



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE  
*Ouratea parviflora* (OCHNACEAE)**

**CLAUDIANA BARBOSA DOS SANTOS**

**ORIENTADOR**

**Dr. MÁRIO GERALDO DE CARVALHO**

**Seropédica, RJ  
Setembro, 2009**

**CLAUDIANA BARBOSA DOS SANTOS**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE  
*Ouratea parviflora* (OCHNACEAE)**

**Monografia apresentada ao curso de engenharia florestal como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Florestal. Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.**

*Sob orientação do Professor*

**Dr. MÁRIO GERALDO DE CARVALHO**

**Seropédica, RJ  
Setembro, 2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE  
*Ouratea parviflora* (OCHNACEAE)**

Monografia apresentada e aprovada em 02 /09 /2009

---

Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho  
Departamento de Química –ICE-UFRRJ  
Orientador

---

Prof(a).D<sup>ra</sup> Márcia Cristina Campos de Oliveira  
Departamento de Química-ICE-UFRRJ  
Membro Titular (presidente)

---

Prof(a).D<sup>r</sup> Heber dos Santos Abreu  
DPF-IF-UFRRJ  
Membro Titular

---

Prof(a). MSc Natália Dias de Souza  
DPF-IF-UFRRJ  
Membro Suplente

## DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus pais, minhas irmãs (Ana e Cleide), ao meu companheiro (Rodrigo) e a minha linda filha Iara. Também ao meu professor Mário Geraldo e a todos que sempre acreditaram que eu seria capaz.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por todos os dias me mostrar que é sempre fiel e que sempre posso contar com ele.

Ao Prof. Mário Geraldo de Carvalho exemplo de competência, paciência e humildade, pela enorme dedicação em me ensinar;

Aos meus pais Ostriano e Maria que tanto me ensinaram e me amaram, às minhas irmãs Cleidiana e Ana Cláudia por serem companheiras e presentes em minha vida;

Aos verdadeiros amigos que fiz nessa universidade, quarto 21 que me acolheu nessa minha trajetória acadêmica onde pude conhecer pessoas que nunca esquecerei: Aline, Carol, Leticia, Paula, Ivanete, Ana, Raquel, Rose, Jú, Sharita vou sentir saudades.

Ao meu eterno companheiro Rodrigo pela compreensão, apoio, presença e por sempre acreditar em mim;

A minha linda filha Iara que me deu mais forças para continuar e terminar o que comecei;

A minha amiga Gisely e aos demais do laboratório de Química da madeira pelo apoio e conhecimento sempre compartilhado;

E ao LQPN pela oportunidade e convívio com pessoas competentes e determinadas onde aprendi muito com todos.

## RESUMO

Neste trabalho descreve-se o isolamento de algumas substâncias de folhas de *Ouratea parviflora* através das técnicas clássicas em fitoquímica e a quantificação de lignina e celulose (holocelulose) em galhos de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae), conhecida popularmente como coração de bugre. A extração com solvente e processamento cromatográfico dos extratos de folhas desta planta conduziu, até o momento, à identificação do triterpeno fridelina, sitosterol, stigmasterol, campesterol, tocoferol, o flavonóide apigenina e as biflavonas agatisflavona, 7''-metil-agatisflavona e amentoflavona. Detectou-se um teor médio de 24% de lignina e 62% de celulose em galhos de *O. parviflora*. A frequência e a diversidade estrutural dos biflavonoides encontrados em espécies do gênero *Ouratea* permitem ser utilizados como marcadores taxonômicos.

Palavra-chave: Ochnaceae, *Ouratea*, biflavonoides, lignina, celulose

## ABSTRACT

The isolation of some substances from the leaves of *Ouratea parviflora* through the classic techniques in phytochemistry and the quantification of lignin and cellulose (holocelulose) in branches of *Ouratea parviflora* (Ochnaceae), popularly known as “coração de bugre” are described. The extraction with solvent and chromatographic techniques of the extracts from the leaves of this plant resulted, until the moment, in the identification of the triterpeno fiedelin, sitosterol, stigmasterol, campesterol, tocopherol, the flavonoid apigenin and the biflavones agatisflavone, 7”-methyl-agatisflavone and amentoflavone. It was detected 24% of lignin and 62% of cellulose in branches of *O. parviflora*. The frequency and the structural diversity of the biflavonoids found in *Ouratea* species allow to be used this class of compounds as taxonomic markers.

Key-words: Ochnaceae, *Ouratea*, biflavonoids, lignin, cellulose

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> -----	<b>ix</b>
<b>Lista de Esquemas</b> -----	<b>x</b>
<b>Lista de Figuras</b> -----	<b>xi</b>
<b>1. Introdução</b> -----	<b>1</b>
<b>2. Parte Experimental</b> -----	<b>4</b>
2.1 Isolamento dos constituintes químicos das folhas de <i>Ouratea parviflora</i> -----	4
2.1.1 Material vegetal-----	4
2.1.2 Materiais e métodos-----	4
2.1.3 Procedimento experimental para isolamento dos constituintes químicos das folhas-----	4
2.1.3.1 Extrato diclorometano das folhas (OPFD)-----	5
2.1.3.2 Extrato metanólico das folhas (OPFM)-----	6
2.1.3.2.1 Partição diclorometano (OPFM - D)-----	7
2.1.3.2.2 Partição Acetato (OPFM - A)-----	9
2.1.3.2.3. Resíduo (OPFM – R)-----	9
2.2 Quantificação de lignina e celulose dos galhos de <i>Ouratea parviflora</i> -----	10
2.2.1 Material vegetal-----	10
2.2.2 Materiais e métodos-----	10
2.2.3 Preparação do material livre de extrativos -----	10
2.2.4 Determinação da lignina de Klason-----	10
2.2.5 Obtenção de holocelulose por cloração-----	11
<b>3. Resultados e discussões</b> -----	<b>11</b>
<b>4. Conclusão</b> -----	<b>13</b>
<b>5. Referências Bibliográficas</b> -----	<b>13</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl <sub>3</sub> -d <sub>6</sub>	Clorofórmio Deuterado
CG-EM	Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Ultra Violeta
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
HPLC-EM	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas
IV	Infra-Vermelho
MeOH	metanol
MeOH-d <sub>6</sub>	metanol deuterado
OPFD	<i>Ouratea parviflora</i> folhas diclorometano
OPFM	<i>Ouratea parviflora</i> folhas metanol
OPFM-A	<i>Ouratea parviflora</i> folhas metanol - acetato
OPFM-R	<i>Ouratea parviflora</i> folhas metanol - resíduo
OPFM-D	<i>Ouratea parviflora</i> folhas metanol - diclorometano
PA	Pró- análise
P.F.	Ponto de fusão
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
UV	Ultra violeta

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Obtenção dos extratos das folhas-----	5
<b>Esquema 2</b> - Isolamento dos constituintes do extrato diclorometano das folhas-----	6
<b>Esquema 3</b> – Procedimento da partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas de <i>Ouratea parviflora</i> .-----	7
<b>Esquema 4</b> - Isolamento de flavonóides de algumas frações obtidas da fração diclorometano da partição do extrato metanólico-----	9

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Tipos estruturais de biflavonas -----**3**
- Figura 2** – Estruturas das substâncias isoladas de folhas de *Ouratea parviflora* -----**12**

## 1. INTRODUÇÃO

A família Ochnaceae pertence à ordem Theales e compreende cerca de 28 gêneros e 400 espécies de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies (BARROSO, 1986). São plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas, raramente ervas. As espécies espalhadas pelo país recebem designações como o Angelim (*Ouratea vaccinoïdes*), Batiputá (*Ouratea floribunda*), Caju bravo (*Ouratea salicifolia* e *O. salicifolia*) e Coração de Bugre (*Ouratea parviflora*). O que bem caracteriza as espécies são as flores geralmente vistosas e freqüentemente de coloração amarela. As sementes de algumas espécies dessa família, principalmente o Batiputá, produzem um tipo de “manteiga” que fornecem um óleo adocicado e aromático que se torna rançoso com facilidade, além de ser usado em conservas e temperos, este óleo já teve indicação popular como anti-reumático, útil na cura de paralisias, erisipela, feridas do útero e outras ulcerações (BARROSO, 1986), adstringentes, tônicas, estomáquicas, vermífugas (BRAGA, 1960), além de tratamento de distúrbios gástricos e reumatismo (MBING *et al*, 2003).

Esta biodiversidade é pouco conhecida quando se trata do estudo de seus componentes químicos e atividades biológicas, entre outras.

Espécies da família Ochnaceae, são pouco conhecidas do ponto de vista químico e biológico. Estudos químicos demonstram que são capazes de biossintetizar terpenos, flavonóides e biflavonóides, sendo mais bem representada pelos gêneros *Ouratea*, *Ochna*, *Lophira* e *Luxemburgia*. A frequência e a diversidade estrutural de biflavonóides em espécies desses gêneros permitem que sejam utilizados como marcadores taxonômicos (SUZART *et al*, 2007). Em 1929 foi isolada a primeira biflavona, a ginetina, do Ginkgo Biloba (LIN *et al*, 1997), a partir disso mais de mil biflavonóides foram isolados de plantas e uma variedade de atividades biológicas, tem sido relacionada a esta classe de substâncias.

Além das considerações acima, o que é mais frequente na mídia e no meio científico sobre os trabalhos relacionados à química de produtos naturais é o aproveitamento da química das espécies vegetais fornecedoras de produtos com propriedades úteis na indústria farmacêutica, podendo as substâncias ser usadas como medicamentos ou como parte deles. O grande número de substâncias naturais usadas na indústria farmacêutica justifica o crescente investimento na descoberta das propriedades dessas substâncias.

As justificativas mais freqüentes para a realização de estudo químico em plantas estão na expectativa de se descobrir substâncias naturais biologicamente ativas e contribuir para o melhor entendimento e uso da biodiversidade.

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. A grande variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa desses vegetais e para a adaptação as condições ambientais (MONTANARI *et al*, 2001).

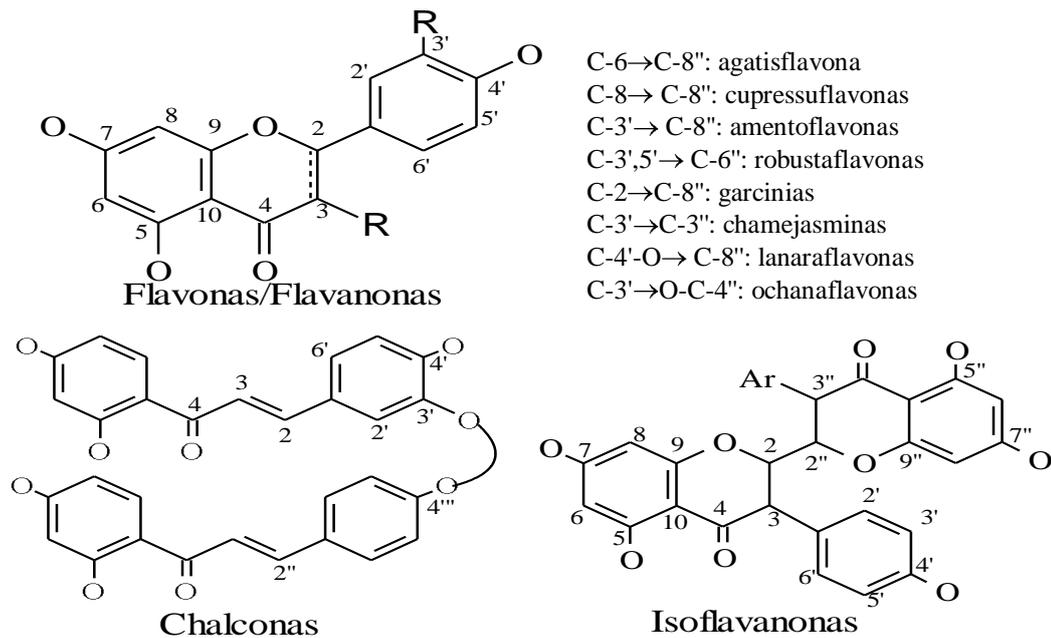
A química de produtos naturais está inserida no contexto da biodiversidade, pois além do conhecimento dos constituintes químicos relacionados às espécies em estudo, gera também informações para o entendimento de outras áreas de conhecimento como ecologia química, quimiotaxonomia, etnofarmacologia, genética, farmacologia, bioquímica, etc (SILVA, 2006).

Os critérios morfológicos utilizados na identificação das espécies vegetais podem ser acrescidos de informações relacionadas com seus possíveis constituintes químicos, detectados pelo estudo fitoquímico de espécies de diferentes famílias. Essas estreitas relações, denominadas quimiotaxonômicas permitem, inclusive, fazer previsões sobre a composição química de uma determinada espécie vegetal e aumentam as chances de se encontrar substâncias específicas que podem ocorrer dentro de uma família ou gênero. Sob este aspecto, merecem destaque os estudos de rotas biossintéticas e enzimas envolvidas nos processos de produção dos metabólitos especiais, além de estudos em ecologia química no entendimento das interações dessas substâncias com o meio ambiente (SILVA, 2006).

Os profissionais da área de química de produtos naturais sempre deram maior atenção ao estudo das substâncias micromoleculares, mas ultimamente têm produzido trabalhos com estruturas mais complexas, não se limitando às substâncias elaboradas via processos do metabolismo especial. O avanço tecnológico tem permitido o aperfeiçoamento da ligação entre os trabalhos de química de produtos naturais, bioquímica e farmacologia. A evidência disso pode ser confirmada pelo grande número de títulos de divulgações científicas nesta área como: “Phytochemistry”, “Biochemical Systematics and Ecology”, “Journal Nat. Cancer Inst.”, “Journal Med. Biol. Res.”, etc., além da exigência no mercado de trabalho de profissionais com formação mais diversificada. (SUZART, 2007).

Além da contribuição para o conhecimento fitoquímico das espécies vegetais de diferentes famílias é importante identificar o componente (substância) majoritário na espécie estudada. Isso revela a fonte dessa substância e fornece material para avaliar as possíveis atividades biológicas e utiliza-la na preparação de derivados que, às vezes, pode potencializar suas atividades. .

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonóides diméricos, diferenciando-se de outros oligômeros, devido à origem biogenética das unidades flavonoídicas constituintes. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelo dímero flavona-flavona, flavona-flavonona, flavanona-flavanona além de ocorrerem, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas, **Figura 1** (SUZART *et al*, 2007). Quando as duas unidades são iguais, constituem os bisflavonóides e quando as duas unidades são diferentes, os biflavonóides (SUZART *et al*, 2007).



**Figura-1.** Dímeros de flavonóides.

A madeira ou qualquer outro material lignocelulósico constitui um acervo químico e bioquímico cuja constituição e organização ainda revestem-se de segredos e desconhecimentos. A constituição química dos materiais lignocelulósicos é abrangente e diversificada, com relação às substâncias que nelas se traduzem em um sistema multimolecular de alta complexidade estrutural, de ligações cruzadas e de grande importância na preservação e nas propriedades dos materiais lenhosos (ABREU *et al*, 2006) e para o avanço dos estudos em química da madeira.

A lignina ocorre na maioria das plantas e sua composição e teor não são idênticos em todas elas. Em contraste com a celulose que é formada por todas as plantas, a formação da lignina só ocorre em plantas vasculares que desenvolvem tecidos especializados em funções tais como transporte de soluções aquosas e suporte mecânico. A lignina é um componente estrutural que dá a madeira propriedades de elasticidade e resistência bastante únicas (KLOCK *et al*, 2005).

A holocelulose é o produto obtido após a remoção da lignina da madeira, ou seja é a quantidade de celulose total encontrada (hemicelulose e  $\alpha$ -celulose) no material vegetal.

A quantificação de lignina e celulose em um material vegetal e de grande importância no que diz respeito ao espectro de utilização e preservação das espécies vegetais de um modo geral.

Dentro das considerações reveladas acima, o grupo do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFRuralRJ (LQPN-UFRRJ) vem desenvolvendo trabalhos sobre o estudo químico de plantas brasileiras de diferentes famílias e tem merecido destaque os trabalhos com espécies de Ochnaceae. Este estudo tem contribuído para o cadastro fitoquímico da família, registro de novas substâncias naturais na literatura, preparação de

novos derivados e na detecção das atividades biológicas de metabólitos especiais como a atividade antitumoral das biflavonas de Ochnaceae (SUZART *et al*, 2007).

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Isolamento dos constituintes químicos das folhas de *Ouratea parviflora*

#### 2.1.1 Material vegetal

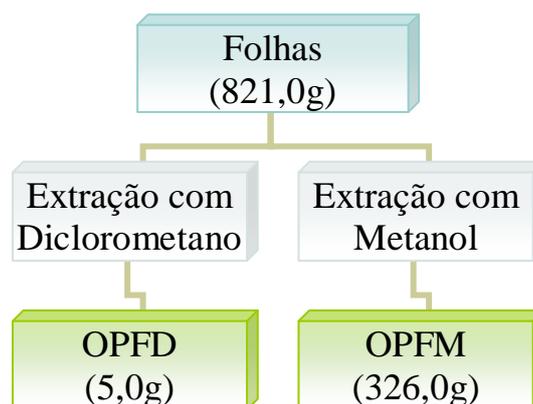
As folhas de *Ouratea parviflora* foram coletados no município de Ouro Preto, Minas Gerais, e identificada pela Dra Elsie F. Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A exsicata está depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) com o número RB 44.334.

#### 2.1.2 Materiais e Métodos

Nos processos de extração usaram-se solventes grau PA da Vetec e não foram destilados previamente. Nas técnicas cromatográficas usaram-se gel de sílica (230-400 e 70-230 mesh, da Vetec) e sephadex LH-20 (Sigma, USA) para colunas abertas. Para cromatografia em camada preparativa (CCDP) foi utilizada sílica G 2-25 µm, 60 A, F<sub>254</sub> Vetec ou Carlo Erba em suportes de vidro. Nas cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck ou Sorbent). As placas de camada fina analítica foram reveladas com luz UV (254 e 366 nm), com AlCl<sub>3</sub> em metanol (1%) ou vapor de iodo. As amostras para análise espectrométrica foram preparadas através de secagem em pistola Habder Halden, pesagem, até 3-10mg para RMN <sup>1</sup>H e maior quantidade para RMN <sup>13</sup>C, cerca de 5 mg para CG-EM.

#### 2.1.3 Procedimento experimental para isolamento dos constituintes químicos das folhas

As folhas após secas ao ambiente e moídas forneceu 821,0g, sendo este material submetido à extração com os solventes diclorometano e metanol (ordem crescente de polaridade) por meio de maceração a temperatura ambiente. Os solventes foram retirados por meio de destilação em evaporador rotatório com baixa pressão e uso de ar quente para tirar o resíduo do solvente do concentrado do balão. Foram obtidos os extratos denominados **OPFD** (*Ouratea parviflora* Folhas Diclorometano-5,0g) e **OPFM** (*Ouratea parviflora* Folhas Metanol-326,0g) (**Esquema 1**).



**Esquema 1** – Obtenção dos extratos das folhas

### 2.1.3.1 Processamento do extrato obtido com diclorometano das folhas (OPFD)

O extrato de diclorometano das folhas foi analisado em cromatografia em placa analítica de sílica gel e recromatografado em coluna aberta com gel de sílica, eluída inicialmente com hexano e aumento gradativo da polaridade com metanol até 100% metanol. Foram coletadas 44 pequenas frações de aproximadamente 25ml cada, reunidas por semelhança de perfil cromatográfico segundo análise em CCDA, sendo obtidas 6 subfrações dessa reunião. O **Esquema 2** mostra um resumo dessa etapa

As subfração 1 (103,7mg), subfração 2 (131,0mg) e subfração 5 (565,0mg) foram submetidas à purificação em coluna de sílica gel com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano – 100% acetato) resultando nos produtos, os códigos sublinhados são as frações finais cujos componentes foram identificados:

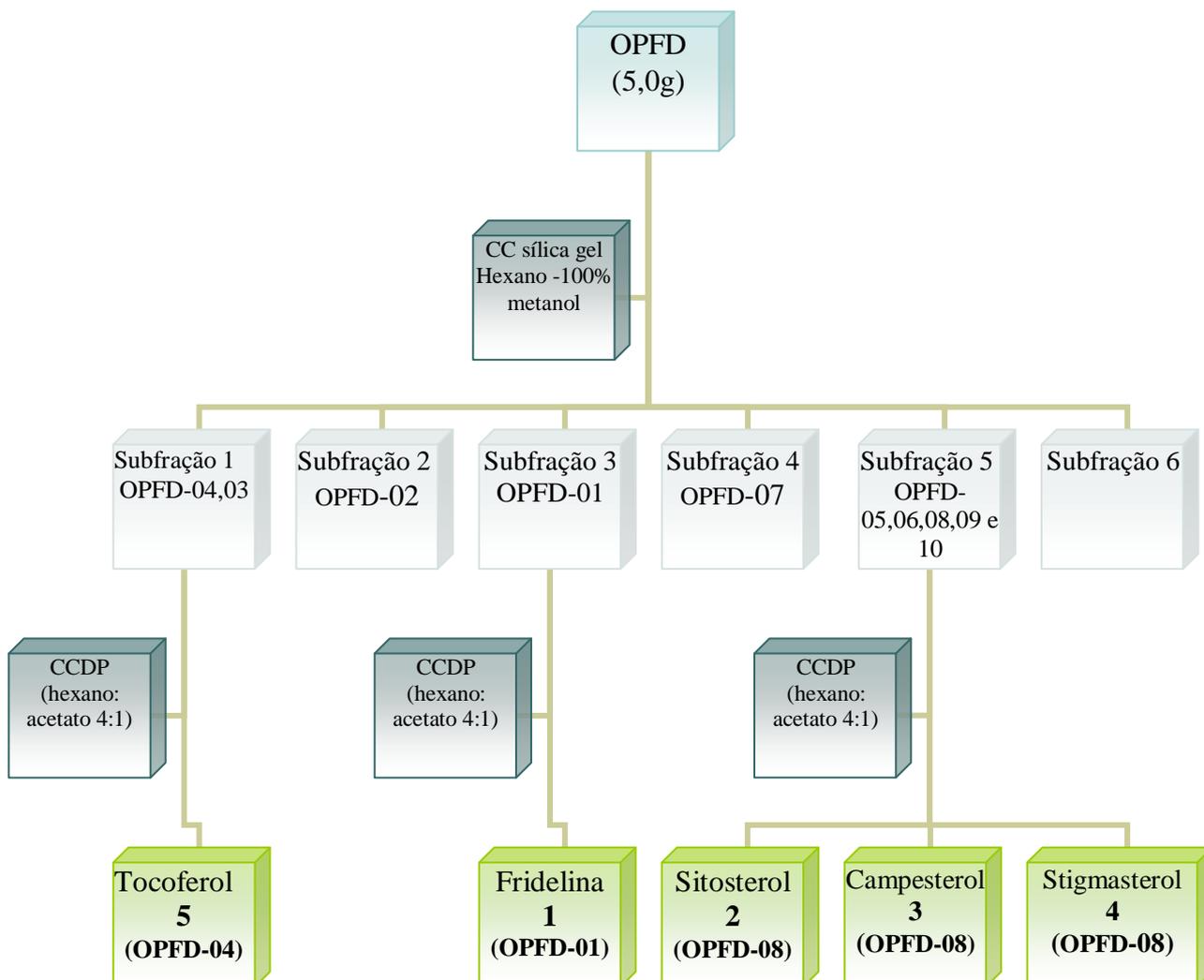
- ❖ Subfração 1: OPFD-03 (10,7mg) e OPFD-04 (22,5mg);
- ❖ Subfração 2: OPFD-02 (10,0mg);
- ❖ Subfração 5: OPFD-05 (29,0mg), OPFD-06 (27,0mg), OPFD-08 (23,0mg), OPFD-09 (14,5mg) e OPFD-10 (1,2mg).

A OPFD-08 e OPFD-04 foram analisadas com RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e CG-EM e a análise dos dados permitiu identificar a mistura de esteróides e o tocoferol, respectivamente. (**Esquema 2**).

A subfração 3 (18,0mg) após seca ao ambiente forneceu um precipitado cristalino, que foi recristalizada em acetona e foi denominada OPFD-01 (PF 240-245 °C), identificada como fridolina (**Esquema 2**).

A subfração 4 (163,0 mg) foi submetida a técnicas de separação em placa preparativa de sílica com eluente hexano: acetato de etila (4:1), resultando no produto OPFD-07 (27,5mg), que em comparações em placa de CCDA e RMN, demonstrou ser igual à OPFD-01.

Com base na análise em placa CCDA a subfração 6 (780,5mg) apresentou-se muito complexa de vários componentes em pouca quantidade sendo inviável o isolamento com as técnicas usadas até o momento.

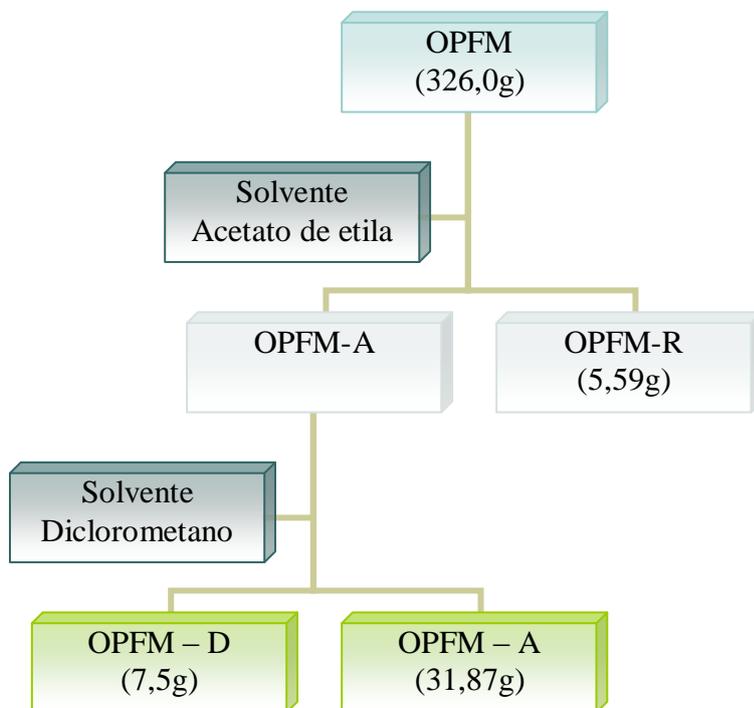


**Esquema 2** - Isolamento dos constituintes do extrato diclorometano das folhas

### 2.1.3.2 Estudo do Extrato metanólico das folhas (OPFM)

O extrato metanólico das folhas foi submetido ao processo de extração líquido-líquido. Esse extrato foi dissolvido com metanol: água (8:2) e transferido para um funil de separação onde foi adicionado acetato de etila, obtendo-se a fração acetato e o resíduo (5,59g). O solvente da fração acetato foi retirado através de destilação sob vácuo em evaporador rotatório, essa fração foi retornada para o funil de separação onde adicionou-se diclorometano, obtendo-se as partições: diclorometano (7,5g) e acetato (31,87g). Os produtos finais da extração líquido-líquido do extrato das folhas foram: OPFM-R (*Ouratea Parviflora*

*Folhas Metanol – Resíduo*), OPFM-A (*Ouratea Parviflora Folhas Metanol – Acetato*) e OPFM-D (*Ouratea Parviflora Folhas Metanol – Diclorometano*). O **Esquema 3** mostra o procedimento utilizado na partição líquido-líquido.



**Esquema 3** – Procedimento da partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas de *Ouratea parviflora*.

#### 2.1.3.2.1 Partição diclorometano (OPFM - D)

A partição OPFM – D foi analisada em cromatografia de camada analítica de sílica gel e submetida ao fracionamento em coluna com gel de sílica usando diclorometano como eluente inicial, aumentando gradativamente a polaridade com metanol até 100% de metanol. Sendo coletadas 73 pequenas frações de aproximadamente 25 ml, que foram reunidas por semelhança de perfil cromatográfico de acordo com análise em placas de CCDA. Resultaram 15 subfrações desta análise (**Esquema 4**). Os grupos de frações foram denominados subfrações e foram análise com espectros de IV e RMN  $^1\text{H}$  e foram recromatografadas para obter os componentes puros ou em condições de identificação mesmo em mistura.

Algumas subfrações, tais como 5, 6, 9 e 10, apresentaram coloração amarela quando reveladas as placas com  $\text{AlCl}_3$  em etanol, indicando a presença de flavonóides. Estas frações foram submetidas a técnicas para isolamento dos flavonóides.

As subfrações 1 (64,5mg), 2 (40,0mg), 3 (30,0mg), 4 (30,0mg), 7 (51,0mg), 8 (51,0mg), 11 (2,0g) e subfração 12 (589,9mg) foram analisadas em placa de CCDA e, de acordo com o número de componentes visualizados, essas subfrações estão sendo recromatografadas para obter substâncias puras ou em condições de identificação dos componentes em mistura.

A subfração 5 (80,0mg) foi submetida à separação em CCDP com eluentes clorofórmio : acetona (4:1), resultando nos produtos OPFM-06 e OPFM-07.

A subfração 6 (57,8mg) foi submetida à filtração em coluna com sílica gel usando como eluente inicial o hexano e aumentando a polaridade até 100% de metanol. Conseguiu-se chegar a uma fração pura denominada OPFM-03.

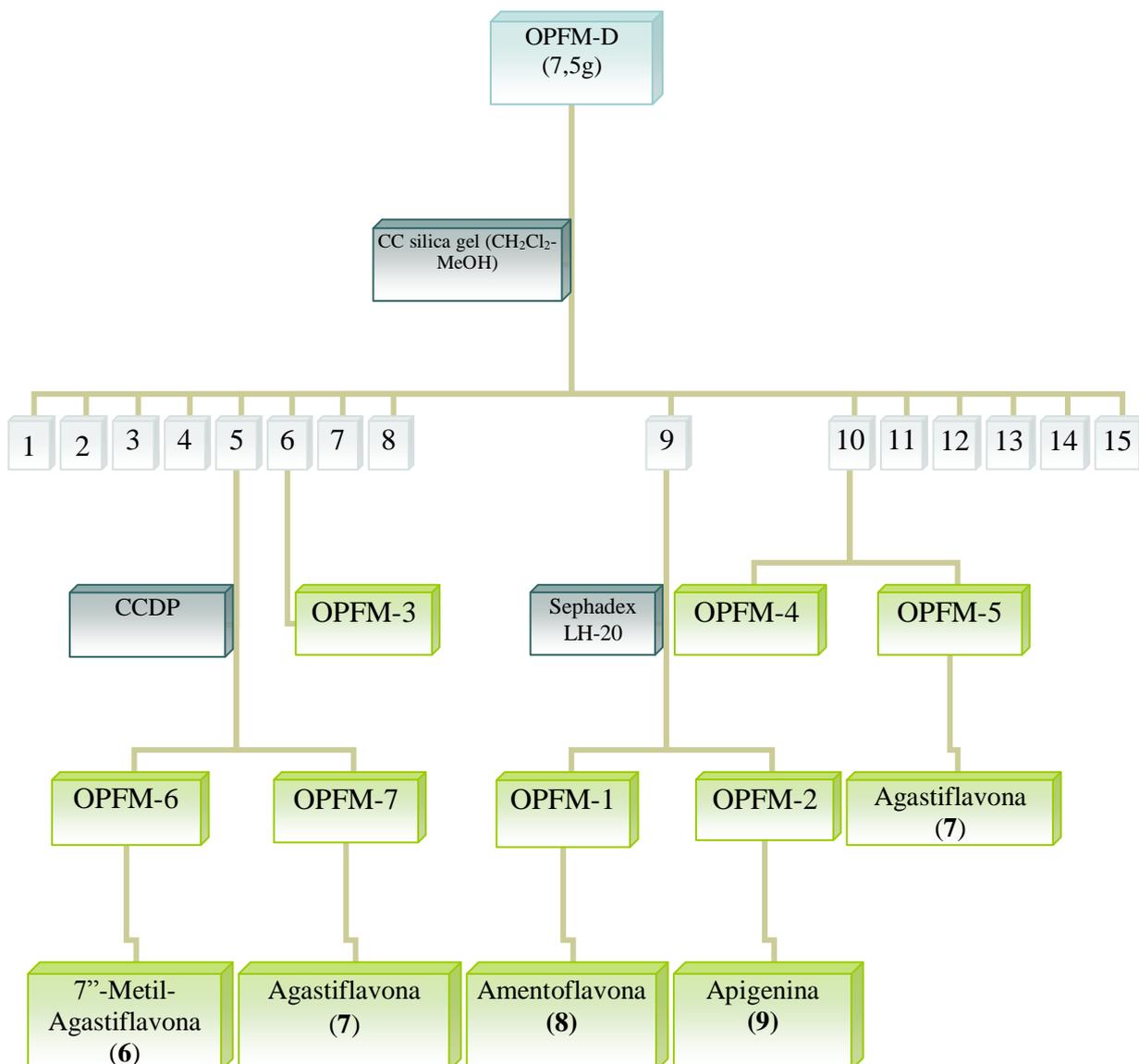
A subfração 9 (350,0mg) foi submetida à fracionamento em coluna com gel Sephadex LH-20 e eluída com 100% metanol. Devido a grande quantidade a subfração foi dividida em partes iguais para uma melhor separação, resultando em frações puras denominadas como os produtos OPFM-01 e OPFM-02 (Esquema 4).

A subfração 10 (1,75g) foi fracionada em coluna de gel de sílica, usando diclorometano como eluente inicial aumentando a polaridade até 100% metanol, obtendo como produto: OPFM-04 e OPFM-05.

Segundo análise de CCDA, as subfração 13 (14,2mg), 14 (15,8mg) e a subfração 15 (15,9mg), apresentaram grande mistura dos componentes químicos, sendo inviável o isolamento devido a pequena quantidade de amostra.

O **Esquema 4** mostra o processo utilizado com esse extrato para o isolamento de flavonóides de algumas frações.

As frações que não foram submetidas a processamento de purificação conforme descrito acima poderão ser usados em análises com técnicas especiais como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao ultravioleta (CLAE-UV) ou acoplada a espectrometria de massas (HPLC-EM), inclusive usando padrões isolados anteriormente de outras espécies de *Ouratea* ou *Luxemburgia* (SUZART et al, 2007).



**Esquema 4** - Isolamento de flavonóides de algumas frações obtidas da fração diclorometano da partição do extrato metanólico.

#### 2.1.3.2.2 Partição Acetato (OPFM - A)

Por apresentar alta polaridade essa amostra deve ser submetida a processos químicos como o de acetilação, com a tentativa de diminuir a polaridade e facilitar o processo de isolamento.

#### 2.1.3.2.3. Resíduo (OPFM – R)

Após análises com CCDA e com RMN <sup>1</sup>H em dimetilsulfóxido, o resíduo obtido com metanol na partição não foi trabalhado normalmente porque possui material muito polar e,

portanto, será submetido a acetilação (com refluxo) e posterior extração com solvente orgânico para tentar isolar alguns constituintes. Tem-se a expectativa de se isolar derivados de taninos hidrolisáveis.

## **2.2 Quantificação de lignina e celulose dos galhos de *Ouratea parviflora***

### **2.2.1 Material vegetal**

Os galhos de *Ouratea parviflora* foram coletados no município de Ouro Preto no estado de Minas Gerais.

### **2.2.2 Materiais e Métodos**

O material utilizado foi separado por meio de peneiras de malha 40 e malha 60. E o material transferido para um balão volumétrico de 1000mL em banho-maria para a remoção de impurezas. Para a filtração do material utilizou-se funil de placa sinterizada de porosidade média, kitassato e uma fonte de vácuo. A secagem do material foi feito em estufa e esfriada em dessecador de vidro. O material depois de seco foi pesado em balança analítica.

### **2.2.3 Preparação do material livre de extrativos**

Os galhos de *Ouratea parviflora* depois de seco ao ambiente foi moído fornecendo 293,8g de serragem que foi submetido a extração com os solventes diclorometano e metanol (ordem crescente de polaridade) por meio de maceração a temperatura ambiente. Após seco ao ar o material foi peneirado utilizando a fração que atravessou a peneira de numero 16 internacional (malha 40 ASTM) e que ficou retida na peneira numero 24 internacional (malha 60 ASTM). Foi transferido 20g de amostra seca ao ar para o balão de vidro e extraído com 1000mL de água destilada aquecendo o balão em banho-maria a 100° C durante uma hora. Depois de repetido esse processo por 3 vezes, esse material passou pelo processo de filtração lavado com 500mL de água destilada quente e completamente seco ao ar. Resultando em 16g de material livre de extrativo.

### **2.2.4 Determinação da lignina de Klason**

Essa análise sofreu 5 repetições utilizando a amostra dos galhos de *Ouratea parviflora* livre de extrativos. Para cada repetição foi transferida aproximadamente 300mg de amostra seca de madeira livre de extrativo para um tubo de ensaio adicionando lentamente 3 ml de ácido sulfúrico (72%). A amostra é homogeneizada por agitação contínua durante 1 minuto e conservada por 1 hora entre 25 e 30° C, agitando quando necessário. Após este período, o material foi transferido para um balão de 250 ml e a solução de ácido sulfúrico diluída, onde se adicionou 84 ml de água destilada. O material ficou em refluxo por 4 horas e depois foi lavado com 500 ml de água destilada quente em um funil de placa sinterizada previamente tarado e em seguida seco em estufa a 105°C durante 24 horas (ABREU *et al*, 2006). Para o cálculo da quantidade de lignina foi utilizada a seguinte fórmula:

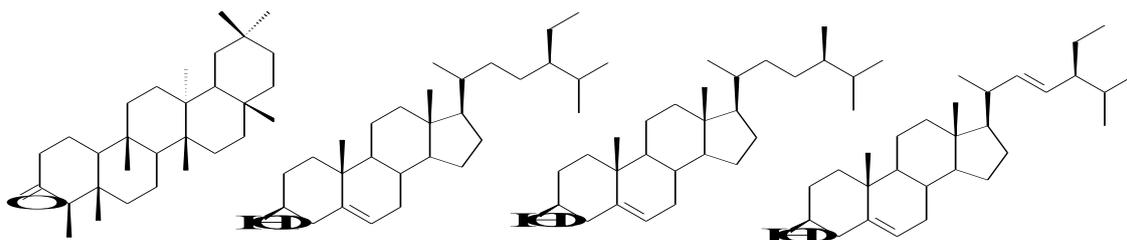
$$\% \text{ lignina} = \frac{(\text{Peso Seco do resíduo (mg)}) \times 100}{(\text{Peso da amostra de madeira})}$$

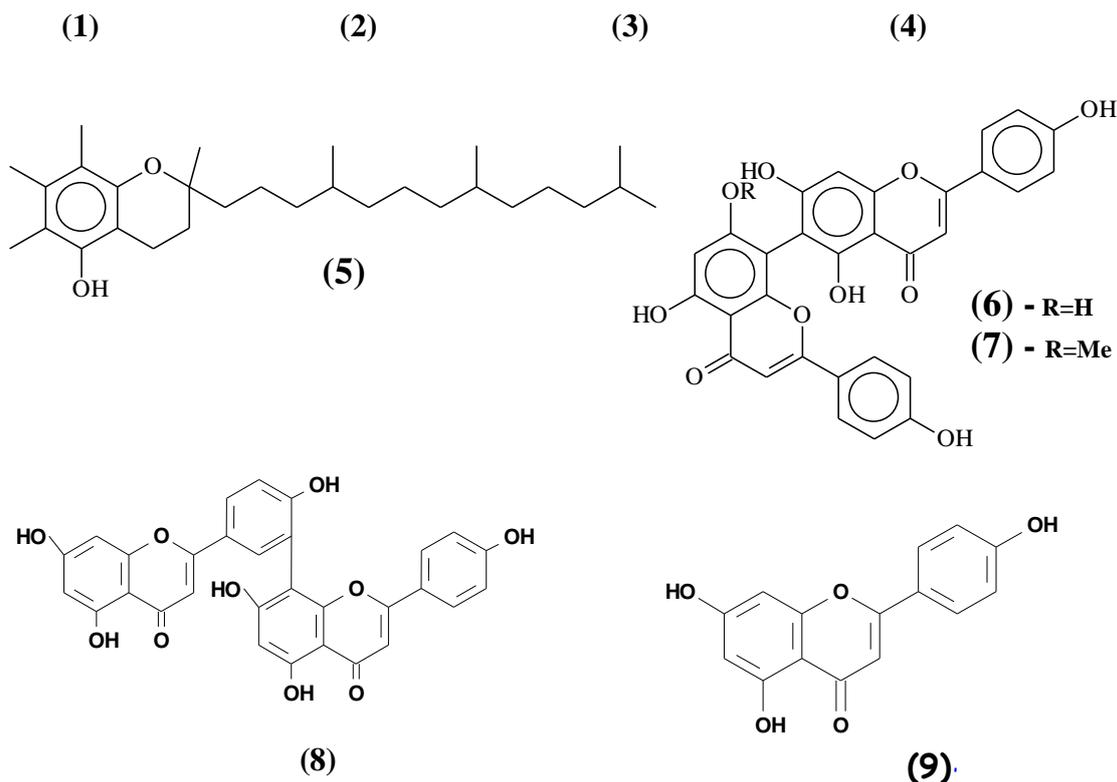
### 2.2.5 Obtenção de holocelulose por cloração

Para esta análise foram feitas 3 repetições de cada amostra para a determinação do teor médio de holocelulose. O material utilizado estava livre de extrativos e totalmente seca. Transferiu-se para um Erlenmeyer 2,5g da madeira seca livre de extrativos e em seguida adicionou-se 8 ml de água destilada e quente, 1g de clorito de sódio e 0,5mL de ácido acético. Essa mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 70°C. Após 60 minutos, 0,5mL de ácido acético e 1g de clorito de sódio foram adicionados sob agitação. Essa etapa foi repetida até o momento em que as fibras se mostraram completamente separadas da lignina. Depois desse período, esfriou-se o material que em seguida foi filtrado, sendo lavado com água destilada até que a cor amarelada e o odor de cloro desapareçam completamente. Essa etapa deve ser realizada sob vácuo, em um kitassato e um funil de placa sinterizada previamente tarado. Em seguida, o material foi levado para a estufa a uma temperatura de 105°C durante 24 horas e após esse período a amostra foi retirada da estufa e esfriada em um dessecador por 1 hora para proceder à pesagem.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estruturas das substâncias foram deduzidas através da análise de espectros de RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, comparação de dados espectrométricos da literatura, comparação com padrões através de CCDA ou análise adicional com CG-EM obtidos das substâncias isoladas [A parte de análise dos espectros e proposta de estrutura foi feita pelo orientador e, por isso os espectros e/ou dados não foram incluídos neste trabalho]. Em alguns casos fizeram-se placas de CCDA para comparação com padrões existente no laboratório. A análise dos dados do material resultante de meu trabalho de isolamento permitiu a identificação das seguintes substâncias encontradas nas folhas de *Ouratea parviflora*: fridelina (1), sitosterol (2), campesterol (3) stigmasterol (4), tocoferol (5), agastiflavona (6), 7''-metil-agastiflavona (7), amentoflavona (8) e apigenina (9).





**Figura 2.** Estruturas das substâncias identificadas em folhas de *Ouratea parviflora*.

Até o momento há apenas um trabalho de estudo químico desta espécie onde foram identificadas apenas duas biflavonas sendo 7,7'' dimetoxi-agatisflavona e amentoflavona, além de diterpenos como stigmasterol (FELICIO *et al*, 2004)

Estas substâncias são comuns em espécies de *Ouratea*, mas apenas a substância 7'' metil-agatisflavona não está sendo registrada pela primeira vez nesta espécie. Do extrato obtido com diclorometano foram isoladas substâncias de baixa polaridade enquanto as substâncias mais polares como os flavonóides são encontrados na fração obtida com diclorometano da partição líquido-líquido do extrato metanólico de folhas. Parte desses resultados foram divulgados na Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ, 2008 (SANTOS *et al*, 2008 e na XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SANTOS *et al*, 2009).

Trabalhos anteriores realizados pelo grupo de Química de produtos naturais revelam que nesta parte de espécies de *Ouratea* são encontrados terpenóides e biflavonóides entre outros constituintes químicos (VELANDIA *et al*, 2002).

Não consta na literatura trabalhos sobre quantificação dos teores de lignina e celulose em espécies de Ochnaceae.

Os teores de lignina e celulose encontrados nos galhos de *Ouratea parviflora*, foram respectivamente, 24% e 62%.

Em média os teores de lignina e celulose encontrados em espécies vegetais são respectivamente, de 15 a 30% e de 50 a 70%. Os extrativos equivalem em média a 10% do total do material analisado.

#### 4. CONCLUSÃO

- Foram identificadas substâncias já encontradas em outras espécies de *Ouratea*;
- Esse é o segundo trabalho que descreve identificação de constituintes químicos em *Ouratea parviflora* que, mesmo sem estar concluído, já acrescentou informações sobre constituintes desta espécie.
- As frações intermediárias do extrato de folhas de *Ouratea* são ricas em biflavonas;
- As biflavonas encontradas são marcadores sistemáticos deste gênero, isso confirma a classificação botânica do material estudado;
- A lignina e a holocelulose que foram encontrados, estão sendo quantificados pela primeira vez nessa espécie;
- Os teores de lignina, celulose e extrativos encontrados em *Ouratea parviflora* estão dentro da faixa média encontrados em materiais vegetais.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H.S.; CARVALHO, A.M.; MONTEIRO, M.B.O.; PEREIRA, R.P.W.; SILVA, H.R.; SOUZA, C.A.; AMPARADO, K.F.; CHALITA, D.B. **Métodos de análise em química da madeira**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2006. 20p.

ALVES, A.N.; SILVA, V.C. da; CARVALHO, M.G.de. **Outros constituintes isolados das folhas de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae)**.XVI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ,2006.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. Viçosa: UFV-MG, 1986.

BRAGA R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960.

CARVALHO, M.G.de; SILVA, V.C.da; ALVES, A.N. **Derivados dos ácidos benzóico e cinâmico isolados de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae)**. In: XXIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, Águas de Lindóia. SBQ, 2006. v. 01, PN012.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. **Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds**. Food Chemistry, v. 97, p. 654–660, 2006.

FELÍCIO, J. D., ROSSI, M. H., BRAGGIO, M. M., GONÇALEZ, E., PAK, A., CORDEIRO, I., FELÍCIO, R. C. **Chemical constituents from *Ouratea parviflora***. *Biochemical Systematics and Ecology* 32 (2004) 79-81.

FERREIRA, D.T.; ÁLVARES, P.S.M; HOUGHTON, P.J.; FILHO,R.B.**Constituintes Químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal**. ISSN 0100-4042 *versão impressa Quím. Nova* v.23 n.1 São Paulo jan./fev. 2000.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G.I.B.; HERNANDEZ, J.A.; ANDRADE, A.S. **Química da Madeira** 3 ed Curitiba: UFP, 2005.

LIN Y. M., ANDERSON H., FLAVIN M. T. AND PAI Y. H. S., **In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora***. *J. Nat. Prod.* 60, 884-888, 1997.

MATOS, F.J. ABREU. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1998.

MBING, J. N.; PEGNYEMB, D. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. **Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark**. *Phytochem.*, 63, 427-431. 2003.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. **Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais**. *Quim. Nova.*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

PERÉZ, Y.B.; JIMÉNEZ, M.H.H.; PULPEIRO, O.G. **Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L.** *Rev Cubana Plant Med* v.10 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-ago. 2005.ISSN 1028-4796.

RASHEED, A.N; AFIFI, F.U; SHAEDAH, M.; TAHA, M.O. **Investigation of the active constituents of *Portulaca oleraceae* L. (Portulacaceae) growing in Jordan** . *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* (2004), vol. 17(1), pags. 37-45. ISSN:1011-601X.

SANTOS, C. B., CARVALHO, M. G. de, ARAUJO, M. F., **“Constituintes químicos isolados das folhas de *Ouratea parviflora* (OCHNACEAE)”**, XVIII Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ, 2008. CD-ROM.

SANTOS, C. B.dos, CARVALHO, M. G. de, ARAUJO, M. F.de, WERLE, A.A. de **“Constituintes químicos isolados das folhas de *Ouratea parviflora* (OCHNACEAE)”**, XXXII Reunião Anual da SBQ, Fortaleza-CE, PN-192, 2009

SILVA, V.C.da; **Metabólitos Especiais Isolados das Raízes de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr. e *Andira fraxinifolia* Benth. (Leguminosae) e das Folhas de *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. (Rubiaceae)**. Tese de doutorado,2006.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; **Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico: com dados de RMN <sup>13</sup>C.** ed. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2005.

SIMÕES, M.O.; GUERRA, M.P.; *et al* -**Farmacognosia: da planta ao medicamento-**5.ed.rev.ampl.,primeira reimpressão- Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.Cap.:29 e 34.

SIMONI, I.C.; FELICIO, J.D.; GONÇALEZ, E.; ROSSI, M.H. **Avaliação da Citotoxicidade de Biflavonóides Isolados de *Ouratea Spectabilis* (Ochnaceae) em Células de Córnea de Coelho Sirc. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.69, n.4, p.95-97, out./dez., 2002.**

SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras-2** ed Editora UFC-Fortaleza 2004.

SUZART, L.R., DANIEL, J.F. DE S., CARVALHO, M. G. DE E KAPLAN, M. A. C., **Biodiversidade Flavonoídica e Aspectos Farmacológicos em Espécies dos Gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae),** Química Nova, 30|4| 984-987, 2007.

SUZART, L.R. **Considerações sobre os gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, estudo químico de duas espécies de Ochnaceae: *Ouratea hexasperma* St. Hil e *Ouratea cuspidata* St. Hil e atividade biológicas.** Defesa de tese doutorado, 2007.

VELANDIA, J.R., CARVALHO, M.G. de, BRAZ-FILHO, R. AND WERLE, A.A., **Biflavonoids and a Glucopyranoside Derivative from *Ouratea semiserrata*,** Phytochem. Anal. 13, 283-292, 2002.