos, em função do efeito de repulsão dos dipolos originados pelo oxigênio de C-1' e pelo oxigênio do ciclo hexano, estão em conformação equatorial, esta porção ligada ao esqueleto do iridóide pelo carbono C-1' pode ser confirmada conformacionalmente por meio do valor  $J$  do dubleto no espectro de RMN  $^1H$ . Portanto, o sinal relativo ao hidrogênio anomérico (H-1') da unidade glicosídica foi atribuído ao dubleto em  $\delta$  4,58 ppm (*d*,  $J=7,7$ ), acoplado axialmente com o hidrogênio H-2' (C-2') em  $\delta$  4,48 ppm (*d*,  $J=7,7$ ) e este, com o hidrogênio H-3' em 4,26 ppm (*d*,  $J=7,7$ ).

O valor destas constantes de acoplamento axial-axial foi atribuída pelo ângulo diedro de  $180^\circ$  formado em sistemas rígidos como do anel hexacíclico, o que confere com a posição antiperiplanar desses hidrogênios com seus orbitais mais sobreponíveis face aos dados da literatura (Williams, H. D., Fleming, I. 1995).

Segundo Chaudhuri, o carbono C-4 ligado a porção carboximetila ( $-CO_2CH_3$ ) de iridóides, quando utiliza-se o solvente  $D_2O$  frente ao  $CD_3OD$ , observa-se uma grande diferença nos sinais químicos de C-3 e C-4, levando os carbonos, respectivamente, ao desblindamento, campo baixo  $p/\sim 4$  ppm (150-154 ppm), e o blindamento, campo alto ( $p/\sim 4$  ppm; 110-114 ppm), como resultado de diferentes solvatações produzidas pelos dois solventes (Chaudhuri, K.R *et al.* 1980). Entretanto, no que concerne os sinais observados em C-3 e C-4 assinalados no espectro de  $^{13}C$  do iridóide (Espectro 20, pág.83), usando como solvente  $CD_3OD$ , os valores apresentados de ambos os carbonos, respectivamente, foram de  $\delta$  152,57 ppm e  $\delta$  115,12 ppm. Desse modo, o deslocamento de C-4 foi

ligeiramente maior que o esperado, frente aos dados propostos acima pela literatura consultada (Chaudhuri, K.R *et al.* 1980).

Em contraste com átomos de carbono C-1 (94,2 ppm), que possuem um deslocamento químico entre  $\delta$  93,3– 98,5 ppm, átomos de carbonos anoméricos C-1' (99,5 ppm) são confinados a uma pequena diferença de deslocamento químico,  $\delta$  99,9 +/- 0,3 ppm (Junior, P. 1990). Esta informação pôde ser tomada como parâmetro de diferenciação entre ambos os carbonos, identificados em seus deslocamentos químicos, respectivamente, em  $\delta$  94,20 ppm e  $\delta$  99,51 ppm (Junior, P. 1990).

A existência de um grupo –OH ligado ao carbono quaternário C-5 ( $\delta$  71,7 ppm), confirmou sua posição em campo baixo, tanto pela região de seu deslocamento químico (50-80 ppm), quanto pelo deslocamento produzido sobre o carbono metínico C-9 ( $\delta$  61,5 ppm), conforme se observou no espectro de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 20, pág.83 Tabela 13, pág 81) com ambos os sinais indicados. Estes sinais se encontraram próximos do observado frente aos dados da literatura consultada, tomada como padrão (Futuro, D. 1997).

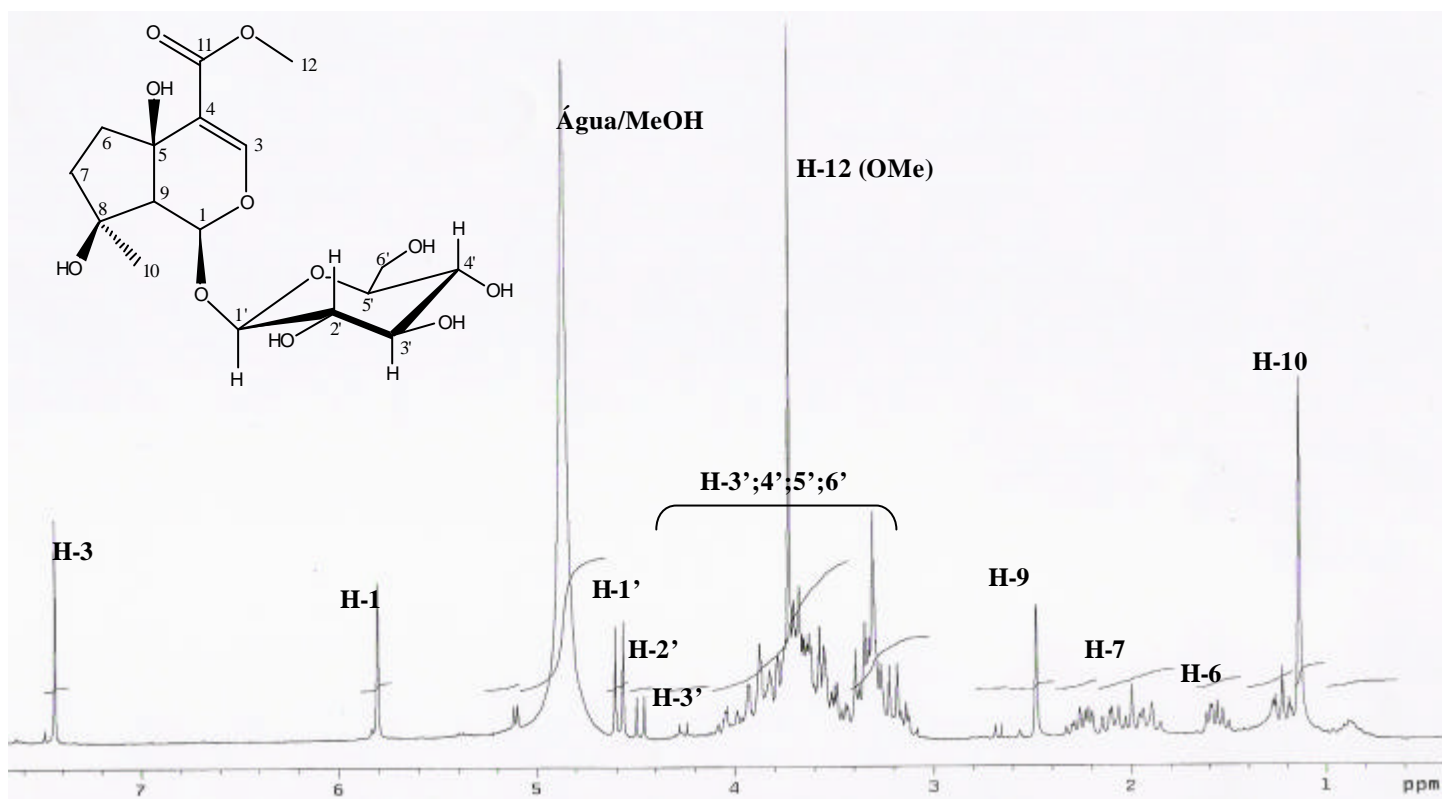
A ausência de hidroxila no carbono C-6, foi constatada pela ausência do sinal referenciado por um triplete e/ou duplo-dublete em torno de  $\delta$  4,15 - 4,19 ppm, no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Entretanto, os dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado e APT (Espectro 21, pág.83), permitindo, este último, confirmar o número e o tipo de átomos de carbono na substância IV, corroborou de forma irrefutável a confirmação da hidroxila ausente no carbono metilênico C-6 pelo valor de seu sinal ( $\delta$  38,7 ppm), comparado a 6- $\beta$  hidroxipolamiida ( $\delta$  74,50 ppm) tomada igualmente como modelo (Futuro, D. 1997).

Diante destes dados, a substância em questão foi identificada como sendo o iridóide glicosilado ipolamiida.

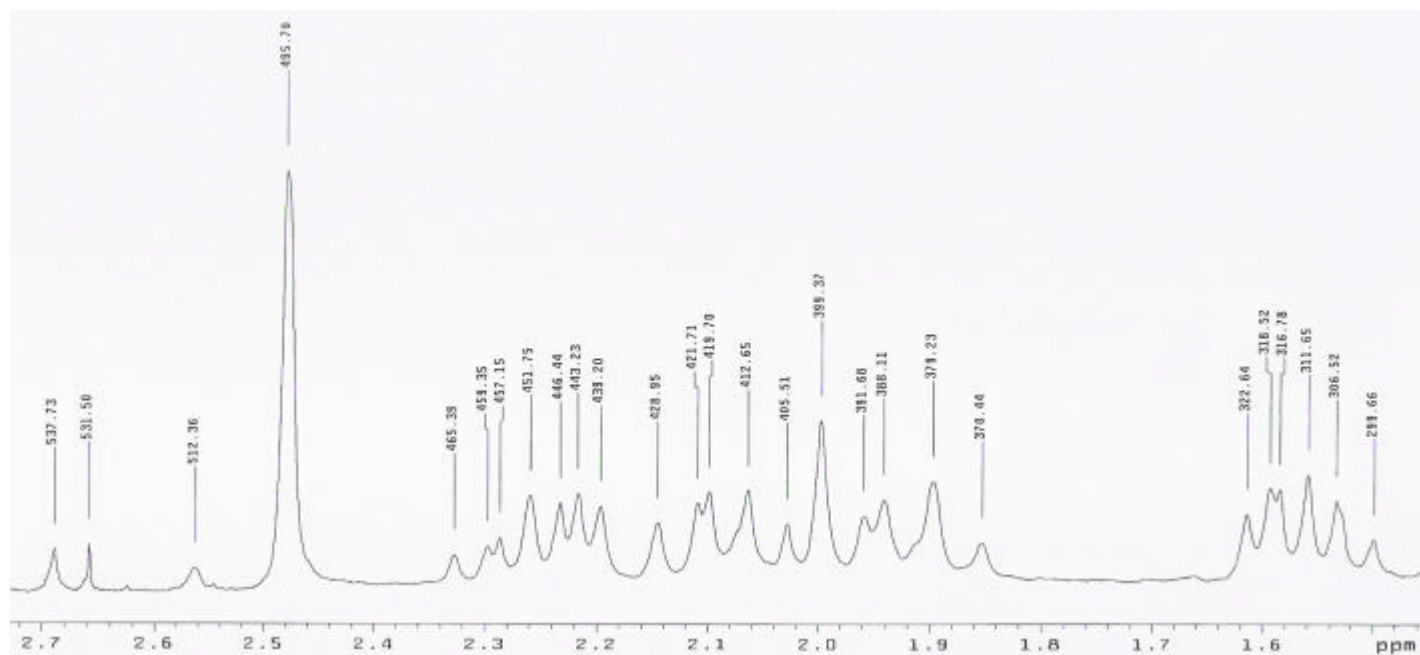
Tabela 13: Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  d ppm, Hz) e de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância IV em comparação com dados da literatura <sup>a</sup>

| 6 $\beta$ - hidroxipolamiida ( $\text{D}_2\text{O}$ ) <sup>a</sup> |                   |                              | Ipolamiida ( $\text{D}_2\text{O}$ ) <sup>a</sup> |                              | Substância IV     |                                   |
|--|-------------------|------------------------------|--|------------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| C  | d $^{13}\text{C}$ | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz) | d $^{13}\text{C}$                                | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz) | d $^{13}\text{C}$ | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz)      |
| <b>Porção iridóide</b>   |                   |                              |  |                              |                   |                                   |
| 1  | 94,2              | 5,86 (s)                     | 94,4   |                              | 94,1              | 5,80 (s)                          |
| 3  | 154,5             |                              | 153,0  | 6,74 (d, J=2,0)              | 152,5             | 7,41 (s)                          |
| 4  | 112,8             |                              | 113,8  |                              | 115,1             |                                   |
| 5  | 70,4              |                              | 71,3   |                              | 71,7              |                                   |
| 6  | 74,5              | 4,15 (t, J= 8,2)             | 37,9   |                              | 38,7              | 1,53 (ddd, J= 1,7; 6,8; 17,1)     |
| 7  | 47,7              | 2,16; 1,90 (J= 8,0; 13,5)    | 39,4   |                              | 40,3              | 2,10-2,23 (ddd, J= 2,0; 7,0;17,4) |
| 8  | 74,7              |                              | 79,0   | 2,80 (m)                     | 78,8              |                                   |
| 9  | 59,1              | 2,63 (s)                     | 60,6   | ~4,06- 3,28                  | 61,5              | 2,47 (s)                          |
| 10   | 23,6              | 1,18 (s)                     | 22,7   |                              | 23,2              | 1,12 (s)                          |
| 11   | 169,0             |                              | 169,0  |                              | 168,0             |                                   |
| 12   | 52,7              | 3,77 (s)                     | 52,6   |                              | 51,7              | 3,72 (s)                          |
| <b>Glicosila</b>   |                   |                              |  |                              |                   |                                   |
| 1'   | 99,3              | Valores não fornecidos       | 99,2   | 4,37 (d, J=7,8)              | 99,5              | 4,58 (d, J= 7,7)                  |
| 2'   | 73,3              | -                            | 73,2   | Valores não fornecidos       | 74,3              | 4,48 (dd, J= 7,7)                 |
| 3'   | 76,1              | -                            | 76,1   | -                            | 77,3              | 4,26 (d, J= 7,7)                  |
| 4'   | 70,4              | -                            | 70,4   | -                            | 71,5              | ~3,36-4,0 (m)                     |
| 5'   | 77,2              | -                            | 77,1   | -                            | 78,2              | ~3,36-4,0 (m)                     |
| 6' a   | 61,5              | -                            | 61,5   | -                            | 62,7              | 3,39 (d, J=1,8)                   |
| 6' b   |                   |                              |  |                              |                   | 3,87 (d, J=2,2)                   |

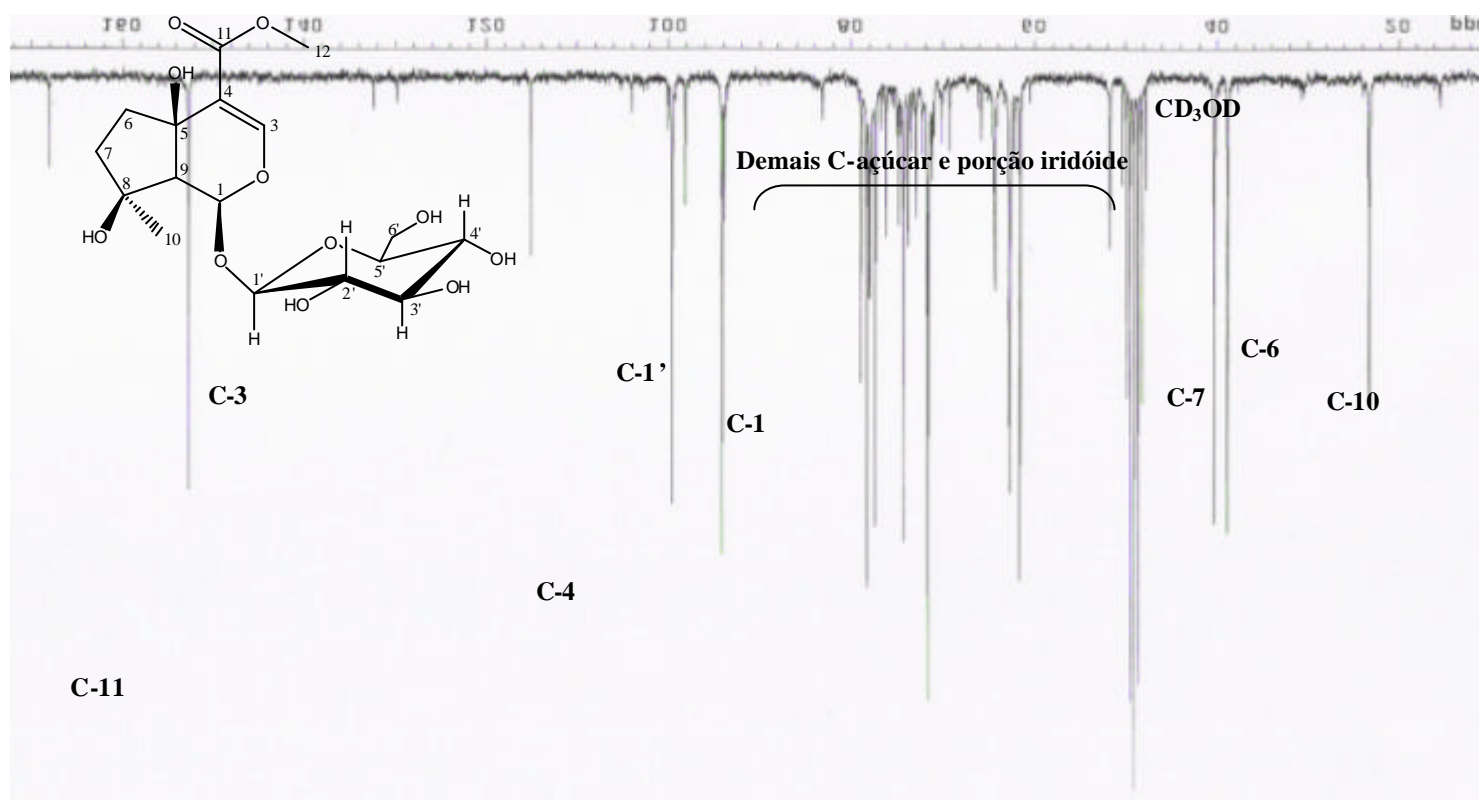
a-Futuro, D. 1997. Tese Doutorado



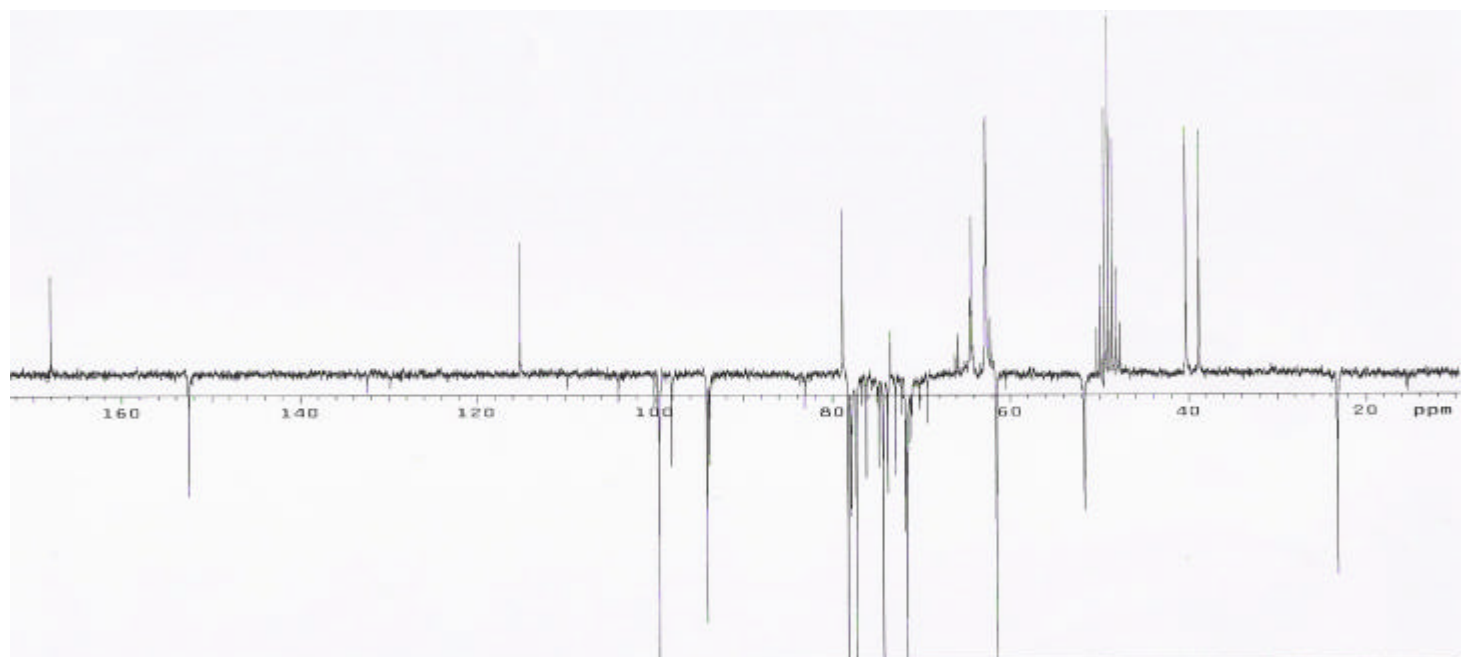
Espectro 18: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância IV. (200MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



Espectro 19: Expansão ( $d_{\text{H}}$  1,5- 2,7 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância IV. (200MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



Espectro 20: Espectro de RMN <sup>13</sup>C da substância IV. (50MHz, CD<sub>3</sub>OD)

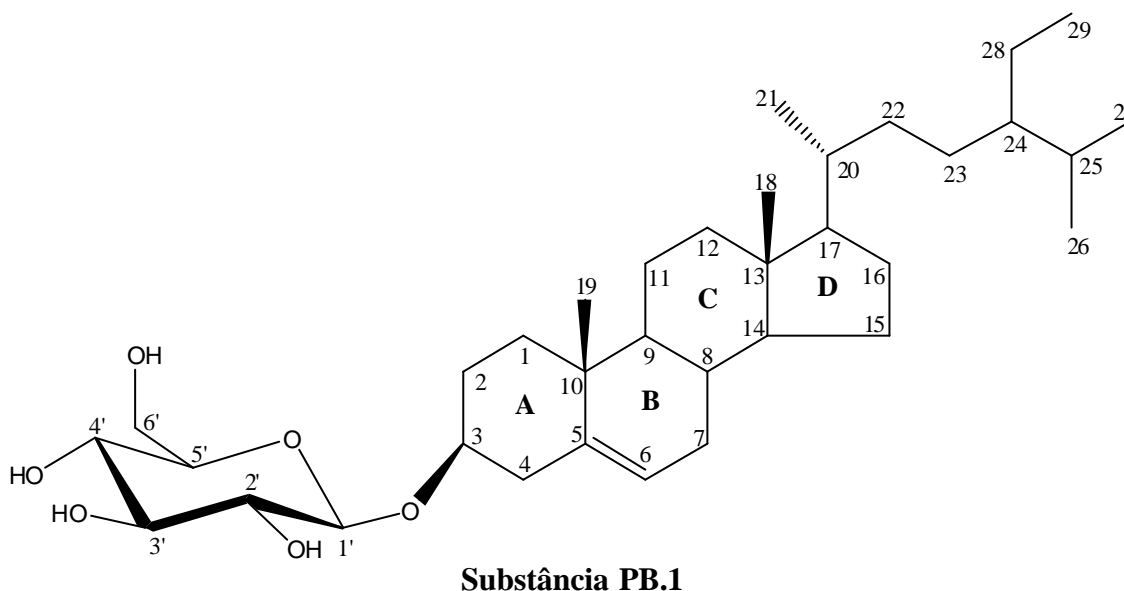


Espectro 21: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (APT: CH<sub>3</sub>, CH para baixo; CH<sub>2</sub>, C para cima) da substância IV. (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

#### 4.4 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas de *Pheurothyrium bahiense* (Meiss) Barroso

##### 4.4.1 Determinação Estrutural do Esteróide glicosilado (PB.1)

A purificação da fração 38-46, da fração MeOH, após fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica conduziu ao isolamento de uma substância que, de acordo com as análises dos dados espectrométricos das técnicas unidimensionais de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , APT, e das técnicas bidimensionais HMBC envolvendo uma ligação ( $^1\text{JCH}$ ) e HMQC envolvendo duas ( $^2\text{JCH}$ ) e três ( $^3\text{JCH}$ ) assim como diante dos dados da literatura consultada (Tabela 14, pág. 87) demonstrou tratar-se da seguinte estrutura esteroidal:



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 22, pág. 89) apresentou sinais intensos com deslocamentos químicos em 0,65 (s), 0,85 (d,  $J= 7,7$  Hz), 0,88 (d,  $J= 1,5$  Hz), 0,90 (s), 0,92 (d,  $J= 8,8$  Hz), 0,86 (t,  $J= 8,6$  Hz) e que correspondem a seis grupos metila. O multiplete em  $d_{\text{H}}$  4,28 ppm e o dubleto em 5,34 ppm ( $J= 5,1$  Hz) foram atribuídos, respectivamente, ao hidrogênio carbinólico (H-3) e ao hidrogênio olefínico (H-6). O deslocamento químico destes sinais bem como suas feições no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram compatíveis com a natureza esteroidal para a substância PB.1. A comparação dos dados obtidos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (Espectro 23, pág.89) para a substância PB.1 diante dos valores citados na literatura (Tabela 14, pág. 87) conduziu-nos em sugerir a estrutura do  $\beta$  sistosterol glicosilado.

Esta sugestão acabou sendo confirmada sob a ótica do espectro de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC-  $^n\text{J}_{\text{CH}}$   $n = 2, 3$  o que possibilitou a análise das interações de acoplamento ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) através de duas e três ligações, auxiliando na união dos fragmentos estruturais constituintes da substância completa.

Este espectro (Espectro 24, pág.90) mostra que o átomo de carbono C-1 ( $d_{\text{C}}$  37,4 ppm) possui uma interação a três ligações com o átomo de hidrogênio localizado em 0,98 ppm (*s*, H-19); o carbono localizado em  $d_{\text{C}}$  30,1 ppm (C-2) possui uma interação de acoplamento a tres ligações ( $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) com o átomo de hidrogênio indicado em 2,11 ppm (*d*,  $J = 11,7$  Hz); o átomo de carbono determinado em 78,5 ppm (C-3) possui uma interação a duas ligações ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ ) com os átomos de hidrogênios H-4 determinados em 2,74 e 2,70 ppm (*dd*,  $J = 4,0; 4,1$  Hz), e a três ligações ( $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) com o átomo de hidrogênio anomérico H-1' definido em 5,04 (*d*,  $J = 7,7$  Hz), evidenciando a ligação entre a aglicona e o açúcar (Espectro 25, pág.91); o átomo de carbono definido com C-5 (140,8 ppm) apresenta interações de acoplamento heteronuclear a duas ligações ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ ) com o hidrogênio H-4 (2,74; 2,70; *dd*,  $J = 4,0; 4,1$  Hz) e a três ligações ( $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) com os hidrogênios metínicos H-19 (*s*) em 0,90 ppm; o carbono C-10 (36,8 ppm) apresenta interações em  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  com os átomos de hidrogênio com 0,90 ppm (*s*, H-19), e a  $^3\text{J}_{\text{CH}}$  com o hidrogênio olefínico H-6 localizado em 5,34 ppm (*d*,  $J = 5,1$ Hz) e com os hidrogênios metilênicos H-4 em 2,41 e 2,70 ppm (*dd*,  $J = 4,1; 4,0$  Hz), definindo dessa forma o anel A do esteróide.

O anel B pode ser definido pelas correlações entre o átomo de carbono C-6 (122, 8 ppm) com interações a duas ligações com os hidrogênios metínicos H-7 (1,51 *dd*,  $J = 9,5$  Hz; 1,86 *m*) e a três ligações ( $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) com os hidrogênios metilênicos H-4 do anel A (2,74; 2,70; *dd*,  $J = 4,0; 4,1$  Hz) e com o hidrogênio olefínico H-6 (5,34 *d*,  $J = 5,1$  Hz); o carbono C-9 (50,2 ppm) apresentou interação heteronuclear a  $^3\text{J}_{\text{CH}}$  com o hidrogênio H-19 (*s*, 0,90 ppm). Atribuições análogas foram realizadas para os anéis C, D e parte alifática do esteróide PB.1, revelando as conectividades entre os anéis.

Observou-se ainda a interação via  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  do acoplamento entre o carbono C-2' (75,2 ppm) e o hidrogênio H-3' em 3,96 ppm (*m*); o átomo de carbono situado em 78,4 ppm (C-3') apresenta interações via  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  com H-2' (4,05 *t*,  $J = 16,1$  Hz) e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$  com o hidrogênio anomérico H-1' (5,04 *d*,  $J = 7,7$  Hz); o carbono situado em 78,0 ppm (C-5') apresenta interações à longa distância em  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  com hidrogênios H-4' (4,27 *t*,  $J = 10,6$  Hz) e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$

com o hidrogênio anomérico H1' (5,04 *d*,  $J= 7,7$  Hz) e com H3' (3,96 *m*). Por fim, o carbono C-6' situado em 62,7 ppm mostrou interação de acoplamento em  $^3J_{CH}$  com os hidrogênios localizados em 4,27 ppm (*t*,  $J= 16,1$  Hz).

Essas análises permitiram uma atribuição clara dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 14 e Tabela 15, pág. 87 e 88), confirmando a estrutura proposta do 3 $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol (PB.1).



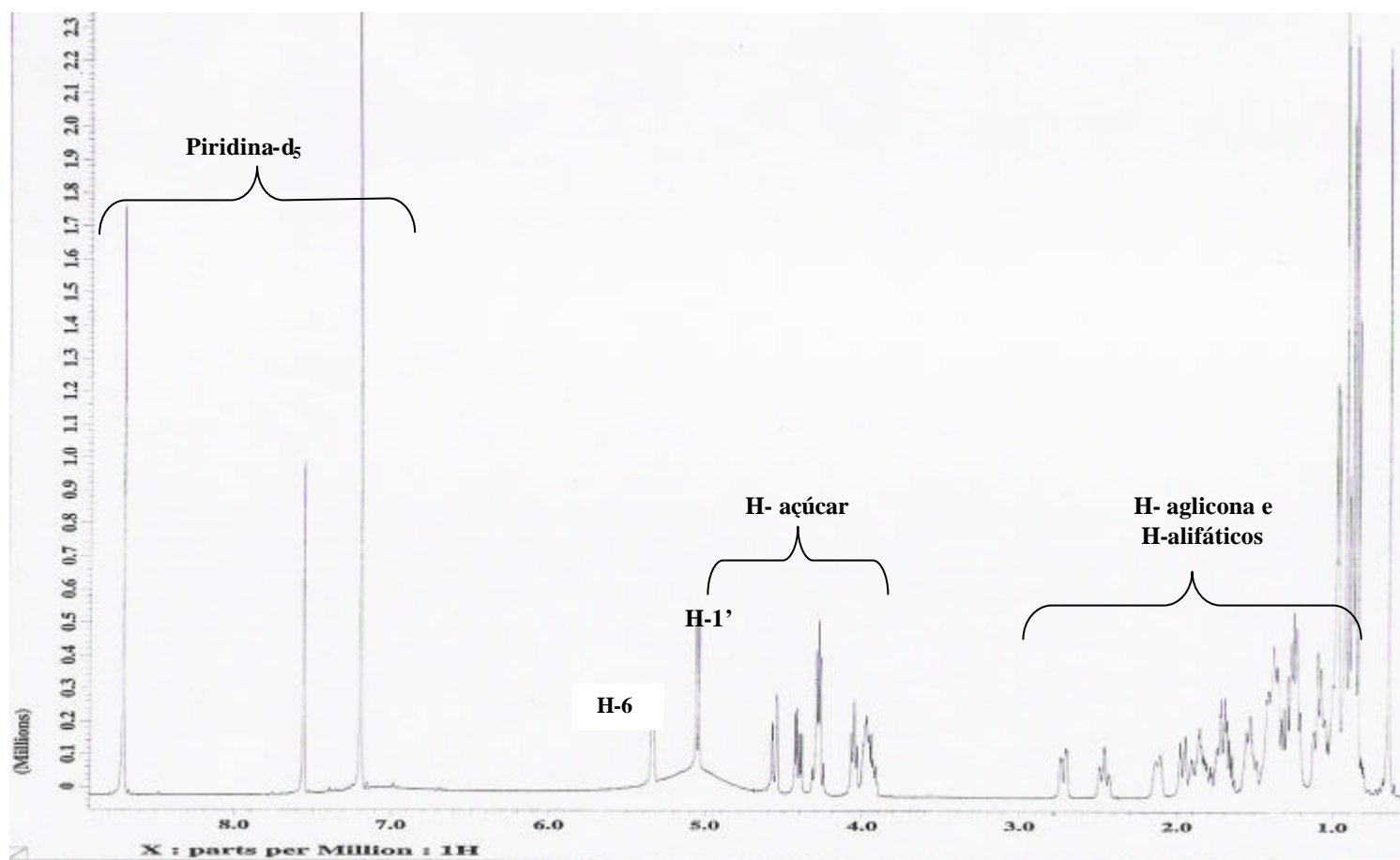
Tabela 14: Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Piridina- $d_5$ , ppm, Hz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, Piridina- $d_5$ ) da substância PB.1 e comparados com valores citados na literatura ( $\text{CDCl}_3$ )<sup>a</sup>

| $\beta$ -D- glicosil- Sitosterol (Acetilado) <sup>a</sup> |                                    |  | Substância PB.1       |  |
|---|------------------------------------|--|-----------------------|--|
| C   | $\delta^{13}\text{C}$<br>(50,3MHz) | $\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz )<br>(200,13 MHz)  | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz)       |
| 1   | 37,1                               | 3,47 (m)   | 37,4                  | 0,98; 1,71 (dd, J= 9,8; 6,6)           |
| 2   | 29,4                               | 2,19 (d, J= 2,0)                                   | 30,1                  | 2,11 (d, J= 11,7)                      |
| 3   | 80,4                               |  | 78,5                  | 4,28 (m)                               |
| 4   | 38,8                               |  | 39,2                  | 2,74; 2,70 (dd J= 4,0; 4,1)            |
| 5   | 140,3                              |  | 104,8                 |  |
| 6   | 122,1                              | 5,35 (d, J= 4,0)                                   | 122,8                 | 5,34 (d, J= 5,1)                       |
| 7   | 31,8                               |  | 31,9                  | 1,51 (d, J= 9,5); 1,85 (m)             |
| 8   | 31,8                               |  | 32,1                  |  |
| 9   | 50,1                               |  | 50,2                  |  |
| 10  | 36,7                               |  | 36,8                  |  |
| 11  | 20,6                               |  | 21,2                  |  |
| 12  | 39,7                               |  | 39,8                  | 1,97 (d, J= 12,4)                      |
| 13  | 42,2                               |  | 42,4                  |  |
| 14  | 56,7                               |  | 56,7                  |  |
| 15  | 24,3                               |  | 24,4                  |  |
| 16  | 28,2                               |  | 28,4                  |  |
| 17  | 55,9                               |  | 56,1                  |  |
| 18  | 11,8                               |  | 11,9                  | 0,65 (s)                               |
| 19  | 19,8                               |  | 19,3                  | 0,90 (s)                               |
| 20  | 36,9                               |  | 36,3                  |  |
| 21  | 19,8                               |  | 19,1                  | 0,92 (d, J= 8,8)                       |
| 22  | 33,8                               |  | 34,1                  |  |
| 23  | 25,9                               |  | 26,3                  |  |
| 24  | 45,7                               |  | 45,9                  |  |
| 25  | 29,0                               |  | 29,4                  |  |
| 26  | 18,9                               |  | 18,9                  | 0,88 (d, J= 8,8)                       |
| 27  | 19,8                               |  | 19,9                  | 0,85 (d, J= 7,7)                       |
| 28  | 22,9                               |  | 23,3                  |  |
| 29  | 11,8                               |  | 12,0                  | 0,86 (t, J= 8,6)                       |
| 1'  | 99,6                               | 4,57 (d, J= 8,0)                                   | 102,5                 | 5,04 (d, J= 7,7)                       |
| 2'  | 71,4                               | 4,97 (t, J= 9,5; 8,0)                              | 75,2                  | 4,05 (t, J= 16,1)                      |
| 3'  | 71,6                               | 5,14 (t, J= 9,5)                                   | 78,4                  | 3,96 (m)                               |
| 4'  | 68,4                               | 5,05 (t, J= 9,5)                                   | 71,6                  | 4,27 (t, J= 10,6)                      |
| 5'  | 72,8                               | 3,65 (m)   | 78,0                  | 4,30 (t, J= 10,6)                      |
| 6'  | 62,0                               | 4,24 (dd, J= 17,1; 4,5)<br>4,08 (dd, J= 17,0; 2,0) | 62,7                  | 4,56 (dd, J= 2,2)<br>4,40 (dd, J= 5,5) |
| OAc   | 170,7; 170,3;<br>169,4; 169,3      |  |                       |  |

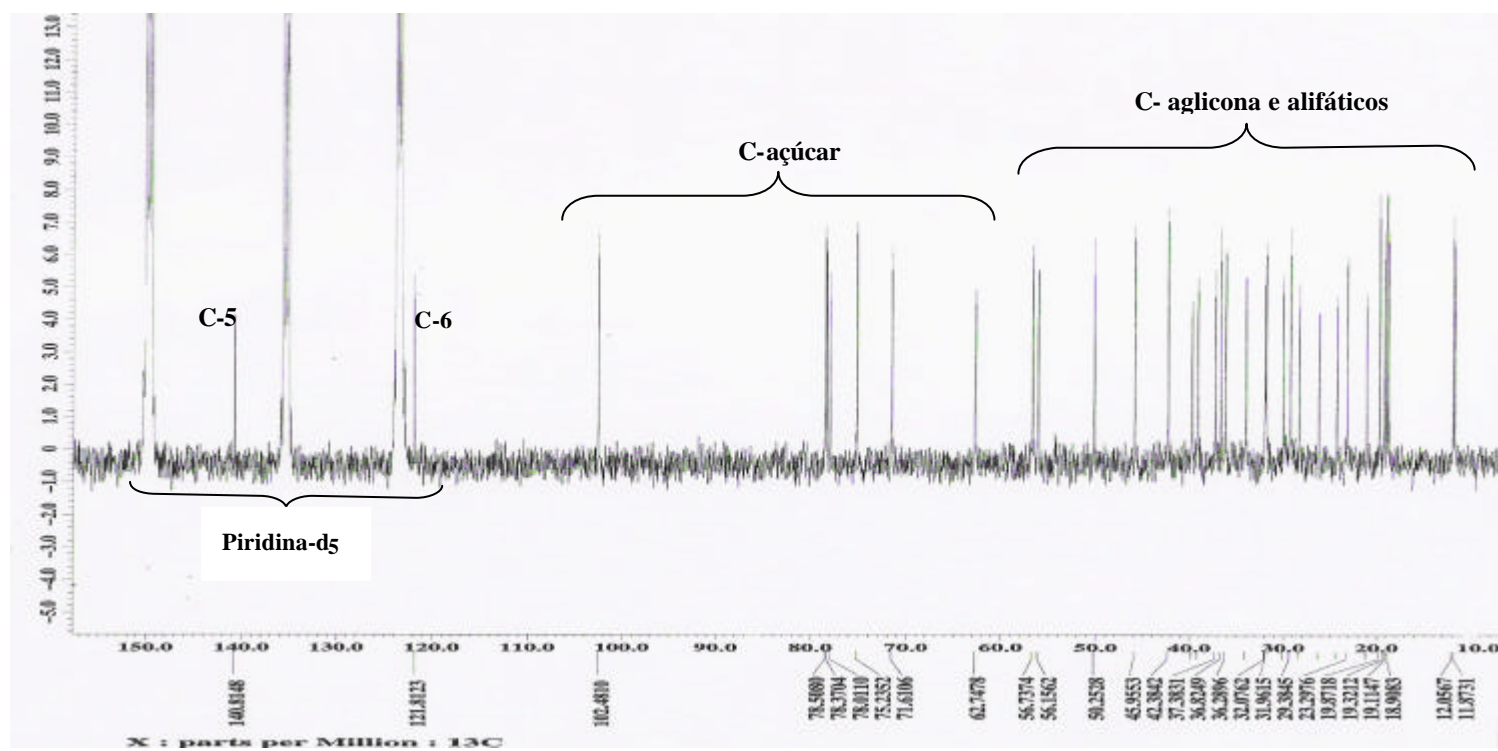
a- Oliveira de, M.C.C .1994. Tese de Mestrado.

Tabela 15: Dados resultantes de experiência de 1D e 2D,  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HETCOR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) ( $^1\text{J}$ ), e HMBC- $^n\text{JCH}_n = 2,3$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) com PB.1

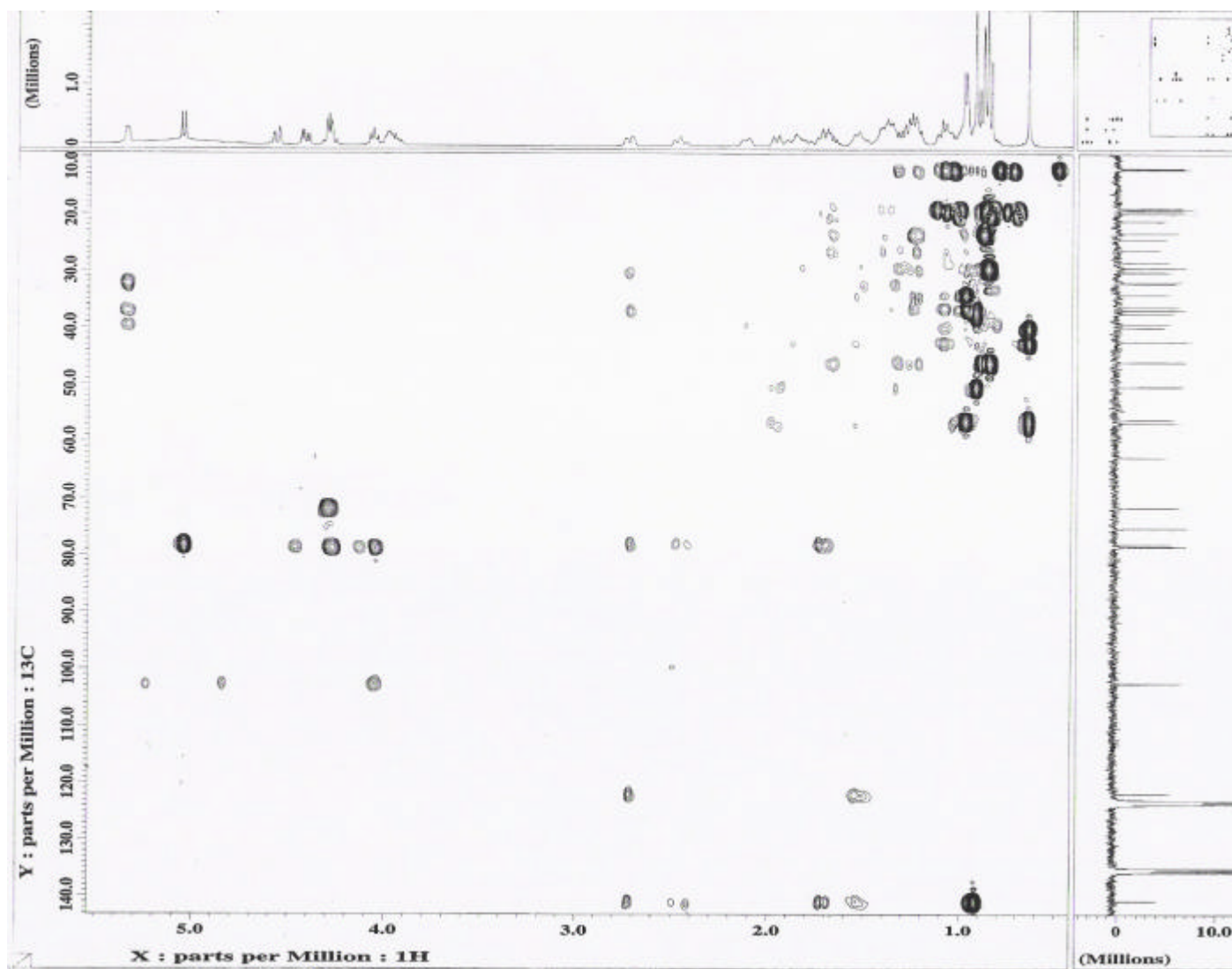
| C               | $d^{13}\text{C}$ | $d^1\text{H}$<br>(mult., J Hz) | $^2\text{JCH}$ | $^3\text{JCH}$ |                 | $d^{13}\text{C}$ | $d^1\text{H}$<br>(mult., J Hz) | $^2\text{JCH}$ | $^3\text{JCH}$ |
|-----------------|------------------|--------------------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|--------------------------------|----------------|----------------|
| 5               | 140,8            |                                | H-4            | H-19           | CH <sub>3</sub> |                  |                                |                |                |
| 10              | 36,8             |                                | H-19           | H-4; H-6       | 18              | 11,9             | 0,65 (s)                       |                | H-12           |
| 13              | 42,4             |                                | H-18           |                | 19              | 19,3             | 0,90 (s)                       |                |                |
| CH              |                  |                                |                |                | 21              | 19,1             | 0,92 (d, J= 8,8)               |                |                |
| 3               | 78,5             | 4,28 (m)                       | H-4            | H-1'           | 26              | 18,9             | 0,88 (d, J= 1,5)               |                | H-27           |
| 6               | 122,8            | 5,34 (d, J= 5,1)               | H-7            |                | 27              | 19,9             | 0,85 (d, J= 7,7)               |                | H-26           |
| 8               | 32,1             |                                |                | H-6            | 29              | 12,0             | 0,86 (t, J= 8,6)               |                |                |
| 9               | 50,2             |                                |                | H-19           | CH              |                  |                                |                |                |
| 14              | 56,7             |                                |                | H-18           | 1'              | 102,5            | 5,04 (d, J= 7,7)               |                |                |
| 17              | 56,1             |                                |                | H-18; H-21     | 2'              | 75,2             | 4,05 (t, J= 16,1)              | H-3'           |                |
| 20              | 36,3             |                                | H-21           |                | 3'              | 78,4             | 3,96 (m)                       | H-2'           | H-1'           |
| 24              | 45,9             |                                |                | H-26; H-27     | 4'              | 71,6             | 4,27 (t, J= 10,6)              |                | H-6'           |
| 25              | 29,4             |                                | H-27           |                | 5'              | 78,0             | 4,30 (t, J=10,6)               | H-4'           | H-1'; H-3'     |
| CH <sub>2</sub> |                  |                                |                |                | CH <sub>2</sub> |                  |                                |                |                |
| 1               | 37,4             | 0,98;1,71 (dd, J= 9,8; 6,6)    |                | H-19           | 6'a             | 62,7             | 4,56 (dd, J=2,2)               |                | H-4'           |
| 2               | 30,1             | 2,11 (d, J= 11,7)              |                | H-4            | 6'b             |                  | 4,40 (dd, J=5,5)               |                |                |
| 4               | 39,2             | 2,74;2,70 (dd, J= 4,0; 4,1)    |                | H-6            |                 |                  |                                |                |                |
| 7               | 31,9             | 1,51 (d, J= 9,5); 1,85 (m)     | H-6            |                |                 |                  |                                |                |                |
| 11              | 21,2             |                                |                |                |                 |                  |                                |                |                |
| 12              | 39,8             | 1,97 (d, J= 12,4)              |                | H-18           |                 |                  |                                |                |                |
| 15              | 24,4             |                                |                |                |                 |                  |                                |                |                |
| 16              | 28,4             |                                |                |                |                 |                  |                                |                |                |
| 22              | 34,1             |                                |                |                |                 |                  |                                |                |                |
| 23              | 26,3             |                                |                |                |                 |                  |                                |                |                |
| 28              | 23,3             |                                | H-29           |                |                 |                  |                                |                |                |



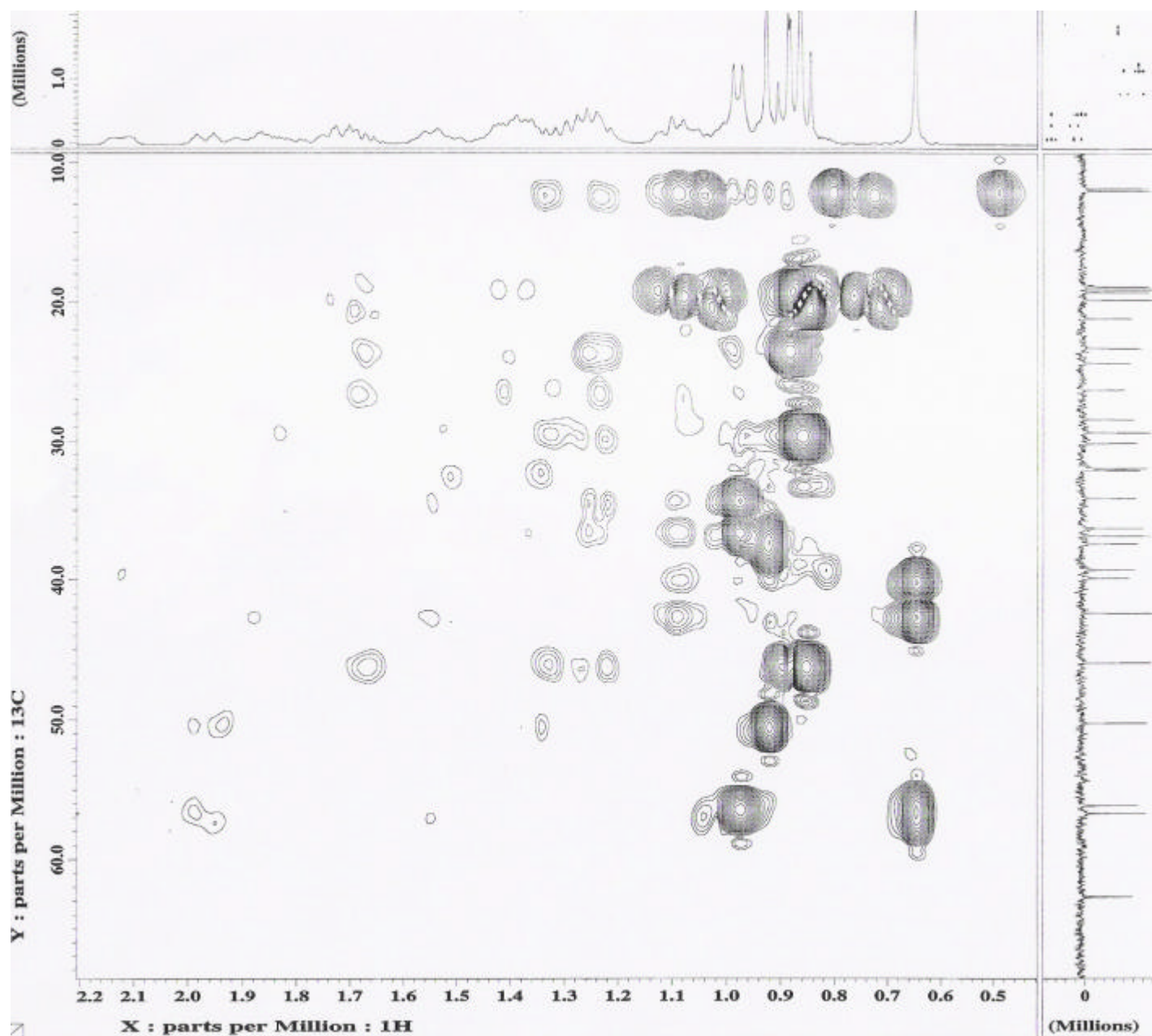
Espectro 22: Espectro RMN <sup>1</sup>H de PB.1 (400 MHz, Piridina-d<sub>5</sub>)



Espectro 23: Espectro de RMN <sup>13</sup>C da substância PB.1 (100 MHz, Piridina-d<sub>5</sub>)



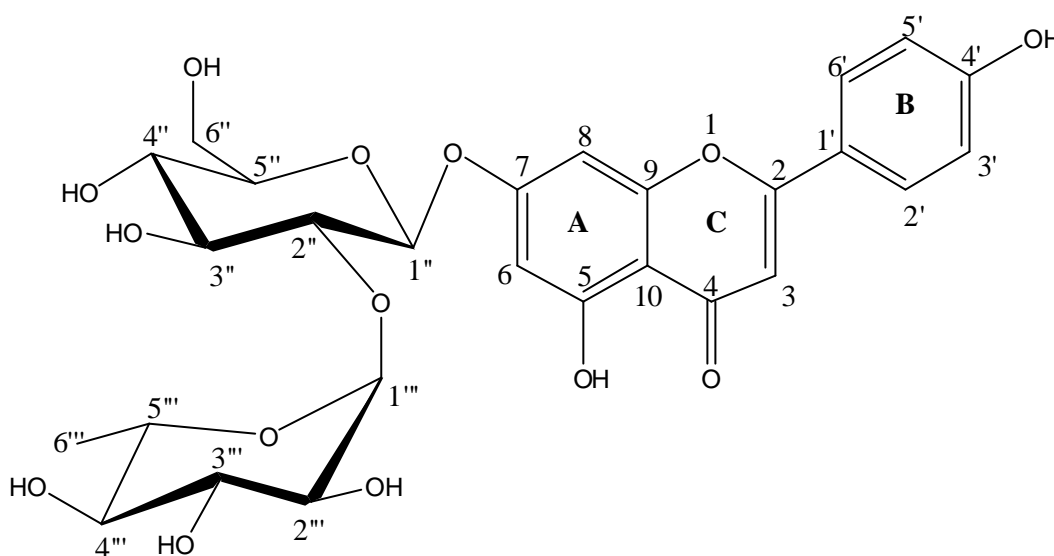
Espectro 24: Espectro  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC ( $^2\text{J}$ ;  $^3\text{J}$ ), região (1,0-5,0 x 10,0-140,0) ppm de PB.1 (400 MHz, Piridina- $\text{d}_5$ )



Espectro 25: Espectro  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC ( $^2\text{J}; ^3\text{J}$ ), região de expansão (0,5-2,2 x 10,0-60,0) ppm de PB.1 (400 MHz, Piridina- $d_5$ )

#### 4.4.2 Determinação Estrutural do Flavonóide glicosilado (PB.2)

Por meio dos valores das bandas de absorção de IV ( $\text{cm}^{-1}$ ) e dos deslocamentos químicos ( $d_{\text{H}}$  ppm) e ( $d_{\text{C}}$  ppm) das técnicas unidimensionais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , APT, apoiado nas técnicas bidimensionais de correlação homonuclear ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) e heteronuclear ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) através de uma ligação ( $^1J_{\text{CH}}$ , HECTOR) e a longa distância envolvendo duas ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e três ( $^3J_{\text{CH}}$ ) (HMBC) ligações, bem como nas informações adicionais dos dados espectrais do derivado (PB-2.1), pôde-se propor a seguinte estrutura para a substância PB-2:



**Substância PB-2**

O espectro de IV (Espectro 26, pág.99) evidenciou a presença de uma intensa e larga banda de absorção atribuída à vibração de deformação axial da ligação intramolecular do hidrogênio do grupo hidroxila (-OH), característico do hidrogênio deste grupo na região de  $\nu_{\text{OH}}$   $3366 \text{ cm}^{-1}$ ; a presença de uma banda de absorção intensa, característica da vibração de deformação axial de ligação carbono-oxigênio (carbonila conjugada,  $\nu_{\text{C=O}}$   $1660 \text{ cm}^{-1}$ ) justifica a feição da banda de absorção do grupo hidroxila citado, quelado ao grupo carbonílico em C-5. Nesta posição estrutural a carbonila absorve entre  $1650\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$  (Fleming, I. *et al.* 1995).

Absorções típicas de deformação axial de ligações carbono-carbono e carbono-hidrogênio de anel aromático puderam ser constatados, respectivamente, nas regiões entre  $\nu_{\text{C=C}}$   $1450\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{\text{C-H}}$   $650\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ ; pôde-se constatar ainda o tipo e/ou um

dos tipos de substituição no(s) anel/anéis aromáticos da estrutura molecular, pelas bandas de absorção entre 800-860  $\text{cm}^{-1}$  indicando uma dissubstituição em *para* (Fleming, I *et al.* 1995).

Como a natureza glicosídica de um flavonóide se reflete por meio de bandas largas de absorção em torno de 3250 e 1060  $\text{cm}^{-1}$  (Agrawal, P. 1989), as regiões no espectro entre (950-1180  $\text{cm}^{-1}$ ) indicaram a presença de sacarídeo(s) na molécula, de modo que entre (900-930  $\text{cm}^{-1}$ ; 755-785  $\text{cm}^{-1}$ ) e (250-600  $\text{cm}^{-1}$ ) obteve-se, respectivamente, a indicação de anel piranosídico com configuração  $\alpha$  e/ou  $\beta$  (Fleming, I. *et al.* 1995), (Silverstein, M. R. *et al.* 1994).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 27, pág. 100) apresentou nove sinais de peculiar importância entre a região de 6,3 - 8,1 ppm, atribuídos aos hidrogênios aromáticos. Oito destes sinais foram condizentes com a presença de dois sistemas aromáticos, apresentando-se como pares de dubletos com seus deslocamentos químicos ( $d_{\text{H}}$ ) e constantes de acoplamentos ( $J$ ) em 6,40 ppm,  $J= 2,1$  Hz e 6,80 ppm,  $J= 2,1$  Hz, caracterizando, respectivamente, os hidrogênios H-6 e H-8 acoplados em posição *meta* no anel A.

Os sinais dos hidrogênios do anel B foram facilmente assinalados, usando-se os efeitos do substituinte sobre os deslocamentos químicos e a simetria promovida dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  pela presença de um único substituinte oxigenado neste anel aromático. Os dois pares de dubletos em  $d$  6,94 ppm e 7,98 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-5', H-3' e H-6', H-2' deste anel. Por estar o par H-5', H-3' em posição *orto* em relação a um grupo substituinte doador de elétrons em C-4', estes se apresentaram via efeito mesomérico de proteção mais blindados quando comparados à posição *meta* do par H-6', H-2', em relação ao substituinte.

Dois sinais no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 28, pág.101) representando dois pares de carbonos metínicos (CH), reforçaram a indicação de uma função oxigenada localizada em C-4' (anel B). O deslocamento químico do sinal dos carbonos metínicos CH-3' e CH-5' (116,0 ppm), é típico de carbonos localizados em posição *orto* em relação a uma função oxigenada, cuja proteção mesomérica desloca o sinal para campo mais alto (quando comparado ao benzeno; 128,5 ppm), (Agrawal, P.K. 1989).

O valor da constante de acoplamento ( $J$ ) de 9,0 Hz entre cada par dos hidrogênios (H-5', H-6'; H-3', H-2') permitiu atribuir o acoplamento em *orto* no anel B. Para ambos os anéis, A e B, o espectro de  $^1\text{H}$  apresentou por meio dos sinais de seus hidrogênios o sistema de substituição AB.

Segundo Breitmaier e Voelter (Breitmaier, E., Voelter, W. 1990), carbonos e hidrogênios em posição *orto* e *para* em relação a benzenos monosubstituídos por grupos doadores de elétrons (como o – OH) tornam-se blindados pela maior densidade eletrônica incidente via interação mesomérica entre o substituinte e os átomos do anel aromático, tendo seus sinais atribuídos a campo mais alto ( $d_{c(o,p)} < 128,5$  ppm), enquanto na presença de substituintes retiradores de elétrons (como o acetato –OCOCH<sub>3</sub>) seus sinais caem para campo mais baixo ( $d_{c(o,p)} > 128,5$  ppm), pela menor densidade eletrônica insidente sobre os carbonos e hidrogênios nas posições já citadas. Entretanto, para carbonos na posição *meta* os valores de seus deslocamentos químicos não são auferidos em relação a substituintes doadores e/ou retiradores de elétrons, de forma que em benzenos monosubstituídos os valores que usualmente estes carbonos apresentam são de  $129 \pm 1$  ppm (Breitmaier, E., Voelter, W. 1990).

O sinal dos carbonos metínicos CH-2' e CH-6' (128,5 ppm) do anel B de deslocamento químico similar quando comparado ao benzeno, revelaram a posição *meta* em relação à oxigenação em C-4'.

O último dentre os nove sinais analisados, um singleto intenso em 6,83 ppm, foi atribuído à presença do hidrogênio H-3 da ligação dupla entre os carbonos olefínicos C-2 e C-3 no anel C. A ligação dupla entre estes carbonos, por possibilitar a conjugação com a carbonila, explicaria a desproteção dos prótons H-2' e H-6' localizados em campo mais baixo no espectro, via efeito de ressonância, quando da ocorrência da coplanaridade entre seus orbitais  $sp^2$ . Outro efeito que pode contribuir com a localização do sinal destes hidrogênios e seus carbonos no anel B, é o efeito de desproteção indutivo do oxigênio adjacente ao carbono olefínico C-2.

A acetilação na hidroxila posicionada em C-4' confirmou sua localização pelo efeito de desproteção, ocasionado pela carboxila nos hidrogênios 3' e 5'  $\delta = 0,28$  ppm.

O singleto, de feição largo, em campo mais baixo (13,0 ppm) foi atribuído ao hidrogênio do grupo (–OH) ligado em C-5, pela ligação intramolecular com o grupo carbinólico (C=O) em C-4, ocasionado pelo efeito indutivo de ambos os oxigênios interagidos com o hidrogênio, reforçando assim, a indicação apresentada pela banda de absorção pertinente a este sinal no espectro de IV já mencionado, para este segundo substituinte analisado indicado no anel aromático A.

*A priori*, tais informações quando comparadas aos dados da literatura consultada (Agrawal, P.K. 1989) indicaram a presença de um flavonóide, já que, em espectros de



RMN  $^1\text{H}$  para esta classe de substâncias, observa-se o acoplamento em *meta* ( $J= 2,5$  Hz) para os hidrogênios H-6 (~6,2 ppm) e H-8 (~6,5 ppm) no anel A, e para os pares de hidrogênios do anel B (H-2'; H-3') e (H-3'; H-6') *para*-substituídos com acoplamento em *orto* ( $J= 9$  Hz), têm-se os dois singletos em ~ 7,7 ppm (H-2'; H-6'), e em ~ 6,8 ppm (H-3'; H-5'). O espectro de COSY (RMN 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) (Espectro 31, pág.103) confirmou as atribuições para os hidrogênios de ambos os anéis citados.

Os dados da literatura (Agrawal, P.K. 1989), distinguem ainda de forma irrefutável o deslocamento químico dos tipos de flavonóides existentes na natureza por meio de alguns sinais peculiares de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Dessa forma, o singlete intenso em 6,83 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  foi atribuído ao hidrogênio olefínico H3 no anel C, possibilitando classificar, inicialmente, este flavonóide como uma flavona.

Os dados de  $^{13}\text{C}$  confirmaram esta classificação por meio dos carbonos olefínicos C-2 (164,3 ppm) e C-3 (103,1 ppm) no anel C, quando comparados aos da literatura (Agrawal, P.K. 1989), C-2 (157,4 - 165,8 ppm) e C-3 (102,3-113,7 ppm).

As atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos do anel A, apresentaram algumas dificuldades quando comparada com o referente anel B, em decorrência da assimetria imposta pelos dois pontos de ligação deste anel com o anel heterocíclico C.

O sinal de C-10 pôde ser mais facilmente identificado pela comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e APT (Espectro 29, pág.101), permitindo a distinção entre os sinais de carbonos metínicos e quaternários, e pelo deslocamento químico comparado com os demais sinais dos carbonos quaternários oxigenados restantes.

A flavanona glicosilada, Sarotanósídeo (Pinocebrina-7-*O*-neohesperidósídeo) [5(OH),7-*O*-glicosil-(2''''-1''''')rhamnosídeo, e a flavona Apigenina 7-*O*- $\beta$ -2''-*O*-a-rhamnosila glucuronídeo (Tabela 16, pág 97), foram tomadas como modelo na comparação e confirmação da estrutura proposta PB.2.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  revelou ainda a presença de duas unidades de piranoses na flavona PB.2, confirmando os valores indicados pelas bandas de absorção no espectro de IV já mencionadas, conforme a existência de sinais típicos de sistemas oximetínicos (O-CH-O-) de hidrogênios anoméricos entre ~ 4,50- 5,40 ppm (Agrawal, K.P. 1992).

Pela análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , e com o auxílio da técnica de APT, constatou-se a presença de 12 sinais condizentes com a dois resíduos de piranoses. Onde dois destes sinais foram atribuídos aos sistemas dioximetínicos (-O-CH-O-) da glicose

(97,8 ppm C-1''; 5,25 ppm H-1'') e da rhamnose (100,4 ppm; C-1'''; 5,12 ppm H-1'''). O valor da constante de acoplamento ( $J$ ) de 6,9 Hz em 5,25 ppm pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$ , possibilitou determinar a configuração  $\beta$  do sistema dioximetínico (-O-CH-O-) da glicose.

Os espectros HETCOR (RMN 2D,  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^1J_{\text{CH}}$ ) (Espectro 30, pág.102) e HMBC (RMN 2D,  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ) (Espectro 32, pág.104), usados para definir as ligações entre os átomos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em conjunto com o espectro de COSY (RMN 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) (Espectro 31, pág.103) (Tabela 17, pág 98) usado na determinação da correlação espacial entre átomos de hidrogênios, auxiliaram no reconhecimento dos sinais de acoplamento entre os demais átomos de ambas hexoses. No entanto, o espectro de HMBC foi imprescindível na correlação dos sinais de ambos os hidrogênios anoméricos, com seus respectivos carbonos.

A distinção entre as três formas isoméricas de rhamanosilglicosídeos, isto é, neo-hesperidosídeos [rhamnosil-(1? 2)-glicosídeos], rutinósídeos [rhamnosil-(1? 6) glicosídeos] e rhamnosil- (1? 4)- glicosídeos pode ser determinada baseada nos deslocamentos químicos do resídeo da glicose (Agrawal, P.K. 1989).

Em neo-hesperidosídeos, por exemplo, o sinal do carbono C-1 da glicose cai em campo alto (~1,0 - 2,0 ppm), quando comparado a  $\beta$ -D-Glicose apenas (C-1; 96,8 ppm), devido ao efeito  $\beta$  da rhamnosilação em C-2. Por conseguinte, o deslocamento químico do carbono anomérico da glicose (97,8 ppm) foi de suma importância para a identificação da ligação (1? 2). Outro deslocamento químico diferenciador para esta ligação, é o carbono C-6 da glicose presente em torno de 61,0 ppm (Agrawal, P.K. 1989).

O valor do carbono oximetínico (CHOH) de C-2'' (77,2 ppm) da glicose, por apresentar ainda um valor em campo mais baixo, cerca de 2 ppm acima do comparado ao da literatura (75,2 ppm) (Agrawal, K.P. 1992), reforçou a conclusão da existência da ligação glicosídica da rhamnose nesta porção da piranose. As substâncias tomadas como modelos (Tabela 16, pág 97), após obtenção dos valores dos deslocamentos químicos nos espectros de HETCOR e HMBC (Tabela 17, pág 98), confirmaram o local da ligação di-*O*-glicosilflavona entre as hexoses.

A glicosilação atribuída em C-7' (anel A) por causar um deslocamento químico para campo mais baixo no carbono *ipso* (162,5 ppm) e em campo mais alto nos carbonos em *orto* (C-6 99,3 ppm; C-8 94,5 ppm), proporcionou um caminho para a identificação do local da glicosilação após a identificação das ligações metínicas (CH) neste anel pelo espectro HETCOR, bem como pela ausência desta correlação com C-7'. O espectro

HMBC pôde, então, confirmar como sendo neste carbono o local da ligação glicosídica através da ligação a longa distância ( $^2J$  e  $^3J$ ) entre os grupos metínicos (CH-6 e CH-8) em *orto* a C-7.

Diante dos dados fornecidos pelos espectros analisados, confrontados com os padrões utilizados para a estrutura proposta, o flavonóide foi determinado como sendo a flavona Apigenina -7- *O*- neo-hesperidosídeo; 5,4' diidroxiflavona-7-*O*-[  $\beta$ -D-glicopiranosil - (2''? 1''') ]  $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo (PB.2).

Tabela 16: Dados de RMN  $^1H$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm, Hz) e  $^{13}C$  (50 MHz, , DMSO- $d_6$ ) da substância PB.2 comparados com valores citados na literatura.<sup>a, b</sup>

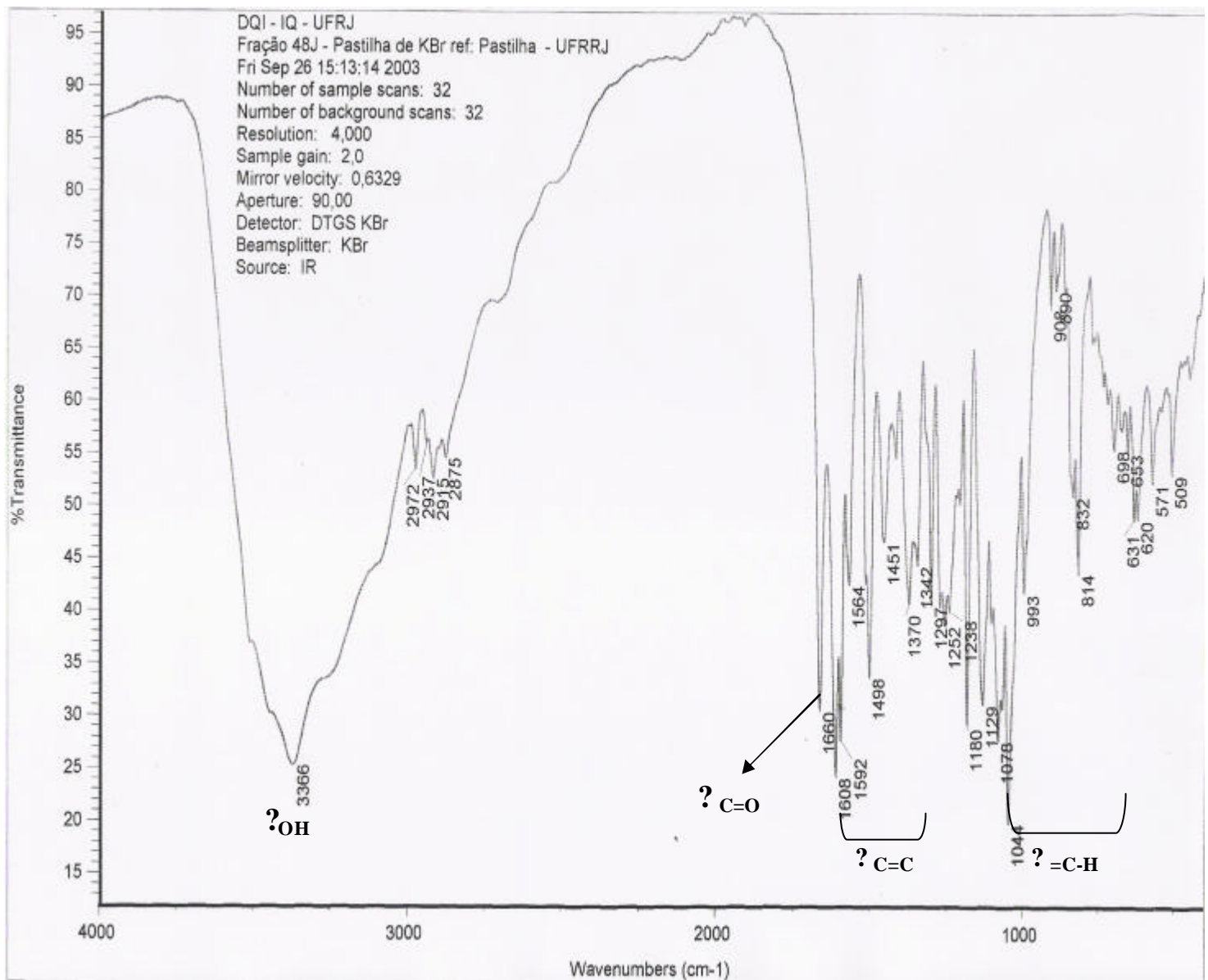
| 4'''- <i>O</i> -Acetilsarotanosídeo<br>(Flavanona)<br>( $^1H$ 100MHz, DMSO $d_6$ /D $_2$ O) <sup>a</sup> |            |                                     | Apigenina 7- <i>O</i> - $\beta$ (2''- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnosil)<br>Glucuronídeo ( $^1H$ 400 e $^{13}C$ 100 MHz) <sup>b</sup> |                                    | Substância PB.2              |                              |
|--|------------|-------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| C  | d $^{13}C$ | d $^1H$ (mult., J Hz)               | d $^{13}C$   | d $^1H$ (mult., J Hz)              | d $^{13}C$                   | d $^1H$ (mult., J Hz)        |
| <b>Anel Aromático C</b>  |            |                                     |  |                                    |                              |                              |
| 2  | 77,0       | 5,98 ( <i>dd</i> , $J= 12,0; 3,0$ ) | 164,2  | 6,81 ( <i>s</i> )                  | 164,3                        | 6,83 ( <i>s</i> )            |
| 3  | 42,1       |                                     | 102,9  |                                    | 103,1                        |                              |
| 4  | 196,8      |                                     | 181,8  |                                    | 181,9                        |                              |
| <b>Anel Aromático A</b>  |            |                                     |  |                                    |                              |                              |
| 5  | 163,0      | 6,46 ( <i>d</i> , $J= 2,0$ )        | 160,9  | 6,90 ( <i>d</i> , $J= 1,8$ )       | 161,5                        | 6,40 ( <i>d</i> , $J= 2,1$ ) |
| 6  | 96,4       |                                     | 99,4   |                                    | 99,3                         |                              |
| 7  | 164,8      | 6,53 ( <i>d</i> , $J= 2,0$ )        | 162,6  | 6,76 ( <i>d</i> , $J= 1,8$ )       | 162,5                        | 6,80 ( <i>d</i> , $J= 2,1$ ) |
| 8  | 95,1       |                                     | 94,3   |                                    | 94,5                         |                              |
| 9  | 162,6      |                                     | 156,9  |                                    | 156,9                        |                              |
| 10   | 103,4      |                                     | 105,3  |                                    | 105,4                        |                              |
| OH   |            |                                     |  |                                    |                              | 13,0 ( <i>s</i> )            |
| <b>Anel Aromático B</b>  |            |                                     |  |                                    |                              |                              |
| 1'   | 138,4      |                                     | 120,5  | 7,88 ( <i>d</i> , $J= 8,8$ )       | 120,8                        | 7,98 ( <i>d</i> , $J= 9,0$ ) |
| 2'6'   | 126,6      |                                     | 128,4  |                                    | 128,5                        |                              |
| 3'5'   | 128,5      |                                     | 116,0  | 116,0                              | 6,94 ( <i>d</i> , $J= 9,0$ ) |                              |
| 4'   | 128,6      |                                     | 161,7  | 161,0                              |                              |                              |
| <b>Glicosila</b>   |            |                                     |  |                                    |                              |                              |
| 1''  | 97,7       | 5,56 ( <i>m</i> )                   | 97,6   | 5,17 ( <i>d</i> , $J= 7,3$ )       | 97,8                         | 5,25 ( <i>d</i> , $J= 6,9$ ) |
| 2''  | 78,6       |                                     | 76,2   | 3,48 ( <i>m</i> )                  | 77,2                         | 3,46 ( <i>d</i> , $J= 3,3$ ) |
| 3''  | 75,5       | 5,13 ( <i>t</i> , $J= 10,0$ )       | 77,4   | 3,45 ( <i>m</i> )                  | 76,2                         | 3,48 ( <i>d</i> , $J= 4,8$ ) |
| 4''  | 69,5       |                                     | 71,9   | 3,19 ( <i>m</i> )                  | 69,6                         | 3,30 ( <i>s</i> )            |
| 5''  | 77,0       |                                     | 73,3   | 3,59 ( <i>d</i> , $J= 10,0$ )      | 76,9                         | 3,44 ( <i>d</i> , $J= 8,1$ ) |
| 6''  | 60,4       |                                     | 1,42 ( <i>d</i> , $J= 7,0$ )   | 171,5                              |                              | 60,4                         |
| <b>Rhamnosila</b>  |            |                                     |  |                                    |                              |                              |
| 1'''   | 99,7       | 5,56 ( <i>m</i> )                   | 100,4  | 5,12 ( <i>d</i> , $J= 1,2$ )       | 100,4                        | 5,12 ( <i>s</i> )            |
| 2'''   | 70,2       |                                     | 70,3   | 3,66 ( <i>m</i> )                  | 70,3                         | 3,71 ( <i>d</i> , $J= 4,5$ ) |
| 3'''   | 67,9       | 5,13 ( <i>t</i> , $J= 10,0$ )       | 70,4   | 3,31 ( <i>dd</i> , $J= 9,4; 3,3$ ) | 70,5                         | 3,75 ( <i>d</i> , $J= 6,4$ ) |
| 4'''   | 74,0       |                                     | 71,8   | 3,19 ( <i>m</i> )                  | 71,8                         | 3,20 ( <i>s</i> )            |
| 5'''   | 65,6       |                                     | 68,2   | 3,73 ( <i>dd</i> , $J= 9,3; 6,2$ ) | 68,3                         | 3,77 ( <i>d</i> , $J= 6,3$ ) |
| 6'''   | 17,5       |                                     | 1,42 ( <i>d</i> , $J= 7,0$ )   | 17,9                               | 1,18 ( <i>d</i> , $J= 6,2$ ) | 18,0                         |

a- Me(Ac) 20,8 (2,32, *s*), CO (Ac) 169,8 (Ripperger, H. 1981);

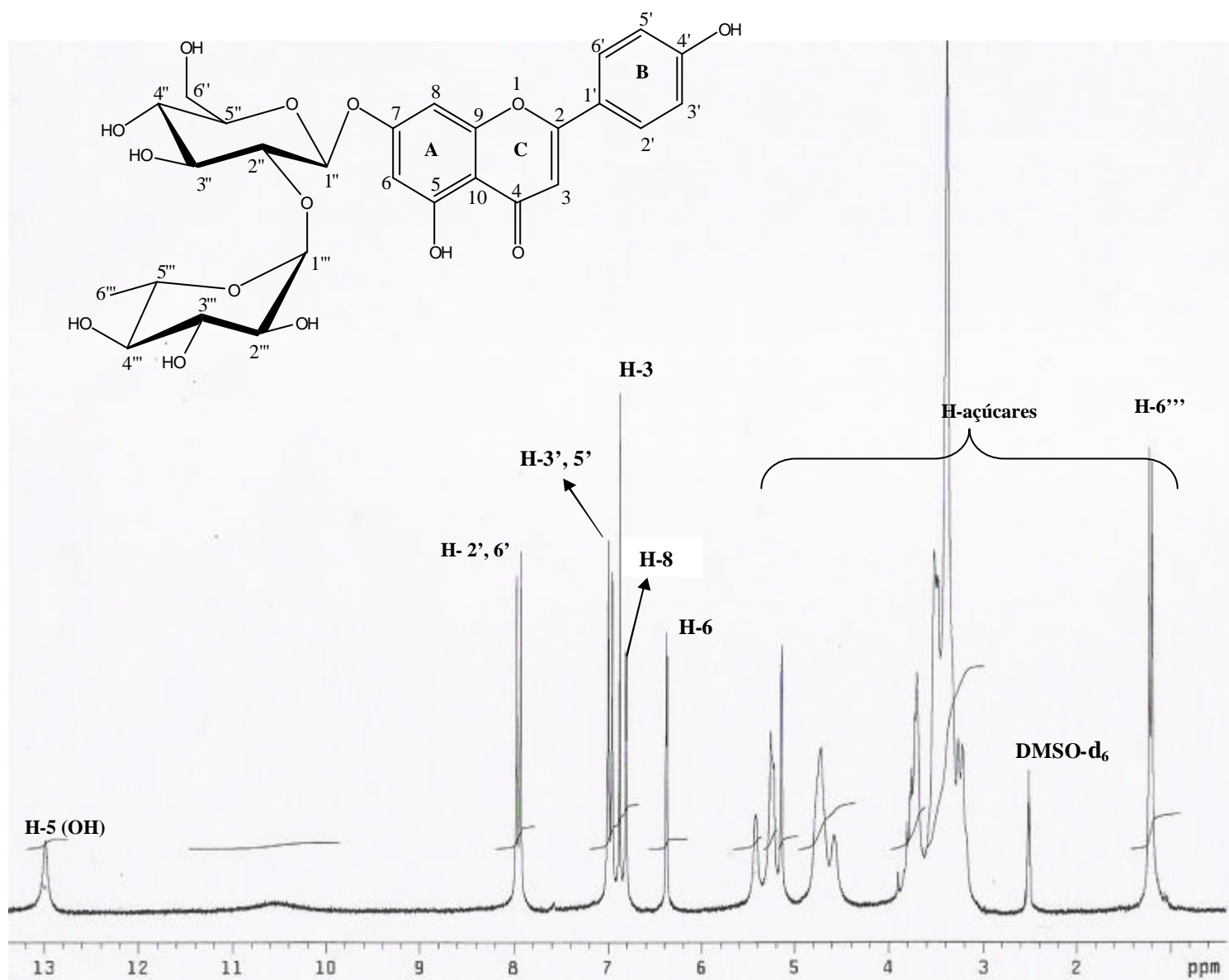
b- (Huang, Y. *et al.* 1999)

Tabela 17: Dados resultantes de experiência de 1D e 2D, RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm, Hz),  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HETCOR ( $^1\text{J}$ ), ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) e HMBC-  $^n\text{JCH}_n = 2,3$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) com PB.2

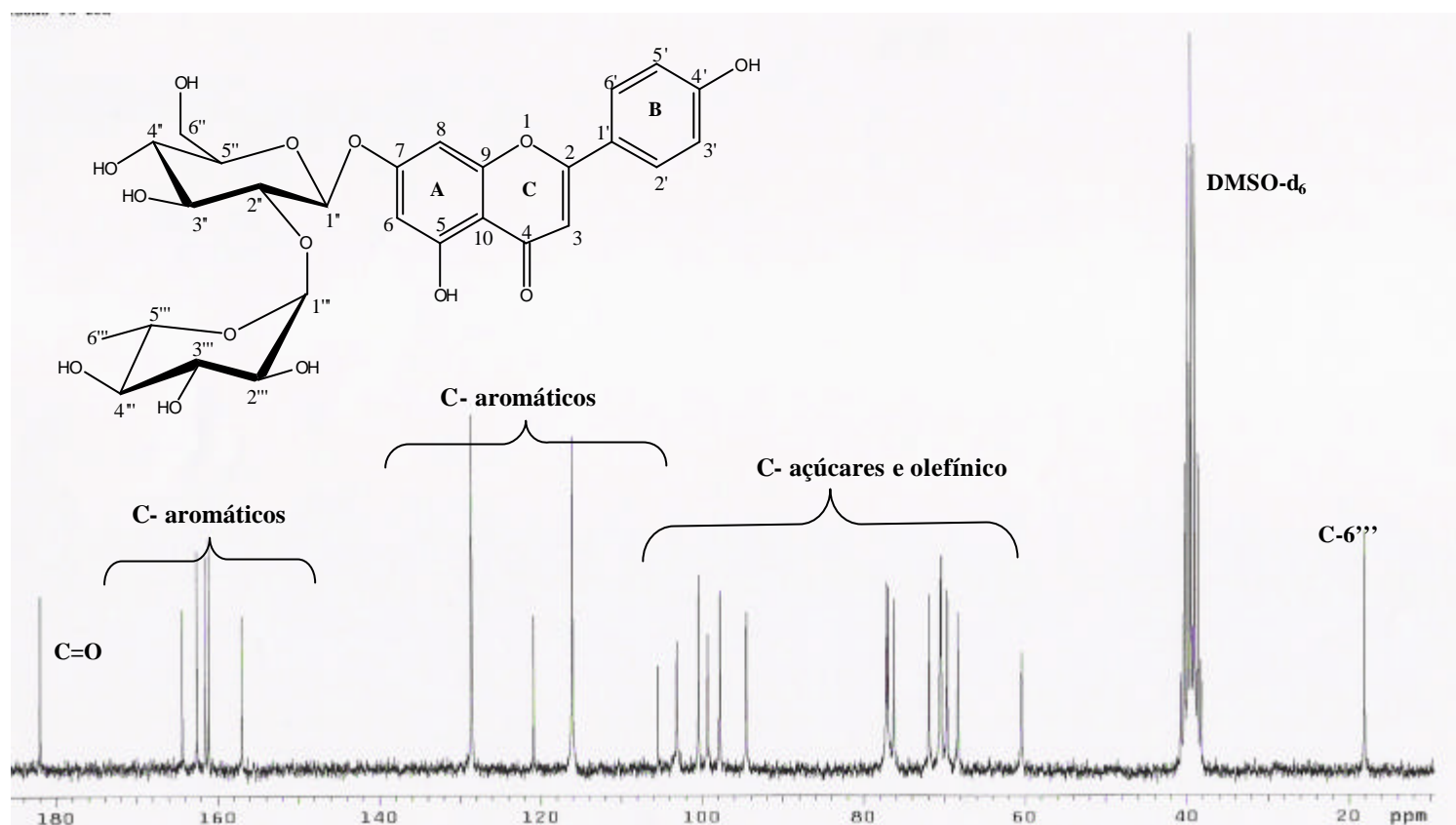
| C    | $d^{13}\text{C}$ | $d^1\text{H}$ (mult., J Hz)        | $^2\text{J}_{\text{CH}}$ | $^3\text{J}_{\text{CH}}$ | $^1\text{H} \times ^1\text{H}_{\text{COSY}}$ |
|------|------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| 1'   | 120,8            |                                    |                          | H-5'; H-3'               |  |
| 4'   | 161,0            |                                    |                          | H-6; H-2                 |  |
| 2    | 164,3            |                                    | H-3                      |                          |  |
| 4    | 181,9            |                                    | H-3                      |                          |  |
| 5    | 161,5            |                                    | H-6                      |                          |  |
| 7    | 162,5            |                                    | H-6; H-8                 |                          |  |
| 9    | 156,9            |                                    | H-8                      |                          |  |
| 10   | 105,4            |                                    |                          | H-6                      |  |
| CH   |                  |                                    |                          |                          |  |
| 2'   | 128,5            | 7,95 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0)  |                          | H-5'                     | H-2'- H-6'                                   |
| 3'   | 116,0            | 6,94 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)  |                          | H-3'                     | H-3'- H-5'                                   |
| 5'   | 116,0            | 6,94 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)  |                          | H-2'                     | H-5'- H-3'                                   |
| 6'   | 128,5            | 7,95 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0)  |                          |                          | H-6'- H-2'                                   |
| 3    | 103,1            | 6,83 ( <i>s</i> )                  |                          |                          |  |
| 6    | 99,3             | 6,96 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)  |                          | H-8                      | H-6 - H-8                                    |
| 8    | 94,5             | 6,80 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)  |                          | H-6                      | H-8 - H-6                                    |
| 1''  | 97,8             | 5,25 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,9)  | H-2''                    | H-3''                    | H-1''- H-2''                                 |
| 2''  | 77,2             | 3,46 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 3,3)  | H-1'';H-3''              |                          | H-2''- H-3''                                 |
| 3''  | 76,2             | 3,48 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 4,8)  | H-2'';H-4''              |                          | H-3''- H-4''                                 |
| 4''  | 69,6             | 3,30 ( <i>s</i> )                  | H-3'';H-5''              |                          |  |
| 5''  | 76,9             | 3,44 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)  | H-4''; H-6''             |                          | H-5''- H-6''                                 |
| 1''' | 100,4            | 5,12 ( <i>s</i> )                  |                          |                          |  |
| 2''' | 70,3             | 3,71 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 4,5)  | H-1''' ; H-3'''          | H-4'''                   | H-2'''- H-3'''                               |
| 3''' | 70,5             | 3,75 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,4)  | H-2''' ; H-4'''          |                          | H-3'''- H-4'''                               |
| 4''' | 71,5             | 3,20 ( <i>s</i> )                  | H-3''' ; H-5'''          |                          | H-4'''- H-5'''                               |
| 5''' | 68,3             | 3,77 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,3)  | H-4''' ; H-6'''          |                          | H-5'''- H-6'''                               |
| CH2  |                  |                                    |                          |                          |  |
| 6''  | 60,4             | 4,74 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 16,5) | H-5''                    |                          | H-6''- H-5''                                 |
| 6''' | 18,0             | 1,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1)  | H-5'''                   |                          | H-6'''- H-5'''                               |



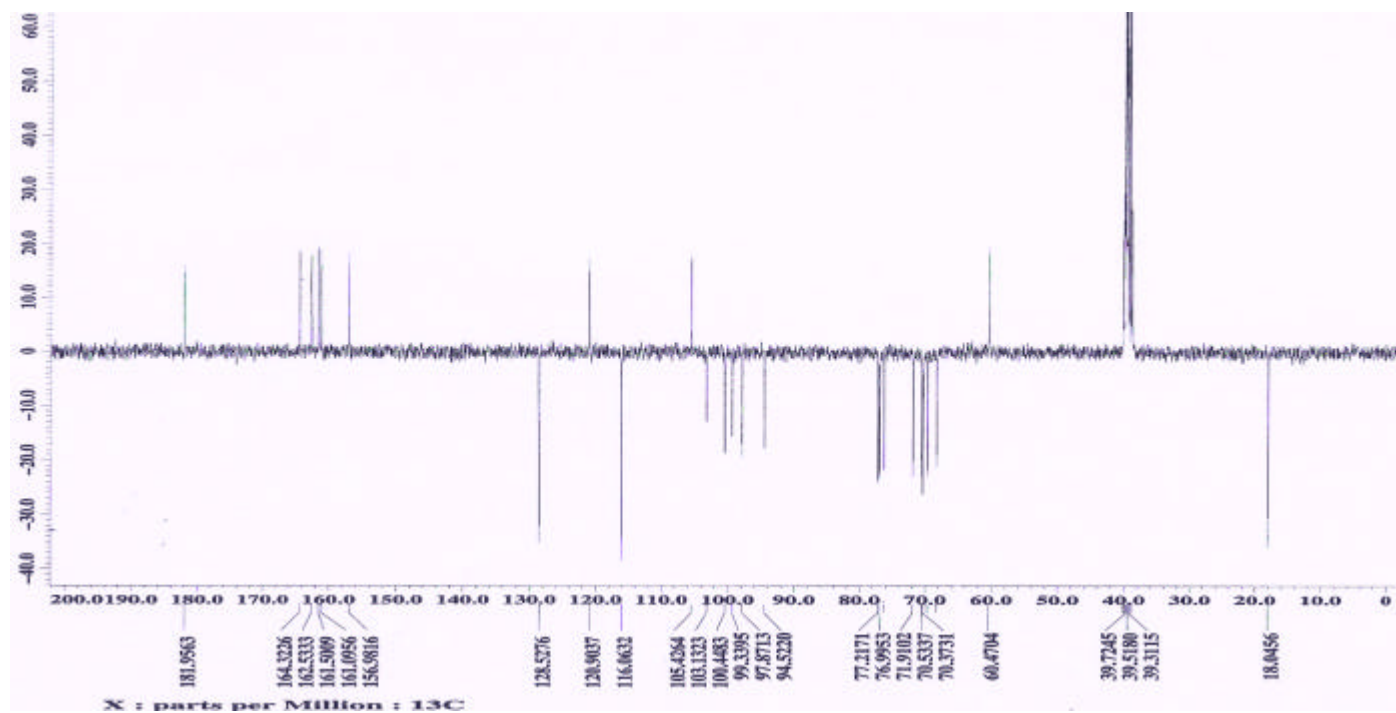
Espectro 26: Espectro de IV da substância PB.2



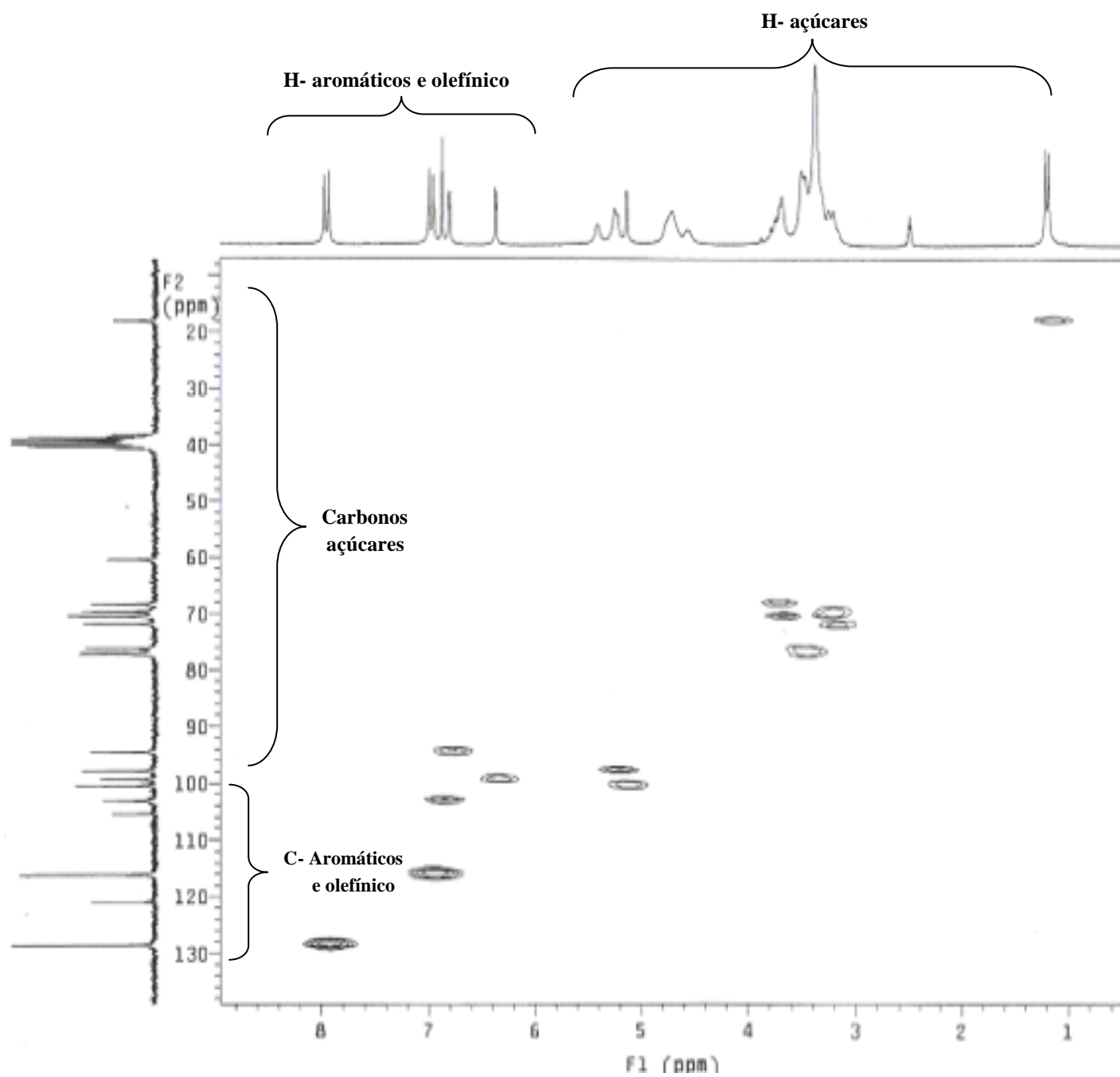
Espectro 27: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PB.2 (200 MHz, DMSO- $d_6$ )



Espectro 28: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de PB.2 (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).

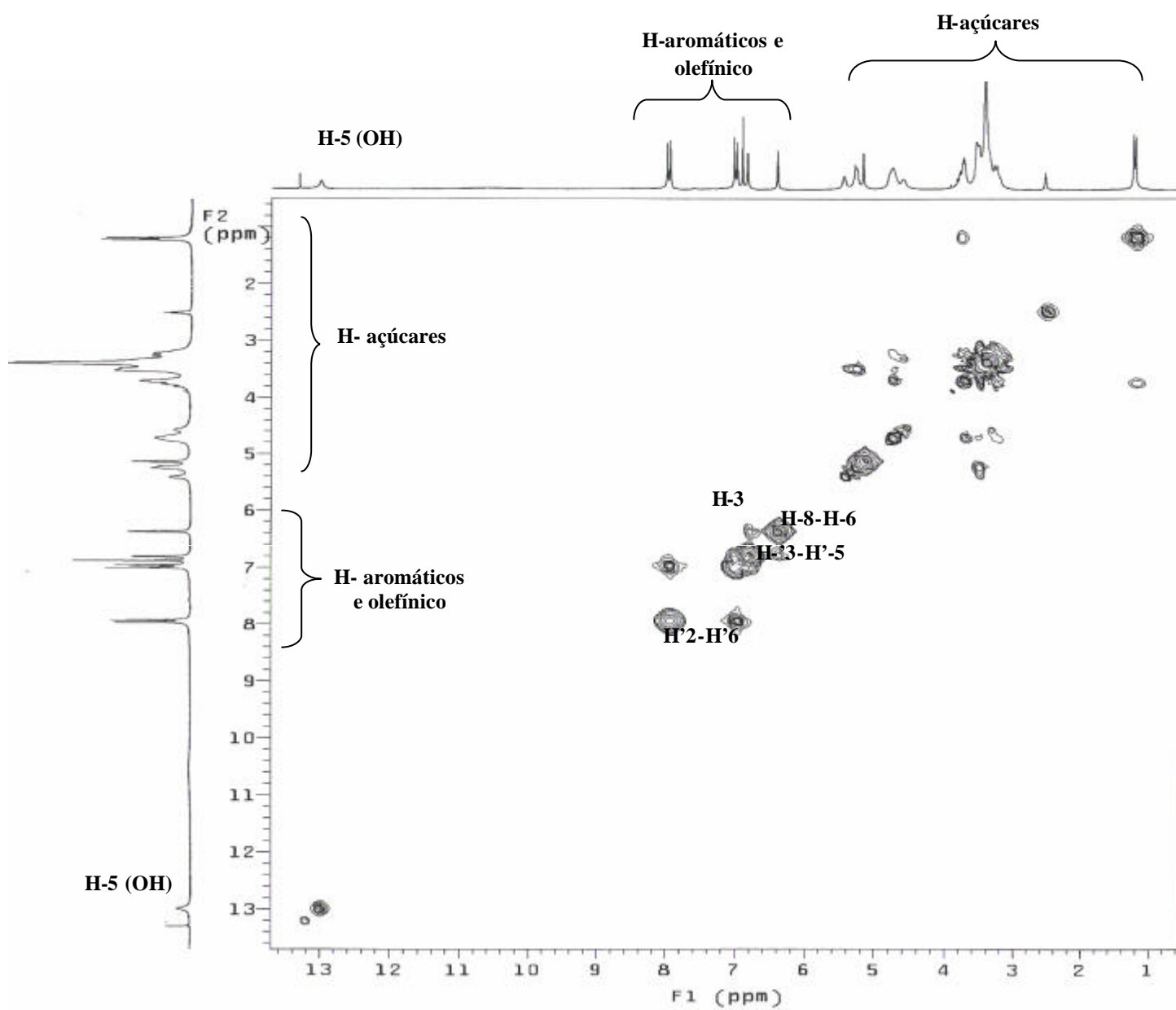


Espectro 29: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (APT: CH<sub>3</sub>, CH para baixo; C, CH<sub>2</sub> para cima) de PB.2 (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

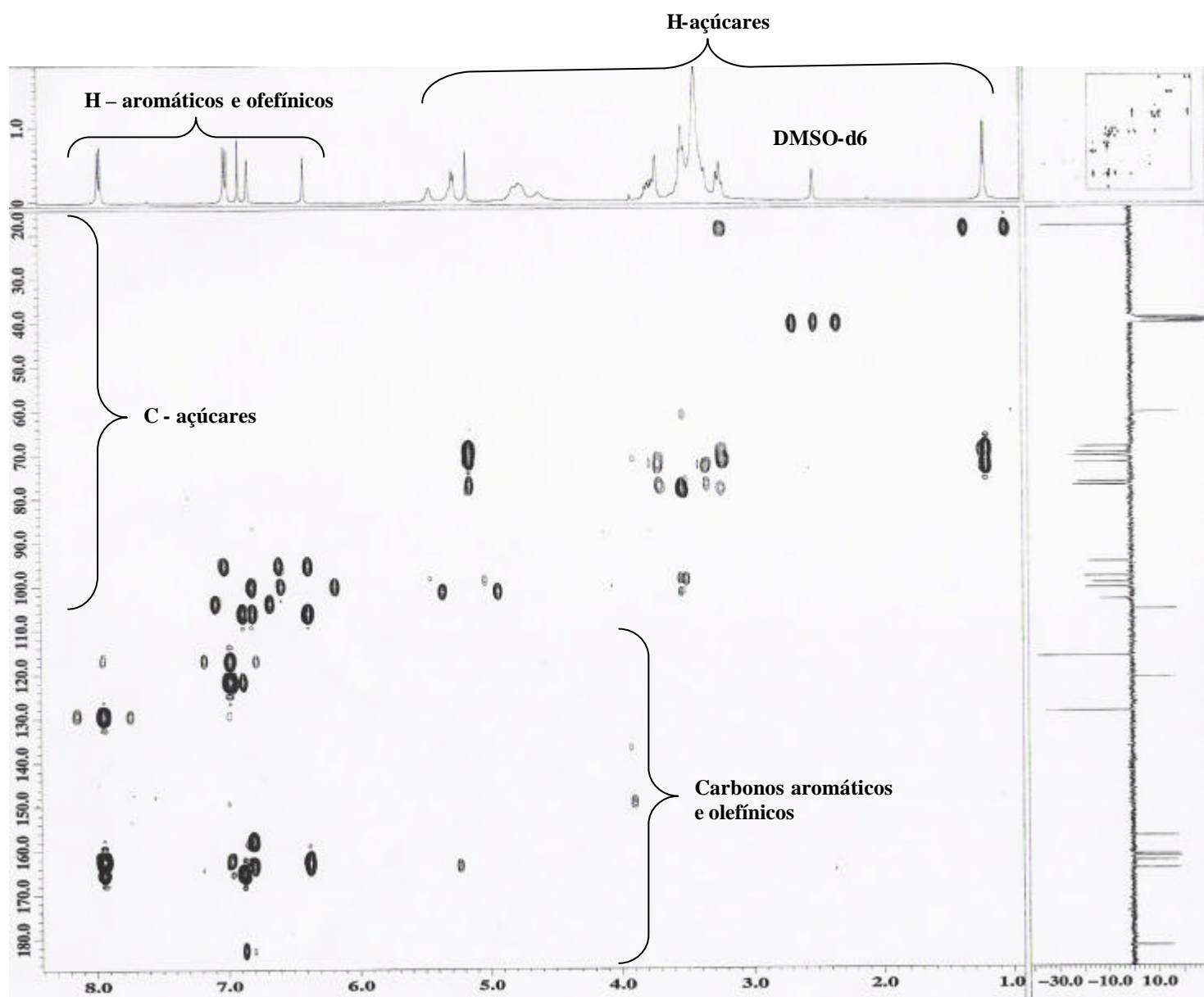


Espectro 30: Espectro de Correlação Heteronuclear  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HETCOR, 200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de PB.2





Espectro 31: Espectro de Correlação Homonuclear  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  (COSY, 200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de PB-2



Espectro 32: Espectro  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC ( $J^2$ ;  $J^3$ ), região (1,0-8,0 X 15-185,0) ppm PB-2(400 MHz, DMSO- $d_6$ )

#### 4.4.3 Determinação Estrutural do Derivado (PB.2.1)

Um método geralmente empregado para a confirmação de uma dada proposta estrutural, em flavonóides, está na derivação dos grupos funcionais em suas moléculas, e, por meio desta metodologia, comparar os deslocamentos químicos através da técnica de RMN  $^{13}\text{C}$  antes e após a derivação do flavonóide (Agrawal, K. P. 1989).

Este método, não somente fornece uma estabilidade adicional ao flavonóide (aumento da estabilidade oxidativa e da solubilidade em deutério-clorofórmio), como também fornece relevantes informações de ordem estrutural. A natureza do grupo hidroxila pode ser predita através dos deslocamentos do C-a e de outros deslocamentos químicos em sua vizinhança. Ainda pode, predizer com exatidão o número destes grupos por meio dos deslocamentos extras via introdução de grupos funcionais, visto que, cada derivação induz a mudanças nos deslocamentos químicos no espectro de  $^{13}\text{C}$ , podendo assim ser empregado na localização do grupo hidroxil em flavonóides hidroxilados (Agrawal, K. P. 1989).

A acetilação de cada grupo hidroxila, comporta dois carbonos adicionais correspondentes aos grupos carbonila CO(Ac) e metila Me(Ac) do grupo acila, e que aparecem, respectivamente, em uma faixa de deslocamentos químicos bem restritos e de fácil identificação, ~167-172 ppm, ~18-22 ppm. Desta forma, o número de grupos hidroxila não acetilados pode ser determinado por meio do número de sinais existentes nestas duas regiões do espectro (Agrawal, K. P. 1989).

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 34, pág.110), APT (Espectro 35, pág.110) e  $^1\text{H}$  (Espectro 33, pág.109) do derivado PB 2.1, demonstraram que todos os oito grupos hidroxilas presentes na substância PB 2 foram acetilados, após a realização do experimento (Item 3.2.2.2, pág 35) conforme os oitos sinais de carbonilas do grupo acetoxila, CO(Ac), presentes no espectro  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  170,3; 170,0; 169,9; 169,8; 169,6; 169,5; 169,2; 168,8 ppm; oito singletos de cada metila, Me(Ac), –  $\delta$  2(29,5); 21,0; 20,9; 20,7; 20,6; 20,5; 20,4 ppm, bem como no espectro de  $^1\text{H}$  -  $\delta$  2,42; 2,33; 2,14; 2,12; 2,04; 1,98; 1,94 e 1,19 ppm. A flavanona acetilada Pinocembrina 7-neo-hesperidosídeo (Tabela 18, pág 108) foi tomada como modelo quanto a atribuição dos deslocamentos químicos do derivado PB 2.1 [4(OAc), 5(OAc), 7-O-glc (Ac)<sub>3</sub> (2''', 1''') rha (Ac)<sub>3</sub>].

O derivado PB-2.1, apresentou mudanças nos deslocamentos químicos, significativas, correspondentes aos efeitos de proteção nos carbonos *ipso* (blindagem destes carbonos devido aos efeitos exercidos pelo átomo de oxigênio carbonílico e pelo grupo metila da função acetoxila), e de desproteção nos carbonos *orto* e *para* (diminuição da capacidade de blindagem pelo efeito mesomérico retirador de elétrons), e que são por sua vez, consistentes com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxilas em acetoxilas.

Nestes valores incluiu-se o efeito de solvente, já que, segundo Agrawal (Agrawal, K. P. 1989), nos espectros de flavonóides o valor do deslocamento químico de cada carbono, aumenta em torno de  $\sim 0,5$  ppm quando o solvente é trocado de  $\text{CDCl}_3$  para  $\text{DMSO}-d_6$ .

Segundo ainda Agrawal, a carbonila do grupo  $\text{CO}(\text{Ac})$  de acetatos aromáticos surge em torno de 2 ppm abaixo ( $168,5 \pm 0,2$  ppm) quando comparado ao deslocamento químico de carbonilas de acetatos alifáticos ( $171, 0 \pm 1,0$  ppm) (Agrawal, K.P. 1989). Entretanto, por estarem presentes diferentes níveis de água em qualquer solvente, ou mesmo envolvendo a hidratação de glicosídeos, é comum que alguns deslocamentos químicos destes açúcares sejam afetados, como resultado da variação de interações entre soluto-solvente (Agrawal, K. P. 1989). Isto por sua vez, poderia justificar a diferença de valores de  $\sim 1,1$  ppm apresentados pelas carbonilas das acetoxilas no derivado e de alguns carbonos na estrutura cíclica das piranoses.

Pela análise dos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos do anel B, em relação ao substituinte acetilado em C-4', pôde-se constatar a ocorrência adicional dos valores dos deslocamentos químicos para campo mais baixo dos carbonos em *orto* e *para*, por efeito mesomérico de desproteção, respectivamente, com uma variância de magnetude de  $\delta_{\text{C}}$  6,2 ppm e 8,5 ppm quando comparados à substância PB. 2.

Estes resultados estão de acordo com Breitmaier e Voelter (Breitmaier, E., Voelter, W. 1990), que apontam para os efeitos de blindagem pela acetilação de grupos hidroxil fenólicos em carbonos aromáticos *ipso* (oxi-substituídos), enquanto em carbonos *orto* e *para* ocorre o desblindamento em relação ao fenol de origem. Além do que, a acetoxila exerce um efeito de proteção e desproteção (indutivo e mesomérico) maior que a hidroxila no anel aromático.

A mudança do deslocamento químico do sinal da carbonila em campo baixo C-4 ( $181,9$  ppm) da substância PB 2, influenciado pela interação da ligação intramolecular com

o hidrogênio do grupo OH de C-5, e para campo mais alto (176,1 ppm) no derivado PB 2.1, pôde confirmar a acetilação desta hidroxila. O efeito de proteção causado em C-4 pela ressonância com os carbonos olefínicos do anel C, justifica a diferença de magnitude de  $\delta_{\text{C}}$  5,80 ppm da carbonila de ambas substâncias, após a quebra da ligação quelatogênica mantida pela hidroxila antes de ser acetilada.

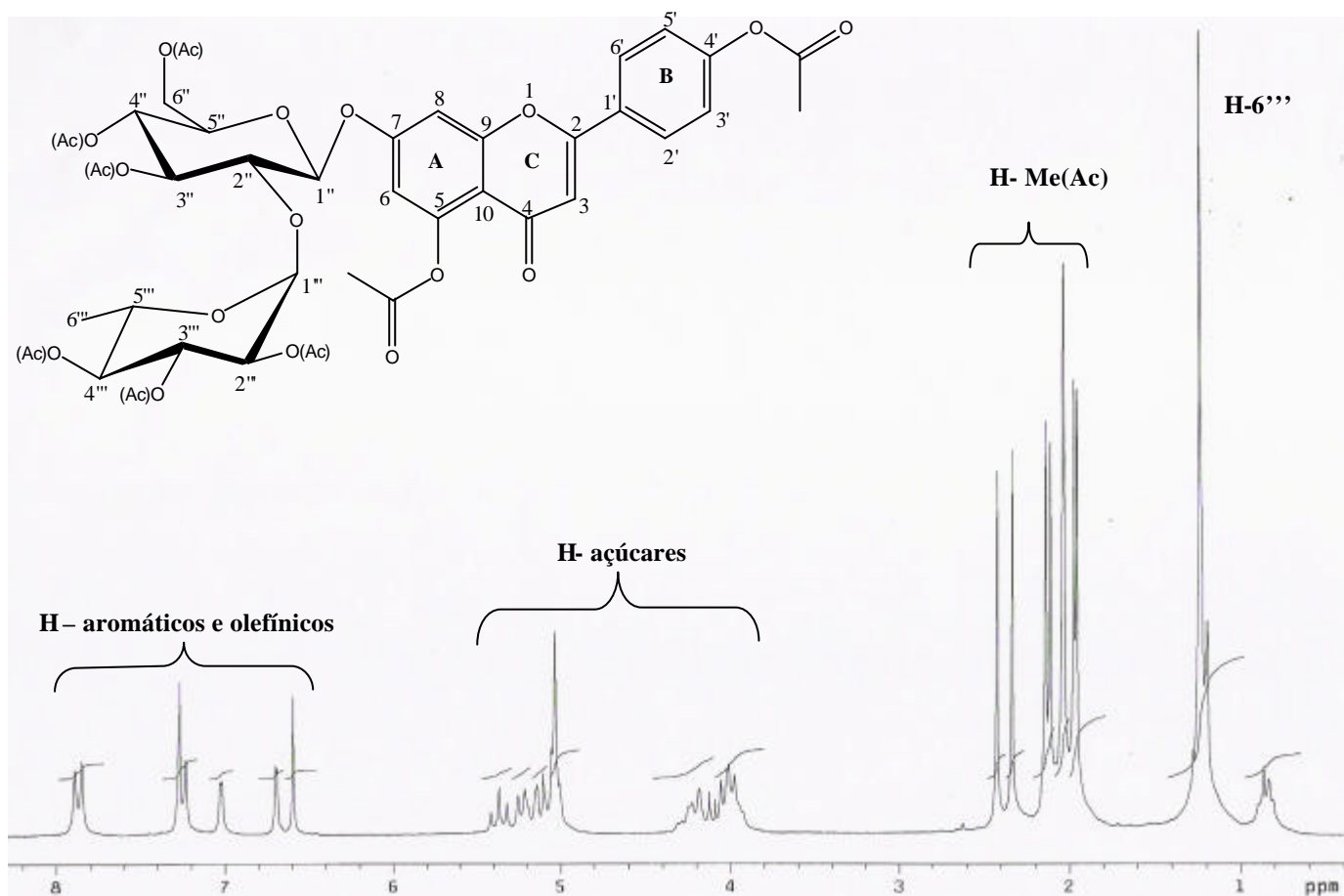
A análise dos sinais dos prótons aromáticos (H-3'; H5') pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$ , apresentaram deslocamentos paramagnéticos em campo mais baixo (~ 0,14- 0,30 ppm) quando comparados aos prótons aromáticos da substância PB.2. Isto pode ser justificado tanto pelo efeito de desproteção mesomérica da acetoxila como grupo retirador de elétrons, bem como pelo efeito estérico da existência de coplanaridade desta acetoxila com o anel aromático. De forma que, os átomos de hidrogênio em *orto*, em relação ao carbono *ipso* ligado ao grupo acetil, não atinjam a região de blindagem anisotrópica da carbonila (C=O). O hidrogênio H-8 (7,0 ppm) e H-6 (6,70 ppm) na posição *para* em relação a acetoxila de C-5, apresentou maior valor quando comparado ao H-8 (6,80 ppm) e H-6 (6,40 ppm) da substância PB.2, justificado pelo grupo retirador de elétrons da carbonila.

Tabela 18: Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm, Hz) e  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância PB.2.1 comparados com valores citados na literatura.<sup>a</sup>

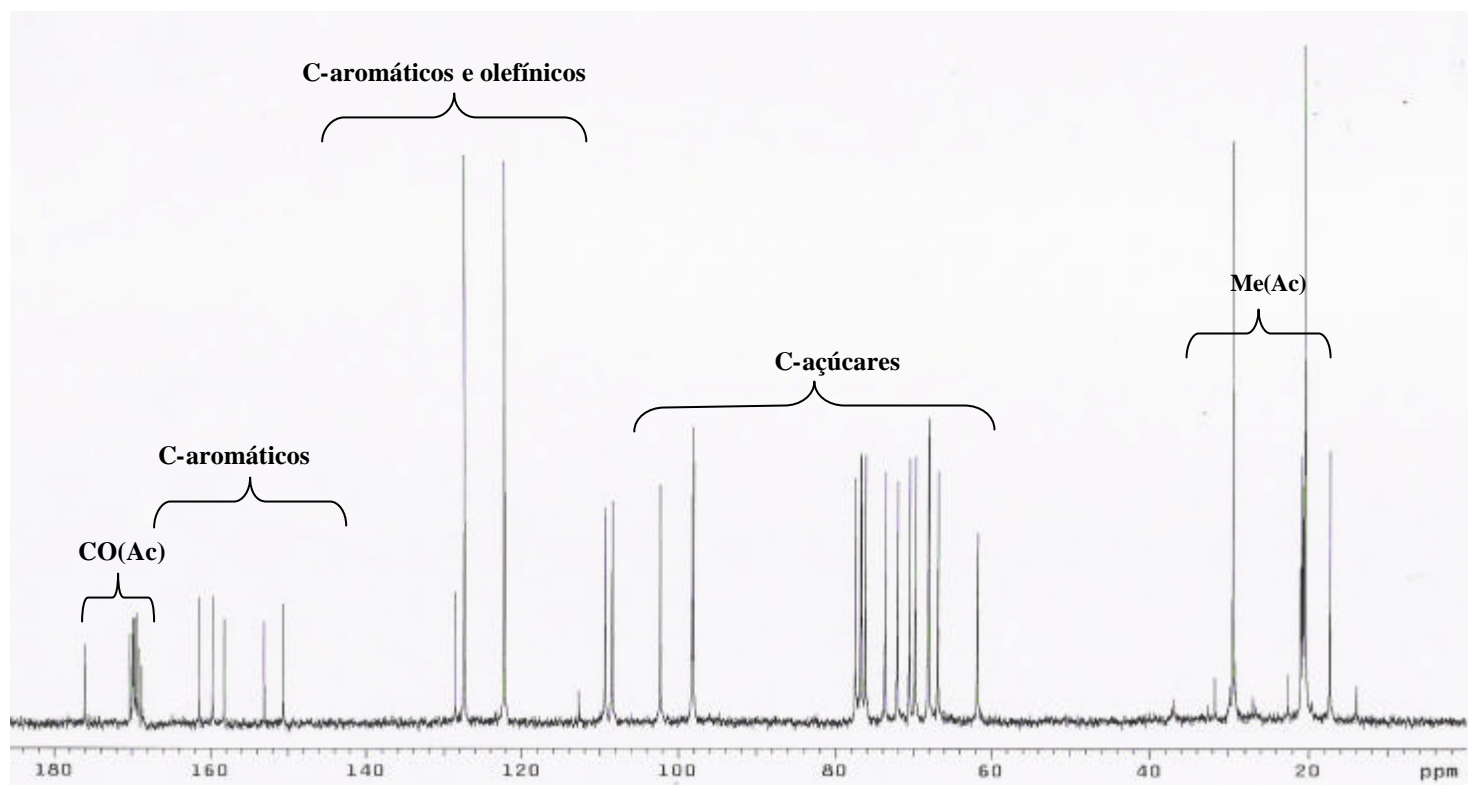
| Pinocembrina 7-neo-hesperidosídeo <sup>a</sup><br>5(OAc), 7-O-glc (Ac) <sub>3</sub> (2''', 1''') rha (Ac) <sub>3</sub> |                   |                              | PB 2.1            |                              |
|--|-------------------|------------------------------|-------------------|------------------------------|
| C  | d $^{13}\text{C}$ | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz) | d $^{13}\text{C}$ | d $^1\text{H}$ (mult., J Hz) |
| Anel Aromático C   |                   |                              |                   |                              |
| 2  | 79,6              | 5,98 (dd, J= 12,0; 3,0)      | 161,4             | 6,58 (s)                     |
| 3  | 44,7              |                              | 109,3             |                              |
| 4  | 187,8             |                              | 176,1             |                              |
| Anel Aromático A   |                   |                              |                   |                              |
| 5  | 160,5             | 6,46 (d, J= 2,0)             | 158,3             | 6,70 (d, J= 1,7)             |
| 6  | 98,1              |                              | 98,3              |                              |
| 7  | 169,7             | 6,53 (d, J= 2,0)             | 153,1             | 7,0 (d, J= 1,7)              |
| 8  | 98,0              |                              | 98,1              |                              |
| 9  | 162,5             |                              | 159,7             |                              |
| 10   | 106,2             |                              | 112,7             |                              |
| Anel Aromático B   |                   |                              |                   |                              |
| 1'   | 137,8             | 7,30 (s)                     | 128,5             | 7,84 (d, J= 8,4)             |
| 2'6'   | 125,9             |                              | 127,4             |                              |
| 3'5'   | 128,8             | 7,46 (s)                     | 122,2             | 7,22 (d, J= 6,0)             |
| 4'   | 128,7             | 7,46 (s)                     | 150,6             |                              |
| Glicosila  |                   |                              |                   |                              |
| 1''  | 105,7             | 5,56 (m)                     | 108,4             | 5,23 (d, J=7,6)              |
| 2''  | 73,9              |                              | 72,2              | 5,11 (d, J=7,4)              |
| 3''  | 76,4              | 5,13 (t, J= 10,0)            | 76,3              | 5,36 (t, J=9,6)              |
| 4''  | 68,2              |                              | 68,1              | 4,9- 5,06 (m)                |
| 5''  | 75,6              |                              | 73,7              | 4,9- 5,06 (m)                |
| 6''  | 61,7              | 1,42 (d, J= 7,0)             | 61,8              | 4,2 (d, J=1,9)               |
| Rhamnosila   |                   |                              |                   |                              |
| 1'''   | 102,2             | 4,7- 5,2 (m)                 | 102,3             | 5,03 (s)                     |
| 2'''   | 69,8              |                              | 68,2              | 4,9- 5,06 (m)                |
| 3'''   | 70,7              | 4,7- 5,2 (m)                 | 69,8              | 4,9- 5,06 (m)                |
| 4'''   | 72,1              | 4,7- 5,2 (m)                 | 70,6              | 4,60 (d, J=6,7)              |
| 5'''   | 66,7              | 3,9- 4,2 (m)                 | 66,9              | 3,80 (d, J= 6,8)             |
| 6'''   | 17,4              |                              | 17,4              | 1,23 (s)                     |

a- (Pomilio, B.A *et al.*1979) – Flavanona-CO(Ac) d 178,6 ppm; Me(Ac)- d 20,4; 20,8; 21,0 ppm;  $^1\text{H}$ , s, 7 grupos acetil (2,02; 2,10; 2,17; 2,21; 2,45 ppm).

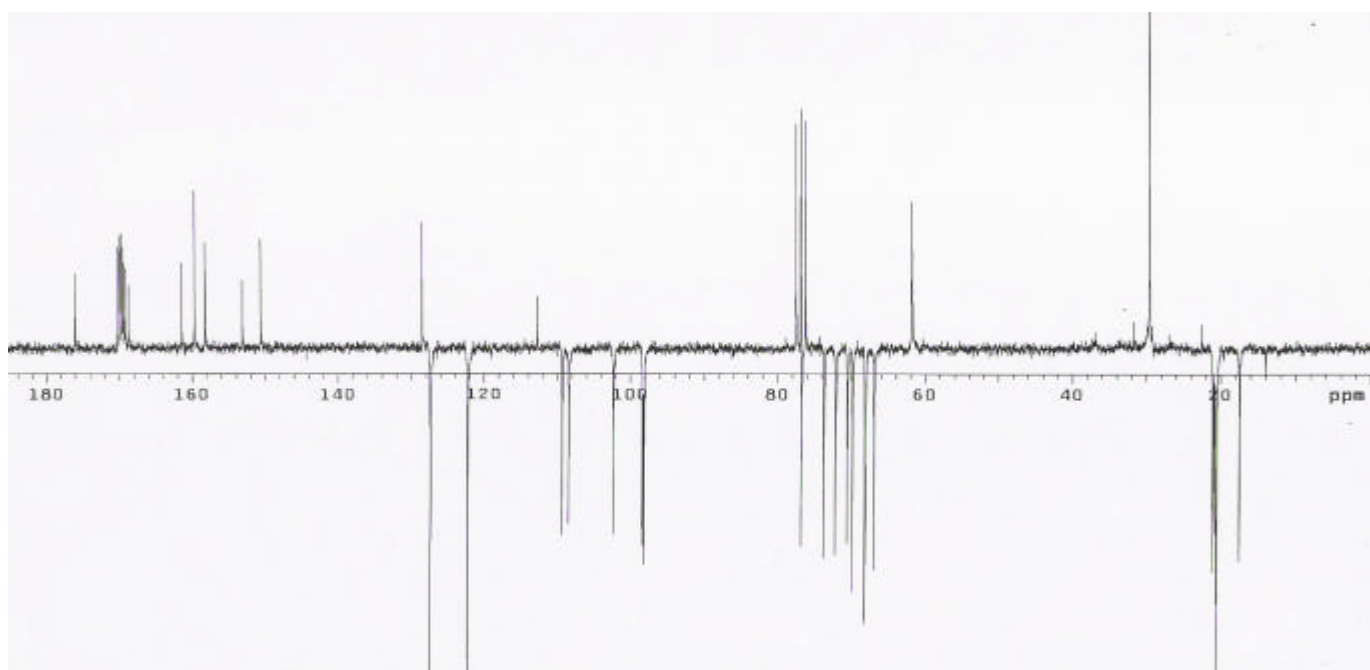
PB 2.1 – CO(Ac) d 170,3;170,0; 169,9; 169,8;169,6;169,5;169,2;168,8 ppm; Me(Ac) – d 2(29,5); 21,0; 20,9; 20,7; 20,6; 20,5; 20,4 ppm; 8 grupos Me(Ac), s, (2,42; 2,33; 2,14; 2,12; 2,04; 1,98; 1,94 e 1,19 ppm)



Espectro 33: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PB.2.1 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Espectro 34 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PB.2.1 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Espectro 35: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PB.2.1 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



#### 4.5 Atividade Antioxidante

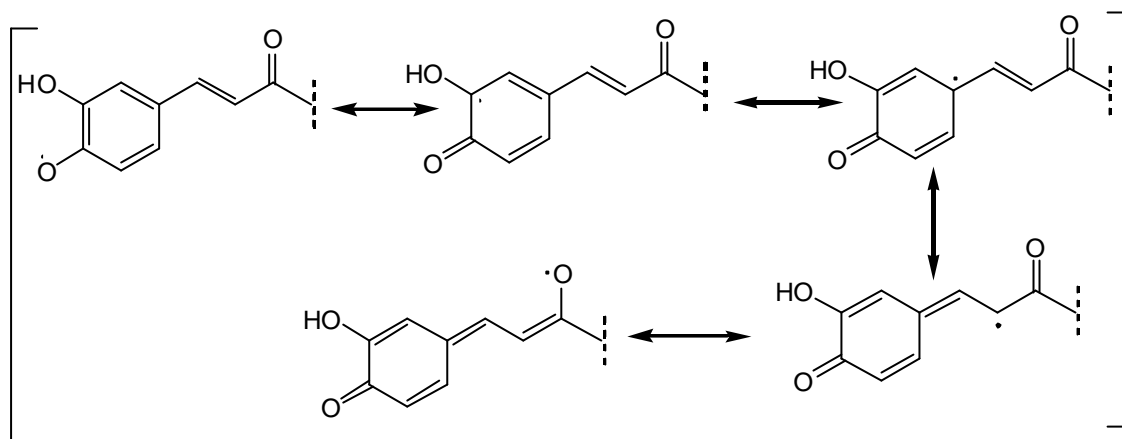
A atividade antioxidante (AA) realizada pelo método fotocolorimétrico do DPPH (pág. 39, item 3.4.1), inicialmente com os extratos brutos e em seguida, com as frações e substâncias isoladas, demonstrou inicialmente à luz da análise dos gráficos (concentração x %AA) para o extrato bruto etanólico das raízes da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl ( $EC_{50}= 64,52 \mu\text{g/ml}$ ) (Tabela 21, pág. 118), um excelente perfil de atividade antioxidante quando comparado com o padrão, extrato padronizado comercial de *Ginkgo biloba* ( $EC_{50}= 40,72 \mu\text{g/ml}$ ). Entretanto, o extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso ( $EC_{50}= 35,13 \mu\text{g/ml}$ ) (Tabela 21, pág. 118), quando comparado ao extrato etanólico de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl apresentou atividade muito inferior.

O extrato padronizado *G. biloba* (Tanakan ou Tebonim) foi tomado como padrão por ser utilizado como um importante coadjuvante pela medicina ortomolecular frente aos muitos efeitos do estresse oxidativo como a queda do sistema imunológico, tônico após um episódio isquêmico cerebral dentre outros efeitos neuroprotetores, arteriosclerose, artrite reumatóide, removedor de radicais livres tóxicos derivados do oxigênio, efeito neuroprotetor dentre outros que este antioxidante venha a atuar sobre a saúde humana, quando usado de forma correta sob orientação médica (Gordon, M, H. 1996), (Schulz, V. *et al.* 2002).

O extrato bruto hexânico testado das raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, por não ter apresentado efeito promissor de atividade antioxidante (AA), valor de  $EC_{50}$  muito baixo, não pôde ser calculado. Atribui-se este fato, *a priori*, por este extrato não apresentar, conforme o espectro de  $^1\text{H}$  obtido (Espectro 1, pág 58), sinais de substâncias com grupo carbonílico adjacente à ligação dupla entre carbonos em conjugação com anel aromático, bem como a presença de grupamentos hidroxilas em *orto* em substâncias de caráter fenólico ou não, como fatores de suma importância para a existência de atividade antioxidante (Namjo, F. *et al.* 1996), (Okada, Y. *et al.* 1996). O número de grupos hidroxilas fenólicas presentes na molécula, é outro importante fator para a existência de AA (Sheng, Q. G *et al.* 2002).

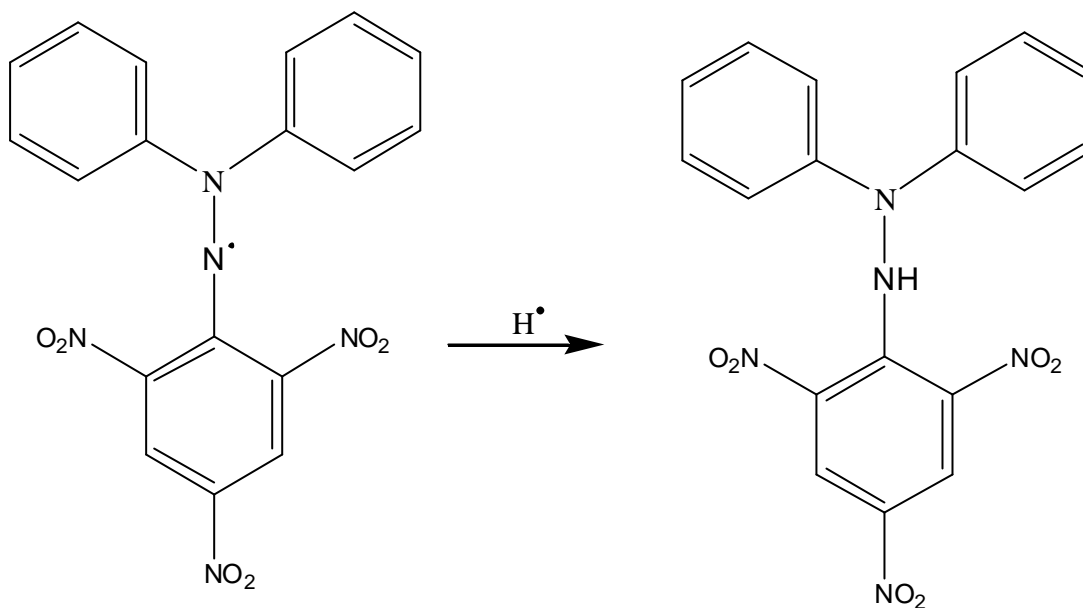
A atividade antioxidante de uma dada substância com as características de ordem estrutural mencionadas acima promoveriam na estrutura molecular, após a perda de um radical hidrogênio ( $\text{H}^\bullet$ ), híbridos de ressonância (Esquema 4) produzido pelo elétron ímpar do orbital *p* do oxigênio da hidroxila de origem, com a totalidade do sistema *p* ao longo da

substância. De modo que, a extensão das ligações dupla da arila conjugadas com a olefina, torna o radical livre mais estabilizado, ou seja, o conteúdo energético quando comparado à molécula de origem diminui. A perda do átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono alifático adjacente ao anel aromático, como no caso do hidrogênio benzílico H-7 nas estruturas dos arilpropanóides glicosilados obtidos da fração acetato de etila, pode vir a se tornar igualmente favorável diante de um radical livre (Morrison, R., Boyd, R. 1983).



**Esquema 4: Híbridos de Ressonância**

Como se pode observar, os elevados valores obtidos de AA no extrato etanólico ( $EC_{50} = 64,52 \mu\text{g/ml}$ ) e de suas frações mais polares (clorofórmica  $EC_{50} = 55,26 \mu\text{g/ml}$ , acetato de etila  $EC_{50} = 46,60 \mu\text{g/ml}$  e butanólica  $EC_{50} = 34,57 \mu\text{g/ml}$ ), quando comparados ao extrato padronizado *G. biloba* ( $EC_{50} = 40,72 \mu\text{g/ml}$ ), foram obtidos, provavelmente, pela presença dos arilpropanóides glicosilados (exceção à fração clorofórmica) isolados da fração acetato de etila, disponíveis para doar um radical hidrogênio (Esquema 4) ao radical de DPPH conduzindo-o a sua forma molecular, como se observa no esquema 5 e na figura 14. Estes resultados expressam ainda o elevado efeito sinérgico das substâncias do extrato etanólico, quando comparado as suas frações.



**Radical 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazila**

**Esquema 5: Radical 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazila (DPPH)**

Corroborada pelo teste preliminar de atividade antimicrobiana, a fração acetato de etila foi usada no aparelho de cromatografia contracorrente (HSCCC), e suas substâncias isoladas testadas quanto à atividade antioxidante.

As substâncias verbascosídeo, isoverbascosídeo, martinósídeo e a ipolamiida, foram testadas (Tabela 21, pág. 118) e tiveram como padrão o flavonóide rutina ( $EC_{50} = 9,30 \mu\text{g/ml}$ ), presente no *Ginko biloba*. Por ser dentre as substâncias desta espécie, a mais promissora quanto a certos efeitos biológicos após testes experimentais realizados em animais e humanos (Schulz, V. *et al.* 2002). Entre eles, o aumento necessário no extravasamento de sangue pelos capilares sanguíneos e por ser o mais eficiente removedor de radicais livres usados comercialmente (Schulz, V. *et al.* 2002).

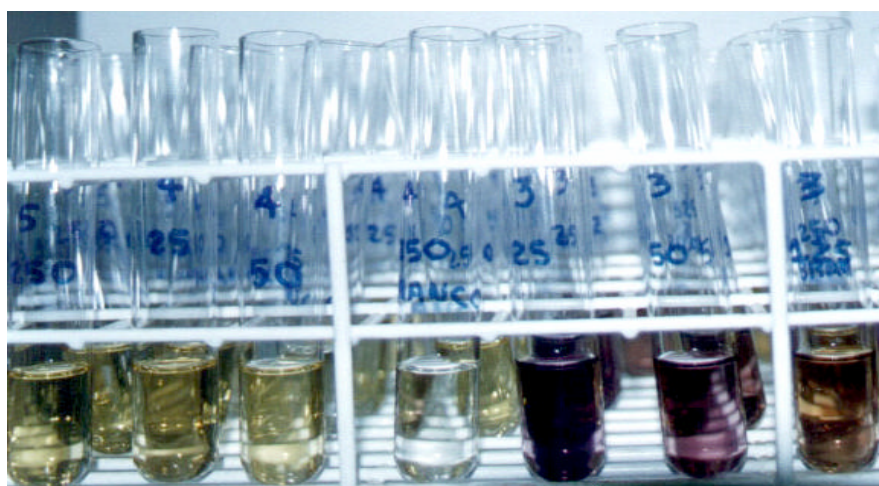
Em um primeiro momento, os resultados (Tabela 19, pág. 115) demonstraram que a substância martinósídeo, ( $EC_{50} = 18,48 \mu\text{g/ml}$ ), apresentou um maior efeito AA quando comparado ao padrão rutina, bem como, em relação às substâncias isoladas verbascosídeo, ( $EC_{50} = 11,04 \mu\text{g/ml}$ ), e isoverbascosídeo ( $EC_{50} = 11,20 \mu\text{g/ml}$ ) (Tabela 21, pág. 118). Já, a ipolamiida, não apresentou efeito antioxidante, pelas razões de ordem estrutural já mencionadas, quanto as substâncias que venham a comportar esta atividade.

A atividade antioxidante da fração butanólica, apesar de ter seu valor ligeiramente baixo quando comparado à fração acetato de etila, clorofórmica e ao padrão *Ginko biloba*,

se deve, provavelmente, ao fato de apresentar esta fração traços de arilpropanóides glicosilados, isolados na fração acetato de etila.

Tal hipótese foi reforçada pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração butanólica (Espectro 4, pág.59), ao mostrar sinais de fraca intensidade na região de hidrogênios aromáticos e olefínicos, análogo aos sinais dos arilpropanóides glicosilados já citados diante dos sinais de maior intensidade de iridóides glicosilados, possivelmente do tipo ipolamiida (Espectro 18, pág. 82).

A substância majoritária isolada da espécie *P.bahiense* (Meiss) Barroso, eluída na fração metanólica, o flavonóide Apigenina-7-*O*-neo-hesperidosídeo, não apresentou atividade antioxidante, de modo que o valor de seu  $\text{EC}_{50}$  não pôde ser calculado. Este fato curioso, por ser notório no meio científico a elevada atividade antioxidante que comporta esta classe de metabólitos especiais, pode estar relacionado pela ausência de grupamentos galóílicos e cafêicos (*orto*-hidroxílicos), responsáveis pela elevada atividade antioxidante dos flavonóides (Namjo, F. *et al.* 1996), (Okada, Y *et al.* 1996). O fato de possuir este flavonóide uma de suas hidroxilas, no carbono C-7, ligada à açúcares, 7-*O*-glicosil-(2''? 1''')rhamnosídeo, pode ser segundo Yokozawa e colaboradores outro fator relevante para a baixa AA (Yokozawa, T *et al.* 1997). Segundo ainda este autor, a hidroxila de flavonóides em C-5 não exerce influência sobre AA (Yokozawa, T *et al.* 1997). Provavelmente, pelo efeito quelante com a carbonila em C-4.



**Figura 14:** Teste de atividade antioxidante com DPPH em tubos de ensaio. A coloração amarela clara indica esta atividade. A coloração violácea indica a ausência desta atividade.

Tabela 19: : Atividade anti-oxidante dos extratos de *S. cayennensis* e *P. bahiense* com DPPH.

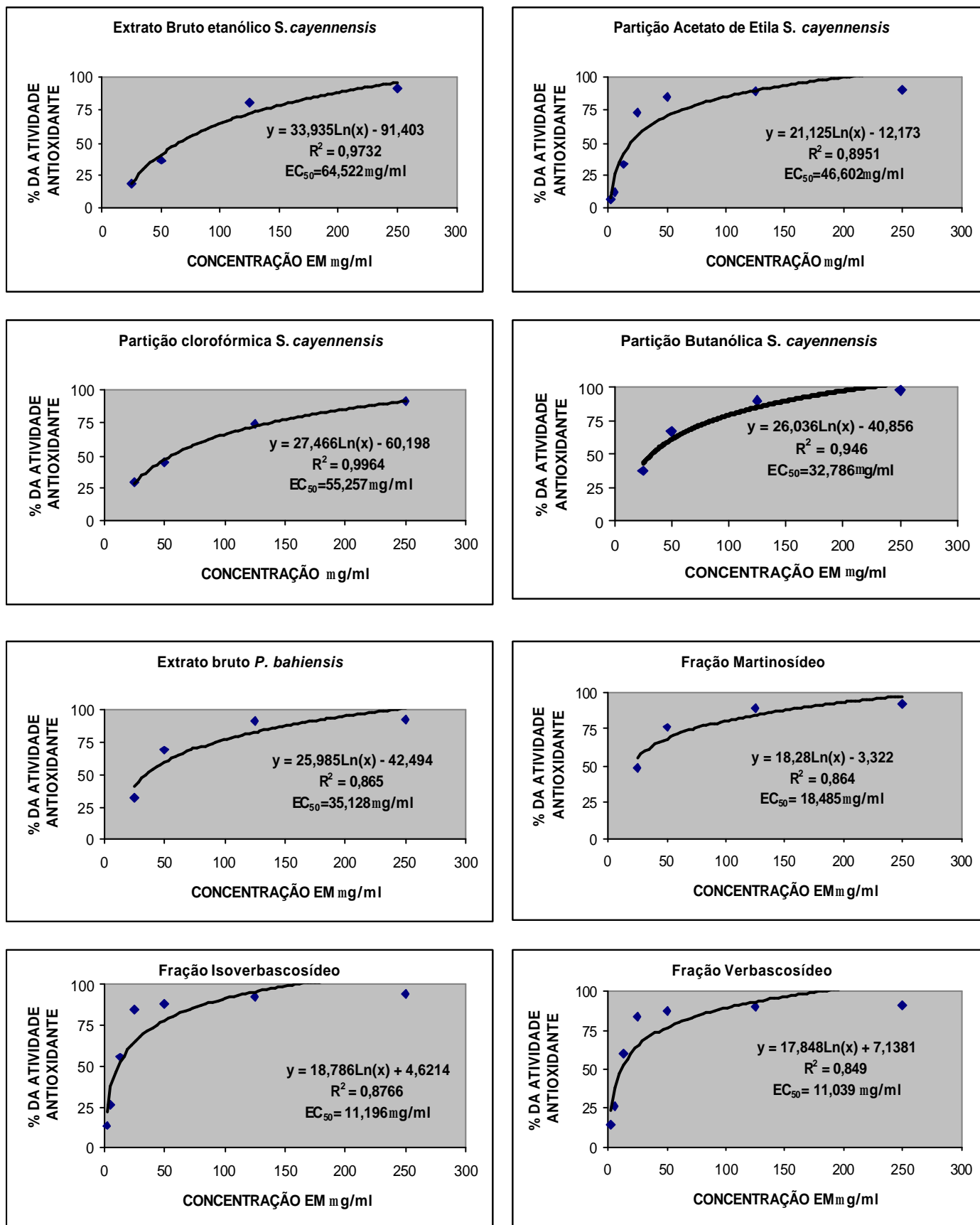
| Amostra  | [ ] µg/ml | ABS<br>branco | ABS<br>controle | ABS<br>amostra | Δ ABS  | % AAO | %<br>AAOM |
|--|-----------|---------------|-----------------|----------------|--------|-------|-----------|
| Extrato Bruto Etanólico<br><i>S. cayennensis</i> | 250       | 0,0280        | 0,8795          | 0,0981         | 0,0701 | 92,03 | 91,81     |
|  |           | 0,0280        | 0,8795          | 0,1042         | 0,0762 | 91,34 |           |
|  |           | 0,0280        | 0,8795          | 0,0978         | 0,0698 | 92,06 |           |
|  | 125       | 0,0182        | 0,8795          | 0,1451         | 0,1269 | 85,57 | 80,26     |
|  |           | 0,0182        | 0,8795          | 0,1907         | 0,1725 | 80,39 |           |
|  |           | 0,0182        | 0,8795          | 0,2396         | 0,2214 | 74,83 |           |
|  | 50        | 0,0043        | 0,8795          | 0,5800         | 0,5757 | 34,54 | 37,03     |
|  |           | 0,0043        | 0,8795          | 0,5765         | 0,5722 | 34,94 |           |
|  |           | 0,0043        | 0,8795          | 0,5179         | 0,5136 | 41,60 |           |
|  | 25        | 0,0033        | 0,8795          | 0,7278         | 0,7245 | 17,62 | 18,50     |
|  |           | 0,0033        | 0,8795          | 0,7206         | 0,7173 | 18,44 |           |
|  |           | 0,0033        | 0,8795          | 0,7118         | 0,7085 | 19,44 |           |
| Fração clorofórmica<br><i>S. cayennensis</i>     | 250       | 0,1500        | 0,8811          | 0,2291         | 0,0791 | 91,02 | 91,22     |
|  |           | 0,1500        | 0,8811          | 0,2258         | 0,0758 | 91,40 |           |
|  |           | 0,1500        | 0,8811          | 0,2273         | 0,0773 | 91,23 |           |
|  | 125       | 0,0686        | 0,8811          | 0,2872         | 0,2186 | 75,19 | 73,74     |
|  |           | 0,0686        | 0,8811          | 0,2981         | 0,2295 | 73,95 |           |
|  |           | 0,0686        | 0,8811          | 0,3145         | 0,2459 | 72,09 |           |
|  | 50        | 0,0298        | 0,8811          | 0,5160         | 0,4862 | 44,82 | 44,97     |
|  |           | 0,0298        | 0,8811          | 0,4979         | 0,4681 | 46,87 |           |
|  |           | 0,0298        | 0,8811          | 0,5302         | 0,5004 | 43,21 |           |
|  | 25        | 0,0157        | 0,8811          | 0,6299         | 0,6142 | 30,29 | 29,41     |
|  |           | 0,0157        | 0,8811          | 0,6527         | 0,6370 | 27,70 |           |
|  |           | 0,0157        | 0,8811          | 0,6305         | 0,6148 | 30,22 |           |
| Fração Butanólica<br><i>S. cayennensis</i>       | 250       | 0,0883        | 0,8811          | 0,1090         | 0,0207 | 97,65 | 97,65     |
|  |           | 0,0883        | 0,8811          | 0,1086         | 0,0203 | 97,70 |           |
|  |           | 0,0883        | 0,8811          | 0,1093         | 0,0210 | 97,62 |           |
|  | 125       | 0,0156        | 0,8811          | 0,1068         | 0,0912 | 89,65 | 89,83     |
|  |           | 0,0156        | 0,8811          | 0,1053         | 0,0897 | 89,82 |           |
|  |           | 0,0156        | 0,8811          | 0,1035         | 0,0879 | 90,02 |           |
|  | 50        | 0,0049        | 0,8811          | 0,2905         | 0,2856 | 67,59 | 66,90     |
|  |           | 0,0049        | 0,8811          | 0,2961         | 0,2912 | 66,95 |           |
|  |           | 0,0049        | 0,8811          | 0,3030         | 0,2981 | 66,17 |           |
|  | 25        | 0,0043        | 0,8811          | 0,5468         | 0,5425 | 38,43 | 37,33     |
|  |           | 0,0043        | 0,8811          | 0,5435         | 0,5392 | 38,80 |           |
|  |           | 0,0043        | 0,8811          | 0,5792         | 0,5749 | 34,75 |           |

|  |        |         |        |        |        |       |       |
|--|--------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Fração Acetato de Etila<br><i>S. cayennensis</i> | 250    | 0,0100  | 0,6694 | 0,0762 | 0,0662 | 90,11 | 90,65 |
|  |        | 0,0100  | 0,6694 | 0,0714 | 0,0614 | 90,83 |       |
|  |        | 0,0100  | 0,6694 | 0,0702 | 0,0602 | 91,01 |       |
|  | 125    | 0,0050  | 0,6694 | 0,0806 | 0,0756 | 88,71 | 88,94 |
|  |        | 0,0050  | 0,6694 | 0,0778 | 0,0728 | 89,12 |       |
|  |        | 0,0050  | 0,6694 | 0,0787 | 0,0737 | 88,99 |       |
|  | 50     | 0,0035  | 0,6694 | 0,1022 | 0,0987 | 85,26 | 85,43 |
|  |        | 0,0035  | 0,6694 | 0,1056 | 0,1021 | 84,75 |       |
|  |        | 0,0035  | 0,6694 | 0,0953 | 0,0918 | 86,29 |       |
|  | 25     | 0,0026  | 0,6694 | 0,1990 | 0,1964 | 70,66 | 73,54 |
|  |        | 0,0026  | 0,6694 | 0,1741 | 0,1715 | 74,38 |       |
|  |        | 0,0026  | 0,6694 | 0,1660 | 0,1634 | 75,59 |       |
|  | 12,5   | 0,0000  | 0,6694 | 0,4822 | 0,4822 | 27,97 | 33,80 |
|  |        | 0,0000  | 0,6694 | 0,4335 | 0,4335 | 35,24 |       |
|  |        | 0,0000  | 0,6694 | 0,4138 | 0,4138 | 38,18 |       |
|  | 5      | -0,0002 | 0,6694 | 0,5896 | 0,5898 | 11,89 | 12,30 |
|  |        | -0,0002 | 0,6694 | 0,5863 | 0,5865 | 12,38 |       |
|  |        | -0,0002 | 0,6694 | 0,5846 | 0,5848 | 12,64 |       |
| 2,5  | 0,0024 | 0,6694  | 0,6195 | 0,6171 | 7,81   | 6,13  |       |
|  | 0,0024 | 0,6694  | 0,6371 | 0,6347 | 5,18   |       |       |
|  | 0,0024 | 0,6694  | 0,6357 | 0,6333 | 5,39   |       |       |
| <i>P. bahiense</i>                               | 250    | 0,0269  | 0,8608 | 0,1003 | 0,0734 | 91,47 | 92,04 |
|  |        | 0,0269  | 0,8608 | 0,0942 | 0,0673 | 92,18 |       |
|  |        | 0,0269  | 0,8608 | 0,0917 | 0,0648 | 92,47 |       |
|  | 125    | 0,0126  | 0,8608 | 0,0846 | 0,0720 | 91,64 | 91,83 |
|  |        | 0,0126  | 0,8608 | 0,0802 | 0,0676 | 92,15 |       |
|  |        | 0,0126  | 0,8608 | 0,0839 | 0,0713 | 91,72 |       |
|  | 50     | 0,0063  | 0,8608 | 0,2458 | 0,2395 | 72,18 | 68,29 |
|  |        | 0,0063  | 0,8608 | 0,2725 | 0,2662 | 69,08 |       |
|  |        | 0,0063  | 0,8608 | 0,3196 | 0,3133 | 63,60 |       |
|  | 25     | 0,0050  | 0,8608 | 0,6420 | 0,6370 | 26,00 | 32,10 |
|  |        | 0,0050  | 0,8608 | 0,5735 | 0,5685 | 33,96 |       |
|  |        | 0,0050  | 0,8608 | 0,5529 | 0,5479 | 36,35 |       |

Tabela 20: Atividade anti-oxidante das substâncias puras de *S. cayennensis* com DPPH.

|                         |        |         |        |        |        |       |       |
|-------------------------|--------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Fração Verbascosídeo    | 250    | 0,0026  | 0,6476 | 0,1273 | 0,1247 | 80,74 | 81,08 |
|                         |        | 0,0026  | 0,6476 | 0,1385 | 0,1359 | 79,01 |       |
|                         |        | 0,0026  | 0,6476 | 0,1096 | 0,1070 | 83,48 |       |
|                         | 125    | 0,0023  | 0,6476 | 0,1338 | 0,1315 | 79,69 | 80,37 |
|                         |        | 0,0023  | 0,6476 | 0,1228 | 0,1205 | 81,39 |       |
|                         |        | 0,0023  | 0,6476 | 0,1316 | 0,1293 | 80,03 |       |
|                         | 50     | 0,0013  | 0,6476 | 0,1206 | 0,1193 | 81,58 | 79,92 |
|                         |        | 0,0013  | 0,6476 | 0,1406 | 0,1393 | 78,49 |       |
|                         |        | 0,0013  | 0,6476 | 0,1328 | 0,1315 | 79,69 |       |
| 25                      | 0,0043 | 0,6476  | 0,1349 | 0,1306 | 79,83  | 79,03 |       |
|                         | 0,0043 | 0,6476  | 0,1473 | 0,1430 | 77,92  |       |       |
|                         | 0,0043 | 0,6476  | 0,1381 | 0,1338 | 79,34  |       |       |
| Fração Martinosídeo     | 250    | 0,0179  | 0,6724 | 0,0697 | 0,0518 | 92,30 | 92,12 |
|                         |        | 0,0179  | 0,6724 | 0,0726 | 0,0547 | 91,86 |       |
|                         |        | 0,0179  | 0,6724 | 0,0703 | 0,0524 | 92,21 |       |
|                         | 125    | 0,0089  | 0,6724 | 0,0748 | 0,0659 | 90,20 | 89,35 |
|                         |        | 0,0089  | 0,6724 | 0,0813 | 0,0724 | 89,23 |       |
|                         |        | 0,0089  | 0,6724 | 0,0854 | 0,0765 | 88,62 |       |
|                         | 50     | 0,0028  | 0,6724 | 0,1604 | 0,1576 | 76,56 | 76,19 |
|                         |        | 0,0028  | 0,6724 | 0,1602 | 0,1574 | 76,59 |       |
|                         |        | 0,0028  | 0,6724 | 0,1680 | 0,1652 | 75,43 |       |
|                         | 25     | 0,0018  | 0,6724 | 0,3513 | 0,3495 | 48,02 | 48,60 |
|                         |        | 0,0018  | 0,6724 | 0,3312 | 0,3294 | 51,01 |       |
|                         |        | 0,0018  | 0,6724 | 0,3597 | 0,3579 | 46,77 |       |
|                         | 12,5   | 0,0278  | 0,6724 | 0,4136 | 0,3858 | 42,62 | 33,16 |
|                         |        | 0,0278  | 0,6724 | 0,4810 | 0,4532 | 32,60 |       |
|                         |        | 0,0278  | 0,6724 | 0,5371 | 0,5093 | 24,26 |       |
|                         | 5      | 0,0028  | 0,6724 | 0,5233 | 0,5205 | 22,59 | 10,69 |
|                         |        | 0,0028  | 0,6724 | 0,7058 | 0,7030 | -4,55 |       |
|                         |        | 0,0028  | 0,6724 | 0,5808 | 0,5780 | 14,04 |       |
| 2,5                     | 0,0033 | 0,6724  | 0,5155 | 0,5122 | 23,83  | 8,53  |       |
|                         | 0,0033 | 0,6724  | 0,6155 | 0,6122 | 8,95   |       |       |
|                         | 0,0033 | 0,6724  | 0,7241 | 0,7208 | -7,20  |       |       |
| Fração Isoverbascosídeo | 250    | 0,0049  | 0,9846 | 0,0615 | 0,0566 | 94,25 | 94,33 |
|                         |        | 0,0049  | 0,9846 | 0,0616 | 0,0567 | 94,24 |       |
|                         |        | 0,0049  | 0,9846 | 0,0590 | 0,0541 | 94,51 |       |
|                         | 125    | 0,0034  | 0,9846 | 0,0717 | 0,0683 | 93,06 | 92,73 |
|                         |        | 0,0034  | 0,9846 | 0,0763 | 0,0729 | 92,60 |       |
|                         |        | 0,0034  | 0,9846 | 0,0770 | 0,0736 | 92,52 |       |
|                         | 50     | 0,0005  | 0,9846 | 0,1128 | 0,1123 | 88,59 | 88,05 |
|                         |        | 0,0005  | 0,9846 | 0,1207 | 0,1202 | 87,79 |       |
|                         |        | 0,0005  | 0,9846 | 0,1211 | 0,1206 | 87,75 |       |
|                         | 25     | -0,0017 | 0,9846 | 0,1473 | 0,1490 | 84,87 | 84,67 |
|                         |        | -0,0017 | 0,9846 | 0,1479 | 0,1496 | 84,81 |       |
|                         |        | -0,0017 | 0,9846 | 0,1526 | 0,1543 | 84,33 |       |
|                         | 12,5   | 0,0016  | 0,9846 | 0,4470 | 0,4454 | 54,76 | 55,56 |
|                         |        | 0,0016  | 0,9846 | 0,4479 | 0,4463 | 54,67 |       |
|                         |        | 0,0016  | 0,9846 | 0,4226 | 0,4210 | 57,24 |       |
|                         | 5      | -0,0009 | 0,9846 | 0,6846 | 0,6855 | 30,38 | 26,51 |
|                         |        | -0,0009 | 0,9846 | 0,7479 | 0,7488 | 23,95 |       |
|                         |        | -0,0009 | 0,9846 | 0,7356 | 0,7365 | 25,20 |       |
| 2,5                     | 0,0000 | 0,9846  | 0,8473 | 0,8473 | 13,94  | 13,78 |       |
|                         | 0,0000 | 0,9846  | 0,8402 | 0,8402 | 14,67  |       |       |
|                         | 0,0000 | 0,9846  | 0,8593 | 0,8593 | 12,73  |       |       |

Tabela 21: Atividade anti-oxidante com DPPH dos extratos e das substâncias isoladas.





#### 4.6 Atividade Antimicrobiana

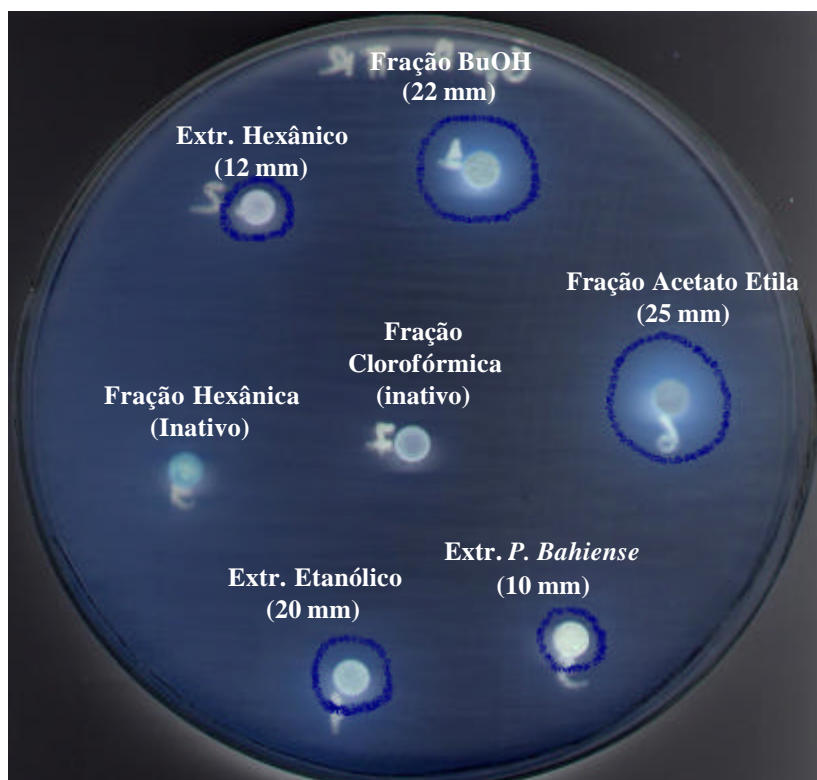
O teste de disco de difusão em agar-ágar, por ser de fácil manuseio, baixo custo e de fácil padronização, comumente usado por muitos laboratórios no mundo (Ellen, B et al. 1990), foi empregado, inicialmente, nos testes de atividade antimicrobiana com os extratos vegetais das duas espécies estudadas.

A atividade antimicrobiana realizada inicialmente com 50 mg de cada amostra, com os extratos e frações já citados, quando testados com as cepas de bactérias, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15422), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus pyogenes* (75194), foram somente significativas para estas últimas duas cepas quando testadas com a fração butanólica (BuOH) conforme os valores de seus halos de inibição (22mm para *S.pyogenes* e 10 mm para *S.aureus*), e com a fração acetato de etila (25 mm para *S.pyogenes* e 15 mm para *S.aureus*) das raízes da espécie *S. cayennensis* (Figura 15). As duas outras cepas não foram sensíveis a estas frações testadas, não apresentando, portanto, halo de inibição. As frações clorofórmica e hexânica foram inativas para todas as cepas testadas.

Os extratos bruto etanólico e hexânico (Figura 15), desta mesma espécie, apresentaram atividade somente para com a cepa de *Streptococcus pyogenes*, respectivamente, com 20 mm e 12 mm no halo de inibição. Já o extrato bruto hidroalcoólico das folhas da espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso (Figura 15) apresentou 10 mm no halo de inibição, para esta mesma cepa.

Os resultados deste teste inicial quando comparados ao antibiótico Cloranfenicol (concentração de 30 µg por disco), tomado como padrão, com seus respectivos halos de inibição (*S. aureus* 25 mm; *E. coli* 24 mm; *S. pyogenes* 39 mm e *P. aeruginosa* 12 mm), possibilitou a segunda etapa dos testes de atividade antimicrobiana com 1mg/ml por substância testada. Conforme procedimento do Lab. de *Coccus* patogenesis sob orientação do Prof. Dr. Lislie C. Benchetrit na UFRJ (Departamento de Microbiologia). Foram usadas nesta etapa as substâncias isoladas da fração acetato de etila de raízes de *S. cayennensis*, em detrimento do resultado promissor inferido pelo halo de inibição sobre as cepas *S. pyogenes* e *S.aureus*, testadas inicialmente a uma concentração de 5,0 mg/ml. A cepa de *S. aureus* não apresentou halo de inibição frente às substâncias isoladas e testadas. A Figura 16 demonstra, portanto, apenas o resultado das substâncias testadas da fração acetato de etila com atividade sobre a cepa de *S. pyogenes*.

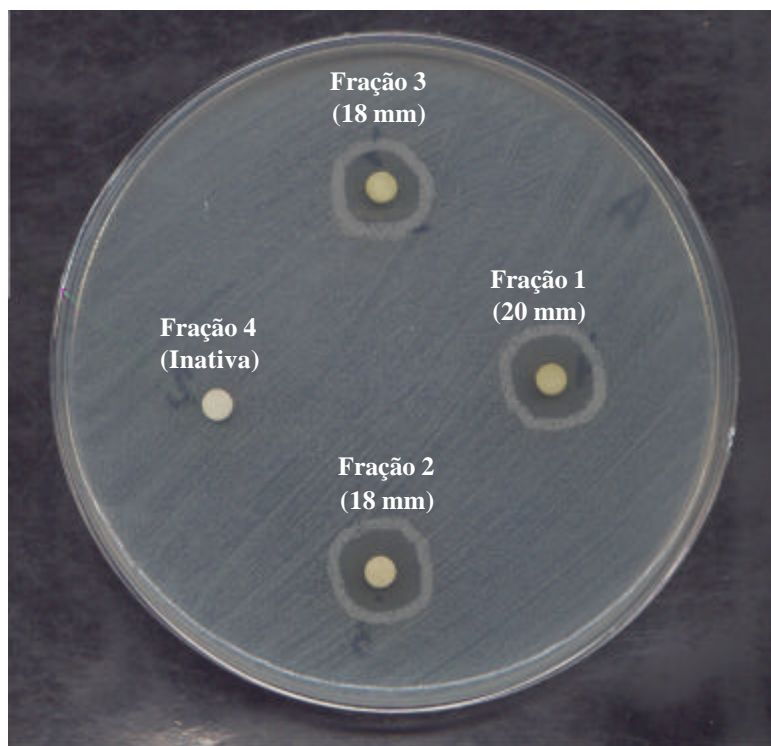
Entretanto, a ipolamiida (fração 4), desta fração, por não ter apresentado halo de inibição na cepa testada, sugere que a atividade da fração butanólica (BuOH) apresentada no teste anterior, foi por conta da presença de substâncias da classe dos arilpropanóides glicosilados (martinosídeo, verbascosídeo e isoverbascosídeo) como observado pelos sinais característicos destas substâncias no espectro de RMN  $^1\text{H}$  desta amostra (Espectro 4, pág.59), quando comparados à intensidade dos sinais do iridóide ipolamiida, substância majoritária nesta fração.



**Figura 15:** Teste antimicrobiano com 5 mg dos extratos e frações com os valores dos respectivos halos de inibição. A circunferência em volta de seus halos em “fluorescência”, nos discos do negativo da foto, é apenas uma forma pictórica e artificial para melhor destacar a visualização da atividade dos extratos sobre a cepa de *S. pyogenes*

Quanto às outras três frações, a fração 3 (verbascosídeo), fração 2 (mistura de martinosídeo e isoverbascosídeo; 90:10 %) e fração 1 (mistura de martinosídeo e isoverbascosídeo; 80:20 %), a atividade sinérgica destas duas últimas frações apresentou um efeito de inibição antimicrobiano maior, quando comparado à fração 3.

O efeito promissor apresentado neste teste encaminhou-nos a terceira e última etapa, buscando a concentração mínima inibitória da cepa estudada (CMI), conforme o procedimento do item (3.4.2, pág.40).



**Figura 16: Teste antimicrobiano com 1 mg das substâncias isoladas da fração AcEOt com seus respectivos halos de inibição. A circunferência em volta dos halos, é apenas uma forma pictórica e artificial para melhor destacar a visualização da atividade das substâncias sobre a cepa de *S. pyogenes***

Dentre as três frações já citadas, a que apresentou, com o procedimento pertinente a esta etapa de diluições, atividade inibitória mais preeminente sobre a cepa de *S. pyogenes* com uma concentração mínima inibitória de 0,040 mg/ml (sétimo tubo) foi à fração 1 (martinosídeo/isoverbascosídeo 8:2), contendo a mistura dos dois arilpropanóides glicosilados já citados. Já as frações 3 (verbascosídeo) e 2 (martinosídeo/isoverbascosídeo 9:1) inibiram, respectivamente, a uma concentração de 0,625 mg/ml (terceiro tubo) e 0,080 mg/ml (sexto tubo). Os resultados da fração 1 e 2 sustentam a idéia do sinergismo destas substâncias frente a fração 3.

Tabela 22: Teste de Disco de Difusão de ágar-ágar (halo de inibição; mm) e Concentração Mínima Inibitória (CMI; mg/ml) das espécies *S.cayennensis* (Rich.) Vahl s e *P. bahiense* (Meiss) Barroso.

| Extratos, Frações e Substâncias Testadas            | Cepas de Bactérias Testadas |                      |                  |                    |
|---|-----------------------------|----------------------|------------------|--------------------|
|   | Atividades:(mm; mg/ml)      |                      |                  |                    |
| <i>S. cayennensis</i> (Rich.) Vahl (Raízes) (mg/ml) | <i>E. coli</i>              | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. pyogenes</i> |
| Ext. Bruto Hexânico<br>5mg/ml                       | –                           | –                    | –                | 12 mm              |
| Ext. Bruto Etanólico<br>5mg/ml                      | –                           | –                    | –                | 20 mm              |
| Fração BuOH<br>5mg/ml                               | –                           | –                    | 10 mm            | 22 mm              |
| Fração Clorofórmica<br>5mg/ml                       | –                           | –                    | –                | –                  |
| Fração Hexânica<br>5mg/ml                           | –                           | –                    | –                | –                  |
| Fração Acetato de Etila<br>5mg/ml                   | –                           | –                    | 15 mm            | 25 mm; 0,080 mg/ml |
| Verbascosídeo<br>1mg/ml                             |                             | –                    | não testado      | 18 mm; 0,625 mg/ml |
| Martinosídeo/Isoverbascos.<br>1mg/ml (9:1)          |                             |                      | não testado      | 18 mm; 0,080 mg/ml |
| Martinosídeo/Isoverbascos.<br>1mg/ml (8:2)          |                             |                      | não testado      | 20mm; 0,040 mg/ml  |
| <i>P.bahiense</i> (Meiss) Barroso                   | –                           | –                    | –                |                    |
| Extrato Bruto hidroalcoólico 5mg/m                  |                             |                      |                  | 10 mm              |

Segundo Hamill (Hamill, F.A *et al.* 2003), os halos de inibição nos testes antimicrobianos de disco de difusão de ágar-ágar em extratos de plantas, diz que, valores de 1 cm (10 mm) representam uma inibição de fraca à moderada, 2 cm (20 mm) representam uma inibição de moderada à boa e 3 cm (30 mm) indicam uma ótima inibição ao crescimento bacteriano.

Quanto aos testes do CMI, segundo os dados da referência consultada (Holetz, B.F *et al.* 2002), extratos de plantas que apresentam atividade com uma concentração menor que 100 µg/ml (0,100 mg/ml) possuem uma atividade bacteriostática considerada boa, de 100 a 500 µg/ml (0,100 - 0,500 mg/ml) a atividade é moderada, de 500 à 1000 µg/ml (0,500 – 1,0 mg/ml) a atividade é fraca, e acima de 1000 µg/ml o CMI do extrato é considerado inativo à atividade antimicrobiana.

Diante dos dados apresentados na tabela 22, e de posse destes parâmetros de comparação, as frações BuOH e acetato de etila de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, demonstraram uma atividade antimicrobiana de moderada à boa, respectivamente, frente as cepas de *S. aureus* e *S. pyogenes*. O extrato EtOH apresentou uma atividade moderada/boa a esta última cepa de bactéria, demonstrando que as frações, por

apresentarem uma maior concentração das substâncias ativas sobre esses microorganismos, possuíram um efeito antimicrobiano mais preeminente.

Os fenilpropanóides glicosilados, isolados da fração acetato de etila demonstraram, por sua vez, pelo teste bacteriostático do CMI sobre a cepa de *S. pyogenes*, efeitos que representam atividade de moderada à boa. Tal resultado pode ser justificado por apresentarem em suas estruturas moleculares, porções análogas às moléculas de ésteres de ácido cafeico, conhecidas na literatura como substâncias que apresentam atividade antimicrobiana (Tomassini, I.C. 1993). O que pode justificar a ausência desta atividade no iridóide ipolamiida, um monoterpeno, deste extrato. A melhor atividade antimicrobiana apresentada neste teste, envolvendo a mistura dos ácidos aromáticos martinósídeo e isomartinósídeo, pode ser justificada por apresentarem estas substâncias em suas porções aromáticas, respectivamente, estruturas de substâncias análogas ao ácido ferúlico e ao ácido cafeico (Tomassini, I.C. 1993).

A mistura de substâncias do tipo acima, bem como de ácidos aromáticos como gálico-caféico, gálico-*p*-cumárico e gálico-cinâmico, dentre outras combinações de arilpropanóides (Tabela 3, pág 24), conforme salienta ainda Aliotta (Aliotta, G *et al.* 1992), promovem uma ação alelopática aditiva e/ou sinérgica adicional contra o crescimento de microorganismos, como no caso de bactérias, e mesmo de espécies vegetais em germinação.

#### **4.7 Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória**

No método das contorções, observamos que para o controle negativo (água) o número de contorções abdominais acumuladas foi de  $39,3 \pm 4,81$  c.a. Na dose de 1,0 g/kg, o EBPB inibiu as contorções em 38,55% ( $24,17 \pm 4,54$  c.a), demonstrando, diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). Na dose de 2,0 g/kg, O EBPB inibiu as contorções em 67,38% ( $12,83 \pm 3,32$  c.a), de forma superior ao controle positivo (indometacina), cuja inibição foi de 50,42% ( $19,5 \pm 1,8$  c.a). Os dados são expostos na Tabela 23 (pág. 125) e para melhor compreensão podem ser visualizados na figura 17.

O tratamento com o EBPB nas doses de 1,0 e 2,0 g/kg, não alterou o tempo de reação dos animais na placa em comparação ao grupo tratado com água. O fentanil (controle positivo) aumentou o tempo de reação em 271,3% ( $29,76 \pm 0,24$  s) e 217,4% ( $22,52 \pm 2,58$  s) quando comparado ao seu controle negativo salina ( $10,97 \pm 2,05$  s e  $10,36 \pm 2,28$  s), revelando diferença estatística significativa nos tempos pós-tratamento 30 e 60

minutos ( $P < 0,0001$  e  $P < 0,01$ , respectivamente) (Tabela 24). Os tempos médios de reação pré e pós-tratamento estão representados na figura 18 para ilustrar os resultados obtidos no ensaio. No método do edema de orelha, EBPB 1,0 g/kg e EBPB 2,0 g/kg não apresentaram diferença estatística significativa com relação ao controle negativo do método (água), que apresentou média de diferença de peso de  $8,01 \pm 0,72$  miligramas (mg). A dexametasona (controle positivo do método) apresentou percentual de inibição de 77% ( $1,85 \pm 0,65$ ,  $P < 0,0001$ , tabela 25 e figura 19).

Por se basear na contagem das contorções abdominais produzidas como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite, o método das contorções é de ampla utilização na pesquisa de drogas analgésicas com ação antiinflamatória. Por outro lado, os testes de reação ao calor como a placa quente, p.ex, são seletivos para o estudo de compostos com ação analgésica exercida por mecanismos centrais semelhantes aos dos opiáceos (controles positivos desses tipos de testes). Sendo assim, os resultados obtidos para esses dois métodos sugerem que o EBPB não possui atividade antinociceptiva central, mas pode ser efetivo no combate à dor periférica relacionada à inflamação nas doses utilizadas.

O modelo do edema de orelha é utilizado na pesquisa da atividade de agentes antiinflamatórios de uso tópico, mas responde também à administração sistêmica de antiinflamatórios esteroidais (Schiantarelle, P. *et al.* 1982). Como pôde ser visto, em nossos estudos optou-se pela via sistêmica, utilizando-se a dexametasona como controle positivo. A ausência de atividade antiinflamatória para o extrato hidroalcoólico de PB demonstrado nesse método e somada aos resultados dos outros métodos, nos permite supor que a espécie vegetal em questão atue inibindo a formação ou bloqueando a liberação de substâncias relacionadas à dor no processo inflamatório sem, contudo, impedir a formação de edema. São relevantes os fatos de o controle positivo do método das contorções (indometacina) se tratar de um antiinflamatório não esteróide (AINE) e o edema de orelha só responder sistemicamente a antiinflamatórios esteróides, pois talvez resida aí – numa ação similar a um AINE – a explicação para o fato do PB não ter demonstrado efeito nesse teste. Entretanto, se faz necessária a realização de mais estudos, dentre os quais o método da formalina, que seria de grande valia para obtermos informações mais concludentes sobre a ação dessa planta.

Tabela 23: N° de contorções abdominais acumuladas (c.a.a) por 30 min expressos como média ± e.p.m e percentual de inibição das contorções com relação ao controle negativo.

| Grupos tratados       | N° de contorções abdominais acumuladas | % de Inibição |
|-----------------------|--|---------------|
| Água                  | 39,33 ± 4,81                           | -----         |
| Indometacina 10 mg/kg | 19,50 ± 1,80                           | 50,42         |
| EBPB 1g/kg            | 24,17 ± 4,54                           | 38,55         |
| EBPB 2g/kg            | 12,83 ± 3,32                           | 67,38         |

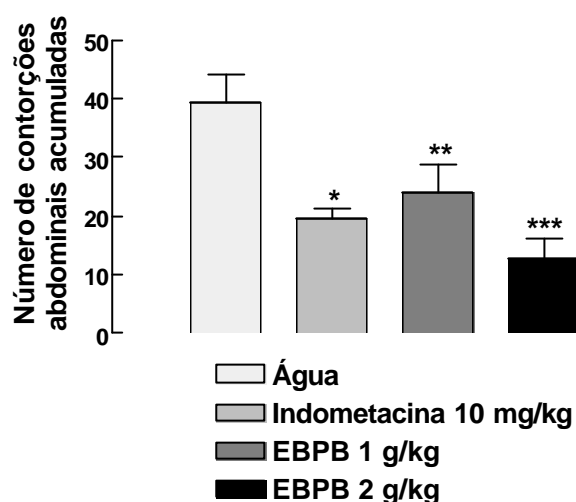


Figura 17: Representação gráfica das médias do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 1,2% , para diferentes grupos tratados. Resultados expressos como média ± e.p.m \* P < 0,01, \*\* P < 0,05 e \*\*\* P < 0,001.

Tabela 24: Tempos de reação dos animais nos diferentes grupos ao estímulo nociceptivo da placa quente expressos como média ± e.p.m.

| Grupos tratados    | Tempos de reação dos animais (segundos) |              |
|--------------------|---|--------------|
|                    | Tempos pós-tratamento                   |              |
|                    | 30                                      | 60           |
| Salina 0,9%        | 10,97 ± 2,05                            | 10,36 ± 2,28 |
| Água               | 10,18 ± 1,68                            | 10,71 ± 2,44 |
| Fentanil 0,3 mg/kg | 29,76 ± 0,24                            | 22,52 ± 2,58 |
| EBPB 1g/kg         | 10,94 ± 1,78                            | 8,80 ± 1,57  |
| EBPB 2g/kg         | 11,45 ± 2,40                            | 12,71 ± 2,63 |

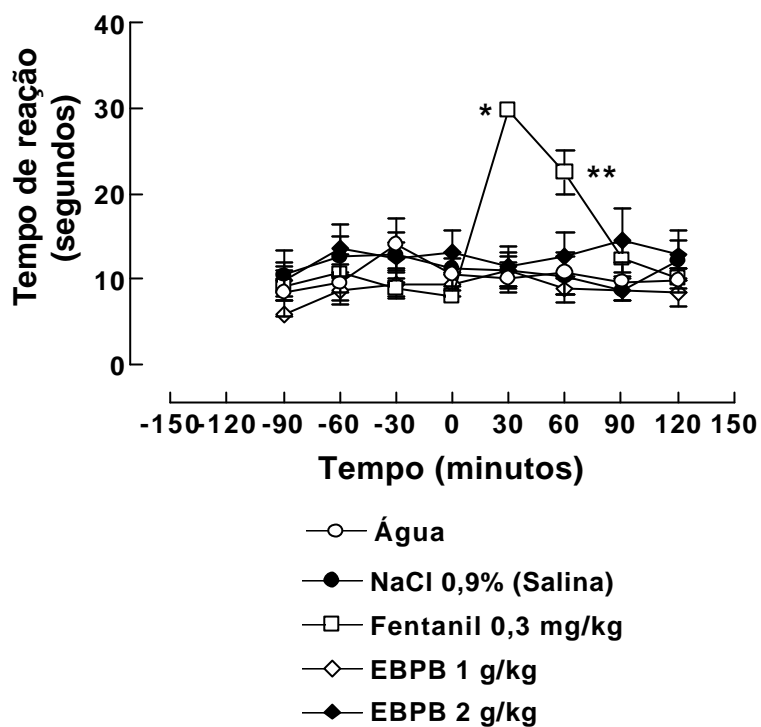


Figura 18: Tempo de reação dos animais dos distintos grupos nas fases de pré e pós- tratamento expressos como média  $\pm$  e.p.m \*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$ .

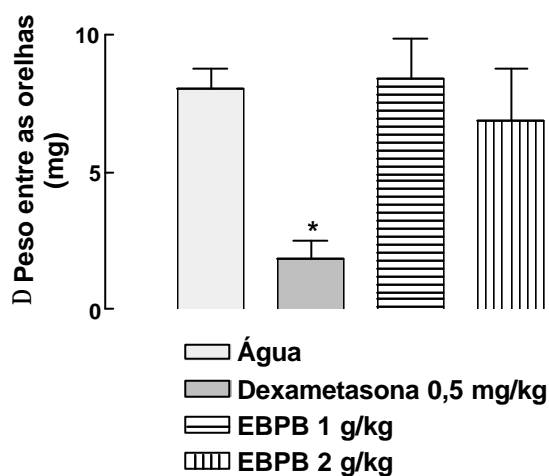


Figura 19: Representação gráfica das diferenças de peso entre as orelhas nos diferentes grupos. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m \*  $P < 0,0001$ .

Tabela 25: Média  $\pm$  e.p.m das diferenças de peso (mg) obtidas nos distintos grupos tratados.

| Grupos tratados        | Diferenças de peso (mg) |
|------------------------|-------------------------|
| Água                   | 8,01 $\pm$ 0,72         |
| Dexametasona 0,5 mg/kg | 1,85 $\pm$ 0,65         |
| EBPB 1g/kg             | 8,37 $\pm$ 1,43         |
| EBPB 2g/kg             | 6,85 $\pm$ 1,92         |



#### 4.8 Análises dos Solos das Áreas de Coletas das Plantas Estudadas

Os dados revelados pelas análises de ambos os solos mostraram que a área onde as plantas foram coletadas se apresentaram moderadamente ácidos (Tabela 6;7;8 e 9 págs. 43-44), e que podem levar a estabelecer importantes especulações entre os níveis de acidez e de absorção/concentração do metal alumínio ( $Al^{3+}$ ) e mesmo do halogeneto flúor ( $F^-$ ) pelas raízes e posterior translocação para as partes aéreas das espécies vegetais estudadas. Já que, excessos de  $Al^{3+}$  no solo poderão formar complexos com  $F^-$  (Wong, M.H *et al.* 2003). Visto que, uma gama considerável de plantas já estudadas acabou estabelecendo uma certa margem de relação com a concentração de alumínio e flúor, com os pHs de solos ácidos (Wong, M.H *et al.* 2003).

O fluoreto ( $F^-$ ), elemento químico de importante relevância como agente de certas morbidades à saúde humana em termos fitoterápicos (tendo sempre em vista a relação tempo/consumo de infusos), pode ser acumulado, principalmente, nas folhas. Apresentando neste órgão da planta uma correlação linear com a idade, seguido pelos ramos/galhos e raiz (Wong, M.H *et al.* 2003).

A caracterização pela análise química da solução do solo dá os conteúdos dos elementos ou substâncias presentes. A grande utilidade de se saber a natureza da solução do solo consiste em se poder predizer o comportamento das plantas quanto à deficiência de nutrição, e possíveis efeitos tóxicos dos nutrientes (Luchese, B. E *et al.* 2001).

O regime hídrico é um outro importante fator frente à conclusão dos resultados da análise química de solos coletados em períodos de baixa precipitação pluviométrica (época de seca). Quando os sais encontram-se na superfície do solo, apresentam um pH inferior ao mesmo solo coletado em época de grande precipitação pluviométrica (épocas de cheias), e que são lixiviados em parte pela percolação das águas através do solo. O regime hídrico atua também no efeito da atividade biológica que pode atuar no pH do solo, quando as reações envolvidas são de caráter ácido ou básico (Luchese, B. E *et al.* 2001).

Os resultados da análise de solo, à luz de estudos preliminares farmacológico/biológico e posteriormente fitoquímicos de plantas medicinais, podem revelar uma possível padronização da nutrição de uma espécie medicamentosa, e, conseqüentemente, de suas propriedades de caráter fitoterápico. Conforme a feição qualitativa e quantitativa de seus metabólitos especiais, que a espécie estudada venha a produzir em seu local de ocorrência e época de coleta.

Vários estudos já mostraram que sob condições de pH baixo (menor que 5,2), onde o Alumínio (Al) está presente na sua forma monomérica  $Al^{3+}$  (Zonta, E. 2003), algumas plantas, chegam a acumular de 10 a 1000 mg/Kg de massa seca em suas folhas (Wong, M.H *et al.* 2003). Nas folhas velhas, especialmente, a quantidade de Al pode chegar a 5600 mg/Kg de massa seca, enquanto que em folhas novas, este teor acaba sendo menor (em torno de 997 mg/Kg) (Wong, M.H *et al.* 2003). Casos extremos de acúmulo de Al já foram relatados nas folhas de chás, usados corriqueiramente na China como infusos, em que os teores de Al excediam a 30.000 mg/Kg (Wong, M.H *et al.* 2003). O alumínio é facilmente hidrolisável e relativamente insolúvel em pH entre 6,0 - 8,0, entretanto, sob condições ácida (pH < 5,2) ou alcalina (pH > 8,0), e- /ou em presença de complexos ligantes tem sua solubilidade aumentada, tornando-se mais disponível para transformações biogeoquímicas (Wong, M. H *et al.* 2003).

Concomitante a presença de Al em solos ácidos, há o F. Presente comumente na forma de minerais, onde sua mobilidade no solo é determinada pela quantidade de minerais e pH presentes na argila, pela adsorção de complexos de carga positiva, bem como pela concentração de Ca, K, Fe, Al, e P no solo (Wong, M.H *et al.* 2003).

A alta solubilidade do F sob condições ácidas (pH <5,5) corresponde à presença de complexos catiônicos com o alumínio ( $AlF_2^+$  e  $AlF^{2+}$ ) no solo e que podem ser facilmente absorvidos pela raiz de uma planta (Wong, M.H *et al.* 2003). Estes complexos podem ser dissociados em  $F^-$  e  $Al^{3+}$ , onde poderão ser absorvidos facilmente pelas raízes e serem transportados até as folhas mais jovens (Wong, M.H *et al.* 2003). O fluoreto acumulado em folhas velhas pode atingir uma concentração em torno de 2000 mg/kg, enquanto que nas folhas novas pode atingir de 250 a 360 mg por Kg de folha (Wong, M.H *et al.* 2003).

Para ambos os solos analisados, os teores de alumínio foram altos conforme dados da (Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8; pág. 43; Tabela 9; pág. 44). O limite para a maioria das espécies de solo gira em torno de 0,3 mol/Kg de Al (Zonta, E. 2003).

Tais informações podem levar, inicialmente, a aduzir que estas espécies vegetais venham a absorver elevados teores de alumínio (e mesmo de F) em suas raízes e folhas. No entanto, como cada planta possui sua fisiologia própria, somente pela análise analítica quantitativa deste metal e mesmo do flúor nas folhas e raízes é que se poderá afirmar se a mesma irá reter ou não estes elementos em seu organismo, para uma possível correlação dos dados da literatura (Wong, M.H *et al.* 2003). Ressalta-se, entretanto, que como os

teores de matéria orgânica de ambos os solos analisados estiveram entre médio a alto (a faixa deste teor parte de 20,0 g/kg) grande parte deste Al poderá ser complexado, a ponto de não ser absorvido pelas espécies vegetais.

Em relação à espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, a indicação do pH de seu solo, 5,1-5,3 (tendo seu solo caracterizado como do tipo *Cambissolos háplicos*) (Curcio, G.R. 2000), à luz do que já foi mencionado, aponta para a existência de teores altos de alumínio e mesmo de flúor em suas folhas e raiz, bem como a espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso (pH= 4,6-4,8) (Latosolos vermelho) (Boletim Técnico, 66). Desde que sejam estas plantas acumuladoras de Al e, conseqüentemente, de F em seus tecidos.

Em trabalhos etnofarmacológicos com as comunidades de caboclos ao sul de Marajó, principal ilha do delta do Amazonas, no Pará, estudos fitoquímicos realizados com as raízes da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl. apresentaram, em seus extratos aquosos, clorofórmico, acetato de etila e etanólico apenas dois tipos principais de substâncias: flavanonas do tipo catequinas e ésteres triterpênicos. Esta última classe de substâncias foi igualmente detectada no extrato hexânico. O tipo de solo, bem como dados da análise de fertilidade do solo e época de coleta, não foram citados na referência consultada (Johns, A E., Hammer, M.L.A. 1993).

Mas pelo perfil da composição química de seus metabólitos especiais pode-se deduzir a existência diferenciada do solo e de seus nutrientes em que esta espécie se encontrava exposta, quando comparada com os dados da composição química dos extratos das raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, do município de Florianópolis- SC.

Outros estudos desta mesma espécie ajudaram para se tomar como ponto inicial de maior importância, em estudos fitoquímicos de plantas medicinais, a análise preliminar do solo. Estudos fitoquímicos (partes aéreas) desta espécie foram realizados nos municípios de Valença e Maricá (restinga de Maricá), no Estado do Rio de Janeiro, como locais de coletas. Tendo o latossolo, como tipo predominante de solo dessas regiões (Futuro, D. 1997).

A espécie estudada por Futuro (Futuro, D. 1997) apresentou em seus extratos hexânico e metanólico a ocorrência de substâncias do tipo esteróide, derivados triterpenoídicos, arilpropanóides glicosilados (verbascosídeo e isoverbascosídeo, somente) e os iridóides 6-β-hidroxiipolamiida e ipolamiida, principalmente, dentro outros iridóides (Futuro, D. 1997).

A referência consultada aponta ainda a uma diferença na produção de iridóides para a espécie coletada nas duas localidades, tendo no município de Valença uma menor

variabilidade desta classe de substâncias, coexistindo tão somente, em proporções equivalentes, o 6- $\beta$ -hidroxiipolamiida e a ipolamiida. Na restinga de Maricá, entretanto, ocorreu uma maior variabilidade estrutural destes monoterpenóides (6- $\beta$ -hidroxiipolamiida, ipolamiida, cayennosídeo, 7-hidroxicayennosídeo, ácido gervásico e cayennensídeo). Tendo a 6- $\beta$ -hidroxiipolamiida como substância de maior concentração (Futuro, D. 1997).

Segundo este mesmo autor, a diferença encontrada na produção da variabilidade estrutural destes iridóides está diretamente atrelada a “riqueza” e a “pobreza” dos solos de ambas as regiões. Ou seja, um solo pobre (em matéria orgânica) estimularia a planta a uma elevada diversificação na produção de metabólitos especiais frente a um solo rico (em matéria orgânica) (Futuro, D. 1997). Entretanto, tal afirmação torna-se questionável, já que o autor não apresentou dados da análise de fertilidade de ambos os solos, na época de coleta do material vegetal estudado, para fins comparativos com a mesma espécie provinda do município de Florianópolis-SC.

## 5 CONCLUSÃO

Esse trabalho de dissertação ampliou o conhecimento farmacológico da espécie *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, por meio de suas raízes, pelos testes de atividade antioxidante e antimicrobiano do extrato etanólico e de suas frações, realizados pela primeira vez para esta espécie. A fração acetato de etila por ter apresentado os resultados mais preeminentes, teve suas substâncias isoladas por meio do uso de cromatografia contracorrente (CCC), procurando com isso a identificação da(s) substância(s) responsável/ responsáveis por ambas às atividades farmacológicas. Os fenilpropanóides glicosilados (martinosídeo, verbascosídeo e isoverbascosídeo), quando comparados ao iridóide majoritário (ipolamiida), isolado nessa fração, foram os responsáveis por ambas as atividades, após terem sido, isoladamente, testados. A atividade antimicrobiana para a cepa de *S. pyogenes* foi obtida pela primeira vez, para esses fenilpropanóides glicosilados.

O efeito sinérgico dessa atividade foi inicialmente constatado segundo os valores do teste de disco de difusão, da fração acetato de etila, frente aos dos fenilpropanóides glicosilados já mencionados. A comparação dos valores do teste da concentração mínima inibitória dessa fração e de seus fenilpropanóides glicosilados isolados e misturados, confirmou o sinergismo dessas substâncias quanto a atividade antimicrobiana. Estudos mais pormenorizados quanto ao sinergismo nessas substâncias, quando misturadas, deve ser realizado a fim de se obter um maior esclarecimento do efeito da atividade antimicrobiana das proporções desses fenilpropanóides glicosilados. Entretanto, o excelente efeito apresentado pela atividade antioxidante do extrato etanólico de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, quando comparado ao padrão do extrato comercial de *Ginko biloba*, apontou outras classes de substâncias com atividade mais promissora, presentes na fração clorofórmica, além dos fenilpropanóides glicosilados isolados da fração acetato de etila. Sugerindo, igualmente, o sinergismo de ambas as frações, responsáveis pela excelente atividade antioxidante.

A utilização da técnica de cromatografia contracorrente, com o uso de sistemas de solventes em gradiente, permitiu o dinamismo do isolamento de seis substâncias, três dos quais os fenilpropanóides glicosilados já mencionados e três iridóides, sendo um deles a ipolamiida e dois outros em fase de identificação.

Este trabalho expôs ainda a importante relação solo-planta e a produção qualitativa dos metabólitos especiais dessa espécie, quando comparados aos da literatura (Futuro, D. 1997), (Johns, A E; Hammer, M.L.A 1993). O que torna, em primeiro momento, os dados da análise de solo para uma dada espécie vegetal em estudo, de suma importância. Bem como, a inclusão dos dados de nível de acidez do solo e a suposta absorção de alumínio e flúor pela planta, abrindo assim novos questionamentos quanto ao assunto toxicidade frente à relação dose-tempo do uso que um fitoterápico ou chá venha a ser utilizado. Contudo, um estudo quanto ao aspecto fisiológico dessa espécie deve ser feito, a fim de se constatar se *S. cayennensis* (Rich.) Vahl apresentará ou não elevados níveis de absorção de alumínio e flúor em suas folhas e raízes.

Para a espécie *P. bahiense* (Meiss) Barroso, constatou-se pela primeira vez no gênero *Pleurothyrium* o flavonóide isolado Apigenina -7- O- neo-hesperidosídeo, o que contribuiu para o conhecimento da composição química desse gênero. Além da primeira análise fitoquímica apresentada para essa espécie, testes farmacológicos foram igualmente realizados, contribuindo assim para a ampliação do parco conhecimento não só do gênero como da família Lauraceae, a que pertence. Tendo como promissor a atividade antinociceptiva para o extrato bruto hidroalcoólico de suas folhas, quando comparado às atividades antiinflamatória, antimicrobiana e antioxidante.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- ABBOT P.T., KLEIMAN R. 1991. Solvent selection guide for counter-current chromatography. *Journal of chromatography*, 538. p.109-118.
- AGRAWAL, P.K.1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. In *studies in Organic Chemistry v.34*. Agrawal PK (ed). Elsevier. Amsterdam.
- AGRAWAL, P.K.1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Review Article Number 70. *Phytochemistry*. v.31.Nº 10, p.3307-3330.
- ALIOTTA, G., MOLINARO., A, MÔNACO. P., PINTO, G., PREVITERA, L. 1992. Three biological active phenylpropanoid glucosides from *Myriophyllum verticillatum*. *Phytochemistry*, v.31. No.1, p.109-111.
- BERTHOD, A. 2002. Counter-current Chromatography, The Support-free Liquid Stationary Phase. *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. XXXVIII. Elsevier Science, Amsterdam.
- BERTHOD, A., BROWN, L., LEITÃO, G.G., LEITÃO, S.G. 2002. Operating a Countercurrent Chromatography Machine In *Countercurrent Chromatography The Support Free Liquid Stationary Phase*, 1<sup>st</sup> Edition; D. Barceló, Alain Berthod, Eds.; *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier: NewYork; Vol. XXXVIII, 37.
- BLOISE, M.R., DYNIA, F.J., MOREIRA, C.N.G. 1979. Manual de Métodos de Análise de Solo. EMBRAPA. Parte 3-Análises de Fertilidade de Solos e Tecidos. SNLCS - Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solo.
- Boletim Técnico, 66. EMBRAPA / SERVIÇO NACIONAL DE LEVANTAMENTO E CONSERVAÇÃO DE SOLOS. 1980. Levantamento semidetalhado do município do Rio de Janeiro, RJ. Rio de Janeiro: EMBRAPA / SNLCS. p.389.
- BORRIS R.P. 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology* v.51 1/3, p. 39-44.
- BREITMAIER, E., VOELTER, W. 1990. Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry. Third Edition.Ed. VCH Verlagsgesellschaft.

- BRITO, N. R. S. 1992. Contribuição à farmacologia de Verbenaceae - O gênero *Vitex L.*, Rev. Brás. Farm. v.73 (21). p.19-23.
- CALIS, I., LAU LOUB, M.F., ROGENMOSER, E., STICHER, O. 1984. Isomartinoside, A Phenylpropanoid Glycoside From *Galeopsis Pubescens*. Phytochemistry, v.23.Nº10, p. 2313-2315
- CONWAY, D.W. 1990. Counter-current Chromatography: Apparatus, Theory and Applications. VCH Publishers, Inc. NY.
- CONWAY, W.D. 1991. Review. Counter-current chromatography. Journal of Chromatography, 538. p.27-35.
- CORRÊA, P. 1984. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, v.5. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, Brasil.
- CURCIO, G. R., CARVALHO, A.P., BOGNOLA, I.A., GOMES, I.A., ROSSI, M., COELHO, M.R.; SANTOS, R.D. 2000. Reunião de classificação, correlação e aplicação de levantamentos de solos, 6. Guia de excursão de estudos de solos nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Colombo: Embrapa Florestas / Rio de Janeiro: Embrapa Solos / Campinas: IAC. 222p. Embrapa Florestas. Documentos, p.222 .
- DE OLIVEIRA, R. R, 2003. Fitoquímica e Atividade Biológica de *Cecropia Lyratiloba* Var. *lyratiloba* Miquel. Tese de Doutorado. UFRJ.NPPN. Rio de Janeiro.
- DE SOUZA, P. A. 1998. Do xamanismo ao Poder de Cura Pelas Plantas Mediciniais. Estudo Fitoquímico de *Baccharis pseudotenuifolia*. Monografia de conclusão do curso de química. Universidade Federal De Santa Catarina-UFSC, Florianópolis, Santa Catarina.
- DEWICK, M. P. 1997. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. British Library.
- DIAS-FILHO, M.B. 1994. How is fecundity affected by mowing in the tropical weed *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae)? Pesq.agropec.bras., Brasília.v.29, Nº11.
- ELLEN, B. J., LANCE, R. P., SYDNEY, M.F. 1994. Diagnostic Microbiology, 9<sup>th</sup> edition. Ed. Mosby.



- EMMERICH, M., SENNA, L. M. 1985. Estudos de etnobotânica no Parque Nacional do Xingu II. Dois componentes do ritual de pajelância: o cigarro e a semente do pajé. *Bradea*. v.4.26. p.170-175.
- FOUCAULT, A. P., CHEVOLOT, L. 1998. Review. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*, 808. p.3-32.
- FOUCAULT, A. P. 1995. Solvent Systems in Centrifugal Partition Chromatography In *Centrifugal Partition Chromatography*, 1<sup>st</sup> Ed.; Alain P. Foucault, Ed. Chromatographic Science Series, Marcel Dekker Inc., New York, v. 68, p.90-92.
- FOUCAULT, A. P., DEKKER, M. 1999. Solvent Systems in Centrifugal Partition Chromatography. Foucault (Ed.), Inc., NY.
- FUTURO, D. 1997. *Stachytarpheta cayennensis*. Considerações Químicas e Ecológicas. Tese de Doutorado, UFRJ, NPPN, Rio de Janeiro.
- GOLD, E.P., CAHILL, L., WENK, L.G. 2003. *Scientific American* Ano 2, nº13, p. 85-89.
- GORDON, H. M. 1996. Dietary Antioxidants in Disease Prevention. *Natural Product Reports*, v.13 (4).
- GOTTLIEB, O.R. 1972. Review Article Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, v.11.p.1537-1570.
- GOTTLIEB, O.R.; YOSHIDA, M. 1978. Neolignanas antitumorais. *Ciência e Cultura*. v.32; p. 93-100
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. 1989. *Free Radical in Biology and Medicine*. Claderon Press-Oxford.
- HAMILL, A.F., APIO, S., MUBIRU, N.K., MOSANGO.M., MAGANYI, O.W., SOEJARTO, D.D. 2003. Traditional herbal drugs of southern Uganda. Part III: Isolation and methods for physical characterization of bioactive alkanols from *Rubus apetalus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.87,p.15-19.
- HENDERSHOT, L.C., FORSAITH, J. 1959. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J. Pharm. Exp. Ther.* v.125, p.237-240.
- HENRIQUES, T. A., SCHAPOVAL, E.S.E., WINTER DE VARGAS, M.R., CHAVES, C.G., BRIDI, R., ZUANNZZI, A.J. A. 1998. Antiinflammatory and

antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytaspheta cayennensis*. *Journal of Ethnopharmacology* v.60, p.53-59.

- HOLETZ, B.F., PESSINI, L. G., SANCHES, R.N., NAKAMURA, V.C., DIAS FILHO, B.P., 2002. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, October*.v.97 (7), p.1027-1031.
- HOSTETTANN, K., HOSTETTANN, M., MARSTON, A. 1984. *Nat. Prod. Reports*.
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, A., SLACANIN, I. 1990. Review paper. Centrifugal Partition Chromatography in the Separation of natural Products. *Phytochemical analysis*, v.1,p.3-17.
- HOTA, D., ACHARYA, S. B. 1994. Studies on peripheral actions of isatin *Ind. J. Exp. Biol.*, v.32 (10), p.710-717.
- HUANG,Y., DE BRUYNE, T., APERS, A., MA, Y., CLAEYS, M., PIETERS, L., VLIETINCK, A. 1999. Flavonoid glucuronides from *Picria febrifera*. *Phytochemistry*.v. 52. P. 1701-1703.
- ITO,Y., QIZHEN, D. 1999. Relationship between the flow-rate of the mobile phase and retention of the stationary phase in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.835.231-235.
- JOHNS, A E., HAMMER, M. L.A .1993. Tapping an Amazônian plethora: four medicinal plants of Marajós Island, Pará (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology* v.40, 53-75.
- JUNIOR, P. 1990. Recent Developments in the Isolation and Structure Elucidation of Naturally Occuring Iridoid Compounds. *Planta Médica* v.56.
- KAPLAN, C.A M., LEITÃO, G.S. 1994. Phenylpropanoid Glucosides from *Aegiphila Obducta*. *Journal of Natural Products*. v.57, Nº 12. p.1703-1707.
- KOSTANIAN, E, A.2002. Modelling counter-current chromatography: a chemical engineering perspective. *Journal of Chromatography A*, v.973.39-46.
- KOSTER, R., ANDERSON, M., DE BEER, E.J. 1959 Acetic acid for analgesic screening. *Fed.Proc.* v.18, p.412.
- LAPA, J.A., SOUCCAR, C., LIMA-LANDAMAN, R.T.M. 2001. Métodos de avaliação da atividade farmacológica em plantas medicinais. (SBFTE). SBPC.

- LIMA-LANDAMAN, R.T M., LAPA, J.A., VELA, M.S.1997. Inibition of Gastric Acid Secretion by the Aqueous Extract and Purified Extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. *Planta médica* v. 63, 36-39.
- LORENZI, H., MATOS, A J.F. 2002. *Plantas Mediciniais no Brasil. Nativas e Exóticas*. Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.
- LUCHESE, B.E., FAVERO, B.O.L., LENZI, E. 2001. *Fundamentos da química do solo*. Ed. Livraria Freitas Bastos Editora S.A.
- MARQUES, C. A. 2001. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*. v.8, n.1, p.195 – 206.
- MENEZES, F. S. 1994. *Base Química das tendências Filogenéticas em Lamiiflorae*, Dissertação de Mestrado, UFRJ, NPPN, Rio de Janeiro.
- MENSOR, L.L., MENEZES, S.F., LEITÃO, G.G., LEITÃO, S.G., REIS, S.A., dos Santos, C.T., COUBE, S.C. 2001. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytotherapy Research*. v.15, 127-130.
- MORRION, R., BOYD, R. 1983. *Química Orgânica*. Fundação Calouste Gulbenkian.ão Calouste Gulbenkian. 8ª Edição.778-783.
- NAMJO, F.,GOTTO, K., SETO, R., SUZUKI, M., SAKAI, M., HARA, Y.1996. Sacaveging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic. Biol. Med*, v. 21 (6):895-902.
- OKADA, Y., KANEKO, M., OKAJIMA, H. 1996. Hidroxil radical scavenging activity of naturally occurring uran fatty acids. *Biol. Pharm. Bull*. v.19 (12).1607-1610.
- POMILIO, B.A . GROS.G. E. 1979. Pinocembrin 7-neohesperidoside form *Nierembergia hipomanica*. *Phytochemistry*.v.18. p.1410-1411.
- PUTMAN, L. J; BUTLER, L. G. 1985. Fraction of condensed tannins by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* 318.
- QUENTIN-LECLERQ, J., WARIN, R., BISSET, N.G. 1988. Isolation and purification of panarine, an alkaloid from Venezuelan curare. *Phytochemistry* v.27, 4002-4004.
- RIPPERGER, H. 1981. 4'''- O-acetylsarotanosideo, a novel flavanone glycoside from *Nierembergia hippomanica*. *Phytochemistry*. v.20.7. p 1757-1758.

- SALATINO, A, SALATINO, F.L.M. 1996. Plantas Medicinai s e Tóxicas, resumo do conteúdo do mini-curso oferecido durante a Reunião Anual SBPC, UFSC, Florianópolis-SC.
- SCHIANTARELL, P., CADEL, S., ACERBI, D., PAVESI, L., 1982. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. *Arzeim.-Forsch./Drug Res.* v.32, p.230-235.
- SCHULZ, V. HÄNSEL; TYLER, V. E. 2002. *Fitoterapia Racional* 4ª Edição, Ed. Manole.
- SHENG, Q.G. 2002. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-pheypyridinium ion-induced neurotoxicity in PC 12 cells. *European Journal of Pharmacology* 451.
- SHU, Y. 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products* v.61, p. 1053-1071.
- SILVERSTEIN, M. R., BASSLER, C. G., MORRIL, C.T. 1991. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5 Ed.Ed.LTC.
- SLACANIN, I., MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. 1989. modifications to a high-speed counter-current chromatograph for improved separation capability. *J. Chromatogr.* 482, 234-239.
- TAYLOR, J. L., MCDONALD-STEPHENS, L.J., HUNTER, B.D., BERTSCH, P.M., EIMORE, D., RENGEL, Z., REID, J.R., 2000. Direct Measurement of Aluminum Uptake and Distribution in Single Cells of *Chara corallina*. *Plant Physiology*, v. 123, pp. 987–996.
- TOLEDO, B.J.1991. Estudo dos constituintes químicos das espécies *Byrsonima variabilis* Juss; *Stigmaphyllon tomentosum* Juss. Tese de Mestrado. UFRRJ.
- TOMASSINI, I.C., NICOLETTI, M.1993. Phenylpropanoid glycosides. Distribution and pharmacological activity. *Fitoterapia*. Vol.LXIV, N°3.
- VANHAELEN, M., VANHAELEN-FASTRE, R. 1988. Counter-current chromatography for isolation of flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves. *J. Liq. Chromatogr.* v.11. 2969-2975.
- VERPOORTE, R. 1989. Some phytochemical aspects of medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology* v.25, p. 43-59.

- WERFF, H. VAN DER., RICHTER, H. G. 1996. Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 8,p. 419 – 432.
- WONG, M.H., FUNG, K.F., CARR, H.P. 2003. Aluminium and fluoride contents of tea, with emphasis on brick tea and their health implications. *Toxicology Letters* 137; 111-120
- WOOLFE, G., MACDONALD, A.D. 1944. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride. *J.Pharm. Exp. Ther.* v. 80, p. 300-30.
- YOKOSAWA, T., DONG, E; WU LIU, Z., SHIMIZU, M. 1997. Antioxidative activity of flavones and flavonols in vitro. *Phytotherapy Research*, v.11. 446-449.
- ZHANG, T.Y., HATANO,T., OKUDA,T. 1998. Separation of flavonóids in crude extract from sea buckthorn by counter-current chromatography with two types of coil planet centrifuge. *J. Liq. Chromatogr.*v.11, 233-244.
- ZHONGJIAN, J., ZIMIN, L., CHANGZENG,W., 1991. Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis spicata*. *Phytochemistry*, v.30.11.p. 3745-3747.
- ZONTA, E. 2003. Estudos da Tolerância ao Alumínio em Arroz de Sequeiro e Seus Efeitos Sobre a Interface Solo-Planta. Tese de Doutorado.UFRRJ. Rio de Janeiro.