

**Luiz Gonzaga Verdi**

**ESTUDO DA REATIVIDADE QUÍMICA E  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE BIFLAVONÓIDES  
ISOLADOS DA *Rheedia gardneriana***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti - UFSC

Coorientador: Prof. Dr. Edésio Luis Simionatto - FURB

FLORIANÓPOLIS

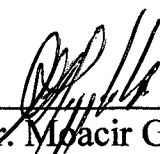
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

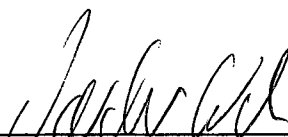
2000

# ESTUDO DA REATIVIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE BIFLAVONÓIDES ISOLADOS DA *Rheedia gardneriana*

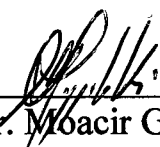
LUIZ GONZAGA VERDI

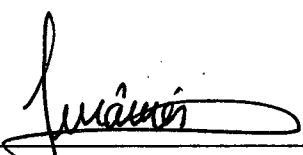
ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA  
FINAL PELO ORIENTADOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

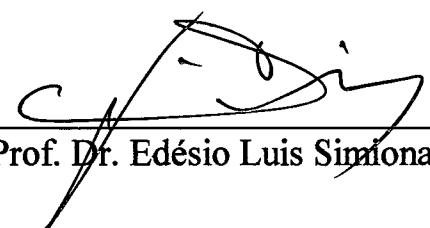
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti  
Orientador

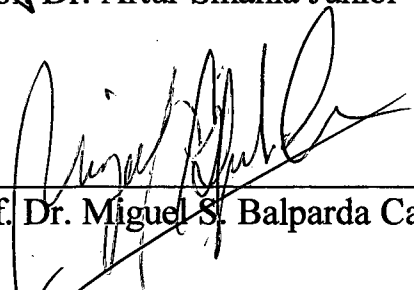
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Valdir Soldi  
Coordenador do Curso de Pós Graduação em Química

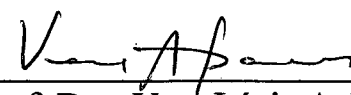
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Artur Smânia Junior

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edésio Luis Simonatto

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Miguel S. Balparda Caro

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Vera Lúcia A. Frescura

Florianópolis, 28 de novembro de 2000.  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

**A minha esposa Zeli e  
meus filhos Alison e Omayra,  
pelo amor, compreensão e dedicação  
durante a realização deste trabalho**

## **Agradecimentos**

A Deus pelas virtudes recebidas, entre elas a fé, a força e a coragem para lutar e vencer.

Ao Professor Moacir Geraldo Pizzolatti, da UFSC, pela orientação e conhecimentos ao curso deste trabalho, incentivo e apoio.

Ao Professor Edésio L. Simionatto, do Departamento de Química da Universidade Regional de Blumenau, pela coorientação, incentivo e apoio.

Ao Professor Artur Smânia Junior, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC, pela realização dos testes de atividade antimicrobiana.

Ao Professor Cláudio Laurentino Guimarães, do Departamento de Farmacologia da Universidade Regional de Blumenau - FURB, pela realização dos testes de atividade farmacológica.

Ao Dr. Franco Delle Monache do CNR - Roma Itália, pela obtenção dos espectros a 300 MHz e pelas sugestões apresentadas.

Ao Professor Miguel S. Balparda Caro da Central de Análises da UFSC, pela obtenção dos espectros a 50 e 200 MHz e infravermelho.

Aos Professores, membros da banca examinadora, Miguel S. Balparda Caro, Vera Lúcia A Frescura e Artur Smânia Junior, pelas sugestões apresentadas para o aprimoramento dessa dissertação.

Aos Professores, que de alguma forma, colaboraram na soma dos conhecimentos adquiridos durante esta jornada.

A CAPES, FUNCITEC, UFSC e a FURB pelo suporte financeiro e pela viabilização dos trabalhos realizados.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO DE TABELAS.....	x
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	xi
SUMÁRIO DE ESPECTROS.....	xiii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS.....	xxi
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 – Objetivos:.....	25
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
2.1 - A Família Guttiferae.....	27
2.2 - Gênero <i>Rheedia</i> L.....	29
2.3 - Espécie em Estudo, Cruz, Lorenzi.....	32
2.3.1 - Posição Sistemática da Espécie <i>Rheedia gardneriana</i> Planch et..	36
2.3.2 - Substâncias Químicas Identificadas de <i>Rheedia gardneriana</i> .....	36
<b>3 - PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>45</b>
3.1 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE <i>R. gardneriana</i> ....	45
3.2 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	45
3.2.1 - Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Bruto.....	45
3.3 - PREPARO DOS EXTR. P/ PESQ. DE GRUPOS QUÍMICOS.....	46
3.3.1 - Extrato Aquoso.....	46
3.3.2 - Extrato Alcoólico.....	46
3.3.3 - Extrato Hidroalcoólico.....	47
3.3.4 - Operações Preliminares do Extrato Hidroalcoólico.....	47
3.3.5 - Extrato Etéreo.....	47
3.4 - INVESTIGAÇÃO QUÍMICA PRELIMINAR.....	48

3.4.1 - Taninos.....	48
3.4.2 - Cumarinas .....	49
3.4.3 - Fenóis com posição Orto e Meta livre .....	49
3.4.4 - Antraquinonas.....	49
3.4.5 - Ácidos Orgânicos .....	50
3.4.6 - Fenóis e Taninos .....	50
3.4.7 - Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides .....	50
3.4.8 - Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavanonas .....	51
3.4.9 - Flavonóis, Flavanonas, Flavononóis e Xantonas .....	52
3.4.10 - Flavonóides .....	52
3.4.11 - Esteróides e Triterpenóides (Liebermann - Burchard) .....	53
3.4.12 - Saponinas .....	53
3.4.13 - Ácidos Fixos Fortes .....	54
3.4.14 - Resinas .....	54
3.4.15 - Alcalóides .....	54
3.4.16 - Bases Quaternárias .....	55
3.4.17 - Heterosídeos Flavonoídicos .....	55
3.4.18 - Separação das Bases Orgânicas .....	56
3.4.19 - Confirmação de Alcalóides .....	56
3.4.20 - Separação dos Ácidos Fortes .....	56
3.4.21 - Separação dos Ácidos Fixos Fracos e Fenóis .....	57
3.4.22 - Teste para Constituintes Fenólicos em meio Alcoólico) .....	57
3.4.23 - Quinonas .....	57
3.5 - GRUPOS QUÍMICOS DO EHB.....	58
3.5.1 - Flavonóides.....	58
3.5.2 - Fenóis.....	58
3.5.3 - Taninos.....	58
3.5.4 - Saponinas.....	68

3.5.5 - Resinas.....	59
3.5.6 - Esteróides e Triterpenóides.....	59
3.5.7 - Ácidos Orgânicos.....	59
3.6 - GRUPOS QUÍMICOS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA....	59
3.6.1 - Flavonóides.....	59
3.6.2 - Fenóis e Taninos.....	59
3.6.3 - Saponinas.....	60
3.7 - GRUPOS QUÍMICOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO .....	60
3.7.1 - Flavonóides.....	60
3.7.2 - Fenóis e Taninos.....	60
3.7.3 - Fenóis.....	60
3.7.4 - Saponinas.....	60
3.7.5 - Flavonóis.....	61
3.8 - ISOLAMENTO DOS BIFLAVONÓIDES.....	61
3.8.1 - Fracionamento do Extrato Hidroalcoólico Bruto.....	61
3.8.2 - Fracionamento do Extrato AcOEt em Coluna de Sílica Gel.....	61
3.8.3 - Separação dos Constituintes Ativos da Fração F2 em Coluna Cromatográfica.....	62
3.8.4 - Separação dos Constituintes Ativos da Fração F2.8 em Coluna...	64
3.8.5 - Separação dos Constituintes Ativos das Frações F2.8-4 e F2.8-6	66
3.8.6 - Separação dos Constituintes Ativos Frações F2.8-4/62 e F2.8-4/64.....	67
3.8.7 - Separação dos Constituintes Ativos da Fração F2.9 em Coluna...	67
3.9 – DERIVATIZAÇÃO DOS BIFLAVONÓIDES.....	70
3.9.1 - Acetilação da Volkensiflavona.....	70
3.9.2 - Acetilação do Fukugetin.....	70
3.9.3 - Benzoilação da Volkensiflavona.....	71
3.9.4 - Benzoilação do Fukugetin.....	71

3.9.5 - Metilação do Fukugetin.....	71
3.9.6 - Metilação da Volkensiflavona.....	72
3.9.7 - Etilação do Fukugetin.....	72
3.10 - ANÁLISE FARMACOLÓGICA.....	73
3.10.1 - Animais Utilizados .....	74
3.10.2 - Sais, Drogas e Soluções .....	74
3.10.3 - Contorção Abdominal .....	74
3.10.4 - Teste da Formalina .....	75
3.10.5 - Teste da Placa Quente .....	76
3.10.6 - Pleurisia em Ratos .....	76
3.10.7 - Análise Estatística .....	77
3.11 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	77
3.11.1 - Bactéria.....	78
3.11.2 - Teste de Difusão em Agar.....	78
3.11.3 - Testes de Diluição para Determinação das CIM e CBM.....	79
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
4.1 - Ensaios Preliminares e Pesquisa de Grupos Químicos.....	81
4.2 - Investigação Química Preliminar das Folhas de <i>Rheedia gardneriana</i> Planch et Triana.....	81
4.3 - Investigação Química do Extrato Hidroalcoólico Bruto e da Resina Correspondente.....	82
4.4 - Investigação Química dos Extratos Acetato de Etila e Hidroalcoólico.....	82
4.5 - Compostos Isolados da Fração Acetato de Etila de <i>R. gardneriana</i>	85
4.5.1 - Identificação da Volkensiflavona (C4).....	86
4.5.2 - Identificação do Fukugetin (C5).....	88
4.5.3 - Identificação do Fukugeside (C6).....	91
4.5.4 - Identificação da Epicatequina (C7).....	92



4.5.5 - Identificação do GB 2a - 7 - glucoside (C9).....	95
4.6 - Derivados do Fukugetin e da Volkensiflavona.....	98
4.6.1 - Identificação da Volkensiflavona Peracetilada.....	98
4.6.2 - Identificação da Volkensiflavona Benzoilada.....	99
4.6.3 - Identificação da Volkensiflavona Metilada.....	99
4.6.4 - Identificação do Fukugetin Peracetilado.....	100
4.6.5 - Identificação do Fukugetin Benzoilado.....	101
4.6.6 - Identificação do Fukugetin Metilado.....	102
4.6.7 - Etilação do Fukugetin.....	102
4.7 - Modelos de Dor Induzidos pelo Ácido Acético, Placa Quente, Formalina e Pleurisia em Ratos .....	104
4.7.1 - Avaliação Farmacológica do Extrato Hidroalcoólico Bruto e das Frações Apolares Particionadas de <i>Rheedia gardneriana</i> .....	115
4.8 - Atividade Antimicrobiana.....	116
<b>5 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>119</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>120</b>
<b>7 - ANEXOS.....</b>	<b>125</b>

## SUMÁRIO DE TABELAS

TABELA 1 - Estudos Químicos e Biológicos do Gênero <i>Rheedia</i> e Estudos Biológicos da Família Guttiferae.....	42
TABELA 2 - Investigação Química Preliminar de <i>Rheedia gardneriana</i> Pl. e Tr. ....	83
TABELA 3 - Resumo para Flavonóides dos EHB, AcOEt e Hidroalcoólico, tabela 2.....	84
TABELA 4 - Ensaio Preliminares realizados em Folhas e Extratos de <i>Rheedia gardneriana</i> Pl. e Tr.....	85
TABELA 5 - Dados de RMN <sup>13</sup> C para o Fukugetin e Volkensiflavona, Comparando com os da Literatura.....	90
TABELA 6 - Dados de RMN <sup>13</sup> C para a Epicatequina, Comparando com os da Literatura.....	94
TABELA 7 - Dados de RMN <sup>13</sup> C para o Fukugeside e GB 2a-7-glucoside, comparando com os dados da literatura.....	97
TABELA 8 - Efeito do EBH de <i>Rheedia gardneriana</i> nos Testes do Ácido Acético e da Formalina.....	115
TABELA 9 - Atividade Antibacteriana dos Compostos Isolados e Derivados.....	118
TABELA 10 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima-CIM e Concentração Bactericida Mínima-CBM.....	118

## SUMÁRIO DE FIGURAS

FIGURA 1- Vista parcial do local das coletas de <i>Rheedia gardneriana</i> Planch et Triana, nos remanescentes florestais do Campus I da FURB.- Blumenau, SC, .....	34
FIGURA 2 - Apresentação geral da <i>Rheedia gardneriana</i> Planch et Triana.....	35
FIGURA 3 - Esquema da Rota Biossintética para Flavonóides .....	43
FIGURA 4 - Esquema de Extração dos Compostos de <i>Rheedia gardneriana</i> .....	69
FIGURA 5 - Estrutura do Composto C4 VOLKENSIFLAVONA.....	88
FIGURA 6 - Estrutura do Composto C5 FUKUGETIN.....	89
FIGURA 7 - Estrutura do Composto C6 FUKUGESIDE.....	92
FIGURA 8 - Estrutura do Composto C7 EPICATEQUINA.....	94
FIGURA 9 - Estrutura do Composto C9 GB 2a - 7 - GLUCOSIDE.....	96
FIGURA 10 - Esquema de Síntese dos Derivados da Volkensiflavona.....	100
FIGURA 11 - Esquema de Síntese dos Derivados do Fukugetin.....	104
FIGURA 12 - Representação das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Administração de EBH via intraperitoneal.....	106
FIGURA 13 - Representação da resposta inibitória, dose-dependente, induzido pelo EBH (via oral) sobre as contorções abdominais provocadas por ácido acético.....	107
FIGURA 14 - O EBH 50 mg/kg (via intraperitoneal) de <i>R. gardneriana</i> sobre as contorções abdominais.....	108
FIGURA 15 - Comparação do efeito inibitório da indometacina,	

dexametasona, ácido acetilsalicílico e fentanil sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	109
FIGURA 16 - Representação do perfil de ação do EBH (via intraperitoneal) na primeira e segunda fase no modelo da formalina.....	110
FIGURA 17 - Comparação da atividade inibitória da indometacina com a do EBH no edema de pata de camundongo induzido por formalina.....	111
FIGURA 18 - Ilustração do “time-course” para o efeito inibitório do EBH, administrado por via intraperitoneal sobre o “licking” na 1ª e 2ª fase.....	112
FIGURA 19 - Variação do edema ( $\Delta$ (mg)) de pata de camundongo induzido por formalina.....	113
FIGURA 20 - Latência de quatro grupos de camundongos expostos à placa quente e após tratamento com salina, fentanil ou EBH aos 30 e 60 min.....	114

**SUMÁRIO DE ESPECTROS**

ESPECTRO 1 - Espectro de IV ( KBr ) da Volkensiflavona.....	125
ESPECTRO 2 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H ( 200 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da Volkensiflavona.....	126
ESPECTRO 3 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C ( 50 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da Volkensiflavona.....	127
ESPECTRO 3a - Espectro de RMN <sup>13</sup> C ( 50 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da Volkensiflavona na região de 80 a 170 ppm.....	128
ESPECTRO 4 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT ( 50 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da Volkensiflavona na região de 10 a 130 ppm.....	129
ESPECTRO 5 - Espectro de IV ( KBr ) da Volkensiflavona Peracetilada.....	130
ESPECTRO 6 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H ( 200 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da Volkensiflavona Peracetilada.....	131
ESPECTRO 7 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT ( 50 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da Volkensiflavona Peracetilada.....	132
ESPECTRO 8 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT ( 50 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da Volkensiflavona Peracetilada.....	133
ESPECTRO 9 - Espectro de IV ( KBr ) da Volkensiflavona Benzoilada.....	134
ESPECTRO 10 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H ( 200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Volkensiflavona Benzoilada.....	135
ESPECTRO 11 - Espectro de IV ( KBr ) da Volkensiflavona Metilada.....	136
ESPECTRO 12 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H ( 200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Volkensiflavona Metilada.....	137

ESPECTRO 13 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( 50 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) da Volkensiflavona Metilada.....	138
ESPECTRO 14 - Espectro de IV ( KBr ) do Fukugetin.....	139
ESPECTRO 15 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 200 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin.....	140
ESPECTRO 15a - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 200 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin expandido na região de 5 a 7,6 ppm.....	141
ESPECTRO 16 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( 50 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin.....	142
ESPECTRO 17 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ ( 50 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin.....	143
ESPECTRO 18 - Espectro de IV ( KBr ) do Fukugetin Peracetilado....	144
ESPECTRO 19 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 200 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin Peracetilado.....	145
ESPECTRO 20 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( 50 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin.....	146
ESPECTRO 21 - Espectro de IV ( KBr ) do Fukugetin Benzoilado.....	147
ESPECTRO 22 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 200 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin Benzoilado.....	148
ESPECTRO 23 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Fukugetin Etilado - $5_3$ .....	149
ESPECTRO 24 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 300 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin Etilado - $5_3$ .....	150
ESPECTRO 25 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 300 MHz, piridina $\text{d}_5$ ) do Fukugetin Etilado - $5_1$ .....	151
ESPECTRO 25a - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 300 MHz, piridina $\text{d}_5$ ) do Fukugetin Etilado - $5_1$ Expandido na Região de 5 a 8 ppm.....	152

ESPECTRO 26 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( 75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Fukugetin Etilado - 5 <sub>2</sub> .....	153
ESPECTRO 27 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{APT}$ ( 75 MHz, piridina $\text{d}_5$ ) do Fukugetin Etilado - 5 <sub>1</sub> .....	154
ESPECTRO 28 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( 75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Fukugetin Etilado - 5 <sub>1</sub> .....	155
ESPECTRO 29 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{APT}$ ( 75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Fukugetin Etilado - 5 <sub>2</sub> .....	156
ESPECTRO 30 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{APT}$ ( 75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Fukugetin Etilado - 5 <sub>3</sub> .....	157
ESPECTRO 31 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{APT}$ ( 75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Fukugetin Etilado - 5 <sub>3</sub> .....	158
ESPECTRO 32 - Espectro de IV ( KBr ) do Fukugetin Metilado.....	159
ESPECTRO 33 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 200 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugetin Metilado.....	160
ESPECTRO 34 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 200 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugeside.....	161
ESPECTRO 34a - Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( 200 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugeside Expandido na Região de 3,5 a 7,5 ppm..	162
ESPECTRO 35 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( 200 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugeside.....	163
ESPECTRO 35a - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( 50 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugeside na Região de 60 a 120 ppm.....	164
ESPECTRO 35b - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( 50 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugeside na Região de 110 a 170 ppm.....	165
ESPECTRO 36 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ ( 50 MHz, acetona $\text{d}_6$ ) do Fukugeside.....	166
ESPECTRO 36a - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (50 MHz, acetona $\text{d}_6$ )	

do Fukugeside na Região de 70 a 135 ppm.....	167
ESPECTRO 37 - Espectro de IV ( KBr ) da Epicatequina.....	168
ESPECTRO 38 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H ( 300 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) da Epicatequina.....	169
ESPECTRO 38a - Espectro de RMN <sup>1</sup> H ( 300 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) da Epicatequina na na Região de 6,5 a 8,5 ppm.....	170
ESPECTRO 39 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C ( 75 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) da Epicatequina.....	171
ESPECTRO 39a - Espectro de RMN <sup>13</sup> C ( 75 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) da Epicatequina na Região de 60 a 100 ppm.....	172
ESPECTRO 39b - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/APT ( 75 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) da Epicatequina na Região de 30 a 110 ppm.....	173
ESPECTRO 39c - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/APT ( 75 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) da Epicatequina na Região de 110 a 180 ppm.....	174
ESPECTRO 40 - Espectro de IV ( KBr ) do GB 2a-7-glucoside.....	175
ESPECTRO 41 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H ( 300 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) do GB 2a-7-glucoside.....	176
ESPECTRO 41a - Espectro de RMN <sup>1</sup> H ( 300 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) do GB 2a-7-glucoside na Região de 6 a 8,5 ppm.....	177
ESPECTRO 42 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C ( 75 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) do GB 2a-7-glucoside.....	178
ESPECTRO 42a - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/APT ( 75 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) do GB 2a-7-glucoside na Região de 40 a 85 ppm.....	179
ESPECTRO 42b - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/APT ( 75 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) do GB 2a-7-glucoside na Região de 90 a 125 ppm...	180
ESPECTRO 42c - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/APT ( 75 MHz, piridina d <sub>5</sub> ) do GB 2a-7-glucoside na Região de 120 a 200 ppm..	181



## RESUMO

*Rheedia gardneriana* (Guttiferae), largamente distribuída no Brasil, desde o Ceará ao Rio Grande do Sul, é uma planta utilizada na medicina popular, principalmente como analgésico e antiinflamatório.

Estudos fitoquímicos preliminares realizados com as folhas da planta, com o extrato hidroalcoólico bruto-EHB e extrato em acetato de etila, permitiram saber que o vegetal é rico em biflavonóides, os quais integram uma classe de compostos químicos naturais de reconhecida atividade farmacológica.

A partir do EHB obtido das folhas, foram realizadas partições em hexano e acetato de etila. A fração polar, em AcOEt, foi submetida a sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel, utilizando como eluente, hexano, acetato de etila, etanol, acetona e metanol em escala de polaridade crescente. O fracionamento em coluna permitiu isolar cinco compostos, sendo quatro biflavonóides e um flavonóide. Esses foram identificados, através de espectroscopia de IV, MASSAS, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C, como sendo: Fukugetin, Volkensiflavona, Fukugeside, GB 2a-7-glucoside e o flavonóide Epicatequina. Os dois últimos compostos ainda não tinham sido isolados e descritos para este gênero.

As substâncias Volkensiflavona e Fukugetin foram submetidos a modificações estruturais tais como: metilação, benzoilação, acetilação e etilação. As substâncias isoladas, a fração em AcOEt e os derivados foram submetidos a ensaios biológicos de atividade antibacteriana. A atividade antibacteriana foi determinada por difusão em agar e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM). Foram utilizadas as seguintes espécies de bactérias: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*. Os resultados desses ensaios mostrou que a fração em AcOEt foi mais potente em inibir o crescimento bacteriano, menos para *P. aeruginosa*. Dos compostos isolados e derivados apenas o GB 2a-7-glucoside e a Volkensiflavona inibiram o crescimento para todas as bactérias testadas, sendo a Volkensiflavona a mais eficiente,

enquanto que os derivados Fukugetin benzoilado e Etilado, não apresentaram nenhuma atividade.

Foram também realizados ensaios farmacológicos com o EHB e a fração AcOEt, mostrando importante atividade analgésica e antiinflamatória.

Desta forma, a análise dos resultados obtidos demonstram que a *Rheedia gardneriana* apresenta efeito analgésico, antiinflamatório e antibacteriano, justificando o emprego popular dessa planta.

## ABSTRACT

*Rheedia gardneriana* (Guttiferae) is widely spread in Brazil, from Ceará to Rio Grande do Sul State, being a folk medicinal plant used mainly as analgesic and antiinflammatory.

Preliminary phytochemical studies on the leaf from hydroalcoholic crude extract and its ethyl acetate fraction, showed that this vegetable is rich in biflavonoids, a class of natural compounds with recognized pharmacological activities.

In the present work, the leaf hydroalcoholic crude extract (HCE) was partitioned into hexane and ethyl acetate. The polar fraction (EtOAc) was submitted to several silica gel chromatographic columns, using as eluents hexane, ethyl acetate, ethanol, acetone and methanol in the order of increasing polarity. This allowed the isolation of four biflavonoids and one flavonoid, which were characterised by IR, GC-MS, NMR<sup>1</sup>H and NMR<sup>13</sup>C spectroscopy as Fukugetin, Volkensiflavone, Fukugeside, GB 2a-7-glucoside and the flavonoid Epicatequin. the last two have not been previously isolated from genus *Rheedia*.

The compounds Volkensiflavone and Fukugetin were submitted to structural modifications (methylation, benzylation, acetylation and ethylation). The isolated compounds and their derivatives and the EtOAc fraction were screened for antimicrobial activity. The following techniques such as agar diffusion, minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericid concentration (MBC) were used against bacteria type *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus*. These analysis showed the EtOAc fraction ii the most potent "in vitro" sample in inhibiting the bacteria growing, except towards *P. aeruginosa*. Within the isolated compounds and their derivatives only GB 2a-7-glucoside and Volkensiflavone presented activity against all the tested bacteria with the Volkensiflavone as the most active compound, while the ethylated and benzyolated fukugetin derivatives were completely inactives.

In pharmacologic assays, it was observed important analgesic and antiinflammatory activities using HCE and EtOAc fraction.

Therefore the obtained results demonstrate that *Rheedia gardneriana* presents analgesic, antiinflammatory and antimicrobial activities, justifying its popular use as a medicinal plant.

## SÍMBOLOS ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

- APT** - Attached Proton Test (Teste para Hidrogênios Ligados)
- AcOEt** - Fração Acetato de Etila
- CIM** - Concentração Inibitória Mínima
- CBM** - Concentração Bactericida Mínima
- UFC** - Unidade Formadora de Colônia
- CCD** - Cromatografia em Camada Delgada
- DE<sub>50</sub>** - Dose Efetiva 50 %
- DEPT** - Distorsionless Enhancement By Polarization Transfer
- DL<sub>50</sub>** - Dose Letal 50 %
- DL<sub>50s</sub>** - Doses Letais 50 %
- EBH** - Extrato Bruto Hidroalcoólico
- E.P.M.** - Erro Padrão da Média
- E<sub>máx</sub>** - Efeito máximo
- IV** - Espectrometria no Infravermelho
- MIP** - Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC
- MHz** - Frequência
- NHI** - Não Houve Inibição do Crescimento Bacteriano
- P** - Probabilidade
- PF** - Ponto de Fusão
- RMN <sup>1</sup>H** - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
- RMN <sup>13</sup>C** - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C
- s.c.** - Subcutâneo
- UI** - Unidade Internacional/mililitro
- v.o.** - Via Oral
- Δ** - Variação do Edema : relação pata controle/pata teste

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

As novas estratégias utilizadas para a obtenção de novos fármacos incluem estudos envolvendo produtos naturais usados na medicina folclórica, a maioria dos quais derivados de plantas. Como consequência, novas substâncias foram e estão sendo isoladas, muito frequentemente, de plantas e animais e, sua importância atinge um estado de arte imprescindível na busca de novos medicamentos que melhor atendam as demandas. Nesse particular, a medicina tropical tem papel fundamental em países como o Brasil [1].

Não só a medicina tradicional como também a terapêutica vegetal tem feito muitas pesquisas coroadas de sucesso e, é com grande proveito que muitos médicos deixam de lado a medicina oficial, alopática, e passam a usar as plantas na cura de moléstias. Os produtos químicos manipulados em laboratórios, tem trazido e estão trazendo muitos fracassos, motivos pelos quais estão adotando este meio para promover a cura. Nos últimos anos, outros fatores, como a nova “onda naturalista”, também tem contribuído para o aumento da utilização de tais recursos. A medicina mostrou-se consagrada no que diz respeito às virtudes terapêuticas de centenas de plantas [2, 3].

O uso generalizado de produtos naturais, principalmente as plantas, pela medicina popular tem crescido muito nos últimos tempos. Juntamente tem surgido sérios problemas de intoxicação e até mesmo o agravamento de doenças, atribuídos a indicações incorretas, doses e/ou a via pela qual será administrada. Nem todas as plantas, as quais recorremos como remédios empíricos, merecem cientificamente a mesma qualificação. Uma espécie vegetal é dotada de inúmeros princípios ativos, ou seja, produtos que tanto podem fazer bem como também o contrário. Pode-se até mesmo estar ingerindo veneno, um exemplo é a conhecida “dormideira”, usada sob a forma de infusão para problemas de insônia, se dá ao paciente um alívio benéfico, porém, ao mesmo tempo envenena-o com, morfina, codeína, etc., que são alcalóides extraídos do ópio, ou seja do suco das dormideiras. Por isso a identificação química e farmacológica dos princípios ativos

oriundos dos vegetais é fator indispensável para garantir a eficácia na utilização desse campo terapêutico [4, 5].

A busca pelos medicamentos sintéticos apresenta um rápido crescimento mas, que em primeiro plano procura modificar a estrutura molecular de muitos produtos naturais no sentido de melhorar sua atividade ou mesmo ter o produto natural como molécula alvo (modelo) na síntese de novos medicamentos. Esta metodologia é amplamente utilizada e tem apresentado, em geral, bons resultados.

Em algumas áreas da medicina há a necessidade de inovação, procurando desenvolver novas substâncias terapêuticas. Portanto, a busca de novas drogas oriundas de produtos naturais não pode ser deixada de lado. Conseqüentemente, a síntese de moléculas tendo compostos de plantas como modelo e/ ou sua modificação estrutural devem ser, portanto, enfatizada. Embora a importância dos medicamentos de origem vegetal seja freqüentemente subestimada, numerosas substâncias desse tipo fazem parte do arsenal terapêutico da medicina do século XX. Muitos compostos naturais se constituem em precursores de síntese de valiosas substâncias, hoje usadas na medicina, como é o caso de sapogeninas extraídas do cará (*Dioscorea spp*) ou do sisal (*Agave spp*) que são usadas como matéria-prima para a síntese de hormônios e anticoncepcionais. Entretanto, grande número desses compostos de origem vegetal entram na composição da maioria das receitas médicas [6].

Considerando que a fitoterapia, a cura pelo uso de ervas e plantas naturais, foi o primeiro recurso terapêutico utilizado pelo homem, descobrindo na flora enumeras propriedades medicinais, no Brasil cerca de 90% das plantas ainda não foram estudadas, considerando que o território brasileiro possui aproximadamente um terço das espécies existentes no planeta. Mesmo assim se conhecem milhares de compostos naturais e muitos produtos diversos para curar a mesma doença, fazendo-nos demonstrar que não podemos afastar-nos da natureza. Com o crescente desenvolvimento de novas técnicas analíticas, facilita assim os estudos científicos nos produtos naturais [7, 8].



O isolamento e caracterização destes compostos, considerados como princípios ativos, bem como estudos farmacológicos, detalhados em animais, dispõe de tempo relativamente prolongado. Estimado de 3 a 10 anos. Juntamente requer dos pesquisadores muitos conhecimentos específicos, boa dose de imaginação, raciocínio e paciente esforço [1]. Portanto, para lançar um fármaco no mercado ( medicamento ) obviamente incluindo os ensaios clínicos (em humanos), o tempo médio é de 10 a 12 anos com um custo em torno de 500 milhões de dólares, tendo em vista que a cada cinco mil compostos químicos estudados, apenas um chega ao mercado como medicamento [9].

### **1.1 - Objetivos do Presente Trabalho**

Consultando literatura específica verificou-se a existência de vários estudos com compostos químicos isolados de plantas da família Guttiferae e, considerando a importância de tais compostos como agentes terapêuticos e o uso da espécie em estudo na medicina popular em várias regiões do Brasil, o desenvolvimento do presente trabalho visa:

- 1 - Extração e isolamento de biflavonóides com potencial atividade biológica.
- 2 - Identificação dos compostos isolados.
- 3 - Modificações estruturais nos biflavonóides isolados.
- 4 - Análise das atividades biológicas dos compostos naturais e de seus derivados hemissintéticos no intento de correlacionar estrutura atividade.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Considerações Gerais Sobre a Família Guttiferae

A família Guttiferae reúne plantas primariamente lenhosas, arbóreas ou arbustivas, latescentes ou não, com flores em geral vistosas, isoladas ou reunidas em inflorescências. Apresentando um número representativo de plantas úteis ao homem [10]. Está representada por mais de 1000 espécies, distribuída em 50 gêneros e dividida em seis sub-famílias, (Kielmeyeroideae, Calophyllideae, Clusioideae, Moronoboideae, Lorostemnoideae e Hypericoideae). De modo geral, é amplamente distribuída nas regiões tropicais e sub-tropicais de todo o planeta. A maior exceção é o gênero *Hypericum*, atingindo as regiões temperadas. Na flora brasileira são conhecidos cerca de 21 gênero e 183 espécies.

Espécies do gênero *Mammea* são cultivadas pelos frutos comestíveis. São frequentes nos campos cerrados duas espécies de *Kielmeyera*, uma delas conhecida como pau-santo. Um gênero muito freqüente é o *Caraipa* e, o *Platonia* fornece o bacuri, fruta da região amazônica. A *Clusia* é bastante comum nas matas litorâneas com lindas flores brancas. Certas espécies de *Hypericum* com flores amarelas são comuns nos campos do sul do Brasil. Nesta família inclui o gênero asiático *Garcinia*, uma de suas espécies produz o mangostão, fruto bastante apreciado [10].

Grande número de espécies desta família estão contribuindo para a medicina como mostrado em estudos químicos e farmacológicos, através de duas classes de compostos muito ativos como as xantonas e biflavonóides. Muitas espécies de vários gêneros da família Guttiferae destacam-se pela importância de estudos Químicos e biológicos. Espécies como: *Calophyllum zeylanicum*, *Psorospermum febrifugum*, *Cratoxylum pruniflorum*, *Hypericum aucheri*, *Hypericum barbatum*, *Hypericum boissieri*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum maculatum*, *Hypericum rocheli*, *Hypericum rumeliacum*, *Hypericum sampsonii*, *Hypericum degenii*, *Haploclathra paniculata*,

*Garcinia kola*, *Garcinia huillensis*, *Garcinia mangostana*, *Hypericum perforatum*, *Garcinia dulcis*, espécies do gênero *Calophyllum*, *Rheedia brasiliensis*, *Rheedia bentamiana*, *Lorostermon negrencyis*, *Lorostermon coelhoi*, *Clusia nemorosa*, *Porospermum tenuifolium*, *Garcinia nervosa*, *Garcinia cowa*, *Garcinia subelliptica*, *Garcinia dioica* e *Garcinia multiflora*. [11, 12, 13, 14].

Inúmeras xantonas e biflavonóides foram identificados, na família Guttiferae, mostrando um importante desenvolvimento nesta área. Xantonas isoladas de espécies do gênero *Psorospermum*, como a psorospermina, mostrou significativa atividade “in vivo” para leucemia, tumores de cólon e de mama. Uma outra xantona, a mangiferina extraída dos gêneros *Cratoxylum* e *Hypericum*, foi tema de estudos de atividade antiinflamatória, antihepatóxica e antiviral, com doses de 50 mg/kg. Muitas dessas xantonas, principalmente a mangostina, derivada do gênero *Calophyllum*, exibiu significante propriedade antiinflamatória. Além de atividade anti-úlceras e sem efeito analgésico e antipirético. Desse mesmo gênero a xantona 3,6-di-o-glucosilmangostina produz estimulação no miocárdio e aumenta a pressão sanguínea em cães [11]. Da *Garcinia multiflora* foram isolados vários biflavonóides com atividade antiviral, como por exemplo a morelloflavona (= Fukugetin) que apresentou significante atividade antiviral contra HIV-1 [15, 12, 13]. Biflavonóides da *Garcinia kola*, como GB-1, GB-2 e kolaflavanona produzem efeito hipoglicêmico em coelhos diabéticos e também atividade para aldose redutase, antidiabética e antihepatóxica. Já nas espécies *Garcinia mangostana*, *Garcinia dioica*, *Garcinia subelliptica*, *Garcinia cowa* e *Garcinia dulcis* foram estudadas xantonas com atividade antibacteriana, sendo as duas últimas com atividade antimalarial. Em *Garcinia mangostana* foram estudadas xantonas com atividades antifungo, antipirética e anticonvulsante além de ação no sistema cardiovascular de cães e rãs. Produz estimulação do miocárdio e aumenta a pressão sanguínea. Também apresenta atividade antiinflamatória e anti-úlceras em ratos. O extrato bruto etanólico mostrou atividade inibitória contra HIV-1 protease. [ 16, 17, 18, 19, 20 e 21].

Em Outras espécies como *Garcinia nervosa*, *Garcinia spicata*, *Garcinia xanthochymus*, *Garcinia linii*, *Garcinia eugeniifolia*, *Psorospermum tenuifolium*, *Clusia nemorosa*, *Lorostermon negrensis* e *coelhoi* e *Hypericum perforatum* foram isolados e identificados várias xantonas e biflavonas. Do gênero *Calophyllum* foram estudadas algumas espécies, das quais foram isolados xantonas com atividade antimicrobiana. Entre estas podemos destacar a 6-deoxijacareubin e jacareubin e as benzofenonas kolanona e garcinol da espécie *Calophyllum inophyllum* [ 25, 24, 23, 22 e 11].

Algumas xantonas preniladas possuem propriedades antimicrobiana. A mangostina mostra atividade antibacteriana, incluindo a inibição de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina, bem como atividade anti-fúngica (microbial). Um efeito tuberculostático também foi notado em xantonas sintéticas e naturais [ 11].

A maioria das xantonas de origem natural tem sido encontradas em apenas duas famílias de plantas: a Guttiferae e a Gentianaceae. Xantonas preniladas foram encontradas apenas na família Guttiferae. Na década de 80 foram identificadas 95 xantonas em Guttiferae, incluindo a espécie *Rheedia gardneriana*. Desde então houve um crescimento nas pesquisas obtendo hoje um número bem maior de xantonas identificadas de várias espécies desta família.

A família guttiferae produz uma grande variedade de xantonas preniladas e hidroxiladas. O aumento no interesse destes compostos é mostrado pelo grande número de compostos isolados durante os últimos 20 anos.

Ultimamente o estudo farmacológico de xantonas as indicam como potentes agentes terapêuticos [11], tabela 1 p. 42.

## **2.2 - Considerações Gerais Sobre o Gênero *Rheedia* L.**

Em 1753 Linnaeus descreveu a primeira espécie genérica (*Rheedia gardneriana*) para o gênero *Rheedia*, sendo este um dos primeiros gêneros de Guttiferae a ser

classificado, e compreende cerca de 45 espécies [26, 11]. Sua distribuição geográfica restringe-se a América do Sul, América Central e Madagascar.

A maioria das espécies de *Rheedia* apresentam frutos edulos, geralmente com sabor ácido e um tanto adstringente. Algumas dessas espécies são cultivadas e outras são encontradas apenas em estado silvestre. As espécies do gênero *Rheedia* são designadas pelo nome vulgar de bacuri-pari.

São árvores de 5 a 20 m de altura, ramos cilíndricos, retos, resinosos. Folhas opostas de tamanho variável, com inflorescências axilares (raro caulinares), fasciculares para as flores masculinas e raro as hermafroditas, inseridas sobre um pulvínulo. Fruto: baga, epicarpo coriáceo, liso ou murricado, com três a uma sementes cilíndricas, albuminadas, envolvidas por um arilo branco-amarelado, afixas medianamente e embrião com cotilédones obsoletos.

O estudo dos frutos para aproveitamento alimentar, sob forma de conservas e ao natural, está se tornando cada vez mais importante para obtenção de novas formas de nutrientes. Neste particular o gênero *Rheedia* pode oferecer excelente material. Seus frutos amadurecem muito rapidamente, são comestíveis, as sementes contém óleo e a madeira tem usos limitados. Na Amazônia Oriental uma das espécies comumente cultivadas, em sítios e quintais, é *Rheedia macrophylla* Planchon & Triana um dos poucos "bacuri-pari" a sofrer comercialização, embora em escala reduzida [26].

Primitivamente várias espécies do gênero *Rheedia* foram descritas e classificadas sob outros gêneros. Dessas, algumas já existiam como a *Garcinia martius* (1841). Outros eram gêneros novos como, por exemplo, *Verticillaria Ruiz et Pavon* (1794), *Chloromyron Persoon* (1807) e *Lamprophyllum Miers* (1853), criados por esses autores para enquadrar diversas espécies de *Rheedia*.

Em 1860 Planchon & Triana fizeram a primeira revisão sobre o gênero *Rheedia*, o qual dividiram em duas seções: 1) *Eurheedia*, compreendendo as espécies portadoras de frutos lisos e 2) *Verticillaria Ruiz et Pavon*, englobando as espécies com frutos verrucoso-murricados.

Engler (1888), fez a primeira e única revisão das espécies brasileiras de *Rheedia*, na qual ratifica as seções e várias espécies descritas por Planchon & Triana. Engler apontou oito espécies válidas para o Brasil: *R. macrophylla*, *R. longifolia*, *R. brasiliensis*, *R. benthamiana*, *R. spruceana*, *R. cliptrata*, *R. gardneriana* e *R. floribunda*, sendo apenas essa última enquadrada na seção *Verticillaria*, sendo relacionada para a Amazônia brasileira apenas quatro espécies.

Mais tarde, Engler (1895) aceita para o gênero *Rheedia* 17 espécies válidas (15 na América tropical e duas em Madagascar), distribuídas em três seções: *Eurheedia* Planchon et Triana, *Ruscoides* Vesque e *Verticillaria* Ruiz et Pavon.

Standley & Williams (1961) apontam para o gênero *Rheedia* 40 espécies, das quais 4 em Madagascar e as restantes na América tropical. Três espécies foram citadas para a Guatemala; *R. edulis*, *R. intermedia* e *R. macrantha*.

Em 1964 Melchior cita a existência de 30 espécies válidas de *Rheedia*, todas tropicais. Porém segundo Willis (1973), existem 45 espécies válidas de *Rheedia*, distribuídas pela América do Sul, América Central, Índias Ocidentais e Madagascar.

As espécies brasileiras do gênero *Rheedia* estão divididas em duas seções distintas, baseada no aspecto exterior de seus frutos. Segue as oito espécies e sua distribuição geográfica.

1 - Seção *Rheedia* Planchon et Triana. Frutos com epicarpo liso:

*R. longifolia*: Estados do Amazonas, Acre e Rondônia.

*R. macrophylla*: Pará, Amazonas, Acre, Mato Grosso, Amapá, Roraima, Maranhão, Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro.

*R. albuquerquei*: Amazonas.

*R. gardneriana*: Pará, Amazonas, Roraima, Rondônia, Ceará, Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

*R. brasiliensis*: Pará, Amazonas, Acre, Mato Grosso, Maranhão, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná.

2 - Seção *Verticillaria* Ruiz et Pavon. Frutos com epicarpo muricado-tuberculado:

*R. acuminata*: Pará, Amazonas, Acre, Mato Grosso, Amapá e Goiás.

*R. benthamiana*: Pará, Amazonas e Amapá.

*R. madruno*: Pará e Amazonas.

Embora Engler (1888) tenha indicado também oito espécies para o Brasil, (*R. macrophylla*, *R. longifolia*, *R. brasiliensis*, *R. calyptrata*, *R. gardneriana*, *R. spruceana*, *R. tenuifolia* e *R. floribunda*), apenas quatro ainda são válidas, devendo as restantes serem consideradas sinônimos de diversas outras espécies de *Rheedia*.

De acordo com Engler (1888), na Amazônia brasileira existiriam somente quatro *Rheedia* (*R. macrophylla*, *R. longifolia*, *R. spruceana* e *R. floribunda*), das quais só as duas primeiras continuam válidas. Na realidade todas as oito espécies brasileiras ocorrem nesta região, sendo que três a *R. acuminata*, *R. benthamiana* e *R. madruno* são nativas da Amazônia e duas outras constituem endemismos, a *R. longifolia* e *R. albuquerquei*.

As espécies brasileiras do gênero *Rheedia* são comumente designadas por bacuripari, bacupari ou bacopari, além de outros nomes locais ou específicos [26].

Das espécies brasileiras quatro delas (*R. gardneriana*, *R. brasiliensis* popularmente conhecida como bacuripari, bacopari, bacopari do rio, sacopari e limão-do-mato, *R. benthamiana* e *R. madruno* com sinonímia popular de bacuripari e bacuri respectivamente) tem usos medicinais e também já foram realizados estudos químicos, determinando-as como sendo plantas ricas em substâncias ativas e conseqüentemente de interesse para a medicina.

### 2.3 - Considerações Gerais Sobre a Espécie em Estudo, Cruz, Lorenzi e Corrêa

*Rheedia gardneriana* Planch et Triana - Guttiferae.

Nomes populares: bacopari, bacupari, bacoparé, bacopari-miúdo, mangostão-amarelo, bacuri-mirim, remelento, escropari e bacori. Árvore de porte médio, 5 - 7



metros de altura, troncos de 15- 25 cm. de diâmetro. Têm configuração piramidal com folhas opostas pecioladas, coreáceas, glabras, de 7 - 10 cm. de comprimento por 3 - 4 de largura. Seu fruto é amarelo contendo uma substância polposa branca, mucilagenosa, doce e comestível. Se encontra desde o Ceará ao Rio Grande do Sul, principalmente no estado de Minas Gerais e na Floresta pluvial.

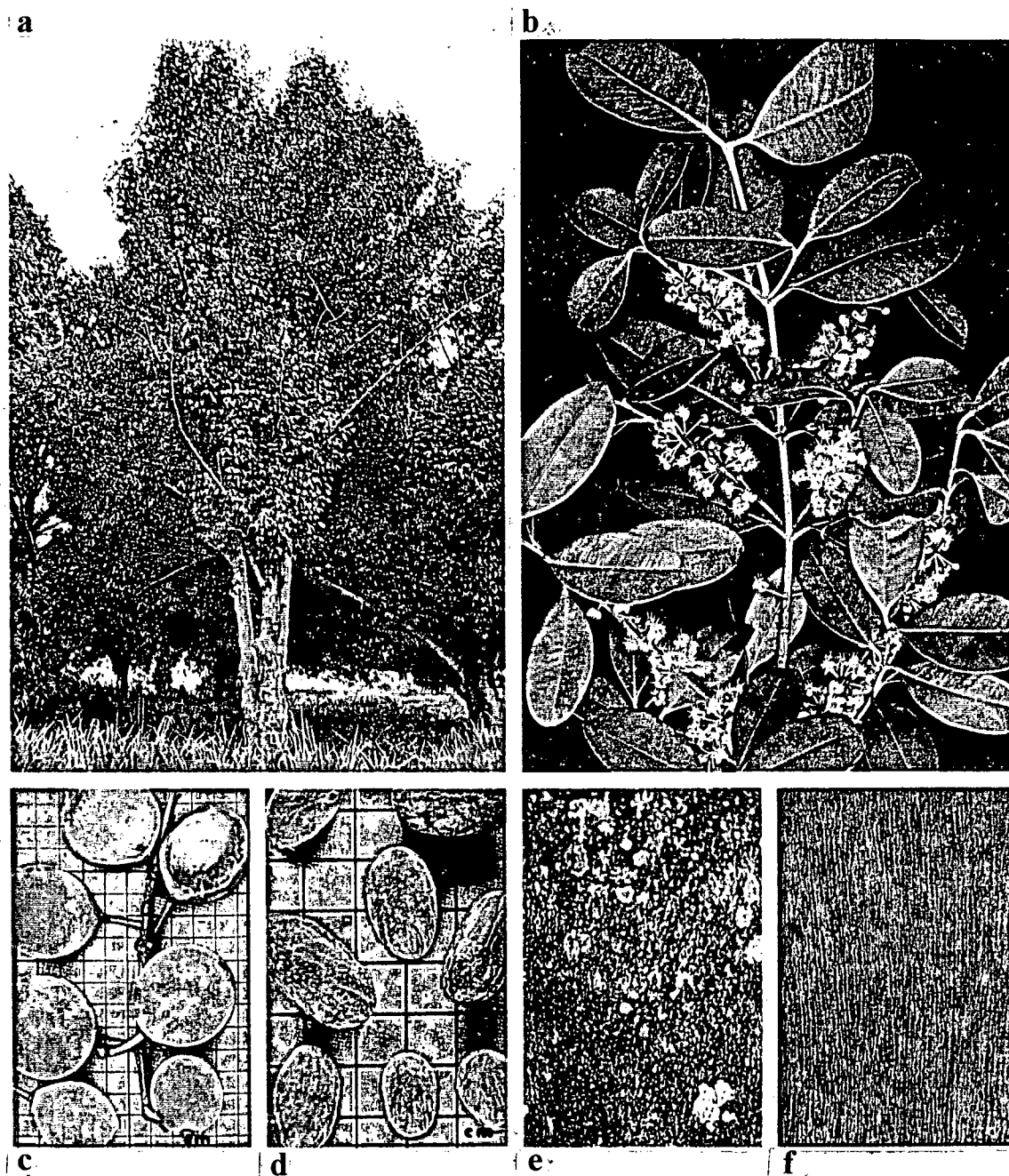
Fornece madeira de pequenas dimensões própria para construção civil, carpintaria, marcenaria, cabos de ferramentas e moirões. É moderadamente pesada ( $0,87\text{g./cm}^3$ ) e durável sob condições naturais. Sua casca exsuda uma resina amarela que serve para curtumes de couro. A planta é característica do interior da mata de beira de rios e córregos, mas produz muito mais fruto quando fora da mata. É também usada como arborização urbana, devido sua característica ornamental. Floresce durante os meses de agosto e setembro e os frutos amadurecem em dezembro a fevereiro. A produção de mudas é simples mas demorada (de 7 - 9 meses) e a taxa de germinação é elevada (acima de 80%). O desenvolvimento das plantas após o plantio definitivo é também lento [27].

Em Santa Catarina há, segundo o Herbário Barbosa Rodrigues, somente a espécie *Rheedia gardneriana*. A espécie estudada foi identificada no Herbário da FURB, em Blumenau SC, em 1993 pelo Botânico Marcos Sobral da Universidade Regional do Rio Grande do Sul, e está catalogada sob o número 3759.

Esta planta é usada pela medicina popular, de modo variado, principalmente como analgésico e antiinflamatório, especialmente em processos infecciosos do trato urinário sob a forma de chás e até como unguentos e compressas [7, 28]. Estudos farmacológicos preliminares anteriores sugerem a ação analgésica de alguns biflavonóides extraídos desta planta [29].



**FIGURA 1 - Vista parcial do local das coletas de *Rheedia gardneriana* Planch et Triana, nos remanescentes florestais do Campus I da FURB - Blumenau, SC, 11/02/1999**



**FIGURA 2 - Apresentação geral de *Rheedia gardneriana* Planch et**

**Triana (LORENZI, 1992)**

**a) aspecto geral da planta**

**b) ramo com inflorescência**

**c) fruto, baga**

**d) sementes**

**e) vista geral da casca**

**f) detalhe da madeira (xilema)**

### 2.3.1 - Posição Sistemática da espécie *Rheedia gardneriana* Planch et Triana

#### Classificação Taxonômica segundo JOLY, 1967 [10]

Divisão	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae
Sub-classe	Archichlamydeae
Ordem	Guttiferales
Família	Guttiferae
Sub-família	Clusioideae
Tribo	Garcinieae
Gênero	<i>Rheedia</i>
Espécie	<i>Rheedia gardneriana</i>
Sinonímia Botânica	<i>Lamprophyllum Gardnerianum</i> Miers
Sinonímia Vulgar	Bacopari, Bacori e Mangostão amarelo

### 2.3.2 - Substâncias Químicas Identificadas de *Rheedia gardneriana*

Alguns estudos químicos já foram realizados com a *Rheedia gardneriana*, determinando várias substâncias que a compõem, partindo de raízes, tronco, casca, frutos e folhas. Entre os compostos químicos isolados e identificados, as xantonas são de maior número, além de outros como: esteróides, triterpenóides e biflavonóides. Os compostos isolados foram: (1,6-dihidroxi-5-metoxixantona (Buchanoxantona) (1), 1,7-dihidroxixantona (Euxantona) (2), 1,5-dihidroxixantona (3), Lupeol (4), Betulina (5) e Beta-sitosterol (6)), todos separados por extração com benzeno a partir da casca e tronco [30, 31].

(8-Deoxigartanina (7), 1,5-dihidroxi-6', 6'-dimetil-2H-pirano (2',3' : 3,2) - 6'',6''-dimetil-2H-pirano (2'',3'' : 6,7) xantona (Rheediaxantona - A) (8), 1,5,6 - trihidroxi-

6',6'- dimetil-2H-pirano (2',3' : 3,2)-7-(3 metilprop-2-enil) xantona (7 - Preniljacareubina) (9) e Piranojacareubina (10)), isolados do extrato em benzeno das raízes da planta [32].

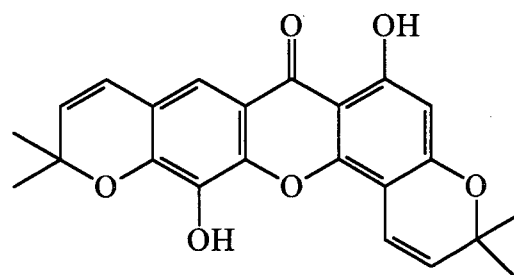
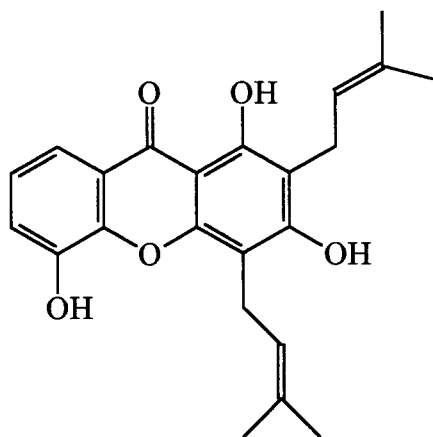
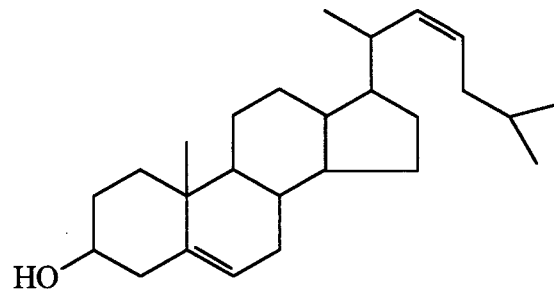
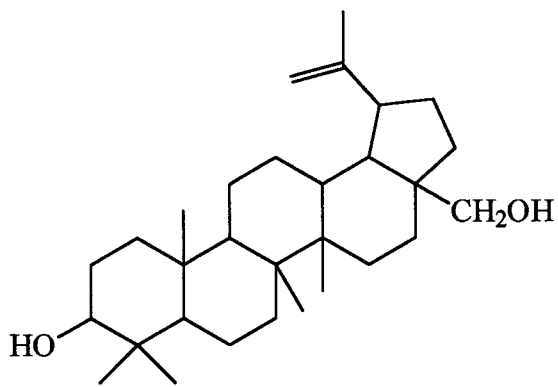
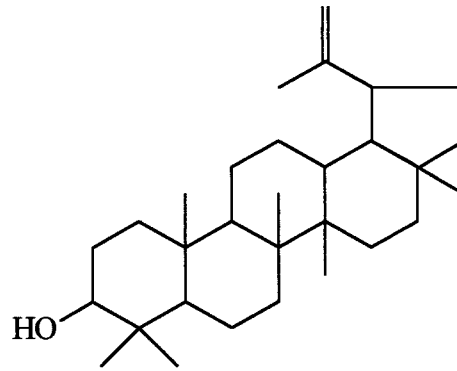
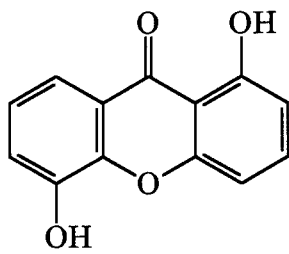
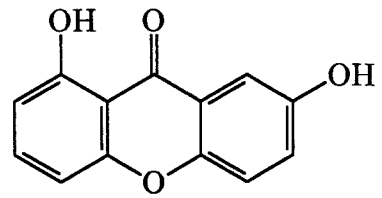
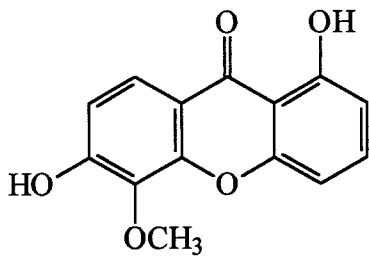
(4',5'-dihidro-1,5,6-trihidroxi-4',5',5'-trimetilfurano (2',3':3,2)-4 (1,1-dimetilprop-2-enil)-xantona (Isorheediaxantona - B) (11), 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano (2',3' : 6,7)-xantona (Rheediacromenoxantona) (12), Rheediaxantona - B (13), Rheediaxantona - C (14) e Macluraxantona (15)). A extração foi feita com benzeno a partir das raízes e sua casca [33, 34].

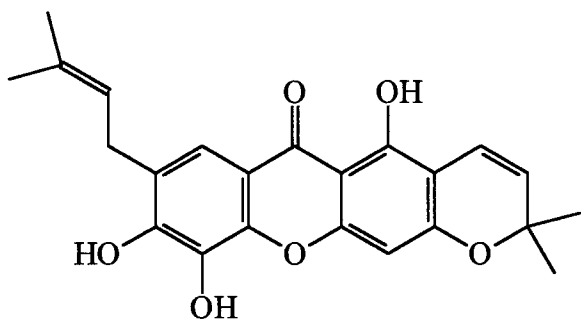
Do extrato etanólico, também das raízes, foram isolados três biflavonóides: Biflavona GB2a (16), Fukugetin (17) e Volkensiflavona (18) [35]. A partir do extrato etanólico, das folhas, foram isolados o Fukugeside (19) e os compostos 16, 17 e 18 citados acima, e I3-naringenin-II8-4'-Ome-eriodictyol (GB-2a-II-4'-OMe) (20) [29, 36].

Recentemente foram isolados da polpa dos frutos de *Rheedia gardneriana* (extração com hexano) o Sitosterol (21) e Estigmasterol (22). O extrato hexânico da casca forneceu  $\alpha$ -copaeno (23),  $\alpha$ -muuroleno (24),  $\gamma$ -cadineno (25), Cadineno (26) e 7-Epiclusianona (27), este último com estudos de atividades biológicas. E do extrato diclorometano também da casca foi isolado o Ácido oleanólico (28) [37, 38].

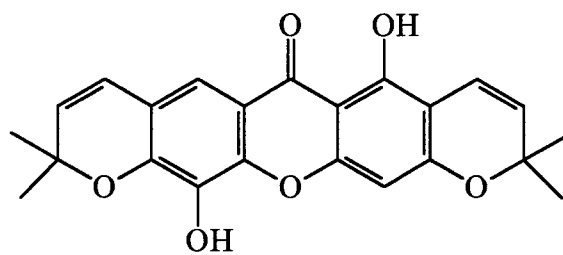
Muitos desses compostos já foram isolados de outras espécies dos mesmos e de diferentes gêneros e famílias, incluindo aqui o Fukugetin e a Volkensiflavona, principais compostos em estudo. Os quais foram isolados de espécies como *Garcinia multiflora*, *Rhus succedanea* e *Garcinia nervosa*, e realizados estudos farmacológicos, com atividades biológicas diversas [13, 39, 24, 25, 14, 15, 11].

Conforme demonstrado, a *Rheedia gardneriana* produz uma variedade de xantonas, entre elas simples e preniladas, aumentando assim o interesse por estes compostos.

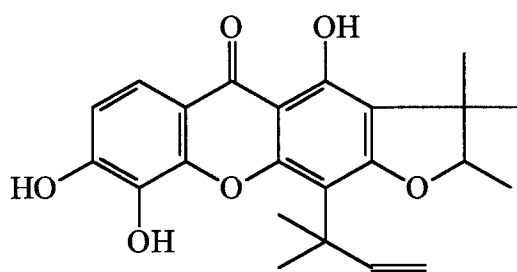




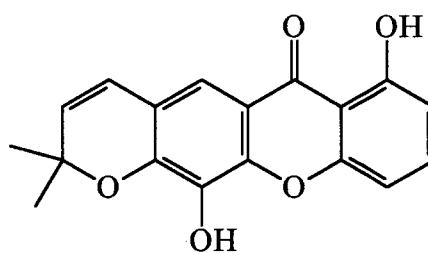
9



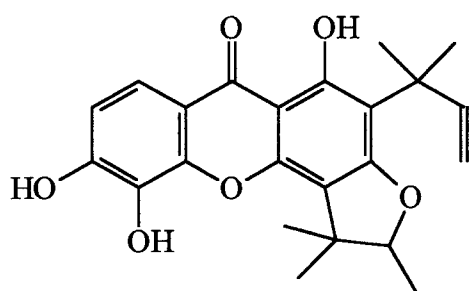
10



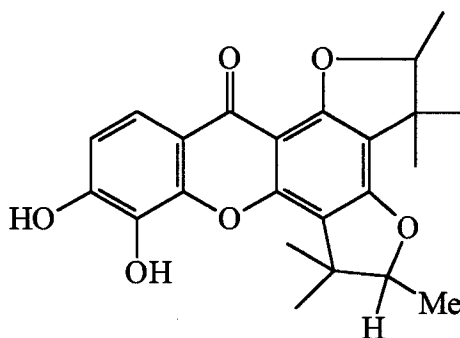
11



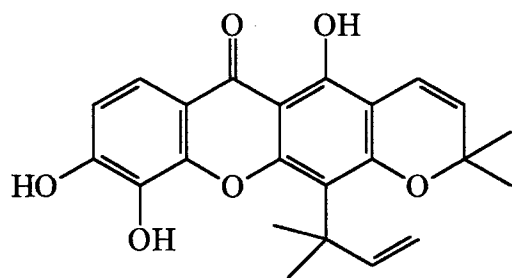
12



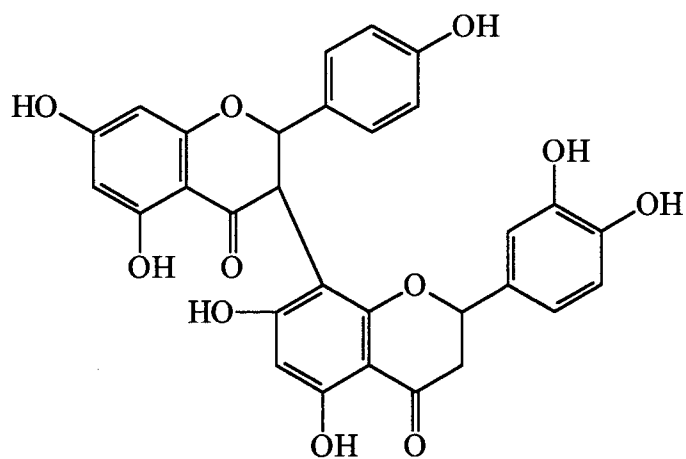
13



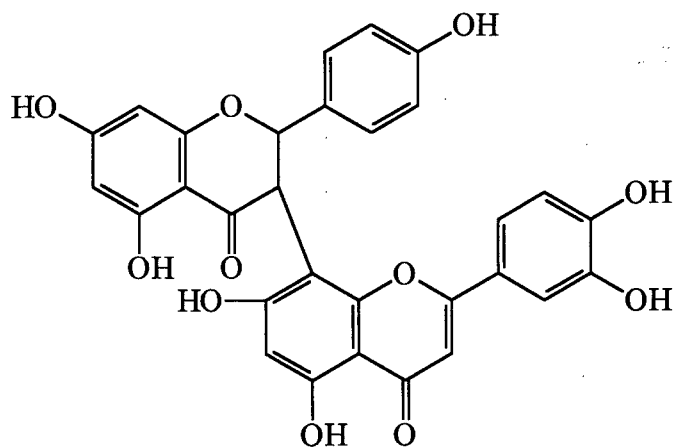
14



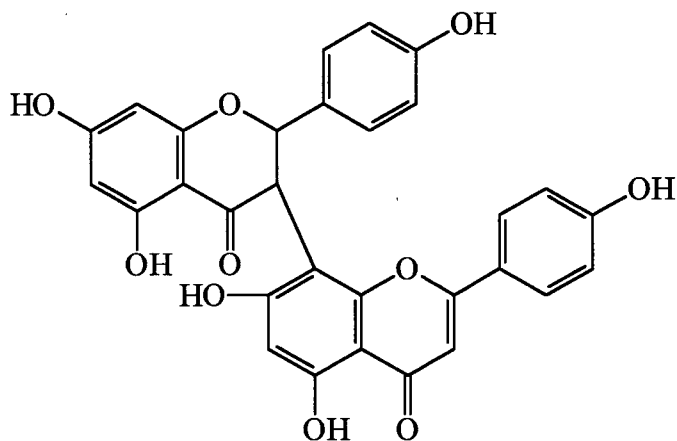
15



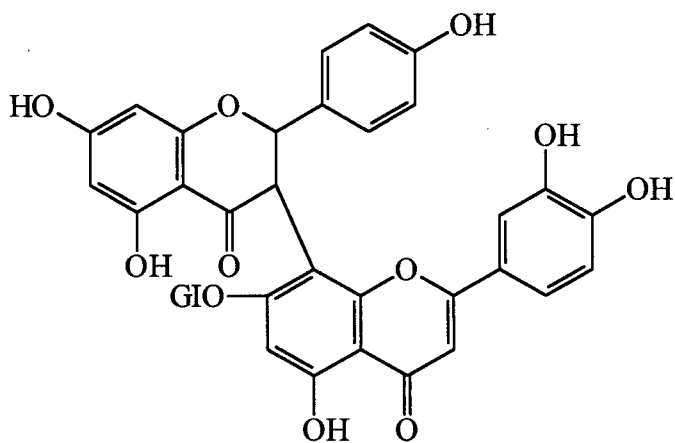
16



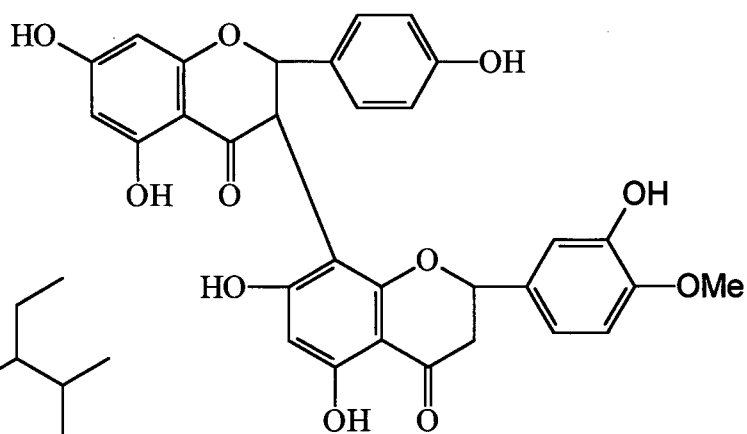
17



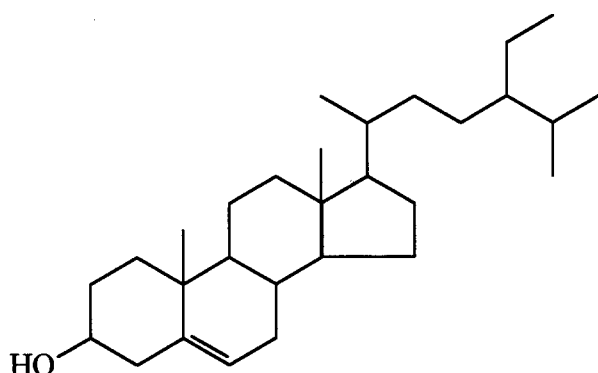
18



19

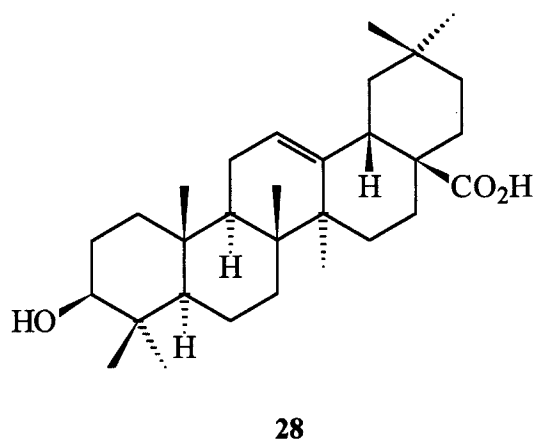
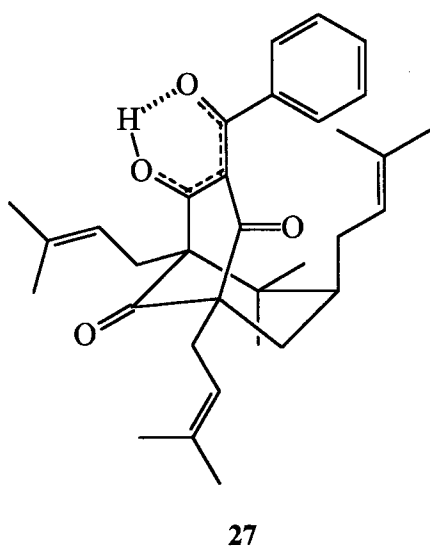
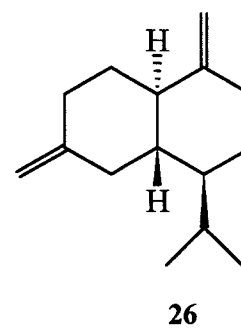
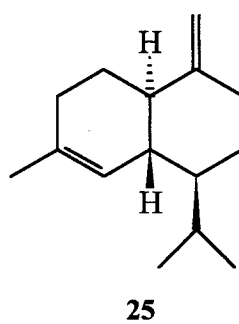
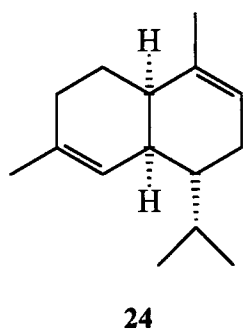
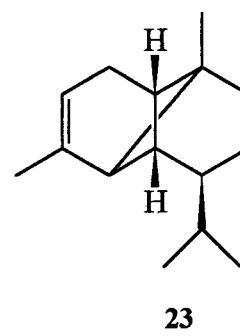
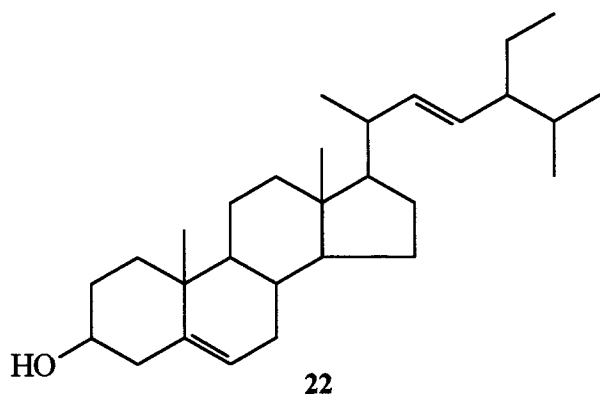


20



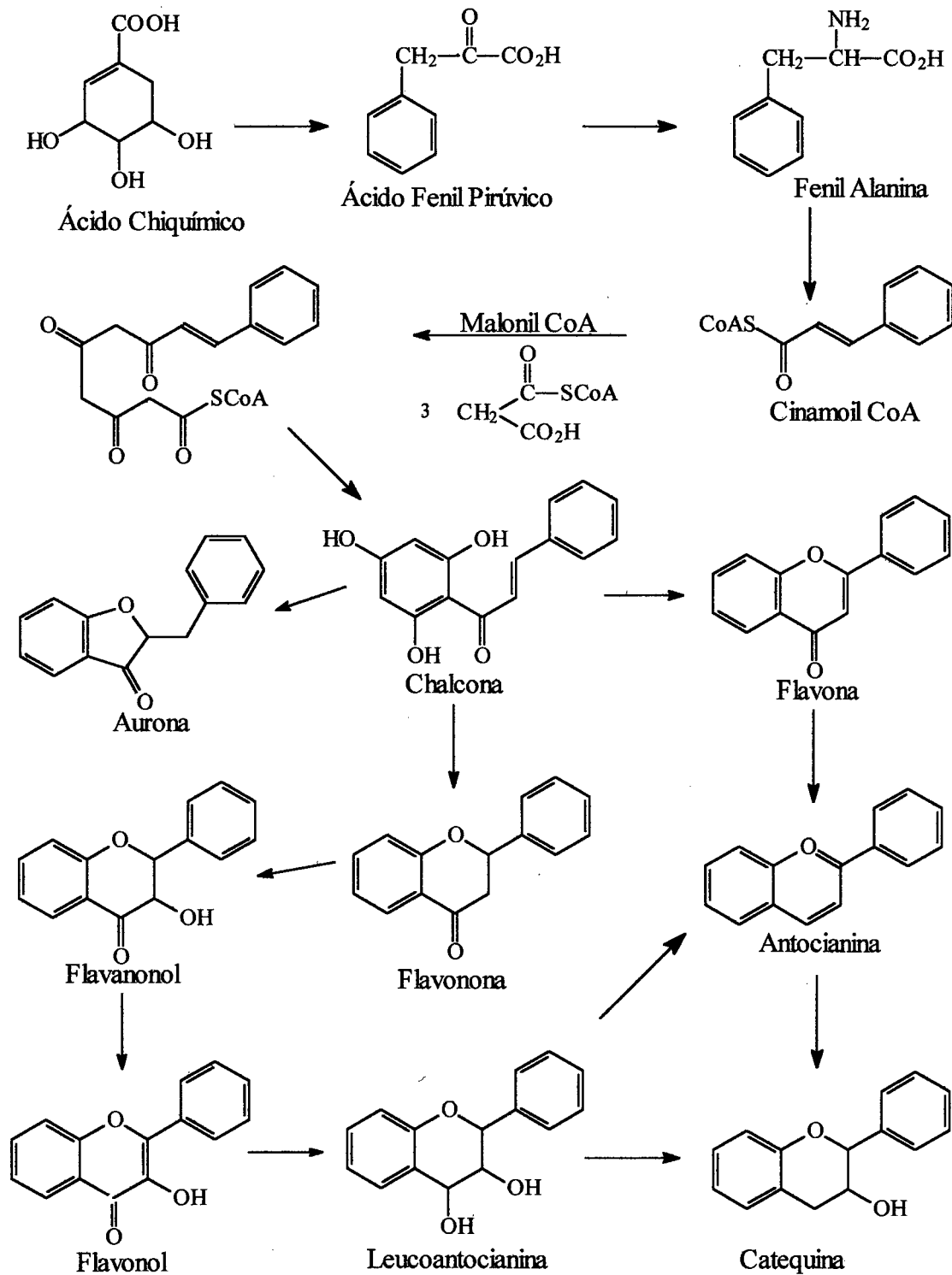
21





ESPÉCIE	GRUPOS QUÍMICOS							ESTUDOS		ATIVIDADE BIOLÓGICA
	FLAVONÓIDES	BIFLAVONÓIDES	XANTONAS	TERPENOS	ESTERÓIDES	QUÍMICO	BIOLÓGICO			
<i>R. gardneriana</i>	X	X [29]	X	X	X	X	[36,40, 34]		Antibact., Antiinflamat. e Analgésica	
<i>R. benthamiana</i>		X	X			X				
<i>R. brasiliensis</i>		X	X			X				
<i>R. medruño</i>		X	X			X				
<i>Garcinia cowa</i>			X			X	[19]		Antimalarial	
<i>Garcinia kola</i>		X	X*			X	[17,16]		Antidiabética, Hipoglicêmica e *Antibacteriana, Antihepatotóxica	
<i>Garcinia multiflora</i>		X				X	X [13,15,12]		Antiviral, Anti HIV e outros	
<i>Garcinia dioica</i>			X			X	X [41,11]		Antibacteriana	
<i>Garcinia dulcis</i>			X			X	[20]		Antimalarial	
<i>Garcinia purpurea</i>			X			X	[42]		Antibacteriana	
<i>Garcinia huillensis</i>			X			X	[11]		Antibacteriana	
<i>Garcinia mangostana</i>			X			X	X [21,18,43,41,11]		Antibacteriana, Antimalarial, Antiúlcera, Antiinflamatória, Antifúngica e Anti - HIV-1 protease	
<i>Hypericum perforatum</i>	X	X	X			X	X [44, 45]		Atividade Biológica	
<i>Calophyllum inophyllum</i>			X			X	X [05]		Antibacteriana e Depressão no SNC	
<i>Calophyllum zeylanicum</i>			X			X	X [11]		Antibacteriana	
<i>Mesua ferrea</i>			X			X	X [11]		Produz depressão no SNC	
<i>Psorospermum febrifugum</i>						X	X [11]		Antitumoral	
<i>Calophyllum moonii</i>			X			X	X [46]		Antibacteriana	
<i>Calophyllum lanckensis</i>			X			X	X [46]		Antibacteriana	
Várias espécies do gênero <i>Hypericum</i>			X			X	X [45]		Antiinflamatória, Antiviral e Antihepatotóxica	

TABELA - 1 - ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO RHEEDIA E ESTUDOS BIOLÓGICOS DA FAMÍLIA GUTTIFERAE



**FIGURA 3 - Esquema da Rota Biossintética para Flavonóides**

**CAPÍTULO III**  
**PARTE EXPERIMENTAL**

### **3 - PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL “*Rheedia gardneriana*”**

A espécie em estudo, *Rheedia gardneriana*, foi coletada nos remanescentes florestais do campus I da Universidade Regional de Blumenau - FURB, no mês de fevereiro de 1999, e identificada no Herbário desta Universidade pelo Professor Marcos Sobral, cuja catalogação está sob os números 534 a 540.

Após a coleta, as folhas foram lavadas em água corrente e submetidas a desidratação na sombra e a temperatura ambiente, durante 14 dias. Todas as folhas foram obtidas de um mesmo indivíduo.

#### **3.2 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS**

##### **3.2.1 - Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Bruto para Isolamento dos Princípios Ativos**

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico bruto, foram utilizados 4,120 kg de folhas desidratadas. O material foi moído em liquidificador e submetido a extração por maceração com 20 litros de álcool etílico de grau comercial e água destilada, (90/10 v/v álcool/água), em frascos de vidro âmbar à temperatura ambiente durante quinze dias, com repetidas reposição de solvente e agitação periódica. O macerado foi filtrado em papel filtro e concentrado até o volume de 2,0 litros, em evaporador rotatório sob pressão reduzida (temperatura  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), resultando num material de coloração marrom claro.

O extrato bruto, com presença de precipitado resinoso, foi armazenado em frasco de cor âmbar e deixado repousar a temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. O precipitado formado foi removido por filtração em papel filtro, resultando numa solução (1,800 L) de

coloração vermelho castanho (concentração de 12,6% de matéria seca), sendo denominado de Extrato Hidroalcoólico Bruto - EHB. O precipitado de cor verde escuro, um material que já se difundia quando na concentração do extrato, aglomerando-se ao redor do balão, resultou em 215 g, recebendo esse a denominação de resina. Considerando apenas o extrato hidroalcoólico bruto, a fase líquida do material extraído, que será o material de partida para as extrações dos constituintes ativos, o rendimento partindo do material vegetal desidratado é de 5,5 %.

O material foi conservado em câmara fria não superior a 4 °C, protegido da luz, sendo somente retirado para o preparo das extrações e testes propostos.

Uma amostra do extrato hidroalcoólico bruto foi usada nos testes das atividades farmacológicas. Este extrato apresentou atividade farmacológica e assim foi utilizado na separação dos seus constituintes ativos.

### **3.3 – PREPARO DOS EXTRATOS PARA PESQUISA DE GRUPOS QUÍMICOS**

#### **3.3.1 - Extrato Aquoso**

O material vegetal moído (20 g), foi misturado com 100 mL de água destilada, e aquecido até a fervura durante 15 minutos. Após repouso de 10 minutos, foi filtrado e o volume completado para 100 mL.

#### **3.3.2 - Extrato Alcoólico**

20 g das folhas secas e moídas foram deixadas em maceração com 200 ml de álcool etílico durante 15 dias, ao abrigo da luz, com agitações ocasionais. O macerado foi filtrado em papel filtro e evaporado em evaporador rotatório a temperatura de 50 °C sob pressão reduzida, até obter 80 mL.

### **3.3.3 - Extrato Hidroalcoólico**

O material vegetal moído (80 g), foi mantido sob agitação (cerca de 1 hora) com 200 mL de água e 600 mL de etanol (70 : 30 v/v). A mistura foi aquecida em banho-maria e filtrada a quente em papel filtro. Evaporou-se o solvente em evaporador a 50 °C até um volume de 150 mL. Após a concentração, apareceu precipitação e foi feita nova filtração.

Coloração do extrato: Castanho avermelhado.

### **3.3.4 - Operações Preliminares do Extrato Hidroalcoólico**

Foram separados sete porções de 5 mL em tubos de ensaio numerados de 1 à 7, e duas porções de 10 mL em Béckeres rotulados, 1 e 2.

Os Bécheres foram colocados em banho-maria até sua secura e mantidos em dessecador até a ocasião de serem usados. O restante do extrato foi concentrado em banho-maria até obter a metade do volume. Levou-o a pH 4 com HCl e em seguida, o líquido acidulado foi filtrado. Reservou-se tanto a solução como o resíduo insolúvel e os tubos de ensaio para testes posteriores.

### **3.3.5 - Extrato Etéreo**

40 g do material vegetal pulverizado foi submetido à extração com 500 mL de éter etílico durante um dia, sendo ocasionalmente agitado. A mistura foi filtrada em papel filtro e concentrada em rotavapor a 50 °C, até 30 mL ( $\pm$  duas partes da planta para uma do solvente). Efetuou-se nova filtração após a concentração.

### 3.4 - INVESTIGAÇÃO QUÍMICA PRELIMINAR

Atendendo ao estudo dos possíveis princípios ativos presentes nas folhas, de *Rheedia gardneriana* Planch et Triana, foram realizados os ensaios fitoquímicos preliminares, a partir dos extratos aquoso, alcoólico e hidroalcoólico, seguindo a marcha sistemática descrita por Souza e Matos[47 e 06].

#### 3.4.1 - Taninos

##### a) Reação com Cloreto Férrico

O extrato aquoso obtido no item 3.3.1, (10 mL), foi transferido para um tubo de ensaio onde foi adicionado duas gotas de solução aquosa de Cloreto Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) a 1%. O desenvolvimento de coloração verde, azul ou a formação de precipitado, indica ensaio positivo.

##### b) Separação dos Taninos Hidrolisáveis e Condensados (Ensaio de Stiasny)

O extrato aquoso obtido no item 3.3.1, (20 ml) foi submetido a refluxo durante 30 minutos, com 10 mL do reagente: (formaldeído 40% - ácido clorídrico fumegante 1:3 v/v). Após o resfriamento foi filtrado e o resíduo foi lavado com água destilada. Os taninos condensados originam precipitados vermelhos.

Os taninos hidrolisáveis permanecem em solução e podem ser pesquisados do seguinte modo:

Em 10 mL do filtrado adicionou-se 5g de acetato de sódio e duas gotas da solução 1% de cloreto férrico - coloração azul indica teste positivo.

##### c) Taninos Hidrolisáveis - confirmação

Em 5 mL do extrato obtido em 3.3.1, foram adicionados 10 mL de ácido acético glacial 10 % e 5 mL da solução de acetato de chumbo 10 %. Formação de precipitado indica taninos hidrolisáveis.



### 3.4.2 - Cumarinas

Ao extrato alcoólico (10 mL) obtido em 3.3.2, foi adicionado quantidade suficiente de HCl até a obtenção de pH 1. O volume foi transferido para um funil de separação e agitado três vezes com porções sucessivas de 20 mL de éter etílico. Foi reunido o extrato etéreo e o seu volume reduzido a 10 mL.

Gotas do extrato etéreo foram depositadas em papel de filtro, em três pontos previamente determinados, de modo a obter três manchas de 1 cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com uma gota da solução de hidróxido de sódio 1N. A mancha 1 foi coberta com uma lâmina de alumínio, e em seguida o papel de filtro foi levado para uma câmara de luz ultravioleta, ficando exposta sob ondas longas (365 nm) durante 3 minutos. O desenvolvimento de fluorescência azul na mancha exposta à luz indica Cumarinas.

### 3.4.3 - Fenóis com Posição Orto e Meta Livre

O extrato etéreo obtido em 3.3.5, (2 mL), foi transferido para uma cápsula de porcelana e levado a secura. Adicionou-se a seguir 2 gotas do reativo de Liebermann - Burchard recentemente preparado. Após 5 minutos foi adicionado uma gota de água destilada e homogeneizada com um bastão de vidro, adicionando em seguida gotas de hidróxido de sódio 4N. O desenvolvimento da coloração indica a presença de fenóis.

### 3.4.4 - Antraquinonas

15 mL do extrato alcoólico obtido em 3.3.2, foi refluxado durante 15 minutos com três ml de ácido sulfúrico a 10%. Após, filtrou-o e o filtrado foi esfriado e transferido para um funil de separação com 30 mL de água destilada e, extraído três vezes com 10 mL de benzeno. Os extratos benzênicos foram reunidos e concentrados, em

evaporador à temperatura de 50 °C, até 10 mL, sendo transferido para um tubo de ensaio e agitando-o com 10 mL de hidróxido de amônia concentrada.

Os derivados antraquinônicos de cor amarela, formam radicais cromóforos avermelhados.

### **3.4.5 - Ácidos Orgânicos**

O extrato etéreo restante obtido em 3.3.5, foi levado à secura. Adicionou-se 5 mL de água destilada para a determinação do pH. A reação ácida confirma a presença de ácidos orgânicos.

### **3.4.6 - Fenóis e Taninos**

Ao tubo de ensaio de número 1 (3.3.4), foram adicionados quatro gotas de solução alcoólica de cloreto férrico. Foi agitado bem com observação de qualquer variação de sua cor ou formação de precipitado abundante escuro. Comparando com um teste em branco, preparado apenas com água e cloreto férrico.

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

- Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos fiobafênicos (taninos condensados ou catéticos).

### **3.4.7 - Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides**

Aos tubos de número 2, 3 e 4 (3.3.4), adicionou-se ácido clorídrico 0,5 N e hidróxido de sódio 0,5 N para acertar o pH em pH 3, pH 8,5 e pH 11 respectivamente. Observou-se mudança na coloração do material.

Aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes, de acordo com a tabela:

Constituintes	Cor		
	pH: 3	pH: 8,5	pH: 11
- Antocianidinas e antocianinas	vermelha	lilás	Azul-púrpura
- Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
- Chalconas e auronas	vermelha	-	Verm.-púrpura
- Flavanonóis	-	-	Verm.-laranja

Obs. A presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa da presença de outro.

### 3.4.8 - Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavanonas

Com os tubos de número 5 e 6 (3.3.4), foi acidulado o primeiro com ácido clorídrico 0,5 N até pH 3 e alcalinizado o segundo com hidróxido de sódio 0,5 N até pH 11. Foram aquecidos na chama de álcool por três minutos. Observou-se qualquer mudança na cor, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste 3.4.7.

- Aparecimento ou intensificação da cor indica a presença de constituintes específicos na tabela seguinte:

Constituintes	Cor	
	Meio Ácido	Meio Alcalino
- Leucoantocianidinas	vermelha	-
- Catequinas (taninos catéquicos)	pardo-amarelado	-
- Flavanonas	-	vermelho-laranja

Obs 1. A presença de um constituinte pode mascarar a presença de outro.

Obs 2. Efetuou-se outros testes referentes aos de 3.4.6, 3.4.7 e 3.4.8, tomando 6 mL do extrato (3.3.3) diluindo com 25 mL de etanol, dividindo-o em 6 tubos de ensaio. O tubo número 1 indicou teste positivo para fenóis, o n° 2 permaneceu normal, n° 3 vermelho-laranja e o n° 4 vermelho-laranja mais intenso. O tubo n° 5 permaneceu igual, sem alteração de cor e o n° 6 intensificou mais a cor.

### 3.4.9 - Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas

Ao tubo de número 7 (3.3.4), adicionou-se 500 mg de magnésio, em fita, picado e 0,5mL de ácido clorídrico concentrado. O fim da efervescência indica o término da reação e observou-se por comparação a mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7.

- Aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas.

### 3.4.10 – Flavonóides

Realizou-se ainda a seguinte pesquisa para flavonóides: 1 g do vegetal pulverizado com 60 mL de metanol, foi mantido em ebulição sob refluxo durante 10 minutos. A solução ainda quente foi filtrada e diluída com 20 mL de água destilada. Após esfriar a solução foi agitada duas vezes com 20 mL de éter de petróleo, e a fase metanólica aquosa foi evaporada até a secura sob pressão reduzida à temperatura de 50 °C. O resíduo obtido foi dissolvido em 30 mL de acetato de etila e filtrado. Desta solução foi separada em três tubos de ensaio, sendo 2 mL cada, para as seguintes reações de identificação:

a) Reação de Shinoda ou Reação da Cianidina (redução pelo hidrogênio) - ao tubo de número 1 foram adicionados 200 mg de magnésio em pó e gotas de ácido clorídrico concentrado. Os derivados flavônicos, as flavonas, as flavanonas e os flavonóis de cor amarela são reduzidos a compostos antociânicos avermelhados.

b) Reação com Ácido Sulfúrico Concentrado - ao segundo tubo foi adicionado gotas de ácido sulfúrico concentrado. Na presença do ácido os compostos flavônicos, em geral formam sais de oxônio e as soluções apresentam fluorescência amarela.

c) Reação de PEW (redução pelo hidrogênio) - Foram adicionados ao último tubo 200 mg de Zinco em pó e gotas de ácido clorídrico concentrado. Os derivados flavônicos de cor amarela reduzem-se a compostos antociânicos avermelhados.

### **3.4.11 - Esteróides e Triterpenóides (Liebermann - Burchard)**

O resíduo seco do bécker número 1 (3.3.4), foi extraído três vezes com 2,0 mL de clorofórmio, sendo bem triturado o resíduo com o solvente. A solução clorofórmica foi filtrada lentamente em pequeno funil com uma bolinha de algodão, coberta com 400 mg de sulfato de sódio anidro, para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético com uma suave agitação, em seguida juntou-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado tornando a agitar suavemente e observando o desenvolvimento de cores.

- Coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteróides livres.

- Coloração pardo até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

### **3.4.12 – Saponinas**

O resíduo insolúvel em clorofórmio, separado em 3.4.11, foi redissolvido com 10 mL de água destilada filtrando-a para um tubo de ensaio. O tubo com a solução foi agitado fortemente por dois minutos. Houve formação de espuma persistente e abundante, indicativo de saponinas (heterosídeos saponínicos).

#### **a) Confirmação de Saponinas**

Adicionou-se dois mL de ácido clorídrico concentrado ao conteúdo do tubo preparado acima, deixando-o por uma hora em banho-maria. Ao esfriar foi neutralizado e agitado novamente.

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

### 3.4.13 - Ácidos Fixos Fortes

Ao resíduo do Bécker número dois item (3.3.4), foi adicionado 0,5 mL de etanol, misturando bem e acrescentando 1 mL de hidróxido de amônia concentrada, com boa mistura. Em seguida foi aquecido e filtrado, mantendo o recipiente com o líquido em banho-maria até a secura e não haver nenhum indício de vapores de amônia. O Bécker com o material seco foi levado à estufa por 10 minutos e, redissolvido em água e filtrado novamente. Separou-se o filtrado em dois pequenos frascos e foi adicionado a um deles 1 mL de hidróxido de sódio 1N, fechando-os rapidamente, deixando-os suspenso na tampa uma tira de papel umedecido com reagente de Nessler. Foi observado o desenvolvimento de cor no papel-reagente.

- Coloração marrom no frasco que contém hidróxido de sódio indica a presença de ácidos fixos fortes no extrato.

### 3.4.14 – Resinas

O resíduo sólido resultante da concentração do extrato hidroalcoólico, de acordo com o item 3.3.4, foi extraído com 4 mL de etanol. Filtrou-se a solução etanólica e 3 mL foram colocados em um tubo de ensaio com 6 mL de água, e observou-se a formação de precipitado.

- Precipitado floculoso que se aglomera por agitação ou aquecimento indica a presença de resinas.

### 3.4.15 - Alcalóides

Foram tomados 15 mL da solução aquosa obtida no item 3.3.4 e elevado o pH até 11 com hidróxido de amônia, e extraído as bases orgânicas com três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL da mistura éter-clorofórmio (3:1), em funil de separação. A fase

aquosa foi reservada para outro teste. A solução eter-clorofórmio foi tratada com sulfato de sódio anidro e, reextraído as bases orgânicas com três porções sucessivas de 5 mL de ácido clorídrico 0,1 N. Descartou-se a solução éter-clorofórmio e a solução aquosa ácida foi repartida em três tubos de ensaio, evitando a presença de solvente orgânico. Adicionou-se a cada tubo respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides, Hager, Mayer e Dragendorff, observando a formação de precipitado.

- Precipitado floculoso pesado é indicativo de alcalóides.

### **3.4.16 - Bases Quaternárias**

A solução aquosa (privada dos alcalóides por lavagem com mistura de éter-clorofórmio item 3.4.15) foi acidulada com HCl até pH 4. Filtrou-se a solução e dividiu-a em três tubos de ensaio, sendo realizado os testes para prospeção de alcalóides.

- Precipitado floculoso indica a presença de bases quaternárias.

### **3.4.17 - Heterosídeos Flavonoídicos**

Colocou-se em um tubo de ensaio 2g do formacógeno e 20 ml de etanol a 60° GL. Foi agitado durante 5 minutos. Filtrou-o com algodão e foi dividido em duas alíquotas A e B. Com A realizou-se a seguinte reação:

Reação Oxalo-Bórica ou Reação de Taubock.

Em uma cápsula de porcelana, a alíquota A foi levado a banho-maria e evaporado até a secura. Adicionou-se ao resíduo 3 mL da solução de ácido bórico a 3% e 1 mL da solução de ácido oxálico a 10%. Evaporou-o novamente até resíduo e o aquecimento foi continuado por mais 3 minutos. Dissolveu-se o novo resíduo, já frio, em 10 mL de éter etílico, vertendo-o para um tubo de ensaio, verificando se apresenta ou não fluorescência.

### **3.4.18 - Separação das Bases Orgânicas**

Com auxílio de um funil de separação, retirou-se as bases orgânicas do extrato (3.3.5) usando três porções sucessivas de 30 mL de ácido clorídrico 0,1N, e uma de 50 mL de água destilada. O extrato original foi separado para teste posterior, e as soluções aquosas foram reunidas e alcalinizada a pH 11 com hidróxido de amônia. O precipitado de bases orgânicas foi extraído com três porções sucessivas de 15, 10 e 5 mL de solução éter-clorofórmio (3:1). Reservou-se a fase aquosa e, a solução éter-clorofórmio foi filtrada e separada em duas porções. Retomou-se as bases contidas na metade da solução éter-clorofórmio, por meio de agitação com três porções sucessivas de 6 mL de HCl 1,0N em funil de separação. Retornou-se a fase orgânica para junto do extrato original. A fase aquosa ácida foi filtrada e submetida aos testes para determinação de alcalóides.

### **3.4.19 - Confirmação de Alcalóides.**

Separou-se a solução aquosa ácida (3.4.18) em três tubos de ensaio e foram adicionados a cada um deles três gotas dos reagentes Hager, Dragendorff e Mayer respectivamente, para verificar a presença de alcalóides.

Pesquisou-se também as bases quaternárias, adicionando-se ácido acético na fase aquosa reservada no item 3.4.18, até pH 5 e 0,5 ml de reagente de Hager.

### **3.4.20 - Separação dos Ácidos Fortes**

Retomou-se o extrato original (3.4.18) e tratou-o em funil de separação com três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL de solução de bicarbonato de sódio a 2%, e uma de 20 mL de água. Reservou-se a fase orgânica para teste posterior. A fase aquosa foi acidulada com HCl até pH 1. Os ácidos livres foram retomados com três lavagens sucessivas de 20, 10 e 5 mL de éter etílico em funil de separação. A solução etérea foi



lavada com 20 mL de água e tratada com sulfato de sódio anidro, e filtrada em seguida.

Efetuiu-se ainda a pesquisa para Ácidos fixos fortes do seguinte modo: concentrou-se a solução etérea até a secura e aplicou os mesmos testes descritos no item 3.4.13.

### **3.4.21 - Separação dos Ácidos Fixos Fracos e Fenóis**

Com a fase orgânica reservada no item 3.4.20 foi extraído, em funil de separação, os ácidos fracos e fenóis agitando o extrato com três porções sucessivas de 30, 30 e 20 mL de  $\text{NaHCO}_3$  a 2% , e uma de 50 mL de água destilada. As soluções aquosas foram reunidas e filtrada e acidulada até pH 3 por adição de HCl concentrado. Foram extraídos os ácidos e fenóis livres por meio de três lavagens sucessivas de 20, 15 e 10 mL de éter etílico, intercaladas por vigorosa agitação durante três minutos seguido de 10 minutos de repouso. A fase orgânica foi lavada com 20 mL de água destilada e tratada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e filtrada.

### **3.4.22 - Teste para Constituintes Fenólicos (em meio alcoólico)**

A metade da solução etérea (item 3.4.21) foi concentrada até a secura e redissolvido o resíduo em 25 mL de etanol e foi dividido em 6 tubos de ensaio para aplicação nos testes descritos nos itens 3.4.6, 3.4.7 e 3.4.8.

- resultado positivo pode indicar a presença de um ou mais dos seguintes constituintes: fenóis simples, catequinas e flavonóides.

Obs: Taninos não aparecem neste teste (3.4.6).

### **3.4.23 – Quinonas**

Foram separados 5 mL da solução etérea (3.4.21) para um tubo de ensaio e

adicionado 2 mL da solução de hidróxido de amônia 6N. Foi agitado bem e deixado em repouso para separar as duas fases.

- Cor vermelha na camada aquosa alcalina indica a presença de quinona, especialmente antraquinonas hidroxiladas, na solução e seus heterosídeos no extrato hidroalcoólico.

### **3.5 – PESQUISA DOS GRUPOS QUÍMICOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO**

#### **3.5.1 - Flavonóides**

Foram colocados em 6 tubos de ensaio, numerados de 2 - 7, 4 mL do extrato e executados testes conforme itens 3.4.7, 3.4.8 e 3.4.9. Da mesma forma realizou-se testes com 2 mL do material, diluído para 5 mL com etanol.

#### **3.5.2 - Fenóis**

2 mL do material foi levado ao banho-maria e evaporado até a secura e prosseguido conforme item 3.4.3.

#### **3.5.3 - Taninos**

Em 5 mL do extrato foram acrescentados 15 mL de água destilada e prosseguido de acordo com o item 3.4.1-b.

Também realizou-se teste com 1 mL do material mais 4 mL de água destilada e seguindo a marcha analítica descrita no item 3.4.1-a.

#### **3.5.4 – Saponinas**

Em 2 mL do material foram acrescentados 8 mL de água destilada e aquecido em ebulição por 10 minutos. Filtrou-o com papel filtro para um tubo de ensaio, agitando-o vigorosamente durante 30 segundos.

- Formação de espuma persistente que não desaparece pela adição de 1 mL de HCl 2N é positivo para saponinas.

### **3.5.5 – Resinas**

10 mL do material foi evaporado até a secura em banho-maria e após foi extraído com 4 mL de etanol, prosseguindo conforme item 3.4.14.

### **3.5.6 - Esteróides e Triterpenóides**

Foi evaporado 15 mL do extrato até a secura e na seqüência executado de acordo com o item 3.4.11.

### **3.5.7 - Ácidos Orgânicos**

Em 10 mL do extrato foi adicionado ácido clorídrico até obter pH 1. Extrauiu-se três vezes sucessivas com 20 mL de éter etílico. O extrato etéreo foi reunido e evaporado até a secura. Adicionou-se 5 mL de água destilada para a determinação do pH. A reação ácida confirma a presença de ácidos orgânicos.

## **3.6 - PESQUISA DE GRUPOS QUÍMICOS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA**

### **3.6.1 - Flavonóides**

Dissolveu-se 0,5 g do material em 20 mL de etanol e 10 mL de água destilada, dividindo-o em 7 tubos de ensaio numerados de 1-7. Realizou-se teste para flavonóides conforme descrito nos itens 3.4.7, 3.4.8 e 3.4.9.

### **3.6.2 - Fenóis e Taninos**

Ao tubo número 1 (3.6.1) realizou-se teste conforme item 3.4.6.

### **3.6.3 - Saponinas**

Uma amostra de 0,1 g do material foi usada na realização do teste conforme item 3.4.12.

## **3.7 - PESQUISA DE GRUPOS QUÍMICOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO**

### **3.7.1 - Flavonóides**

Tomou-se uma amostra de 7 mL do extrato e foi diluída com 20 mL de etanol e 3 mL de água destilada, dividindo em 7 tubos de ensaio numerados de 1-7, prosseguindo testes de acordo com os itens 3.4.7, 3.4.8 e 3.4.9.

Obs: Realizou-se testes para flavonóides com uma amostra sem diluição.

### **3.7.2 - Fenóis e Taninos**

Ao tubo número 1 (item 3.7.1) foi tratado de acordo com a técnica descrita no item 3.4.6.

Também pesquisou-se taninos tomando 5 mL do extrato e realizando a técnica descrita em 3.4.1-a.

### **3.7.3 - Fenóis**

10 mL do extrato foi extraído 3 vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico e evaporado a fração etérea até a secura. Pesquisou-se fenóis conforme procedimento 3.4.3.

### **3.7.4 - Saponinas**

Com 2 mL do extrato mais 8 ml de água destilada, prosseguiu-se de acordo com o item 3.5.4.

### **3.7.5 - Flavonóis**

10 mL do extrato foi colocado em cápsula de porcelana e evaporado até a secura. Ao resíduo adicionou-se 3 mL da solução de ácido bórico a 3% e 1 mL da solução de ácido oxálico 10% e evaporado até a secura, prolongando o aquecimento por mais 5 minutos. O novo resíduo, já frio, foi dissolvido em 10 mL de éter etílico e transferido para um tubo de ensaio. A solução etérea adquire fluorescência amarela-esverdeada para teste positivo.

## **3.8 - ISOLAMENTO DOS BIFLAVONÓIDES**

### **3.8.1 - Fracionamento do Extrato Hidroalcoólico Bruto**

O extrato hidroalcoólico bruto ( EHB ) (1800 mL) foi extraído três vezes em funil de separação, com porções de 600 mL para cada um dos solventes: hexano e acetato de etila. O líquido restante (fase aquosa) foi denominado extrato hidroalcoólico. Em cada uma dessas extrações foi esperado o tempo suficiente até obter a nítida visualização das linhas de separação das duas fases. Na extração com hexano formou uma emulsão na fase orgânica, requerendo um tempo maior para que fosse quebrada essa emulsão. As fases orgânicas de cada extração, foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório a temperatura de  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , até a secura, completando a secagem em dessecador. No particionamento do EHB com hexano não houve extração de nenhum material. O extrato acetato de etila, de coloração bege, teve rendimento de 140,86 g equivalente a 62,10% do Extrato Bruto Hidroalcoólico. A fase aquosa, de coloração castanho avermelhado, resultou em 5,97 % de matéria seca. A figura 4 (p. 69) apresenta o fluxograma das operações realizadas para obtenção das frações.

### **3.8.2 - Fracionamento do Extrato Acetato de Etila em Coluna de Sílica Gel**

O extrato acetato de etila (40 g), foi dissolvido com um mínimo de acetona e misturado com 80 g de sílica gel 60 (230-400 mesh) para formar uma pastilha contendo todo o material adsorvido à sílica. Esta pastilha foi submetida a um fracionamento preliminar através de uma coluna de 5,5 cm de diâmetro por 6 cm de altura de sílica gel 60 (230-400 mesh), usando como eluente acetato de etila, hexano e metanol, com uma vazão de 4,0 mL por minuto. Inicialmente a coluna foi eluída utilizando uma mistura composta de 40% de acetato de etila e 60% de hexano seguido de um gradiente crescente de polaridade até atingir 100% de acetato. Na continuidade usou-se a mistura acetato de etila (95%) e metanol (5%), aumentando gradativamente o metanol até 100% do mesmo.

Foram coletadas 40 frações de 150 mL e reunidas de acordo com monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD). Desta forma separou-se cinco grupos de frações e foram concentradas até a secura em evaporador rotatório à temperatura de 50 °C, completando a secagem em dessecador.

As frações de 3 - 6 apresentaram coloração vermelho castanho de consistência oleosa (F1 = 0,748 g). As frações 7 - 18 apresentaram constituição sólida, de coloração amarelo gema (F2 = 12,282 g). As frações 19 - 28 apresentaram constituição sólida de coloração marrom claro, (F3 = 21,480 g). As frações de 29 - 35 apresentaram-se como um sólido marrom, (F4 = 4,452 g). E das frações 36 - 40 obteve-se um sólido de cor marrom queimado, (F5 = 0,404 g).

A fração F2, obtida na escala de eluição entre 40/60% hexano / acetato de etila, até 100% de acetato de etila, apresentou as melhores atividades biológicas e se constitui principalmente de biflavonóides de interesse.

### **3.8.3 - Separação dos Constituintes Ativos da Fração F2 em Coluna Cromatográfica**

A fração F2 (3,0 g), do extrato acetato de etila foi dissolvida com um mínimo de acetona e misturado 6,0 g de sílica gel 60 ( 230 - 400 mesh ) e evaporado até a secura

sob ventilação de ar quente para a formação da pastilha. Esta pastilha foi cromatografada através de uma coluna de 3,3 cm de diâmetro por 30 cm de altura de sílica gel 60 (230 - 400 mesh), usando como eluente hexano/ acetato de etila/ metanol, numa escala crescente de polaridade com uma vazão de 3,0 mL por minuto.

Inicialmente a coluna foi eluída com 60/40% hexano/acetato de etila, até atingir 100% do acetato e na sequência foi eluída com etanol até não haver mais arraste na coluna, conforme o quadro abaixo:

Hexano (%)	Acetato de Etila (%)	Frações eluídas	Frações reunidas
60	40	01 - 10	
60	40	11 - 13	F2.1 (11-15)
50	50	14 - 25	F2.2 (16-18)
45	55	26 - 28	F2.3 (19-20)
40	60	29 - 31	F2.4 (21-23)
35	65	32 - 33	F2.5 (24-25)
30	70	34 - 38	F2.6 (26-28)
20	80	39 - 40	F2.7 (30-32)
10	90	41 - 43	F2.8 (33-43)
05	95	44 - 45	F2.9 (44-49)
00	100	46 - 53	F2.10 (50-54)
-	Etanol	54 - 58	F2.11 (55-58)

Foram coletadas 58 frações de 130 mL e reunidas de acordo com monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD). Desta forma separou-se 10 grupos de frações que foram concentradas em evaporador rotatório á temperatura de 50 °C.

F2.1 - As frações de 11 - 15 são constituídas por uma substância verde amarelada de consistência oleosa denominada de C-1, não identificada.

F2.2 - As frações 16 - 18 também de consistência oleosa, mas de coloração

marrom escuro.

F2.3 - As frações 19 - 20 de constituição oleosa com coloração vermelho castanho, foi denominado de C-2.

F2.4 a F2.6 - As frações de 21 - 28 são constituídas por uma mistura de compostos oleosos de cor castanho.

F2.7 - Nas frações 30 - 32 obteve-se um composto sólido de cor amarelo claro, denominado de C-4, o qual foi identificado como sendo a Volkensiflavona.

F2.8 - Nas frações 33 - 43 de consistência sólida e cor amarelo gema, constituída de uma mistura de três compostos foi reservada para posterior purificação.

F2.9 - As frações 44 - 49 também constituída de uma mistura sólida de compostos, de cor amarela mais forte. Pela análise por CCD observou-se que esta fração continha dois dos compostos da fração anterior além de outros mais polares, sendo então reservado para futura purificação.

F2.10 - As frações de 50 - 54, sólida de coloração amarelo queimado, apresentaram-se como uma mistura complexa de substâncias.

F2.11 - Finalmente nas frações 55 - 58 também apresentaram uma mistura complexa de substâncias sólidas de cor marrom café.

O mesmo procedimento acima descrito, foi utilizado para processar o restante da fração F2 (9,282 g), dividido em três operações separadas.

Após o término das quatro colunas, que processaram o fracionamento de um total de 12,282 g de F2, os grupos de frações correspondentes foram reunidas resultando nas seguintes quantidades: F2.1 = 80 mg; F2.2 = 17 mg; F2.3 = 27 mg; F2.4 a F2.6 = 203 mg; F2.7 = 1,2440 g; F2.8 = 6,8760 g; F2.9 = 1,6540 g; F2.10 = 1,1310g e F2.11 = 1,0350 g.

#### **3.8.4 - Separação dos Constituintes Ativos da Fração F2.8 em Coluna**

A fração F2.8 (6,8760 g) foi dividida em duas porções de 3,4380 g, dissolvidas em um mínimo de acetona, misturada a 7 g de sílica gel 60 ( 230 - 400 mesh ) e



evaporado até a secura sob ventilação de ar quente para a formação das respectivas pastilhas. Cada pastilha foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 ( 230 - 400 mesh ), com 3,3 cm de diâmetro por 30 cm de altura, utilizando-se como eluente acetato de etila, hexano e etanol em escala crescente de polaridade, com uma vazão de 2,5 mL por minuto, conforme resumido no quadro abaixo.

Hexano (%)	Acetato de Etila (%)	Frações eluídas	Frações reunidas
50	50	1 - 2	F2.8-1 (1-13)
40	60	3 - 6	F2.8-2 (14-15)
30	70	7 - 8	F2.8-3 (17-20)
30	70	9 - 20	F2.8-4 (21)
20	80	21 - 23	F2.8-5 (22-24)
10	90	24 - 26	F2.8-6 (25-29)
-	100	27 - 30	F2.8-7 (30)
-	Etanol	31 - 34	F2.8-8 (31-34)

Foram coletadas 34 frações de 200 mL e reunidas de acordo com monitoramento por cromatografia em camada delgada ( CCD ). Reunindo as frações das duas colunas obteve-se sete grupos de frações os quais foram concentrados em rotavapor a temperatura de 50 °C.

Desta forma as frações 14 - 15 (18 mg) apresentaram um composto de consistência oleosa, amarelo esverdeado, o qual foi denominado de composto C-3.

Nas frações 17 - 20 (1,3860 g) isolou-se outra parte do composto C-4 (Volkensiflavona).

A fração 21 permaneceu uma mistura dos compostos C-4 e C-5.

Nas frações 22 - 24 (1,6430 g) obteve-se o composto C-5, identificado como o fukugetin.

As frações 25 - 29 contém a mistura dos compostos C-5 e C-6.

A fração 30 (34 mg) , sólido verde amarelado, é uma mistura complexa.

Nas frações 31 - 34 (350 mg) apresentou um sólido marrom escuro sem resolução nas condições ( CCD ) realizadas.

### 3.8.5 - Separação dos Constituintes Ativos das Frações F2.8-4 e F2.8-6

As frações F2.8-4 e F2.8-6, contendo os compostos C-4, C-5 e C-6, foram reunidas (3,4050g) e submetidas a cromatografia em coluna de altura de sílica gel (230 - 400 mesh), com 3,3 cm de diâmetro por 30 cm de altura, usando como eluente acetato de etila, hexano e etanol com um gradiente crescente de polaridade e uma vazão de 2,5 mL por minuto, conforme o quadro abaixo.

Hexano (%)	Acetato de Etila (%)	Frações eluídas	Frações reunidas
40	60	1 - 13	F2.8-4/6-1 (7)
35	65	14 - 16	F2.8-4/6-2 (8)
30	70	17 - 20	F2.8-4/6-3 (9)
20	80	21 - 22	F2.8-4/6-4 (10-26)
-	100	23 - 26	F2.8-4/6-5 (27-29)
-	Etanol	27 - 36	F2.8-4/6-6 (30-36)

Num total de 36 frações coletadas de 130 mL e reunidas de acordo com monitoramento por CCD, foram isolados na fração 7, 29 mg do C-4, na fração 8 (141 mg) ficou uma mistura do C-4 e C-5 e na fração 9 obteve-se 492 mg do C-5. Nas frações 10 - 26 mantiveram os compostos C-5 e C-6 (2,6550 g), e nas frações 27 - 29 (37 mg) apresentou um material sólido de cor marrom avermelhado. Por final nas frações 30 - 36 (36 mg), um material também sólido de cor bege, sendo esse dois últimos ficaram na base do cromatograma.

### 3.8.6 - Separação dos Constituintes Ativos das Frações F2.8-4/6-2 e F2.8-4/6-4

As frações F2.8-4/6-1 e F2.8-4/6-4 (2,7960 g), contendo os C-5 e C-6, foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica gel (230 - 400 mesh), com 3,3 cm de diâmetro por 30 cm de altura, usando como eluente acetato de etila e hexano, com uma vazão de 2,5 mL por minuto, conforme quadro abaixo.

Hexano (%)	Acetato de Etila (%)	Frações eluídas	Frações reunidas
60	40	1 - 3	F2.8-41 (23-30)
50	50	4 - 7	F2.8-42 (31)
40	60	8 - 28	F2.8-43 (32-39)
30	70	29 - 41	F2.8-44 (40-45)
20	80	42 - 45	F2.8-45 (46-53)
10	90	46 - 47	
-	100	48 - 53	

Foram coletadas 53 frações de 125 mL e reunidas de acordo com o monitoramento em CCD e concentradas em evaporador rotatório a temperatura de 50 °C.

Nas frações 23 - 30 obteve-se mais 43 mg do composto C-4, na 31 (81 mg) uma mistura do C-4 e C-5, e as frações 32 - 39 (2,10 g) isolou-se o composto C-5. As frações 40 - 45 ( 0,4920 g ) permaneceu os compostos C-5 e C-6 e finalmente as frações 46 - 53 (102 mg) obteve-se o composto C-6, um sólido amarelo, identificado como o fukugeside.

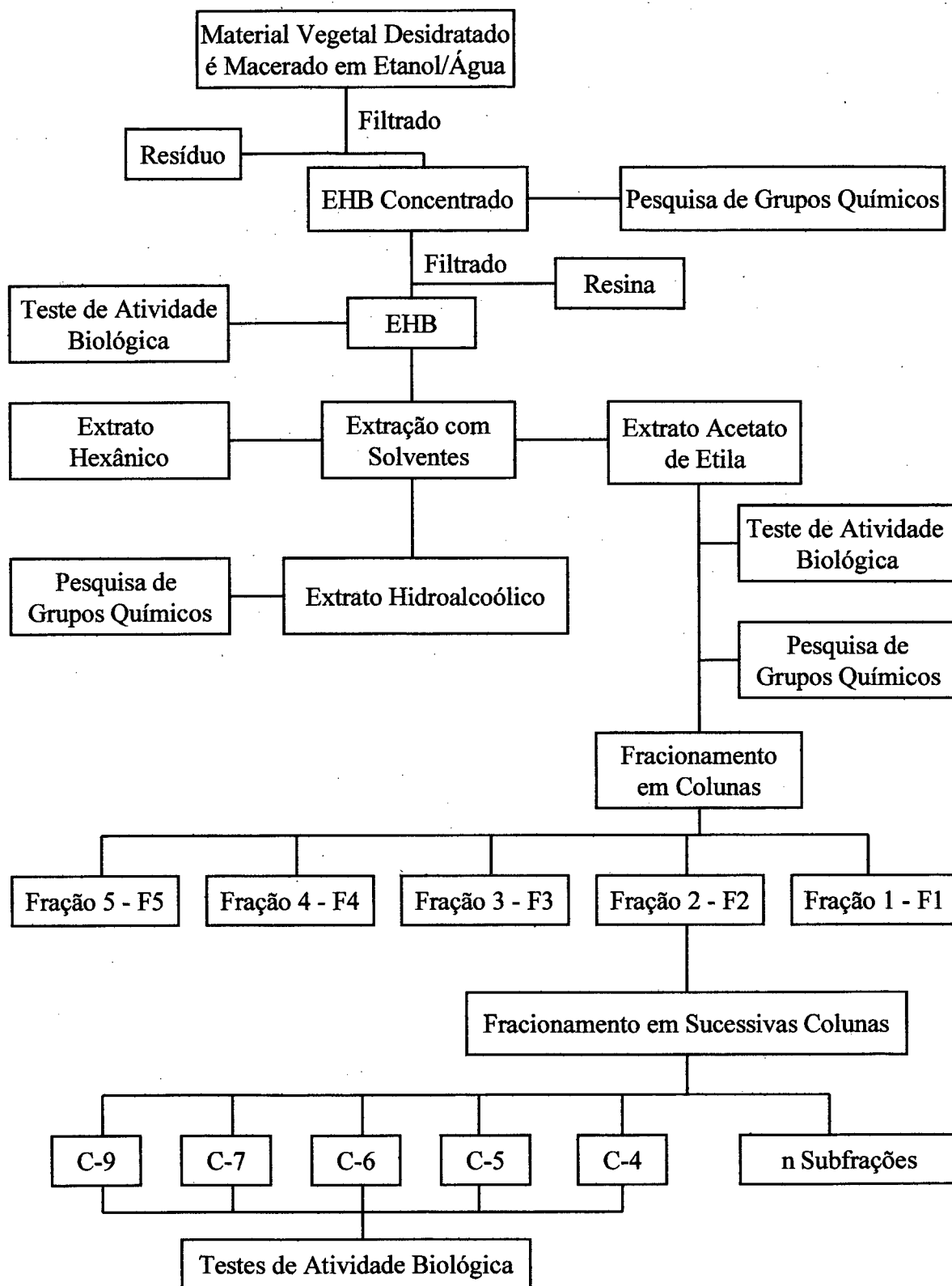
### 3.8.7 - Separação dos Constituintes Ativos da Fração F2.9 em Coluna

A fração F2.9 (1,6540 g) resultante do fracionamento de F2, dissolvida em acetona foi acrescido 4g de sílica gel 60 (230 - 400 mesh) e evaporado sob ventilação de ar quente até a secura para formação da pastilha. A pastilha foi cromatografada através

de uma coluna de sílica gel 60 (230 - 400 mesh), com 3,3 cm de diâmetro por 30 cm de altura, usando como eluente acetato de etila, hexano e etanol, com uma vazão de 2 mL por minuto. O objetivo é isolar maior quantidade do C-6, além de outros compostos acima deste, conforme segue.

Hexano (%)	Acetato de Etila (%)	Frações eluídas	Frações reunidas
40	60	1 - 7	F2.9-1 (4-5)
30	70	8 - 9	F2.9-2 (6-9)
20	80	10 - 13	F2.9-3 (10)
10	90	14 - 19	F2.9-4 (11)
-	100	20 - 22	F2.9-5 (12-13)
-	Etanol	23 - 35	F2.9-6 (14-17)
			F2.9-7 (18-27)
			F2.9-8 (22)
			F2.9-9 (23-24)
			F2.9-10 (25-27)

Foram coletadas 35 frações de 125 mL e reunidas segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada - CCD. Desta forma das frações 4 - 5 obteve-se o C-1 (27 mg), de 6 - 9 o C-3 (21 mg), a fração 10 o C-4 (129 mg) e a fração 11 uma mistura dos compostos C-4 e C-5 (186 mg). Nas frações 12 - 13 separou mais do C-5 (0,4090 g), e as frações 14 -17 obteve-se o C-6 com traços do C-5 (0,298 g), as frações 18 - 21 (111mg) são constituídas por um composto sólido de cor amarelo, sendo este o composto C-7 identificado como Epicatequina. A fração 22 (152 mg) apresentou um composto sólido C-8, de cor bege o qual não foi identificado. Nas frações 23 - 24 (256 mg) apresentaram um outro composto denominado de C-9, sólido também de cor bege o qual foi identificado como sendo um biflavonóide GB 2a-7-glucoside. E por último as frações 25 - 27 (46 mg) contém uma mistura de compostos.



**FIGURA 4 - Esquema de Extração dos Compostos de *Rheedia gardneriana***

## **3.9 – DERIVATIZAÇÃO DOS BIFLAVONÓIDES**

### **3.9.1 - Acetilação da Volkensiflavona**

104 mg da volkensiflavona foi dissolvida em 5 mL de acetato de etila e adicionado, com agitação, 2 mL de ácido acético, 3 mL de anidrido acético e uma quantidade catalítica de dimetilaminopiridina e deixado sob refluxo por 1 hora e 30 minutos. Após realizou-se uma cromatografia em camada delgada, mostrando que a reação havia ocorrido completamente.

A mistura reacional foi evaporada até secura, em evaporador rotatório, com a adição de 10 mL de etanol P.A. por 4 vezes sucessivas, resultando num óleo amarelo, que foi dissolvido em clorofórmio e filtrado através de uma coluna com sílica gel 60 ( 230 - 400 mesh ). Inicialmente saiu um óleo amarelo e em seguida o produto da reação, o qual após a evaporação do solvente em rotavapor e dessecador, resultou em 130,98 mg de um sólido branco correspondendo a um rendimento de 96 %.

Repetiu-se essa reação com 200 mg do composto, sem aquecimento, sob monitoramento em CCD e observou-se que a peracetilação ocorre em aproximadamente 20 minutos, a temperatura ambiente.

### **3.9.2 - Acetilação do Fukugetin**

A 200 mg de fukugetin em 5 mL de acetato de etila, foram adicionados, com agitação, 2 mL de ácido acético, 3 mL de anidrido acético e 1 mL de piridina. O monitoramento por CCD mostrou que a peracetilação ocorre em 20 minutos, a temperatura ambiente.

A mistura reacional foi evaporada em evaporador rotatório, com a adição de 10 mL de etanol por 4 vezes sucessivas. O resíduo obtido foi dissolvido em clorofórmio e filtrado através de uma coluna contendo sílica gel 60 ( 230 - 400 mesh ). Após a remoção de todo solvente, obteve-se 240 mg do produto peracetilado na forma de um sólido amorfo, amarelo claro, correspondendo a um rendimento de 87,10 %.

### 3.9.3 - Benzoilação da Volkensiflavona

100 mg da volkensiflavona foi dissolvida em 1,5 mL de piridina e adicionado 0,2 mL de cloreto de benzoila, sob agitação e à temperatura ambiente com monitoramento por CCD. Em 5 minutos todo o composto havia reagido e, manteve-se a agitação por mais 25 minutos.

A mistura reacional foi transferida para um funil de separação contendo 50 mL de água destilada a  $\text{pH} \pm 2$  com ácido clorídrico. Efetuou-se a extração por três vezes sucessivas, com 50 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e evaporado todo o solvente em rotavapor. Novamente em funil de separação, com 50 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 5 %, extraiu-se 3 vezes com 50 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi levada a secura obtendo-se 173 mg do produto, sólido de cor bege com 97,80 % de rendimento.

### 3.9.4 - Benzoilação do Fukugetin

623 mg do composto foi dissolvido em 6 mL de piridina e adicionado, sob agitação, 1,2 mL de cloreto de benzoila à temperatura ambiente durante 10 minutos.

Para a purificação do produto prosseguiu-se conforme o item 3.9.3, obtendo-se um produto sólido ( 1205 mg ) de cor amarelo pálido correspondendo a um rendimento de aproximadamente 100 %.

### 3.9.5 - Metilação do Fukugetin

110 mg do composto dissolvido em 20 mL de \*acetona seca, foram adicionados, sob agitação, 300 mg de carbonato de potássio e 0,4 mL de iodeto de metila. A reação foi mantida em refluxo durante 1 hora e 45 minutos, monitorada por CCD. Em seguida a mistura reacional foi filtrada através de uma coluna com sílica gel (230 - 400 mesh), usando acetona como solvente. Evaporou-se o solvente e obteve-se um produto sólido, amarelo queimado (122 mg) com 98,5 % de rendimento.

\* A acetona foi seca em sulfato de magnésio, 25g / litro, agitado por 3 horas mais o tempo suficiente para decantação e destilado sob novo sulfato de magnésio. O primeiro destilado foi descartado e na sequência recolhido em elermyer com o mesmo secante.

### **3.9.6 - Metilação da Volkensiflavona**

110 mg da volkensiflavona foi dissolvido em 20 mL de acetona seca, e foram adicionados, sob agitação, 300 mg de carbonato de potássio, 0,4 mL de iodeto de metila e levado ao refluxo durante 30 minutos, sendo acompanhado por CCD. Foi evaporado a acetona e filtrou-se a mistura através de uma coluna com sílica gel (230 - 400 mesh), usando como solvente acetato de etila. Após a remoção do solvente por evaporação, obteve-se um composto sólido de cor amarelo gema (119 mg) com rendimento de 98,35%.

### **3.9.7 - Etilação do Fukugetin**

110 mg do composto foi dissolvido em 20 mL de acetona seca, e adicionados, sob agitação, 300 mg de carbonato de potássio e 400 mg de iodeto de etila, e levado à refluxo durante 17 horas, monitorado por CCD, mostrando quatro produtos da reação. Após, a acetona foi evaporada e o produto foi filtrado em uma coluna cromatográfica de sílica gel 60, com acetona e levado a secura em rotavapor.

O resíduo foi redissolvido em acetona e acrescentado 1 g de sílica gel e evaporado

até a secura sob ventilação de ar. A mistura foi eluída através de uma coluna de sílica gel 60 (230 - 400 mesh), com 1,2 cm de diâmetro e 30 cm de altura, usando como eluente acetato de etila, hexano e acetona, como segue:



Hexano (%)	Acetato de Etila (%)	Frações eluídas	Frações reunidas
50	50	01 - 04	FEF-1 (02-04)
30	70	05 - 07	FEF-2 (05-07)
-	100	08 - 11	FEF-3 (08-09)
-	Acetona	12 - 15	FEF-4 (10-12)
			FEF-5 (13-15)

Foram coletadas 15 frações de 20 mL e reunidas de acordo com monitoramento por CCD.

Com a purificação obteve-se três produtos conforme seleção das frações, descrito a seguir.

Nas frações 2 - 4 foi separado um composto de consistência oleosa de coloração amarelo escuro denominado de 5<sub>1</sub> (46 mg), as frações 5 - 7 obteve-se um composto sólido amarelo gema representado por 5<sub>2</sub> (32 mg), nas frações 8 - 9 apresentou um composto sólido de cor amarela o qual foi denominado de 5<sub>3</sub> (15 mg), e por último as frações 10 - 12 consistia de uma mistura do composto de partida (C5) e o terceiro da coluna (8 mg).

Procedeu-se outra reação de etilação igualmente a primeira, com as mesmas quantidades de reagentes, e com tempo de refluxo de duas horas e vinte minutos ocorrendo a reação completa, obtendo os três produtos conforme mencionados na reação acima, porem com rendimentos diferentes. O primeiro, 5<sub>1</sub> com 24 mg, segundo 5<sub>2</sub> rendeu 66 mg e o terceiro composto 5<sub>3</sub> com 7 mg.

### 3.10 - ANÁLISE FARMACOLÓGICA

Os ensaios de atividade farmacológica (analgésica e antiinflamatória) foram realizados no laboratório de farmacologia do Departamento de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Regional de Blumenau - FURB, sob orientação do Professor Cláudio L. Guimarães.

### 3.10.1 - Animais Utilizados

Foram utilizados camundongos “Swiss” ( $30 \pm 5$  g) e ratos “Wistar” (150 a 200 g) de ambos os sexos, criados no Biotério Central da FURB. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (15 - 20 por caixa), em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro (luz ligada das 6 às 18 horas). Água e ração (Nuvilab®, Nuvital) foram fornecidas *ad libitum* 12 horas antes dos testes.

### 3.10.2 - Sais, Drogas e Soluções

As soluções foram preparadas com água bidestilada e deionizada e sais com grau de pureza analítica (Merck A.G., Rio de Janeiro, Brasil). Foram utilizadas as seguintes drogas: indometacina (Indocid®), fentanil (Fentanil®) naloxona (Narcan®), ácido acético glacial P.A. (Merck), formalina à 38% e álcool etílico P.A., ambos da empresa Reagen. A indometacina foi diluída em solução de carbonato de sódio à 5%. Naloxona, fentanil e o Extrato Hidroalcoólico Bruto - EBH em solução salina à 0,9%.

### 3.10.3 - Contorção Abdominal

Como agente álgico os animais receberam ácido acético (0,6%, 60 mg/kg, por via intraperitoneal) e 5 minutos após a administração, as contorções abdominais foram contadas cumulativamente durante 15 minutos [48, 49].

Em outros grupos, os animais receberam doses únicas e distintas do extrato hidroalcoólico bruto - EBH ou por via intraperitoneal (2,5 - 50 mg/kg) ou por via oral (200 - 800 mg/kg). Outros camundongos receberam 50 mg/kg do EBH nos seguintes intervalos de tempo: 60, 120, 240 e 360 minutos antes da administração de ácido acético.

Como controle positivo, um grupo de animais recebeu indometacina (0.1, 0.3, 1.0

e 3.0 mg/kg) 30 via intraperitoneal ou 60 minutos via oral antes da administração dos agentes álgicos.

A inibição das contorções abdominais pelo EBH ( $\pm$  DE<sub>50</sub>, administrada 30 minutos antes dos agentes álgicos, via intraperitoneal) foi avaliada em grupos de animais tratados com naloxona (10 mg/kg, via intraperitoneal) 10 minutos antes do EBH. Este último protocolo teve por objetivo avaliar o possível envolvimento do sistema opióide no mecanismo de ação do EBH da *Rheedia gardneriana* sobre o processo da dor.

#### **3.10.4 - Teste da Formalina**

Formalina à 2,5%, como agente flogístico/álgico, foi administrada (20  $\mu$ l) em uma das patas posteriores (região plantar) enquanto que na outra pata foi administrada salina (0,9%) estéril como controle [50, 51]. Neste modelo experimental são evidenciadas duas fases álgicas distintas. A primeira, dor nerogênica, inibida por agonistas opióides, ocorre nos primeiros 5 minutos enquanto que a segunda fase, dor inflamatória, ocorre aproximadamente após os 15 minutos. Após a administração da formalina, foi cronometrado cumulativamente o tempo gasto pelo animal em lambe a pata durante a primeira e segunda fase. Decorrido 35 minutos, o animal foi sacrificado por deslocamento cervical e ambas as patas posteriores foram exisadas e pesadas com o objetivo de avaliarmos o volume do edema.

Nos primeiros grupos, os animais receberam doses únicas e distintas (1 - 10 mg/kg) do EBH por via intraperitoneal, 1 hora antes da administração da formalina.

A partir dos resultados obtidos foi calculada a DL<sub>50</sub>, ou seja, a dose responsável por inibir 50% do tempo do "licking" em relação ao grupo controle, e administrada então nos seguintes intervalos de tempo: 60, 120, 240, 360 e 480 minutos antes da administração de formalina. Outros animais foram divididos em 5 grupos e receberam o EBH via oral (5 - 100 mg/kg, 1 h).

Em outros camundongos, foi administrada indometacina (10 mg/kg, por via intraperitoneal, 1 h) ou fentanil (0,5 mg/kg, por via intraperitoneal) 5 minutos antes da administração intraplantar de formalina.

### **3.10.5 - Teste da Placa Quente**

Neste modelo experimental foi avaliada a latência dos animais em relação ao tempo necessário para que os mesmos levassem uma patas anteriores à boca e a lambesse, quando submetidos a uma placa de alumínio pré aquecida à  $55 \pm 1$  °C [52]. O tempo máximo que os animais foram expostos à placa não ultrapassou os 30 segundos. Primeiramente, cada grupo de animais ( $\pm 6$  por grupo) foi exposto à placa e foram utilizados os animais na qual a sua latência ficou na média  $\pm 1$  desvio padrão. Passados 30 minutos, esses animais foram tratados com EBH nas doses de 25 e 50 mg/kg do EBH, por via intraperitoneal, e expostos à placa a intervalos de 30 e 60 minutos após a administração.

Como controle, um grupo de animais foi tratado com fentanil (0,5 mg/kg, via intraperitoneal) 5 minutos antes da segunda exposição à placa.

### **3.10.6 - Pleurisia em Ratos**

Foi administrado por via intratorácica 0,1 mL de carragenina (2%), após 4 horas os animais foram sacrificados por overdose de éter sulfúrico e a cavidade torácica foi aberta e lavada com 2 mL de salina (0,9 %) heparinizada (10 UI/mL).

Do exsudado foi avaliado o volume e também o número total e específico de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mononucleares).

O número total de leucócitos foi avaliado em câmara de Neubauer após diluição do exsudato (1:20) com solução de Türk (ácido acético a 2 % com violeta de gensiana a 0,001 %). A contagem específica das células brancas foi avaliada em lâminas de citologia.

Após sedimentação e secagem de 0,3 mL do exsudado em câmara de Suta, as lâminas foram coradas com corante de May-Grunwald-Giemsa.

Alguns grupos de animais foram sensibilizados previamente com ovalbumina (50 µg por cavidade) por via intratorácica. Passadas 48 horas, os animais foram sacrificados com éter sulfúrico e a cavidade torácica foi aberta e colhido o exsudato. Avaliou-se o volume do exsudato e os leucócitos, como apresentado anteriormente.

Grupos controles positivos foram realizados para averiguar a inibição da pleurisia através da administração intraperitoneal de indometacina (10 mg/kg; nos animais tratados com carragenina).

Grupos distintos de animais (6 a 8 em cada grupo) receberam, 60 minutos antes da administração do agente flogístico, doses distintas do extrato bruto hidroalcoólico de *Rhedia gardeneriana*. Nos animais sensibilizados ativamente com ovalbumina foi administrada dose de reforço 23 horas após a primeira.

### **3.10.7- Análise Estatística**

A análise Estatística dos resultados foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA) ou através do teste “t” de Student para amostras pareadas ou não pareadas quando mais apropriado [53]. Diferenças entre grupos com níveis de probabilidade menores do que 5 % ( $P < 0,05$ ) foram consideradas estatisticamente significantes. No cálculo da dose inibitória 50% ( $DL_{50}$ ) foi utilizado o método Litchfield-Wilcoxon.

### **3.11- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no laboratório de microbiologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da U.F.S.C., sob a orientação do Professor Dr. Artur Smânia Junior.

As atividades antibacterianas foram determinadas nos extratos Acetato de Etila - AcOEt, Aquoso e compostos isolados e derivados através do método de difusão em agar. Para os compostos isolados foram determinadas as Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

### 3.11.1 - Bactéria

Para a realização dos testes de difusão e a determinação das CIM e CBM foram utilizadas cinco espécies de bactérias: *Bacillus cereus* MIP 96016, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Staphylococcus saprophyticus* MIP 97018 (MIP, Departamento de Microbiologia e Parasitologia). Uma suspensão de cada uma destas bactérias em caldo de cultura Mueller-Hinton, a uma concentração de aproximadamente  $10^6$  UFC . mL<sup>-1</sup>, foram usadas para o crescimento bacteriano. Todas as culturas de bactérias foram incubadas sob condições aeróbicas.

### 3.11.2- Teste de difusão em Agar

As placas com o meio de cultura para os testes de difusão foram preparadas da seguinte maneira: 18 mL de agar Mueller-Hinton foram vertidos em placas de Petri (13 x 100 mm). Após a solidificação do meio foram feitos seis poços de 7 mm de diâmetro para conter o material a ser testado.

As culturas das bactérias, que cresceram durante a noite em caldo Mueller-Hinton, foram diluídas a uma concentração final de aproximadamente  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A suspensão bacteriana foi inoculada na superfície do meio agar Mueller-Hinton, anteriormente preparado, com auxílio de um swab de algodão. Os poços foram preenchidos com 50 µl de cada uma das frações (3 mg) ou compostos puros (1 mg) previamente dissolvidas em NH<sub>4</sub>OH 0.1 N. As placas foram incubadas a 36 °C por 20 h.

O resultado positivo foi definido como uma zona de inibição do crescimento bacteriano de 9 mm ou mais de diâmetro [54]. Para simplificar a interpretação dos resultados, os seguintes símbolos foram usados:

0 (inativo), que corresponde a nenhuma zona de inibição ou um halo de inibição do crescimento bacteriano menor que 9 mm;

1 (parcialmente ativo), com uma zona media de inibição entre 9 a 12 mm;

2 (ativo), com uma zona media de inibição entre 13 e 18 mm;

3 (muito ativo), com uma zona de inibição acima de 18 mm [55].

### **3.11.3 - Testes de Diluição para Determinação das CIM e CBM**

Os compostos isolados foram testados contra cinco espécies de bactérias para a determinação das Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). 500 microlitros da suspensão bacteriana em caldo Mueller-Hinton na concentração de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, foram inoculadas em tubos contendo 500 µl da diluição serial dos compostos a serem testados. Os compostos foram dissolvidos em NH<sub>4</sub>OH 0.1 N e diluídos (0.15 a 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>) no mesmo meio de cultura. Os tubos foram incubados a 36 °C por 20 h. A CIM foi definida como a menor concentração de cada substância que foi capaz de inibir completamente o crescimento de cada espécie bacteriana. Os resultados foram expressos em mg ml<sup>-1</sup>. Para as CBMs, uma subcultura foi feita sobre placas contendo o meio de cultura (agar Mueller-Hinton) para cada tubo que não apresentou crescimento aparente. A CBM foi considerada a menor concentração do composto que proporcionou uma redução no número de unidades de formação de colônias acima de 99.9% [54].

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto hidroalcoólico - EBH, 1800 mL, obtido por maceração, com etanol e água, das folhas de *Rheedia gardneriana* (4,120 kg de folhas desidratadas), foi particionado com hexano e acetato de etila. A fração acetato de etila - AcOEt, rica em flavonóides, resultou em 140,86 g de um produto sólido de cor bege, com um rendimento de 3,4 % em relação ao material vegetal seco. A partir dessa fração procedeu-se o fracionamento em colunas de sílica gel para o isolamento e purificação dos constituintes ativos.

### 4.1 - Ensaio Preliminares e Pesquisa de Grupos Químicos

Na tabela 2 (p. 83) são mostrados os resultados obtidos na investigação química preliminar, a partir das folhas, na investigação química do extrato hidroalcoólico bruto, do extrato acetato de etila e do extrato hidroalcoólico, respectivamente. A tabela 3 (p. 84) mostra de forma mais sintética os resultados obtidos para os flavonóides, que é a classe química de maior destaque e de maior interesse neste trabalho.

Os ensaios preliminares foram determinados apenas nos extratos brutos obtidos das folhas da planta e, os resultados alcançados estão na tabela 4 (p. 85).

### 4.2 - Investigação Química Preliminar das Folhas de *Rheedia gardneriana* Planch et Triana

Os resultados obtidos nas análises preliminares realizadas com material extraído das folhas de *Rheedia gardneriana* (tabela 2 p. 83) demonstram que a planta é rica em flavonóides, saponinas, taninos condensados e resinas, e estão assinalados com “++”. As classes de compostos químicos assinalados com um sinal positivo “+”, foram determinados como estando presente em teores mais baixos. As classes assinaladas com o

sinal “-“ apresentam resultados negativos aos ensaios químicos preliminares, mostrando não estar presentes no material estudado. Devido a característica qualitativa dos testes, a determinação de maiores ou menores concentrações dos compostos pesquisados, baseiam-se na visualização da intensidade das cores desenvolvidas diante das reações cromáticas e da formação, com ou sem abundância, de precipitado em algumas reações.

### **4.3 - Investigação Química do Extrato Hidroalcoólico Bruto e da Resina Correspondente**

Na preparação do extrato hidroalcoólico bruto (evaporação do álcool etílico e parte da água), separou um produto resinoso de cor escura, determinado como resina. Apenas alguns testes foram realizados neste material e, constatou-se a ausência de saponinas e a presença de esteróides, resinas e flavonóides.

A tabela 2 (p. 83) mostra o resultado das classes de compostos determinados no Extrato Hidroalcoólico Bruto - EHB. Foi este Extrato o material de partida para as extrações e conseqüentemente a separação dos constituintes ativos.

### **4.4 - Investigação Química dos Extratos Acetato de Etila e Hidroalcoólico**

Com o particionamento do extrato hidroalcoólico bruto, usando acetato de etila, esperava-se obter um resultado melhor em termos de separação dos constituintes químicos (tabela 2 p. 83). Houve separação dos taninos, fenóis e saponinas e, os flavonóides sendo mais indicados para serem os compostos com atividade farmacológica, permaneceram divididos nas duas frações, a aquosa e a orgânica. Os testes indicaram ter uma maior concentração no extrato acetato de etila de: flavonóis, flavanonóis e xantonas. No extrato hidroalcoólico (fase aquosa) as flavanonas indicam ser o constituinte de maior concentração.

Fazendo uma avaliação geral dos extratos, no que se refere ao teor de flavonóides (tabela 3 p. 84), observa-se que esta classe de compostos está presente nos extratos Hidroalcoólico Bruto, Acetato de Etila e Extrato Hidroalcoólico (fase aquosa) respectivos à tabela 2, porém com maior concentração no extrato acetato de etila.

**Tabela 2 - Investigação Química Preliminar de *Rheedia gardneriana*.**

Grupos Químicos Determinados	Material Pesquisado			
	Folhas	EHB	E. AcOEt	EH
Alcalóides	-			
Ácidos orgânicos em geral	+	+		
Ácidos fixos fortes	+			
Bases quaternárias	-			
Esteróides e triterpenóides	+	-		
Fenóis em geral	+	+	+	-
Fenóis em posição O e M livres	+	+		
Flavonóides (Heteros. flavônicos)	++	+	+	+
flavonóis		+	+ *	+
flavanonóis		+	+ *	+
flavanonas		+	+	+ *
flavonas		+	+	+
xantonas		+	+ *	+
chalconas e auronas		+	+	-
Heterosídeos antraquinônicos				
antraquinonas e quinonas	-			
Heterosídeos antociânicos				
antocianidinas, antocianinas	-	-		
Heterosídeos cumarínicos	-			
Resinas	++	-		
Taninos hidrolisáveis	-			
Taninos condensados	++	+	-	+
Leucoantocianidinas			+	-
Saponinas	++	+	-	+

- = Resultado negativo

+ = Resultado positivo

++ = Positivo, apresentou resultados com maior intensidade

\* = Apareceu mais do que uma vez nos testes (suspeito de ser o constituinte de maior concentração)

**Folhas** = Foi feita uma série de extrações, diferentes do EHB

**EHB** = Extrato hidroalcoólico bruto (a partir das folhas)

**E. AcOEt** = Extrato acetato de etila (a partir do EHB)

**EH** = Extrato hidroalcoólico (fase aquosa da extração com acetato de etila)

**Tabela 3 - Resumo para Flavonóides dos Extratos Hidroalcoólico Bruto, Acetato de Etila e Hidroalcoólico, Tabela 2**

Compostos Químicos Pesquisados	Resultados		
	EHB	E. AcOEt	EH
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	+	++	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	+	++	+
Chalconas e auronas	+	+	-
Flavanonóis	+	++	+
Flavanonas	++	+	++

- = Resultado negativo

+ = Resultado positivo

++ = Indica maior intensidade do que o extrato correspondente para os mesmos compostos.

**Tabela 4 - Ensaio preliminares realizados com os extratos das folhas da *Rheedia gardneriana* Pl. e Tr.**

Pesquisa realizada	Resultados
Extrato hidroalcoólico em maceração	
Cor	Verde amarelado
Odor	mascarado pelo álcool
pH	± 5,0
Sabor	Adstringente
Extrato aquoso em maceração	
Cor	Amarela
Odor	Chá
pH	± 4,5
Sabor	Adstringente
Extrato hidroalcoólico bruto concentrado	
Cor	Castanho avermelhado
Odor	Doce (mel)
pH	± 4,0
Sabor	Adstringente

#### **4.5 - Compostos Isolados da Fração Acetato de Etila de *Rheedia gardneriana***

O fracionamento do extrato AcOEt em sucessivas colunas de sílica gel, utilizando como eluente hexano, acetato de etila, etanol e acetona, permitiu o isolamento de cinco compostos, com os seguintes pontos de fusão e rendimentos em relação às folhas desidratadas e ao extrato acetato de etila, respectivamente: **Volkensiflavona - C4** PF 190 - 193 °C, 3,4840 g, 0,085 % e 8,71 %. **Fukugetin - C5** PF 248 - 251 °C, 6,0976 g 0,148 % e 15,24 %. **Fukugeside - C6** PF 223 - 227 °C, 0,321 g, 0,0078 % e 0.80%. **Epicatequina - C7** PF 154 - 157 °C, 0,152 g, 0,0037 % e 0,38 %, e por último o **GB 2a - 7 - glicoside - C9** com PF 209 - 212 °C, 0,816 g, 0,020 % e 2,04 %. Os compostos C7 e C9 também estão presentes nas subfrações mais polares, não processadas neste trabalho, podendo serem isolados e obter um rendimento melhor.

Dos compostos descritos apenas os três primeiros já tinham sido isolados desta planta [29, 35], sendo que o C7 e C9 são inéditos no gênero, de acordo com a bibliografia.

O grande número de compostos existentes nesta fração e o grau de polaridade similar dos princípios ativos isolados tornam um tanto difícil a separação e purificação dos mesmos.

#### 4.5.1 - Identificação da Volkensiflavona ( C4 )

O composto C4 após purificação por filtração em colunas de sílica gel, apresentou ponto de fusão 190 - 193 °C.

Na região espectral do infra vermelho (espectro 1 p. 125) observou-se uma série de absorções que permitiram identificar a presença de grupos OH fenólico, através de bandas largas de absorção na região de 3300  $\text{cm}^{-1}$ , de duas carbonilas conjugadas (ao anel aromático) pela forte absorção em 1638 e 1630  $\text{cm}^{-1}$ , além de absorções na região de 1516 a 1632 devido as vibrações C=C aromáticos.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 2 p. 126) são observados as absorções em 12,33 e 12,17 ppm para dois grupos OH quelados, característico de biflavonóides. Os sinais em 2,61 e 4,75 ppm para os hidrogênios I-H3 e I-H2 respectivamente, indicam a presença de uma metade flavanona. Uma metade flavona pôde ser caracterizada pela presença do singlete em 5,96 ppm, correspondente ao hidrogênio II-H3. Estas observações indicam que o composto C4 é um biflavonóide flavanona-flavona. Isto é confirmado no espectro de  $^{13}\text{C}$  através dos sinais característicos dos carbonos C2 e C3 do anel "C" de flavonas e flavanonas.

O par de dupletes centrados em 7,23 e 6,71 ppm, com integração de 4 hidrogênios cada, e constante de acoplamento,  $J = 8,0 \text{ Hz}$  para hidrogênios orto correlacionados, são atribuídos aos hidrogênios H2' 6' e H5' 3' dos anéis I-B e II-B.

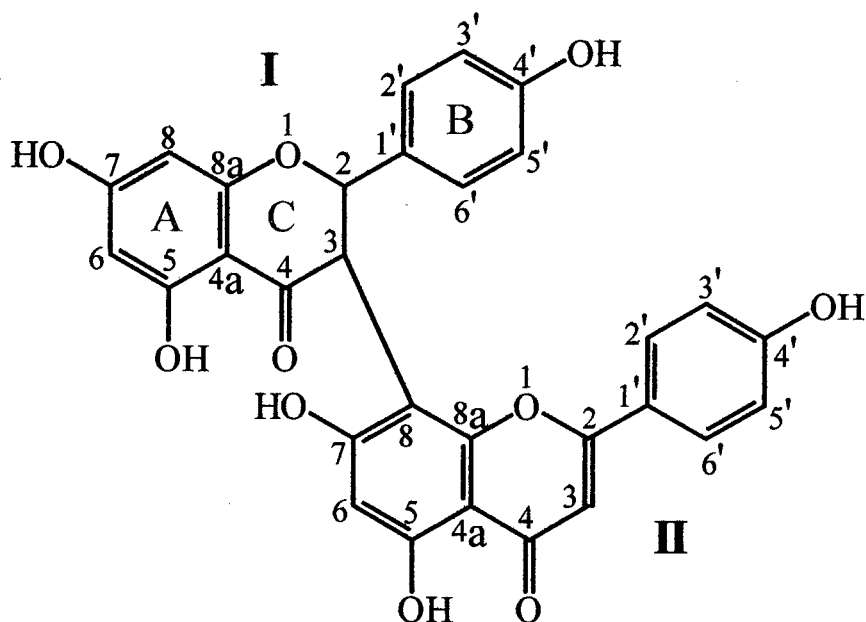
O padrão de substituição dos anéis I-A e II-A são definidos pelos sinais: Um multiplete na região de 6,69 a 7,00 ppm atribuído aos hidrogênios H6 e H8 do anel I-A e definindo-o como C5 - C7 dihidróxi. O singlete que aparece em 5,97 ppm corresponde ao hidrogênio II-H6 da flavona. Estes dados, juntamente com a absorção no espectro DEPT (espectro 4 p. 129) dos sinais em 102,88 ppm para carbono quaternário, atribuído ao carbono II-C8 e 49,02 ppm para um carbono metínico atribuído ao carbono I-C3, sugere que o biflavonóide apresenta uma metade flavanona ligada pelo carbono C3 ao carbono C8 de uma flavona.

A presença de sinais mais largos é explicada devido a sobreposição de sinais dos respectivos atropoisômeros.

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ /DEPT (espectro 3 e 3a p. 127, 128) confirma a presença do esqueleto flavanona através dos sinais em 49,02 ppm (I-C3) e 80,18 ppm (I-C2). Do mesmo modo a metade flavona pode ser identificada pelos sinais em 162,01 e 102,88 ppm, correspondente aos carbonos II-C2 e II-C3 do anel "C" respectivamente.

A análise acima permitiu identificar o composto C4 como sendo a Volkensiflavona.

As atribuições dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  foram realizadas por comparação com os dados da literatura, conforme apresentados na tabela 5 p. 90 [56]. Alguns sinais duplicados são devidos a presença dos atropoisômeros da molécula em solução.



**FIGURA 5 - Estrutura do Composto C4 VOLKENSIFLAVONA**

#### 4.5.2 - Identificação do Fukugetin ( C5 )

O composto C5 após o isolamento e purificação, por colunas em sílica gel apresentou PF 248 - 251 °C.

O espectro na região de infra-vermelho (espectro 14 p. 139) permitiu identificar a presença de grupos OH fenólicos, através de uma larga banda de absorção na região de 3350  $\text{cm}^{-1}$ . As fortes absorções em 1646 e 1640  $\text{cm}^{-1}$  permitiram identificar duas carbonilas conjugadas. A série de absorções na região de 1514 a 1366  $\text{cm}^{-1}$  são devido as vibrações da ligação C=C aromático.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectros 15 e 15a p.140, 141) podemos observar a presença de duas absorções em 13,12 e 12,32 ppm para duas hidroxilas queladas sugerindo um biflavonóide.

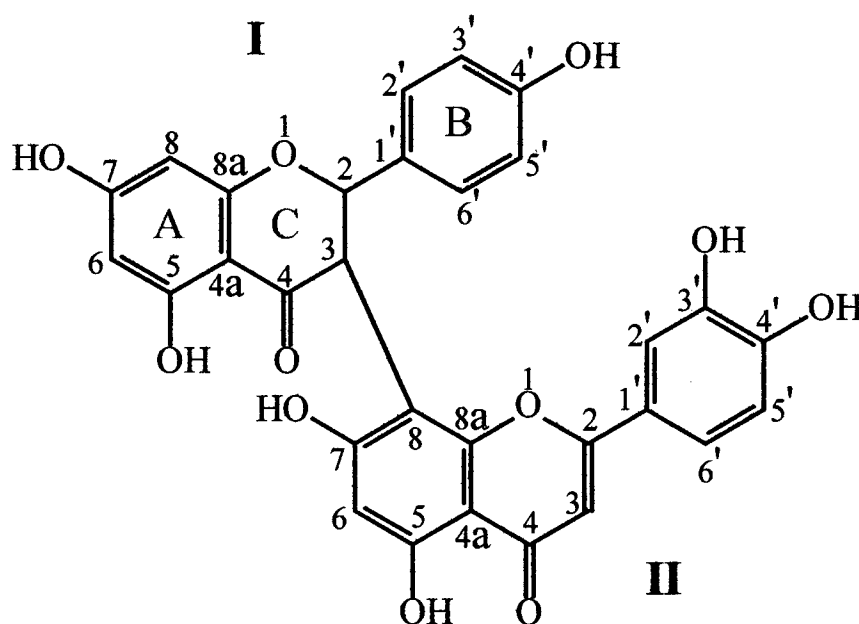
Os sinais na região de 2,60 ppm e 5,0 ppm indicam a presença de um esqueleto flavanona e correspondem aos hidrogênios I-H3 e I-H2 respectivamente. O sinal em 6,33 ppm foi atribuído ao próton II-H3 da metade flavona. Estes dados sugerem um biflavonóide flavanona-flavona análogo a Volkensiflavona.



Os sinais na região de 6.0 a 7,5 ppm correspondem aos hidrogênios dos anéis aromáticos I - II B e I - II A (I-H6 H8, I-H2' H3' H5' H6' e II-H6, II-H2' H5' H6').

Os dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (espectro 16 e 17 p. 142, 143) confirmam a unidade flavanona, do biflavonóide, através dos sinais em 48,04 e 80,60 ppm para os carbonos I-C3 e I-C2. O esqueleto flavona foi identificado através dos sinais em 164,63 e 103,07 ppm atribuídos aos carbonos II-C3 e II-C2. A observação no espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  de um carbono metínico em 48,04 ppm atribuído ao I-C3 e de um carbono quaternário em 104,22 ppm atribuído ao II-C8 indicam um biflavonóide constituído de uma unidade flavanona ligada pelo carbono C3 ao carbono C8 de uma flavona.

Por comparação dos dados de  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  com os dados da literatura, como mostra a tabela 5 p. 90, o composto C5 foi identificado como sendo o Fukugetin [56].



**FIGURA 6 - Estrutura do Composto C5 FUKUGETIN**

C	FUKUGETIN		VOLKENSIFLAVONA	
	Literatura [56]	Experiência	Literatura [56]	Experiência
I - 2	82,30	82,66	81,40	80,18
I - 3	50,10	50,34	48,20	49,02
I - 4	197,20	197,58	196,00	197,29
I - 4a	101,60	101,97	101,70	102,33
I - 5	158,40	158,74	163,70	158,63
I - 6	97,20	97,49	96,40	97,05
I - 7	162,40	162,81	166,60	162,51
I - 8	96,10	96,39	95,30	95,83
I - 8a	164,20	164,64	163,70	164,29
I - 1'	129,80	129,62	128,10	129,96
I - 2'	129,80	129,62	128,10	129,96
I - 3'	115,50	115,80	114,60	115,65
I - 4'	165,70	165,70	162,00	164,80
I - 5'	115,50	115,80	114,60	115,65
I - 6'	129,80	130,40	128,10	129,96
II - 2	164,20	164,64	163,70	162,01
II - 3	103,80	104,06	120,80	102,88
II - 4	183,10	182,47	181,60	183,24
II - 4a	103,00	103,33	100,70	102,33
II - 5	164,90	165,22	160,40	165,46
II - 6	99,60	99,91	98,50	97,56
II - 7	165,60	165,91	162,80	165,18
II - 8	103,90	104,72	100,60	102,88
II - 8a	165,80	167,56	157,30	162,50
II - 1'	120,70	120,85	121,30	131,72
II - 2'	114,20	114,48	128,10	129,96
II - 3'	146,30	146,67	115,90	116,85
II - 4'	150,00	150,48	161,00	167,19
II - 5'	116,50	116,97	115,90	116,85
II - 6'	123,50	123,73	128,10	129,96

**TABELA 5 - Dados de RMN <sup>13</sup>C para o Fukugetin e Volkensiflavona, comparando com os dados da literatura**

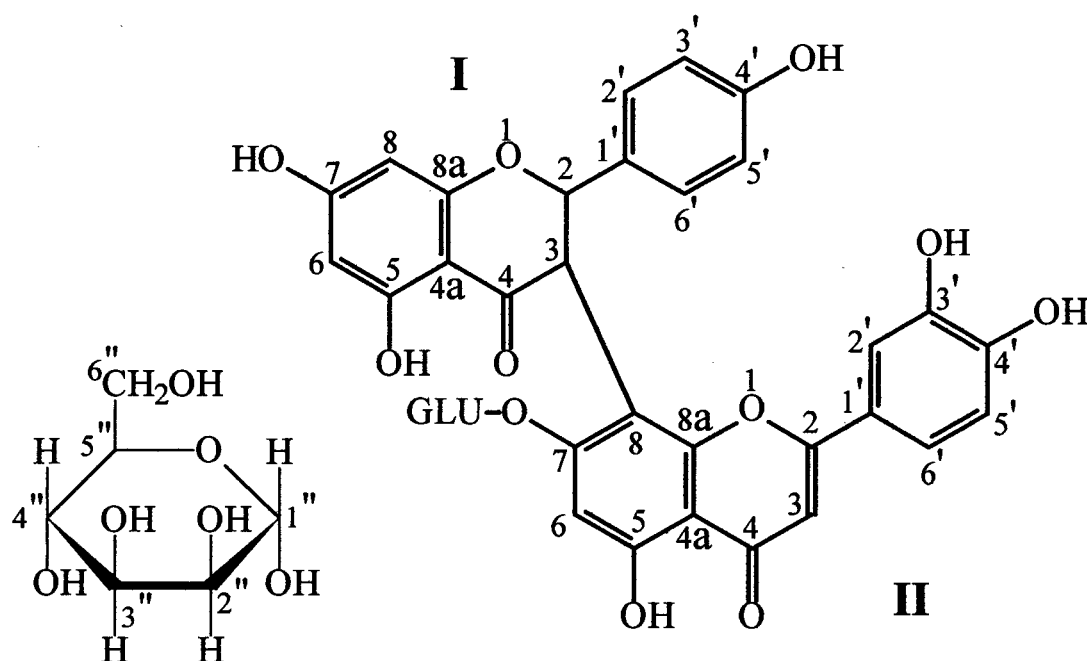
### 4.5.3 - Identificação do Fukugeside ( C6 )

O composto C6 isolado das frações F2.8-4/6-2, F2.8-4/6-4 e F2.9 apresentou ponto de fusão 223 - 227 °C e foi identificado como sendo Fukugeside, com base nos espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C/DEPT e comparados com dados da literatura.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (espectro 34 e 34a p. 161, 162) pode ser observado um perfil de absorções compatíveis com aglicona Fukugetin. As absorções na região de 6,0 a 7,5 ppm foram atribuídos aos prótons aromáticos e os singletos largos em 13,12 e 12,15 ppm indicam a presença de hidroxilas queladas. Pode-se também observar a absorção característica do hidrogênio I-H3 da unidade flavanona na forma de um duplete centrado em 2,70 ppm e o próton I-H2 em 4,85 ppm. Na região de 3,5 a 5,6 ppm aparece uma série de absorções que foram atribuídas a uma unidade de açúcar, onde pode-se observar em 5,96 ppm o pico de absorção do próton anomérico. Desta forma trabalhamos com a hipótese de um Fukugetin glicosilado.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (espectro 35, 35a e 35b p. 163, 164, 165) apresenta sinais característicos para os carbonos I-C2 e I-C3 da unidade flavanona, em 82,2 e 48,5 ppm respectivamente. Também pode-se observar a presença de uma unidade flavona devido as absorções em 164,6 e 103,07 ppm atribuídas aos carbonos II-C2 e II-C3 respectivamente. Estes dados, juntamente com os dados de prótons e os demais sinais de carbono <sup>13</sup>C, na região de aromáticos, são compatíveis com a presença da aglicona Fukugetin, como mostram os dados apresentados nas tabelas 5 e 7 p. 90 e 97. O espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT comprova a presença de uma molécula de açúcar, através das absorções na região de 60 a 80 ppm, o qual foi identificado como sendo uma molécula de glucose. Isto é confirmado no espectro de DEPT (espectros 36 e 36a p. 166, 167) onde observa-se um sinal para CH<sub>2</sub>OH em 61,96 ppm, atribuído ao carbono C6 da glucose. Além dos sinais em 100,9 ppm para o carbono anomérico CH, e mais quatro picos de absorção para carbonos metínicos em 79,87, 77,48, 77,52 e 70,60 ppm.

As atribuições foram feitas com auxílio dos dados da literatura conforme apresentados na tabela 7 p. 97 [57].



### GLUCOSE (GLU)

**FIGURA 7 - Estrutura do Composto C6 FUKUGESIDE**

#### **4.5.4 - Identificação da Epicatequina ( C7 )**

O composto C7 obtido da fração F2.9 p. 69, após purificação por coluna em sílica gel apresentou PF 154 - 157 °C.

As absorções na região espectral do IV (espectro 37 p. 168) nos permitiu identificar a presença de grupos OH fenólicos através de bandas largas em  $3450\text{ cm}^{-1}$  e uma absorção forte em  $1620\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C=C aromático. O espectro de IV também nos indica a ausência de carbonila.

Em análise realizada no espectro RMN  $^1\text{H}$  (espectros 38 e 38a p. 169, 170) pode-se constatar a presença de dois sistemas de prótons aromáticos: O primeiro sistema

atribuído ao anel "B" de um flavonóide aparece na região de 7,2 a 7,9 ppm, onde se pode observar a presença de um duplete centrado em 7,28 ppm com constante de acoplamento 8,0 Hz para prótons orto correlacionados. Um duplo duplete centrado em 7,32 ppm com constantes de acoplamento 8,0 e 2,0 Hz para prótons orto e meta correlacionados. E um duplete centrado em 7,89 ppm com constante de acoplamento 2,0 Hz para prótons meta correlacionados. Estes três sinais apresentados foram atribuídos respectivamente aos prótons H5', H6' e H2' do anel "B" 3', 4' dihidróxi de um flavonóide.

O outro sistema de prótons aromáticos, representado por um par de dupletes centrados em 6,65 e 6,68 ppm, com constantes de acoplamento 2,0 Hz, definem um padrão de substituição 5 e 7 dihidróxi do anel "A" de um flavonóide.

A ausência de sinais de hidrogênio para OH quelado na região 11 a 14 ppm e a presença do sistema de prótons alifáticos na região de 4,7 a 5,3 e 3,3 a 3,5 ppm sugerem uma estrutura flavan-3-ol.

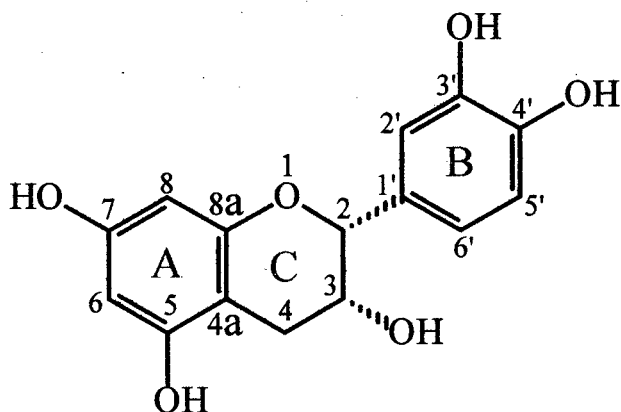
Assim o anel "C" de uma epicatequina foi evidenciado pela presença dos seguintes sinais: Dois duplos dupletes centrados em 3,39 ppm com constantes de acoplamento,  $J = 16,0$  e  $4,5$  Hz e 3,52 ppm com  $J = 16,0$  e  $3,7$  Hz, os quais foram atribuídos ao metileno C4. O próton H3 está representado pelo multiplete em 4,71 ppm e o próton H2 pelo singlete largo em 5,34 ppm.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectros 39, 39a, 39b e 39c p. 171 a 174) pode-se confirmar o anel "C" de um epicatequina através dos sinais em 29,4 ppm para o metileno C4, e em 66,75 e 79,85 ppm para os carbonos metínicos C3 e C2 respectivamente. O anel "A" 5,7-dihidroxi foi confirmado pela presença dos sinais em 95,50 e 96,49 ppm para os carbonos metínicos C8 e C6 respectivamente. O carbono C10 pode ser observado em 99,96 ppm e os carbonos oxigenados C5, C7 e C9 em 158,45, 158,39 e 157,37 ppm respectivamente.

O anel "B", com um padrão de substituição 3',4'-dihidroxi também pode ser verificado pela presença dos sinais correspondentes a três carbonos metínicos C2', C5' e C6' em 115,69, 115,08 e 119,63 ppm respectivamente. O sinal em 131,89 ppm foi

atribuído ao carbono C1' e os sinais para os carbonos oxigenados C3' e C4' foram observados em 146,68 e 146,57 ppm.

A confirmação final da estrutura do composto C7 como sendo Epicatequina foi confirmada com base nos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  em comparação com os dados da literatura (tabela 6 p. 94) [56].



**FIGURA 8 - Estrutura do Composto C7 EPICATEQUINA**

EPICATEQUINA					
C	Literatura	Experiência	C	Literatura	Experiência
2	79,40	79,85	10	99,70	99,96
3	66,90	66,75	1'	132,10	131,89
4	29,10	29,41	2'	115,20	115,69
5	157,40	158,45	3'	145,20	146,68
6	96,20	96,49	4'	145,20	146,57
7	157,40	158,39	5'	115,50	115,08
8	95,70	95,50	6'	119,40	119,63
9	157,00	157,37			

**TABELA 6 - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para a Epicatequina, Comparando com os Dados da Literatura**

#### 4.5.5 - Identificação do GB 2a - 7 - glucoside ( C9 )

O composto C9 isolado da fração F2.9 após purificação por eluição em coluna de sílica gel, apresentou ponto de fusão 209 - 212 °C.

As absorções no espectro de IV (espectro 40 p.175) permitiram identificar a presença de grupos OH fenólicos através da banda larga de absorção na região de 3480  $\text{cm}^{-1}$ . A intensa absorção em 1630  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde aos dois grupos carbonilas conjugadas ( ao anel aromático ). A série de absorções na região de 1550 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  são devido as vibrações da ligação C=C aromático.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectros 41, 41a p. 176, 177) indica a presença de dois sinais em 12,91 e 12,34 ppm atribuídos a dois prótons quelado, o que nos permitiu trabalhar com a hipótese de um biflavonóide. A observação dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , permitiram detectar duas unidades flavanonas, ligadas entre si pelos carbonos I-3 e II-C8.

As duas unidades flavonas foram caracterizadas pelos seguintes sinais: Um duplo duplete centrado em 3,17 ppm com constantes de acoplamento 12,3 e 17,0 Hz, atribuído ao hidrogênio II-H3 $\alpha$ , um duplo duplete centrado em 2,90 ppm, com constantes de acoplamento 12,3 e 2,8 Hz referente ao hidrogênio II-H3 $\beta$  e um duplo duplete centrado em 5,65 ppm com constantes de acoplamento 12,3 e 2,8 Hz para o hidrogênio II-H2. Estes três duplo dupletes definem a unidade flavanona II.

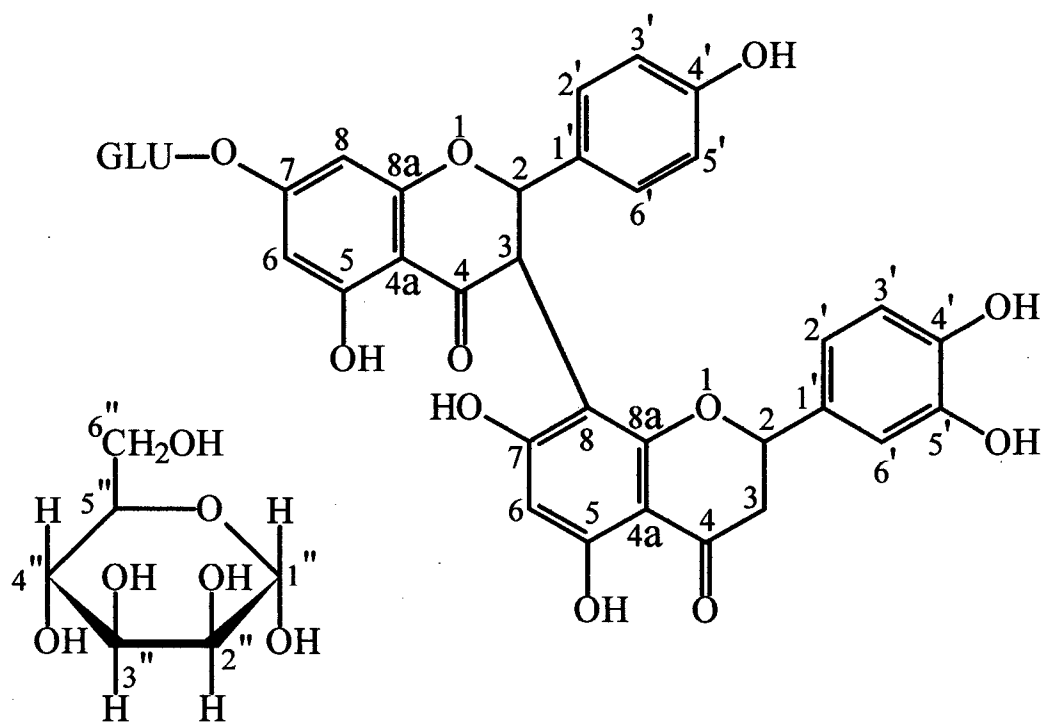
A unidade flavanona I foi definida pelo par de dupletes centrados em 5,34 e 6,57 ppm com constantes de acoplamento igual a 12 Hz referente aos hidrogênios I-H3 e I-H2 respectivamente.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /APT (espectros 42, 42a, 42b, e 42c p. 178 a 181) apresenta sinais para dois carbonos metínicos em 83,40 e 48,10 ppm característicos para os carbonos I-C2 e I-C3 respectivamente, de uma unidade flavanona. A outra unidade flavanona foi identificada através das absorções em 80,00 ppm para um carbono metínico e 44,30 ppm para um carbono metileno, sinais atribuídos aos carbonos II-C2 e II-C3

respectivamente. Estes dados confirmam a estrutura de um biflavonóide flavanona-flavanona ligados entre si pelos carbonos I-C3 e II-C8. A presença de uma unidade de glucose pode ser observada através dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em 6,18 ppm para o próton anomérico e em 4,07, 4,31, 4,45, 5,53 e 5,87 ppm para os demais prótons.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , o grupo metileno da glucose pode ser observado em 61,85 ppm, o carbono anomérico em 101,95 ppm e os demais carbonos na região de 70 a 79 ppm.

A estrutura GB 2a-7-glucoside foi finalmente confirmada por comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  com os dados da literatura [56].



### GLUCOSE (GLU)

**FIGURA 9 - Estrutura do Composto C9 GB 2a - 7 - GLUCOSIDE**



C	FUKUGESIDE		GB 2a - 7 - GLUCOSIDE	
	Literatura [57]	Experiência		Experiência
I - 2	82,40	80,60		83,40
I - 3	48,50	48,04		48,10
I - 4	197,70	197,94		197,80
I - 4a	103,80	101,46		103,70
I - 5	165,80	158,98		165,00
I - 6	98,00	97,32		97,10
I - 7	168,20	162,49		167,70
I - 8	96,70	96,08		97,00
I - 8a	164,10	164,22		164,40
I - 1'	129,70	130,29		130,60
I - 2'	131,00	129,73		131,00
I - 3'	116,50	116,20		116,30
I - 4'	159,90	165,64		159,30
I - 5'	116,50	116,20		116,30
I - 6'	129,60	129,73		130,20
II - 2	165,30	164,63		80,00
II - 3	103,90	103,07		44,30
II - 4	183,00	183,41		197,10
II - 4a	103,50	103,36		102,00
II - 5	162,70	164,63		163,90
II - 6	100,20	99,64		95,80
II - 7	162,20	158,98		163,60
II - 8	103,10	104,22		102,40
II - 8a	156,10	167,47		159,60
II - 1'	122,70	120,96		128,40
II - 2'	114,70	114,57		117,70
II - 3'	148,00	145,73		147,90
II - 4'	152,30	150,73		147,60
II - 5'	115,90	116,46		114,40
II - 6'	120,00	131,73		116,60
C - GLU				
1''	102,20	100,90		102,00
2''	79,30	79,87		79,00
3''	78,70	77,48		78,40
4''	75,30	77,52		74,40
5''	71,30	70,60		70,80
6''	62,10	61,96		61,90

**TABELA 7 - Dados de RMN <sup>13</sup>C para o Fukugeside e GB 2a-7-Glucoside, comparando com os dados da literatura.**

## 4.6 - Derivados do Fukugetin e da Volkensiflavona

Foram realizadas reações de Acetilação, Metilação e Benzoilação para a Volkensiflavona e o Fukugetin. Para o Fukugetin também foram preparados derivados etilados. Os produtos foram purificados através de colunas cromatográficas, com a utilização de solventes adequados para cada etapa realizada. O monitoramento por CCD permitiu acompanhar o tempo de reação.

### 4.6.1 - Identificação da Volkensiflavona Peracetilada

O tratamento da Volkensiflavona com anidrido acético e dimetilaminopiridina em acetato de etila resultou no produto peracetilado (figura 10 p.100), com tempo de reação relativamente baixo (1 h e 30 min). Após os procedimentos de purificação o derivado peracetilado foi obtido na forma de cristais brancos com rendimento de 96 % e ponto de fusão 137 - 140 °C.

A peracetilação foi confirmada pelo total desaparecimento da intensa banda de absorção na região de  $3370\text{ cm}^{-1}$  do espectro IV (espectro 5 p. 130), devido aos OH fenólicos e o aparecimento de uma forte absorção em  $1774\text{ cm}^{-1}$  para carbonila de éster além da vibração de deformação axial de C—O em  $1200\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 6 p.131) pode-se observar o desaparecimento das absorções em 12,33 e 12,17 ppm devido aos OH quelados, indicando que ocorreu a peracetilação (acetilou em todas as hidroxilas, inclusive nas OH menos reativas em I-C5 e II-C5). Observou-se também o aparecimento dos sinais referentes aos grupos metilas do radical acetil na região de 2,2 a 2,3 ppm.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 7 p. 132) observou-se o deslocamento das carbonilas II-C4 e I-C4, de 183,24 e 197,2 ppm para 189,5 e 188,6 ppm, devido a influência anisotrópica conferida pelo grupo acetil nas posições I-C5 e II-C5, confirmando a peracetilação. Também o aparecimento de um grupo de sinais em campo alto a 20 ppm referente aos grupos metilas do radical acetil foi observado.

#### 4.6.2 - Identificação da Volkensiflavona Benzoilada

O tratamento da Volkensiflavona com cloreto de benzoila e piridina em acetato de etila, resultou na obtenção do derivado tetrabenzoilado (figura 10 p.100), na forma de um sólido de coloração bege com ponto de fusão 147 - 150 °C e rendimento de 97,8 %. Esta reação foi rápida, levando ao total consumo do reagente em apenas cinco minutos.

O derivado tetrabenzoilado foi identificado pelo desaparecimento parcial da banda forte de absorção devido aos grupos OH fenólicos, no IV (espectro 9 p. 134) e o aparecimento de uma forte absorção em 1744  $\text{cm}^{-1}$  referente as carbonilas do radical benzoil.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 10 p. 135) observou-se a permanência dos sinais em 12,33 e 12,17 ppm correspondentes aos OH quelados, mostrando que não houve benzoilação nas posições I-C5 e II-C5. Apresentou também absorção com maior intensidade na região de 7 - 8 ppm devido aos prótons aromáticos dos grupos benzoilas.

#### 4.6.3 - Identificação da Volkensiflavona Metilada

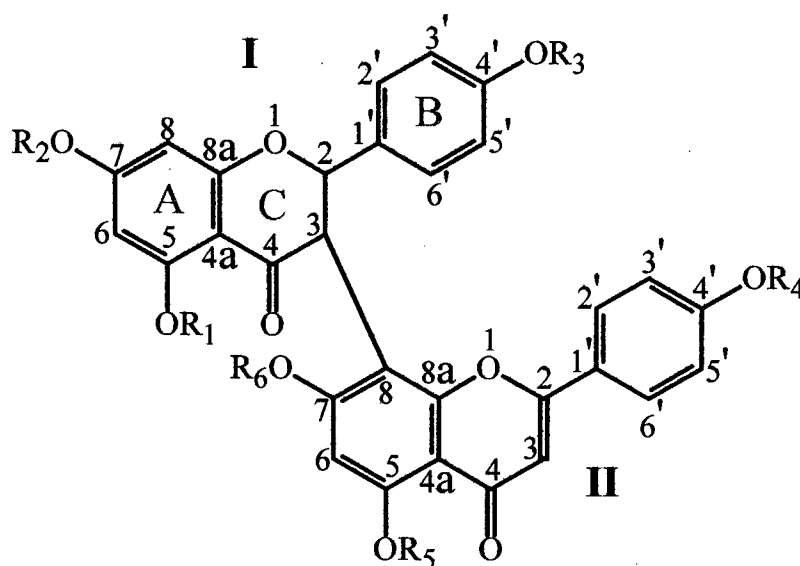
A metilação da Volkensiflavona com iodeto de metila em acetona, resultou no produto tetrametilado na forma de cristais amarelo gema com ponto de fusão 112 - 115 °C (ver figura 10 p. 100) e um rendimento de 98,35 %.

Após purificação, o derivado metilado mostrou no espectro IV (espectro 11 p.137) a diminuição da banda de absorção em 3440  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos OH fenólicos e o aumento significativo da absorção dos estiramentos C—H alifático em 2936 e 2840  $\text{cm}^{-1}$  devido aos grupos  $\text{CH}_3$ .

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  observamos além das absorções na região de 3,8 a 4,0 ppm devido aos grupos metoxilas, a permanência dos sinais referentes aos hidrogênios dos OH quelados em I-C5 e II-C5, indicando que a metilação não ocorreu nas hidroxilas dos carbonos C5 das unidades I e II da Volkensiflavona.

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (espectros 12, 13 p. 137, 138) mostrou o aparecimento de quatro sinais para metoxilas em 57,01, 56,81, 56,53 e 55,86. Isto confirma que não houve metilação das hidroxilas queladas I-5 e II-5, sendo metiladas apenas as hidroxilas I-7, II-7, I-4' e II-4'.

	$\text{R}_1$	$\text{R}_2$	$\text{R}_3$	$\text{R}_4$	$\text{R}_5$	$\text{R}_6$
<b>Volkensiflavona (C-4)</b>	H	H	H	H	H	H
<b>Acetilação</b>	$\text{COCH}_3$	$\text{COCH}_3$	$\text{COCH}_3$	$\text{COCH}_3$	$\text{COCH}_3$	$\text{COCH}_3$
<b>Metilação</b>	H	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$	H	$\text{CH}_3$
<b>Benzoilação</b>	H	$\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5$	$= \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{R}_6$	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}$	H	H



**FIGURA 10 - Esquema de Síntese dos Derivados da Volkensiflavona**

#### 4.6.4 - Identificação do Fukugetin Peracetilado

O tratamento do Fukugetin com anidrido acético em piridina e acetato de etila resultou na obtenção do Fukugetin peracetilado (figura 11 p. 104), que após os

procedimentos de purificação resultou em cristais de coloração amarelo claro com PF 194 - 197 °C e rendimento de 87,10 %.

A identificação do produto peracetilado foi realizado através das análises espectroscópicas. No espectro de IV (espectro 18 p. 144) observou-se o completo desaparecimento da forte banda de absorção devido aos OH fenólicos na região de 3300  $\text{cm}^{-1}$ , e o aparecimento de uma intensa banda de absorção em 1780  $\text{cm}^{-1}$ , para as carbonilas de éster, além de uma banda intensa de absorção em 1200  $\text{cm}^{-1}$ , atribuído a vibração de deformação de C—O, carbono do anel ligado ao grupo acetil.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 19 p. 145) observou-se o desaparecimento das absorções devido aos OH quelados, indicando que ocorreu a acetilação dos grupos OH quelados das posições I-C5 e II-C5 menos reativos. Na região de 1,96 a 2,28 ppm foram identificados um grupo de sinais atribuídos aos grupos  $\text{CH}_3$  do radical acetil.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 20 p. 146) apresentou sinais de absorções na região de 20,8 e 21,0 ppm correspondente aos grupos metilas dos radicais acetil.

Para as carbonilas do radical acetil foram observados sete sinais na região de 168 - 170 ppm, o que confirma a peracetilação do Fukugetin.

#### **4.6.5 - Identificação do Fukugetin Benzoilado**

O tratamento do Fukugetin com cloreto de benzoila em piridina e acetato de etila, resultou na obtenção do Fukugetin penta benzoilado, que após o procedimento de purificação apresentou coloração amarelo pálido, ponto de fusão 98 - 100 °C e aproximadamente 100 % de rendimento

A identificação do produto penta benzoilado foi feita através da observação da diminuição da banda intensa no espectro de IV (espectro 21 p.147) correspondente aos OH fenólicos, o que permitiu concluir que alguns hidrogênios dos grupos OH fenólicos foram substituídos. Além disso houve o aparecimento de uma absorção em 1770  $\text{cm}^{-1}$

atribuídos aos grupos C=O benzólicos e uma banda intensa em  $1200\text{ cm}^{-1}$  da vibração de deformação C—O.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 22 p.148) apresentou sinais de absorção com maior intensidade na região de 7 - 8 ppm devido aos prótons aromáticos dos grupos benzoilas, onde também pode ser observado a permanência das absorções dos grupos OH quelados menos reativos.

#### **4.6.6 - Identificação do Fukugetin Metilado**

A metilação do Fukugetin com iodeto de metila em acetona resultou no derivado penta metilado (figura 11 p. 104), na forma de um sólido amarelo queimado, que após o procedimento de purificação apresentou ponto de fusão  $132 - 135\text{ }^\circ\text{C}$  e rendimento de 98,5 %.

O produto penta metilado foi caracterizado pelas observações dos espectros de absorção no IV (espectro 32 p. 159) através do desaparecimento parcial da banda de absorção dos OH fenólicos em  $1380\text{ cm}^{-1}$  e o aparecimento das absorções na região de  $2940$  e  $2870\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento das ligações C-H dos grupos metilas.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 33 p. 160) os sinais na região de 3,66 - 3,90 ppm comprovam a presença das metoxilas.

A penta metilação foi confirmada através da observação da permanência dos sinais para os OH quelados em I-C5 e II-C5 no espectro do produto.

#### **4.6.7 - Etilação do Fukugetin**

A etilação do Fukugetin com iodeto de etila em acetona resultou na obtenção de quatro produtos observados por cromatografia em camada delgada. Após a separação e

purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, obteve-se três derivados parcialmente etilados (figura 11 p. 104).

Segundo a ordem crescente de polaridade pela CCD eluída com hexano, acetato de etila e acetona, foram isolados os derivados:  $5_1$  de consistência oleosa amarelo escuro,  $5_2$  na forma de um sólido amarelo gema com ponto de fusão 177 – 180 °C e o terceiro  $5_3$  um composto sólido amarelo com ponto de fusão 108 – 111 °C.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (espectros 23, 24, 25, 25a, p. 149 a 152) para os três derivados mostra absorção na região de 1,2 ppm para as metilas e 4,1 ppm para metilenos carbinólicos.

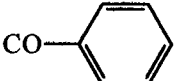
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /APT (espectros 27, 28 p. 154, 155) do derivado  $5_1$ , foram observados cinco sinais na região de 14 – 15 ppm (14,65; 14,84; 14,90; 14,98 e 15,16) atribuídos a cinco metilas e cinco sinais na região de 63 – 65 ppm (63,88; 64,66; 65,03; 65,24 e 65,54) atribuídos a cinco metilenos carbinólicos. Estes dados indicam que o derivado  $5_1$  seja Fukugetin penta etilado.

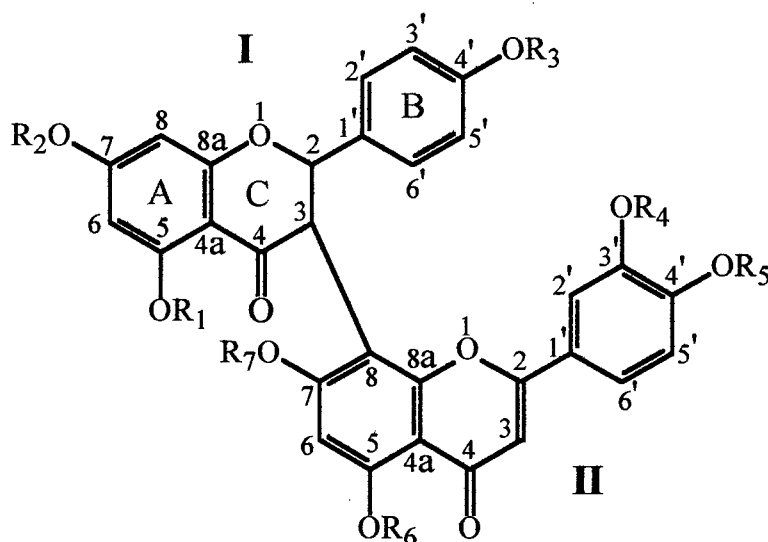
Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ /APT (espectros 26, 29, 30, 31 p. 153, 156 a 158) dos derivados  $5_2$  e  $5_3$  foram observados quatro sinais para os grupos etilas sugerindo serem derivados tetra etilados.

Pela diferença de polaridade e de pontos de fusão entre os derivados  $5_2$  e  $5_3$ , como também as diferenças nos deslocamentos químicos dos grupos etilas, nos permite inferir as estruturas da etilação  $5_2$  e  $5_3$  (figura 11 p. 104) para os isômeros tetraetilados.

$5_2$  como sendo I-7, I-4', II-3' e II-4' tetra etoxi.

$5_3$  como sendo I-7, I-4', II-4' e II-7 tetra etoxi.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
<b>Fukegetin (C-5)</b>	H	H	H	H	H	H	H
Etilação (5 <sub>1</sub> )	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Etilação (5 <sub>2</sub> )	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
Etilação (5 <sub>3</sub> )	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Acetilação	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>
Metilação	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
Benzoilação	H						H



**FIGURA 11 - Esquema de Síntese dos Derivados do Fukegetin**

#### 4.7 - Modelos de Dor Induzidos pelo Ácido Acético, Placa Quente, Formalina e Pleurisia em Ratos

No teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, a administração intraperitoneal do extrato hidroalcoólico bruto - EBH (2,5 a 50 mg/kg) 60 minutos antes, inibiu significativamente e de forma dose-dependente o número de contorções abdominais



em relação ao grupo controle (fig. 12 p. 106). Quando administrado por via oral, nas doses de 200 a 800 mg/kg, 60 minutos antes do ácido acético, o EBH também foi ativo em inibir o número de contorções abdominais (fig. 13 p. 107). O EBH, na dose de 50 mg/kg, administrado por via intraperitoneal 1, 2, 4 e 6 horas antes do agente álgico, mostrou-se eficiente em reduzir a resposta dolorosa até pelo menos a 6ª hora (fig. 14 p. 108).

A administração de indometacina por via intraperitoneal na dose de 1 mg/kg reduz significativamente a resposta álgica (fig. 12 p. 106). Em adição, a administração de indometacina (25 mg/kg, via oral), dexametasona (25 mg/kg, via oral), ácido acetilsalicílico (200 mg/kg, via oral) ou fentanil (0,5 mg/kg, s.c.) também reduziram significativamente a resposta álgica induzida pelo ácido acético (fig. 15 p. 109).

No teste da formalina, nem a indometacina (10 mg/kg, via intraperitoneal) nem o EBH em doses crescentes (1, 2,5, 5 e 10 mg/kg, via intraperitoneal) administradas 60 minutos antes do teste foram capazes de reduzir o tempo do "licking" na primeira fase. O mesmo não aconteceu na segunda fase onde tanto a indometacina quanto o EBH de maneira dose-dependente foram eficazes em reduzir o tempo do "licking" (fig. 16 p. 110). Nestas mesmas doses apenas a indometacina foi eficaz em reduzir o edema de pata de camundongo induzido pela formalina quando administradas 60 minutos antes da injeção do agente flogístico/álgico (fig. 17 p. 111). Quando o EBH, numa dose de 2,5 mg/kg, via intraperitoneal, foi administrado 1, 2 ou 4 horas antes do teste, observou-se redução significativa do tempo do "licking" até a 2ª hora, havendo, então, uma reversão do efeito antinociceptivo após a quarta hora (fig. 18 p. 112). Ainda com uma dose de 2,5 mg/kg, via intraperitoneal, injetada 1, 2, 4, 6 ou 8 horas antes do teste, observou-se uma redução no edema de pata do camundongo induzido por formalina de maneira estatisticamente significativa após a 2ª hora, efeito este que permaneceu até pelo menos a 8ª hora (fig. 19 p. 113).

O tempo de latência dos camundongos no teste da placa quente não foi alterado após a administração do EBH (25 e 50 mg/kg, via intraperitoneal), mas o fentanil (0,5 mg/kg, s.c.) o alterou e de maneira significativa (fig. 20 p. 114).

Na Tabela 8 p. 117 estão expressos os valores calculados para  $DL_{50}$ s e  $E_{máx}$  obtidos com o EBH, administrado por via intraperitoneal ou oral, nos testes do ácido acético ou da formalina. Em ambos os modelos de dor utilizados nos experimentos, o EBH foi muito mais eficaz quando administrado por via intraperitoneal. Entretanto o efeito inibitório máximo foi relativamente semelhante.

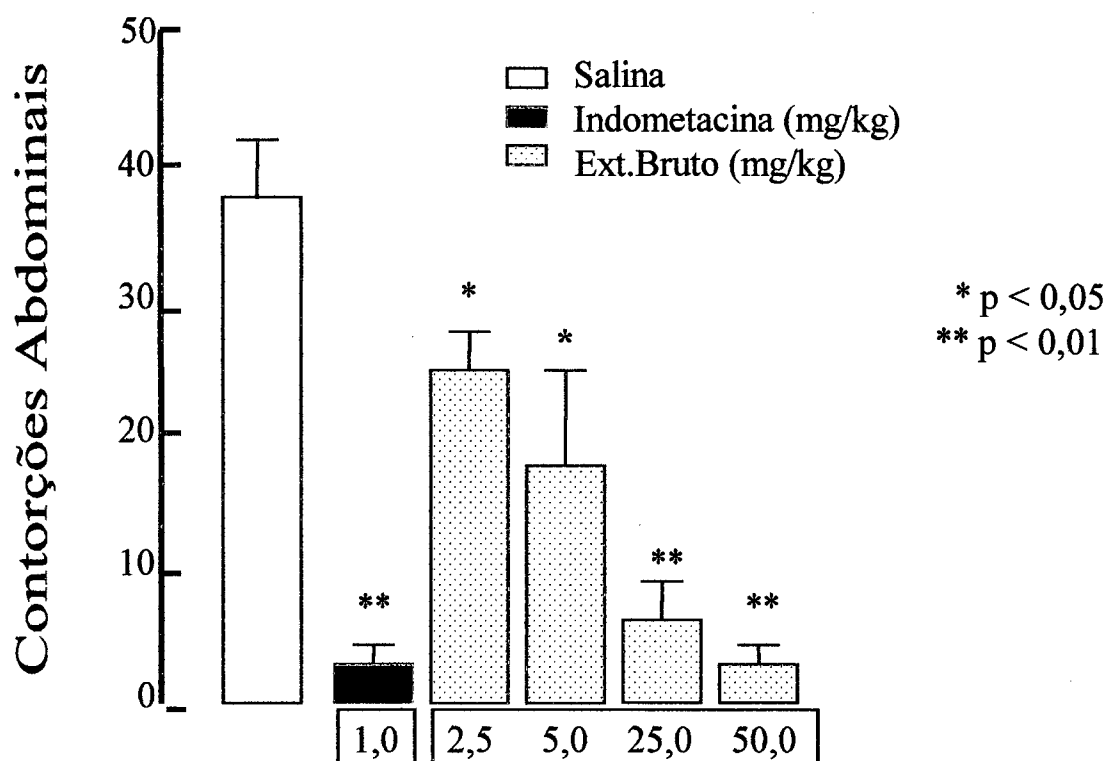


FIGURA 12 - Representação das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. A administração de EBH (via intraperitoneal) inibiu significativamente (ANOVA) de forma dose-dependente as contorções abdominais quando comparado ao controle (salina). A inibição por indometacina (via intraperitoneal) demonstra a sensibilidade do método por antiinflamatórios não-esteroidais. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 8 experimentos.

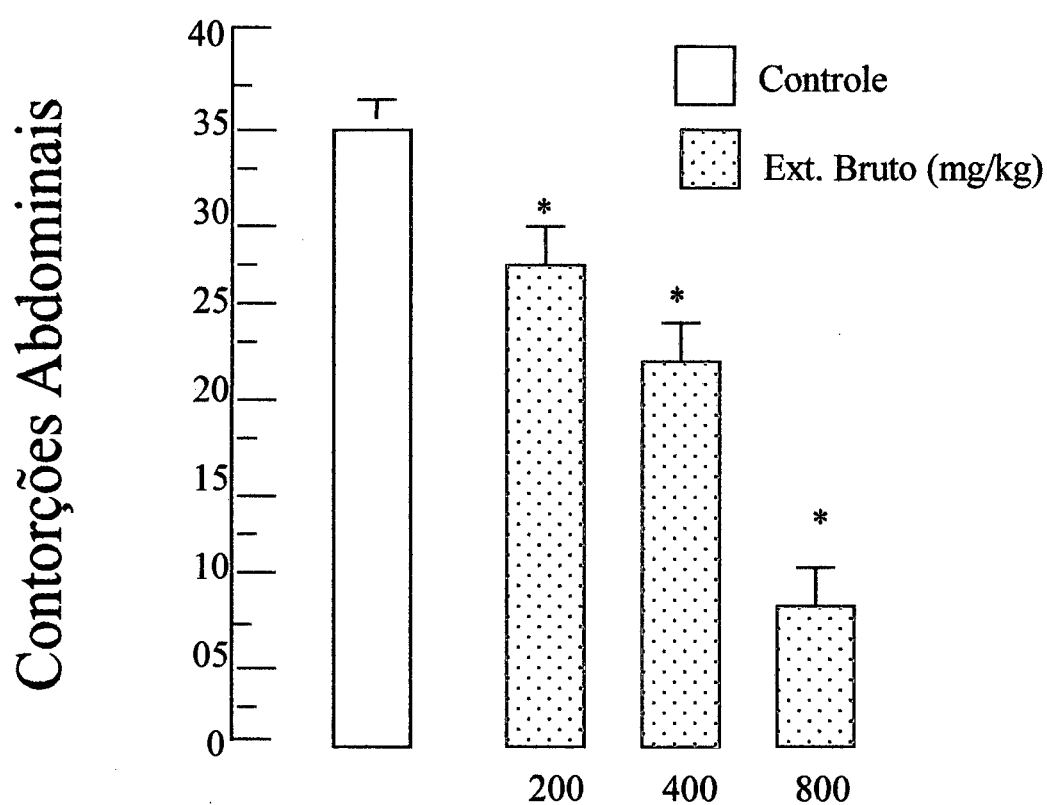


FIGURA 13 - Representação da resposta inibitória, dose-dependente, induzida pelo EBH (via oral) sobre as contorções abdominais provocadas por ácido acético. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 experimentos. Asteriscos denotam  $p < 0,05$  (ANOVA) em relação ao grupo de controle.

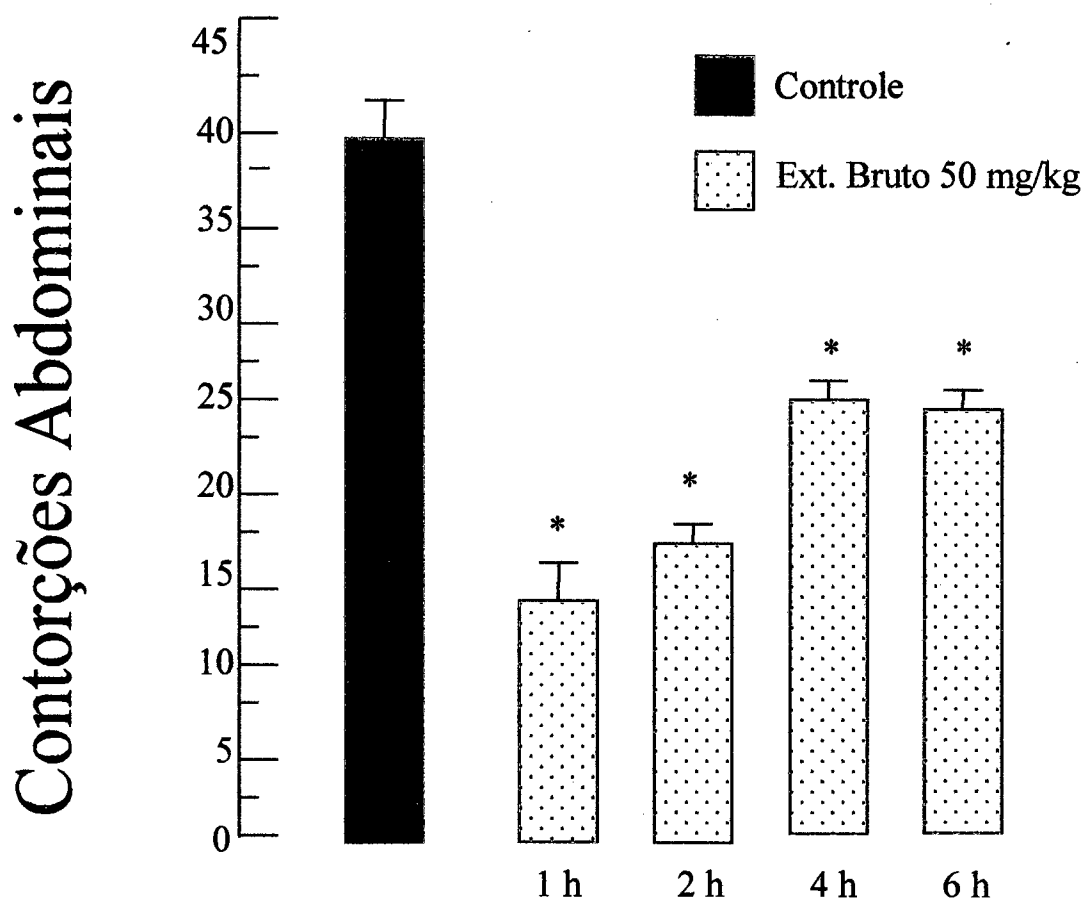


FIGURA 14 - O EBH 50 mg/kg, (via intraperitoneal) de *Rheedia gardneriana* apresentou-se significativamente ativo em inibir as contorções abdominais pelo menos até 6 horas após a administração. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 experimentos. Asteriscos denotam um  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

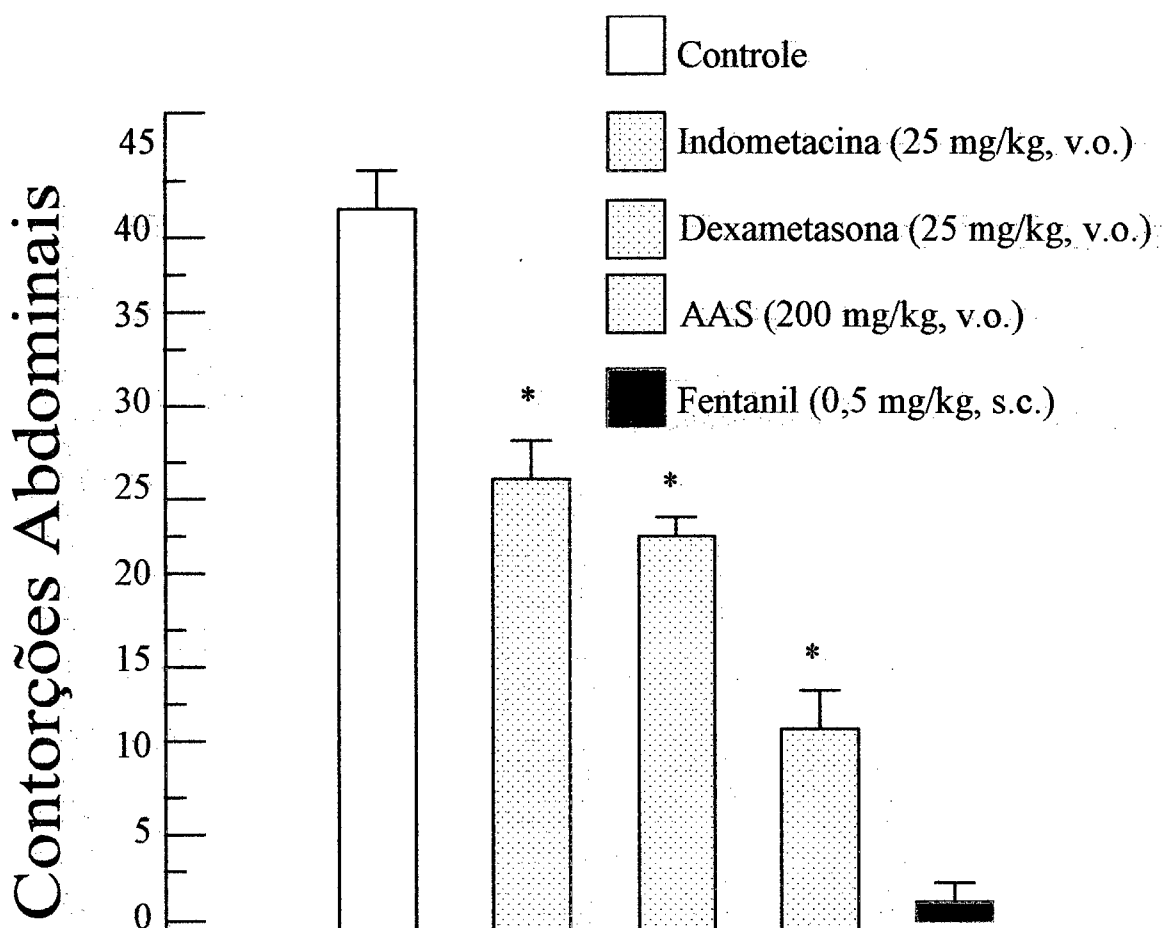


FIGURA 15 - Comparação do efeito inibitório da indometacina, dexametasona, ácido acetilsalicílico (AAS) e fentanil sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 observações. Asteriscos denotam um  $p < 0,05$  (Teste "t") em relação ao grupo controle.

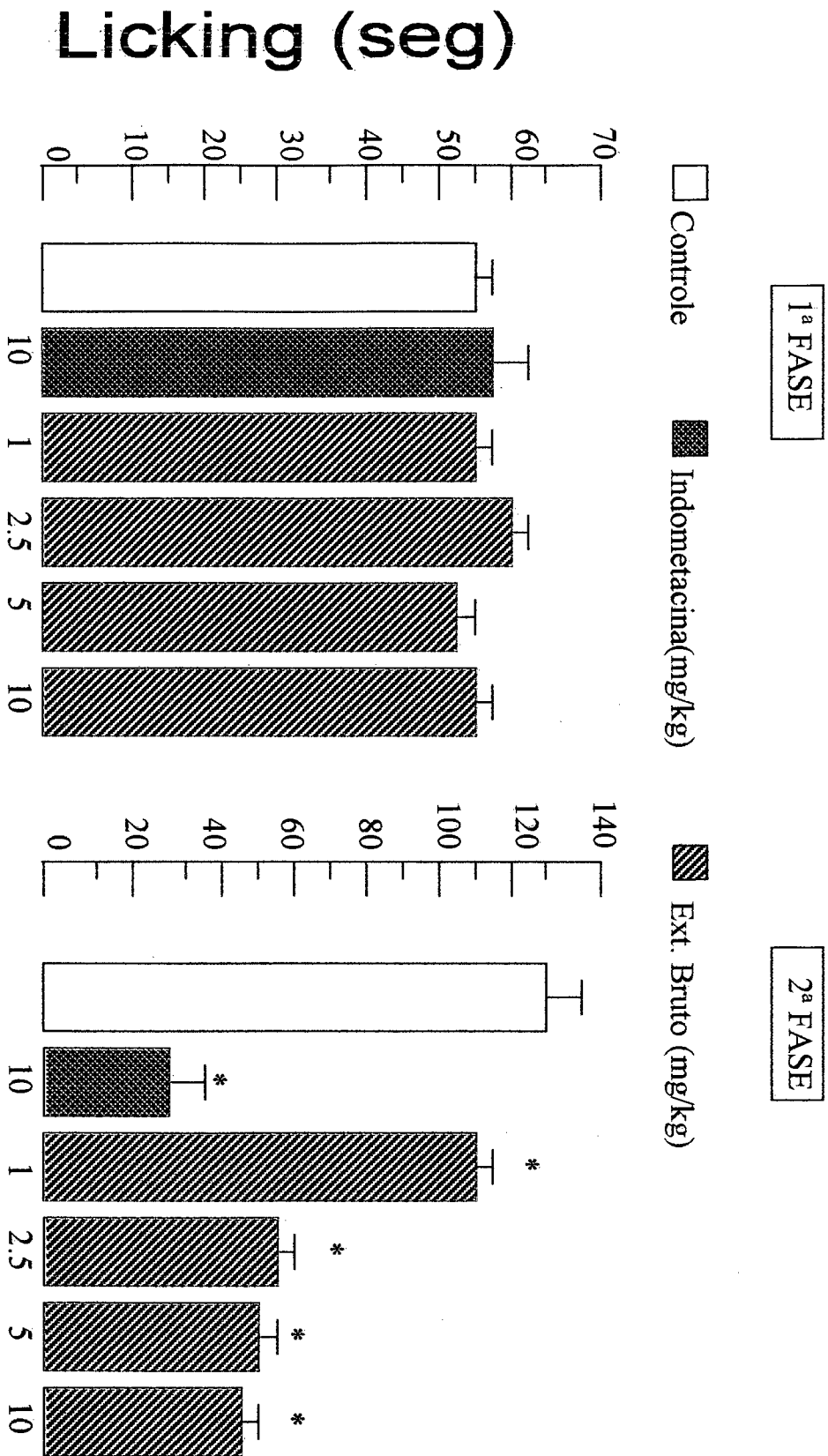


FIGURA 16 - Representação do perfil de ação do EBH (via intraperitoneal) na primeira e segunda fases no modelo da formalina. O EBH foi desprovido de ação na 1ª fase ao contrário da 2ª, na qual observou-se resposta inibitória sobre o "licking" de forma dose-dependente. Compara-se ainda o efeito inibitório do EBH com o efeito induzido por indometacina (via intraperitoneal). Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 experimentos. Asteriscos denotam um  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

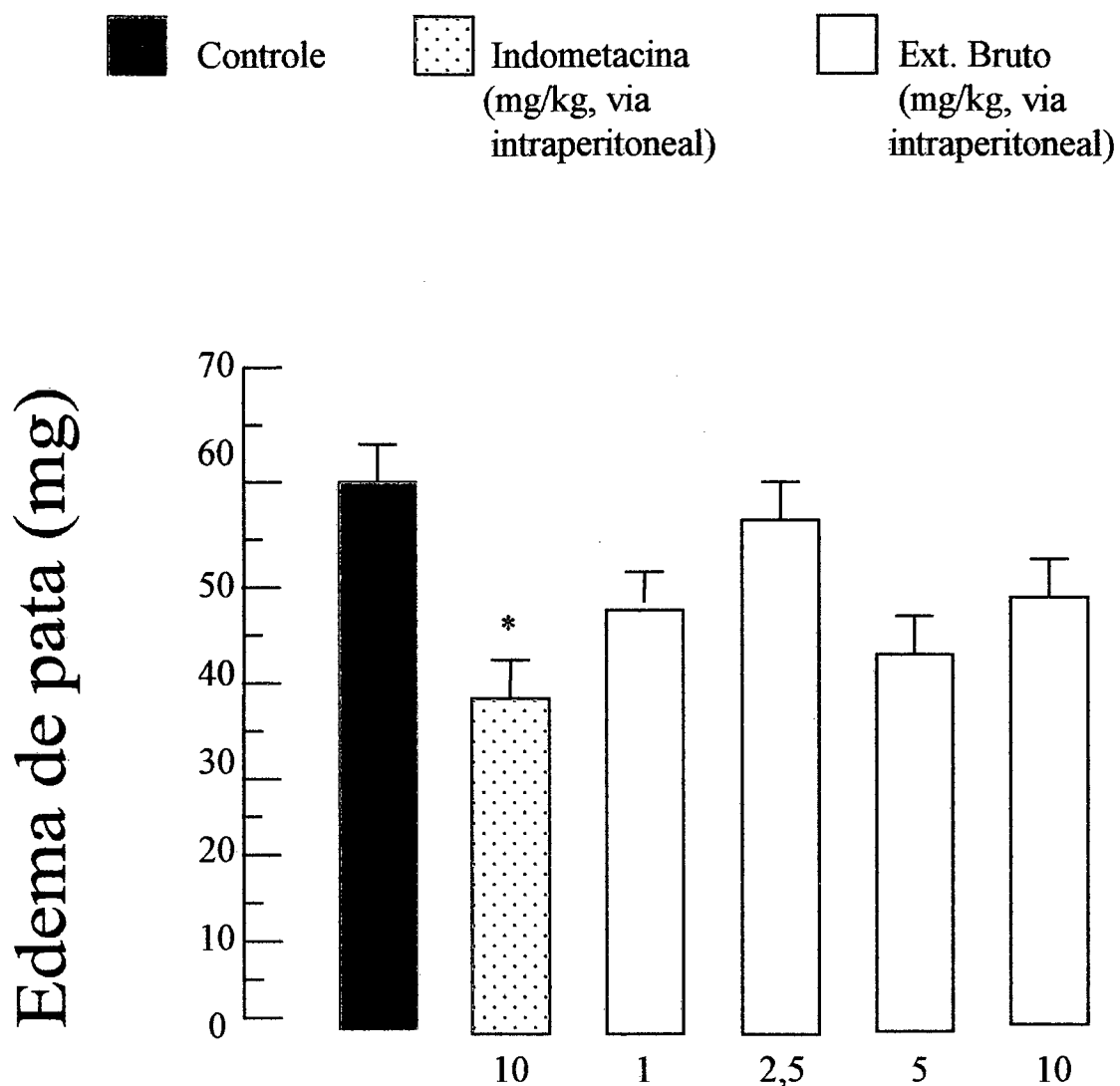


FIGURA 17 - A figura compara a atividade inibitória da indometacina com a do EBH no edema de pata de camundongo induzido por formalina. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 8 experimentos. O asterisco denota um  $p < 0,05$  (Teste "t") em relação ao grupo controle.

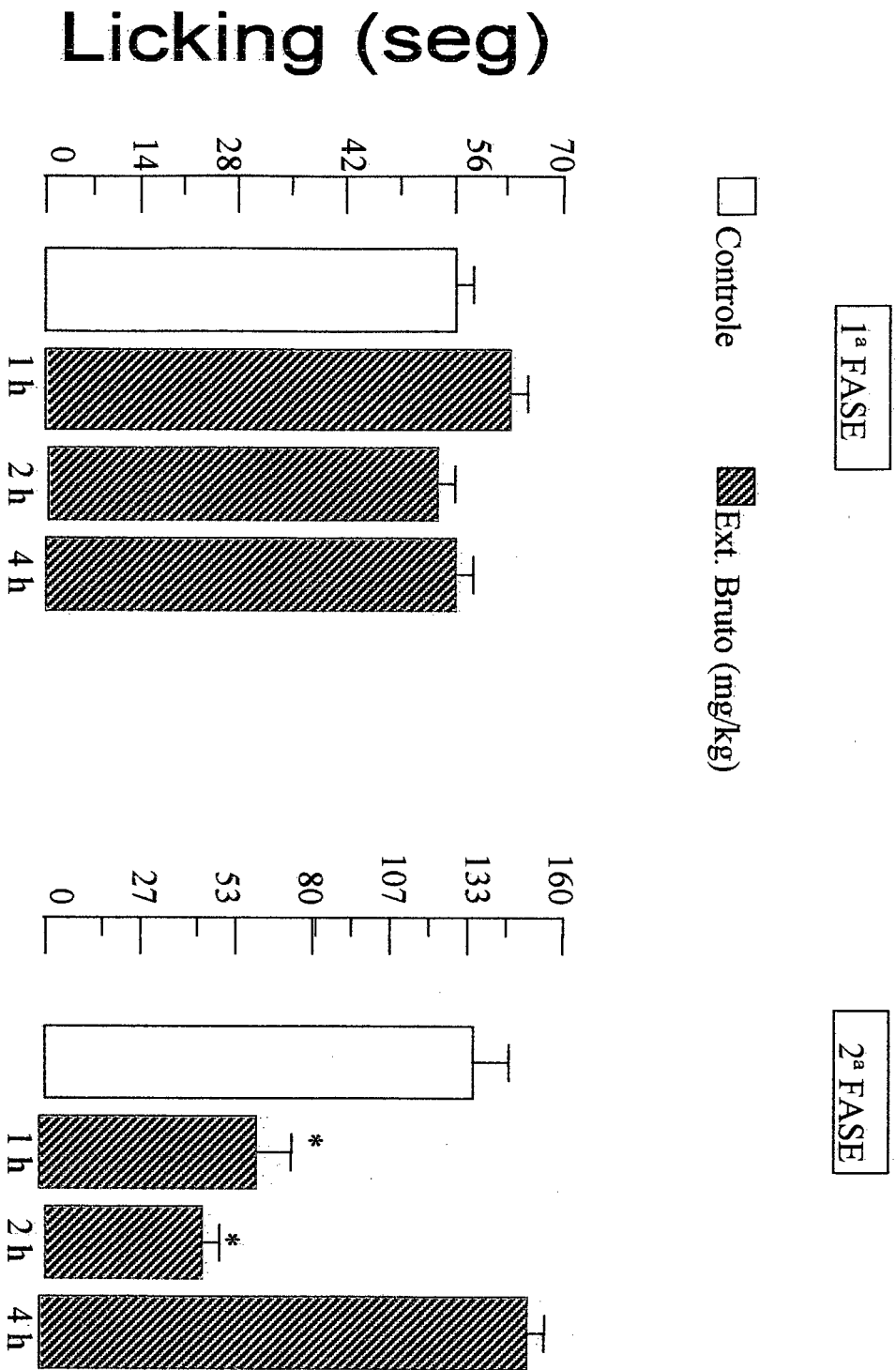


FIGURA 18 - Ilustração do “time-course” para o efeito inibitório do EBH, administrado por via intraperitoneal, sobre o “licking” na 1ª e 2ª fases. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 experimentos. Asteriscos denotam um  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.



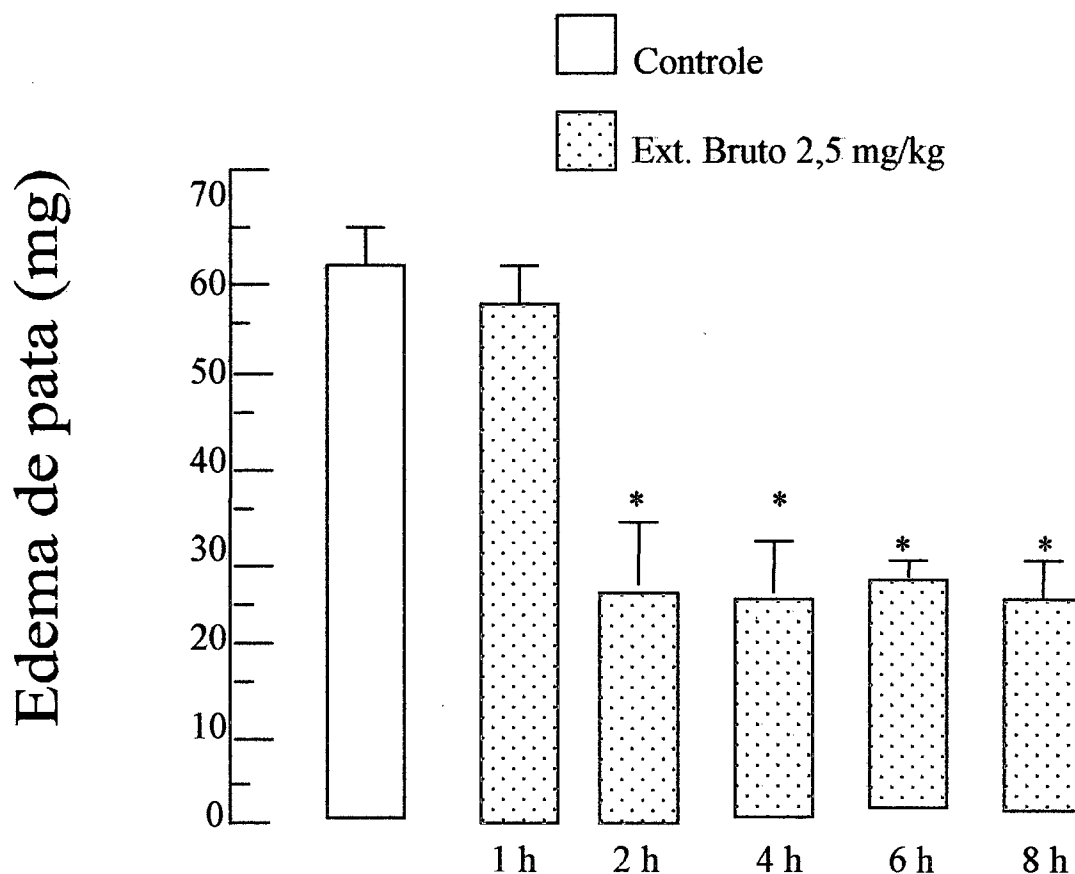


FIGURA 19 - A ilustração representa o  $\Delta$  (mg) do edema de pata de camundongo induzido por formalina. Observa-se que o EBH inibiu significativamente o edema após às 2 h e pelo menos até às 8 h após a sua administração (via intraperitoneal). As barras apresentam a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 experimentos. Asteriscos denotam um  $p < 0,05$  em relação ao controle.

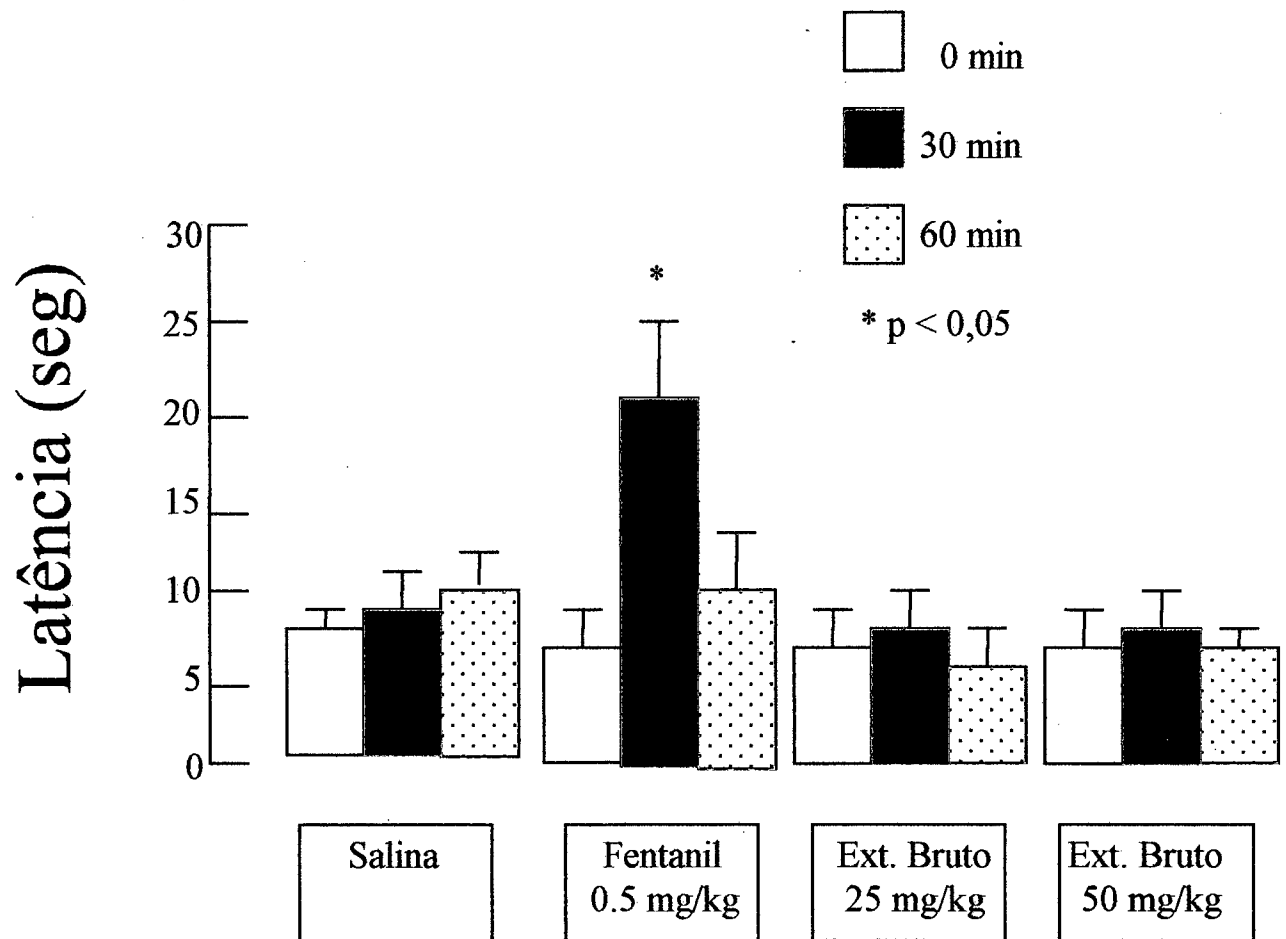


FIGURA 20 - A figura representa a latência de quatro grupos de camundongos expostos à placa quente (tempo 0) e após tratamento com salina, fentanil ou EBH aos 30 e 60 min. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 experimentos. O asterisco aponta um  $p < 0,05$  em relação ao controle (tempo 0).

**TABELA 8 - Efeito do EBH de *Rheedia gardneriana* nos testes do ácido acético e da formalina.**

	Via Intraperitoneal		Via Oral	
	DL <sub>50</sub>	E <sub>máx</sub>	DL <sub>50</sub>	E <sub>máx</sub>
<b>Acetato</b>	8,1 mg/kg (4,2 - 15,5)	85 %	488,6 (280 - 857)	78 %
<b>Formalina</b>	2,3 mg/kg (1,7 - 3,0)	95 %	54,9 (45 - 60)	98 %

O EBH foi administrado por via intraperitoneal ou oral. As DL<sub>50</sub> estão expressas em mg/kg e os valores entre parênteses representam os limites de confiança para 95% (método de Litchfield-Wilcoxon) E<sub>máx</sub> representa o efeito inibitório máximo sobre as contorções abdominais, ou o “licking” no teste do ácido acético ou da formalina, respectivamente.

#### **4.7.1 - Avaliação Farmacológica do Extrato Hidroalcoólico Bruto e das Frações Particionadas de *Rheedia gardneriana***

Em várias regiões do Brasil, os chás unguentos e compressas das folhas de *Rheedia gardneriana* tem sido razoavelmente utilizados pela população, como analgésico e antiinflamatório, no tratamento do trato urinário, em processos infecciosos ou não.

Os testes farmacológicos foram realizados *in vivo*, utilizando animais do tipo camundongos "Swiss" e ratos “Wistar”, em modelos de dor induzidos pelo ácido acético, teste da formalina, teste da placa quente e o modelo de pleurisia. A administração dos

extratos foi feita por via oral e intraperitoneal em doses variadas. Também foi feita a avaliação farmacológica do EHB no trato gastrointestinal *in vitro*.

O extrato hidroalcoólico bruto desta planta apresentou potente atividade analgésica em camundongos quando submetido aos modelos experimentais utilizados, que são: teste do ácido acético e da formalina e, o da placa quente não foi verificado analgesia. O EHB foi administrado por via intraperitoneal e oral.

Na avaliação farmacológica do extrato hidroalcoólico bruto no trato gastrointestinal *in vitro*, o extrato apresentou um mecanismo de ação inespecífico que precisa ser aprofundado a nível químico e farmacológico.

Em outro estudo, onde foi avaliado o efeito antiinflamatório induzido pelo extrato hidroalcoólico bruto em modelos de pleurisia em ratos, administrado por via intraperitoneal, foi verificado significativa atividade anti-inflamatória nos processos inflamatórios agudos ou alérgicos.

O extrato acetato de etila foi estudado para avaliar a atividade analgésica, utilizando o teste da formalina, sendo administrados por via intraperitoneal. Os resultados indicam que o Extrato AcOEt não altera o volume do edema e reduz a dor induzida por processo inflamatório. Esta fração foi menos potente em induzir analgesia quando comparado aos resultados obtidos com o extrato hidroalcoólico bruto. Parece que os compostos ativos foram divididos em outras frações além da Fração AcOEt.

#### **4.8 - Atividade Antimicrobiana**

Os resultados obtidos com os testes de difusão em agar da fração acetato de etila, compostos isolados e derivados estão apresentados na tabela 9 p. 118 e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os compostos Volkensiflavona, Fukugetin e Fukugeside estão apresentados na tabela 10 p. 118.

A fração acetato de etila mostrou-se ativa contra todas as bactérias testadas. Porém a maior atividade se concentrou nas bactérias Gram-positivas tanto bacilos (*Bacillus cereus*) como nos cocos (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*) onde apresentou em média halos de inibição de 24 mm de diâmetro na concentração de 5 mg/50 µl. Para as bactérias Gram-negativas os halos de inibição foram em média de 10 mm de diâmetro.

O mesmo perfil foi observado para os compostos isolados onde os maiores halos de inibição do crescimento bacteriano foram observados para as bactérias Gram-positivas. Os compostos Fukugetin, Fukugeside e Epicatequina foram inativos para *Escherichia coli* e os compostos Volkensiflavona e GB 2a-7-glucoside apresentaram um halo de inibição de 9 mm para *Escherichia coli* na concentração de 1 mg/50 µl, mostrando que estes dois compostos contribuem para a atividade contra *Escherichia coli* observada na fração acetato de etila.

A Volkensiflavona, quando testada pelo método de difusão, foi ativa contra todas as bactérias testadas. Os derivados acetilado, benzoilado e metilado da Volkensiflavona tiveram sua ação antimicrobiana diminuída de modo geral, e também foram inativos para *Escherichia coli* e *Staphylococcus saprophyticus*.

A acetilação do Fukugetin produziu uma diminuição na atividade antibacteriana em menor grau que a Volkensiflavona, sendo que para o *S. aureus* ocorreu um leve aumento da inibição. Porém a benzoilação, metilação e etilação resultaram na completa inativação dos respectivos derivados.

Compostos	<i>E.</i>	<i>B.</i>	<i>P.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>
	<i>coli</i>	<i>cereus</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>aureus</i>	<i>saprophyticus</i>
Fração AcOEt	11	25	9	26	21
Volkensiflavona-C-4	9	22	9,5	18	14,5
Fukugetin-C-5	NHI	25	15	20	18
Fukugeside	NHI	12,5	10	14	9
Epicatequina	NHI	18	11	19	12
GB 2a-7-glucoside	9	17	9	15	10,5
C-4 Acetilado	NHI	12,5	9	9	NHI
C-4 Benzoilado	NHI	12	9	8,5	NHI
C-4 Metilado	NHI	9	NHI	9	NHI
C-5 Acetilado	NHI	21	11	21	15
C-5 Benzoilado	NHI	NHI	NHI	NHI	NHI
C-5 Metilado	NHI	10	NHI	15	NHI
C-5 Etilado 1	NHI	NHI	NHI	NHI	NHI
C-5 Etilado 2	NHI	NHI	NHI	NHI	NHI
C-5 Etilado 3	NHI	NHI	NHI	NHI	NHI

Concentração: Fração AcOEt 3 mg/50 µl, os demais compostos 1 mg/50 µl

**TABELA 9 - Atividade Antibacteriana dos Compostos Isolados e Derivados**

Compostos	<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Volkensiflavona	2,5	2,5	>2,5	>2,5	2,5	>2,5	>2,5	>2,5
Fukugetin	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25
Fukugeside	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25

**TABELA 10 - Determinação da CIM e CBM (concentração em mg/mL)**

## CONCLUSÕES

- O fracionamento cromatográfico em coluna de sílica, da fração Acetato de Etila, resultou no isolamento e identificação dos compostos: Volkensiflavona, Fukugetin, Fukugeside, GB 2a-7-glicoside e Epicatequina.

- O biflavonóide glicosilado GB 2a-7-glicoside e o flavonóide Epicatequina, foram isolados e identificados pela primeira vez no Gênero *Rheedia*.

- Atividade analgésica e antiinflamatória: O extrato hidroalcoólico bruto (EHB) apresentou significativa atividade analgésica e antiinflamatória em modelos de dor induzida pelo ácido acético e formalina. A fração acetato de etila (FAE) foi menos potente em induzir analgesia do que o EHB, indicando que os constituintes ativos estão distribuídos em outras frações além da FAE. Testes farmacológicos com os compostos isolados e seus derivados estão em andamento.

- Atividade antibacteriana: Todos os compostos isolados apresentaram atividade antibacteriana contra bacillus e cocos, tanto Gram-positivo como Gram-negativo. Os biflavonóides Fukugetin, Volkensiflavona e Fukugeside apresentaram as atividades mais relevantes, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) entre 1,25 e 2,25 mg/mL. Os derivados acetilados, benzoilados e metilados tiveram uma diminuição significativa da atividade antimicrobiana. Já os derivados etilados foram completamente inativos para as bactérias testadas.

- Os resultados obtidos, não só confirmam como também estendem as observações populares a respeito do uso medicinal desta planta como analgésico e anti-séptico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. MONTANARI, Carlos A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. *Química Nova*. v.18, n.1, p. 56-64, 1995.
02. BALBACH, Alfons. *As plantas curam*. 2.ed. Itaquaquecetuba: Editora Missionária, 1992.
03. MOREIRA, Frederico. *As plantas que curam*. São Paulo: Hemus, 1985.
04. BALBACH, A. *A flora nacional na medicina doméstica*. 23.ed. v.1,2. Itaquaquecetuba: A Edificação do Lar.
05. MORGAN, René. *Enciclopédia das ervas e plantas medicinais*. São Paulo: Hemus.
06. MATOS, F. J. Abreu. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: Edições EUFC, 1988.
07. BALMÉ, François. *Plantas medicinais*. São Paulo: Hemus, 1982.
08. LAINETTI, R., BRITO, N. R. *A cura pelas ervas e plantas medicinais brasileiras*. Rio de Janeiro: Editora Tecnoprint, 1979.
09. 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, MG. *Planejamento de fármacos*. Poços de Caldas Minas Gerais, 23 a 26 de maio de 2000.
10. JOLY, A. B. *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*. São Paulo: Cia. Editora Nacional, 1967.
11. BENNETT, G. J., LEE, Hiok-Huang. Xanthenes from guttiferæ. v. 28, n.4. *Phytochemistry*, p. 967-998, 1989.
12. LIN, Y. M., FLAVIN, M. T., SCHURE, R. et al. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Médica*, v. 65, n. 2, p. 120-125, mar. 1999.
13. LIN, Y. M., ANDERSON, H., FLAVIN, M. T. et al. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *Journal of Natural Products*, v. 60 n. 9, p. 884-888, sep. 1997.
14. SANZ, M. J., FERRANDIZ, M. L., CEJUDO, M. et al. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica*, v. 24, n. 7, p. 689-699, jul. 1994.
15. LIN, Y. M., FLAVIN, M. T., SCHURE, R. et al. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Médica*, v. 65, n. 2, p. 120-125, mar. 1999.
16. IWU, M. M., IGBOKO, O. A., OKUNJI, C. O. et al. Antidiabetic and aldose reductase activities of biflavanones of *Garcinia kola*. *Journal Pharm Pharmacol*, v. 42, n. 4, p. 290-292, apr, 1990.
17. IWU, M. M., IGBOKO, O. A., ONWUCHEKWA, U. A. et al. Evaluation of the antihepatotoxic activity of the biflavonoids of *Garcinia kola* seed. *Journal Ethnopharmacol*, v. 21, n. 2, p. 127-138, nov. 1987.
18. CHEN, S. X., WAN, M., LOH, B. N. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Médica*, v. 62, n. 4, p. 381-382, aug. 1996.
19. LIKHITWITAYAWUID, K., PHADUNGCHAROEN, T., KRUNGKRAI, J. Antimalarial xanthenes from *Garcinia cowa*. *Planta Médica*, v. 64 n. 1 p. 70-72, feb. 1998.
20. LIKHITWITAYAWUID, K., CHANMHASATHIEN, W., RUANGRUNGSI, N. et al. Xanthenes with antimalarial activity from *Garcinia dulcis*. *Planta Médica*, v. 64, n. 3, p. 281-282, apr. 1998.

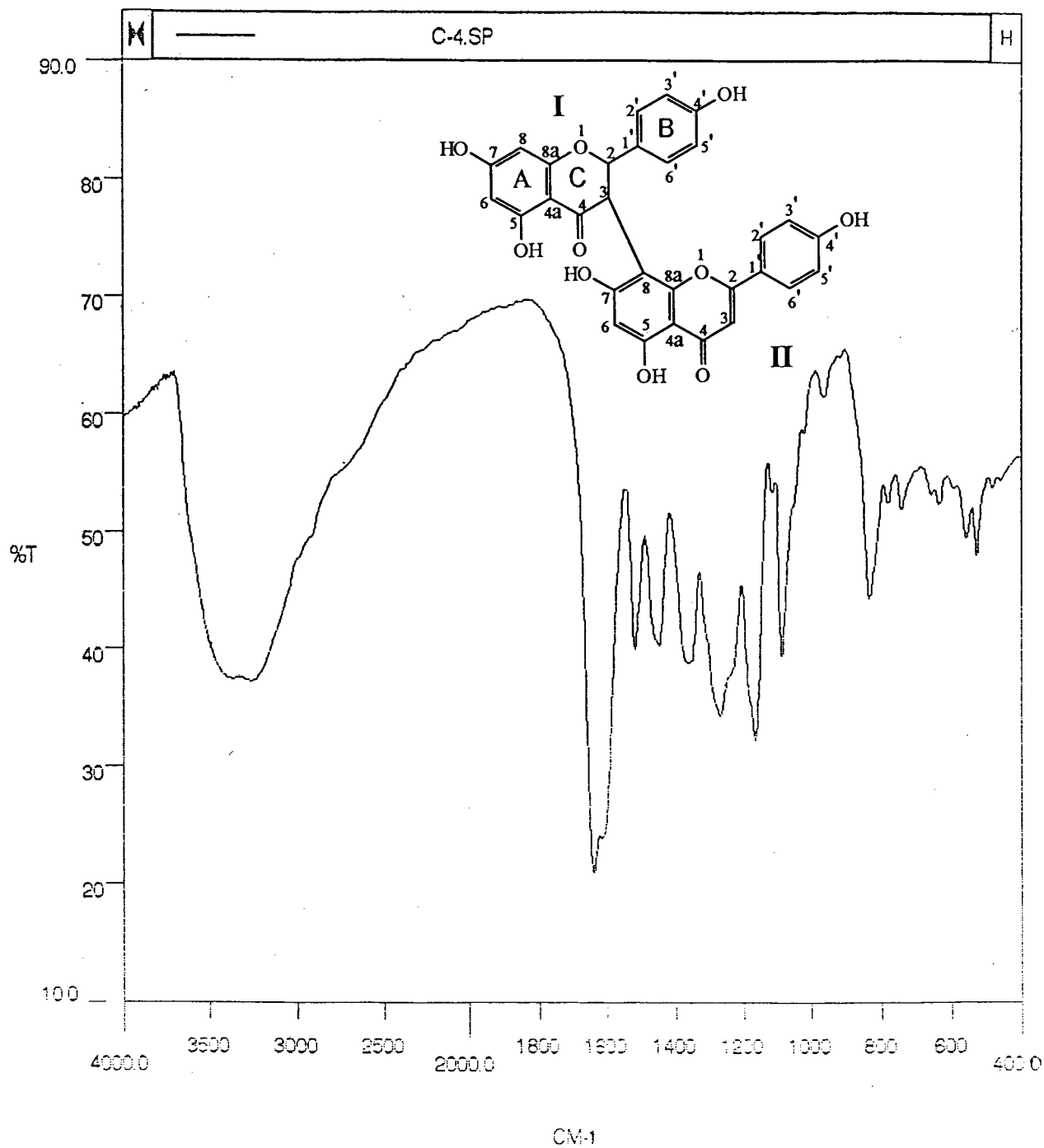


21. GOPALAKRISHNAN, G., BANUMATHI, B., SURESH, G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. **Journal Natural Products**, v. 60, n. 5, p. 519-524, may. 1997.
22. MONACHE, F. D., MONACHE, G. D., PINHEIRO, R. M. et al. Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1<sup>3.7</sup>]-decane-7-hidroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2305-2308, 1988.
23. KONOSHIMA, M., IKESHIRO, Y., MIYAHARA, S. The constitution of biflavonoids from *Garcinia* plants. **Tetrahedron Letters**, n. 48, p. 4203-4206, 1970.
24. BABU, V., ALI, S. M., SULTANA, S., ILYAS, M. A biflavonoid from *Garcinia nervosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3332-3335, 1988.
25. GIL, B., SANZ, M. J., TERCENIO, M. C. et al. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A<sub>2</sub> with anti-inflammatory activity. **Biochem Pharmacol**, v. 53, n. 5, p. 733-740, mar. 1997.
26. BERG, M. E. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Rheedia* L. (Guttiferae). **Acta Amazônica**, v. 9, n. 1, p. 43-74, 1979.
27. LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras**, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.
28. CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 2.ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982.
29. LUZZI, R., GUIMARÃES, C.L., VERDI, L.G. et al. Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, v. 4, n. 2, p. 141 – 144, 1997.
30. BRAZ, R.F., MAGALHÃES, G. C., GOTTLIEB, O. R.. Xanthenes of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v.9, p.673, 1970.
31. ALVARENGA, M. A. et al. Dihydroisocoumarins and phthalide from wood samples infested by fungi. v.17. **Phytochemistry**, p. 511-516, 1978.
32. MONACHE, G. D., MONACHE, F. D., WATERMAN, P. G. et al. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23, n.8, p. 1757-1759, 1984.
33. MONACHE, G. D., MONACHE, F. D., BETTOLO, G. B. Marini. Chemical investigation of the genus *Rheedia* II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46. n. 5, p. 655-659, 1983.
34. MONACHE, G. D., BOTTA, B. Chemical investigation of the genus *Rheedia*, IV three new xanthenes from *Rheedia brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 4, p. 655-659, jul. 1984.
35. BOTTA, B. et al. Chemical investigation of the genus *Rheedia*, V biflavonoids and xanthochymol. **Journal of Natural Products**. p. 1053, nov/dec, 1984.
36. CECHINEL FILHO, V., SILVA, K.L., SOUZA, M.M. et al. I3-naringenin-II8-4'-Ome-eriodictyol: a new potential analgesic agent isolated from *Rheedia gardneriana* leaves. **Z. Naturforsch**, n. 55c, p. 820 – 823, may 2000.
37. ALVES, T. M., ALVES, R., ROMANHA, A. J. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 369-371, feb. 1999.
38. SANTOS, M. H., NAGEN, T. G., OLIVEIRA, T. T. et al. 7-hepiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 654-660, set. 1999.

39. LIN, Y. M., CHEN, F. C., LEE, K. H. Hinokiflavone, a cytotoxic principle from *Rhus succedanea* and the cytotoxicity of the related biflavonoids. **Planta Médica**, v. 55, n. 2, p. 166-168, apr. 1989.
40. CECHINEL FILHO, V., Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 680 – 685, set/out 2000.
41. LINUMA, M., TOSA, H., TANAKA, T. et al. Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Pharm Pharmacol**, v. 48, n. 8, p. 861-865, aug. 1996.
42. LINUMA, M., TOSA, H., TANAKA, T. et al. Antibacterial activity of some Garcinia benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biol Pharm Bull**, v. 19, n. 2, p. 311-314, feb. 1996.
43. SHANKARANARAYAN, D., GOPALAKRISHNAN, C., KAMESWARAN, L. Pharmacological profile of mangostin and its derivatives. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 239, n. 2, p. 257-269, jun. 1979.
44. MELZER, R., FRICKE, U., HOLZL, J. Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* in isolated porcine coronary arteries. **Arzneimittelforschung**, v. 41, n. 5, p. 481-483, may. 1991.
45. NAHRSTEDT, A., BUTTERWECK, V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. **Pharmacopsychiatry**, v. 30, n. 2, p. 129-134, sep. 1997.
46. DHARMARANTNE, H. R., WIJESINGHE, W. M., THEVANASEN, V. Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 66, n. 3, p. 339-342, sep. 1999.
47. SOUSA, Miriam Pinheiro de et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições EUFC, Laboratório de Produtos Naturais, 1991.
48. KOSTER, R., ANDERSON, M., BEER, E. J.. Acetic acid for analgesia screening. **Federation Proc.** v.18, p. 412, 1959.
49. FUJIYOSHI, T. et al. Kaolin-induced writhing in mice, a new model of possible bradykinin-induced pain for assessment of analgesic agents. **Agents and Actions**, v. 27, p. 332-334, 1989.
50. DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G.. **The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats.** *Pain*, v. 4, p. 161-164, 1977.
51. HUNSKAAR, S. et al. Formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci: Methods**, v. 20, p. 69-79, 1985.
52. EDDY, N. B. & LEIMBACH, D. Synthetic analgesia II. Diethienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol Exp. Ther**, v. 107, p. 385-398, 1953.
53. SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G.. **Statistical methods**. Ames, Iowa University Press, 1967.
54. SMANIA, A. J., DELA MONACHE, F., SMANIA, E. F. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, 45, p. 177-181, 1995.
55. ALVES, M. A., SILVA, A. F., BRANDÃO, M. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n. 3, p. 367-373, may 2000.

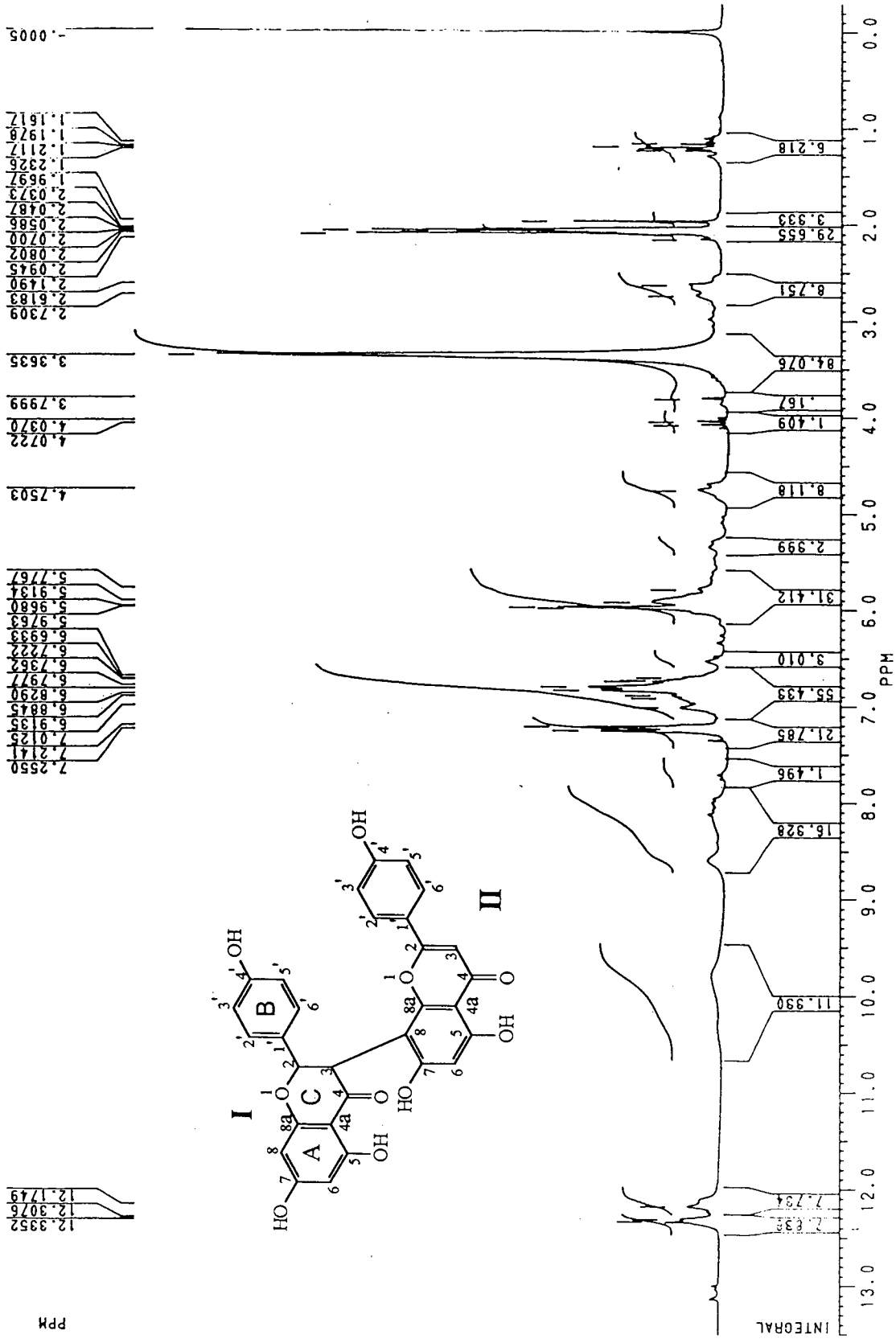
56. AGRAWAL, P. K. **Studies in organic chemistry 39 "Carbono-13 NMR of flavonoids"**. Elsevier, New York, , 1989, p. 273.
57. MARTINEZ, E., MURILLO, M. B., DELA MONACHE, F. Fukugetina y fukosisida, biflavonoides de *Clusia guaviarensis curti*. **Revista Colombiana de Química**, v. 25, n. 1-2, p. 15-20, 1996.
58. BRAZ, R. F., LEMOS, M. J. C., GOTTLIEB, O. R. A new xanthone from lorostemon species. **Phytochemistry**, v. 12, p. 947-948, 1973.
59. COSTA, A. Fernandes. **Farmacognosia**. 2.ed., v.3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.
60. CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. v.6. Rio de Janeiro: Editora Imprensa, 1978.
61. CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. v.1. Rio de Janeiro: Editora Imprensa, 1984.
62. COSTA, A. Fernandes. **Farmacognosia**. 4.ed., v.2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
63. CHUNG, M. I., WENG, J. R., LAI, M. H. et al. A new chalcone, xanthonones and a xanthonolignoid from *Hypericum geminiflorum*. **Journal Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 1033-1035, jul. 1999.
64. DOMINGUEZ, X. A. et al. Plantas medicinales de Mexico XLVI, compuestos aislados de la raiz del thalictrum dioicum L. **Revista Latinoamericana de Química**. n.13, p. 61-62, 1982.
65. DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. Department of pharmaceutical sciences, university of Nottingham, UK. John Wiley & Sons ltd. 1997.
66. FUSON, R. C., CURTIN, Y. D., MORRIL, C. T.. **Identificação sistemática dos compostos orgânicos**. Manual de laboratório. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983.
67. GOTTLIEB, O. R. Biogenetic proposals regarding aucuparins and xanthonones. **Phytochemistry**, v.7 p. 411-421, 1968.
68. GUEDES, A. **Estudo químico e avaliação da atividade analgésica e antimicrobiana de *Hedyosmum brasiliense***, 1997. 127 p. Dissertação ( Mestrado em Química ) Departamento de Química, UFSC, 1997.
69. HUANG, B., FONG, W. P., YEUNG, H. W. et al. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. **Life Sci**, v. 61, n. 10, p. 933-949, 1997.
70. ITO, C., ITOIGAWA, M., FURUKAWA, H. et al. Xanthonones as inhibitors of Epsteinbarr virus activation. **Cancer Lett**, v. 132, n. 1-2, p. 113-117, oct. 1998.
71. IWU, M. M., IGBOKO, O. A., OKUNJI, C. O. et al. Antidiabetic and aldose reductase activities of biflavanones of *Garcinia kola*. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 42, p. 290-292, 1990.
72. KIM, H. K., SON, K. H., CHANG, H. W. et al. Amentoflavona, a plant biflavone: a new potencial anti-inflammatory agent. **Arch Pharm Res**, v.21, n. 4, p. 406-410, aug. 1998.
73. KIRCHNER, Justus G. **Thin - layer chromatography**. 2 ed. v. 14, New York: Edition Edmond S. Perry, 1978.

74. LEE, S. J., CHOI, J. H., SON, K. H. et al. Suppression of mouse lymphocyte proliferation in vitro by naturally-occurring biflavonoids. *Life Sci*, v. 57, n. 6, p. 551-558, 1995.
75. MONACHE, F. D., BOTTA, B. Three new xanthenes and macluraxanthone from *Rhedia benthamiana* Pl. Triana, Guttiferae. *J. Chem. Soc. Perkin I*, p. 484-487, 1981.
76. MONACHE, G. D., MONACHE, F. D., BENEDETTO, R. et al. New metabolites from *Psorospermum tenuifolium*. *Phytochemistry*, v.26, n. 9, p. 2611-2613, 1987.
77. OLIVEIRA, F. de, AKISUE, G., AKISUE, M. K. *Farmacognosia*. São Paulo: Edições Atheneu, 1991.
78. PICKERT, M., SCHAPER, K. J., FRAHM, A.W. Substituted xanthenes as antimycobacterial agents, part 2: antimycobacterial activity. *Arch Pharm*, v. 331, n. 5, p. 193-197. may. 1998.



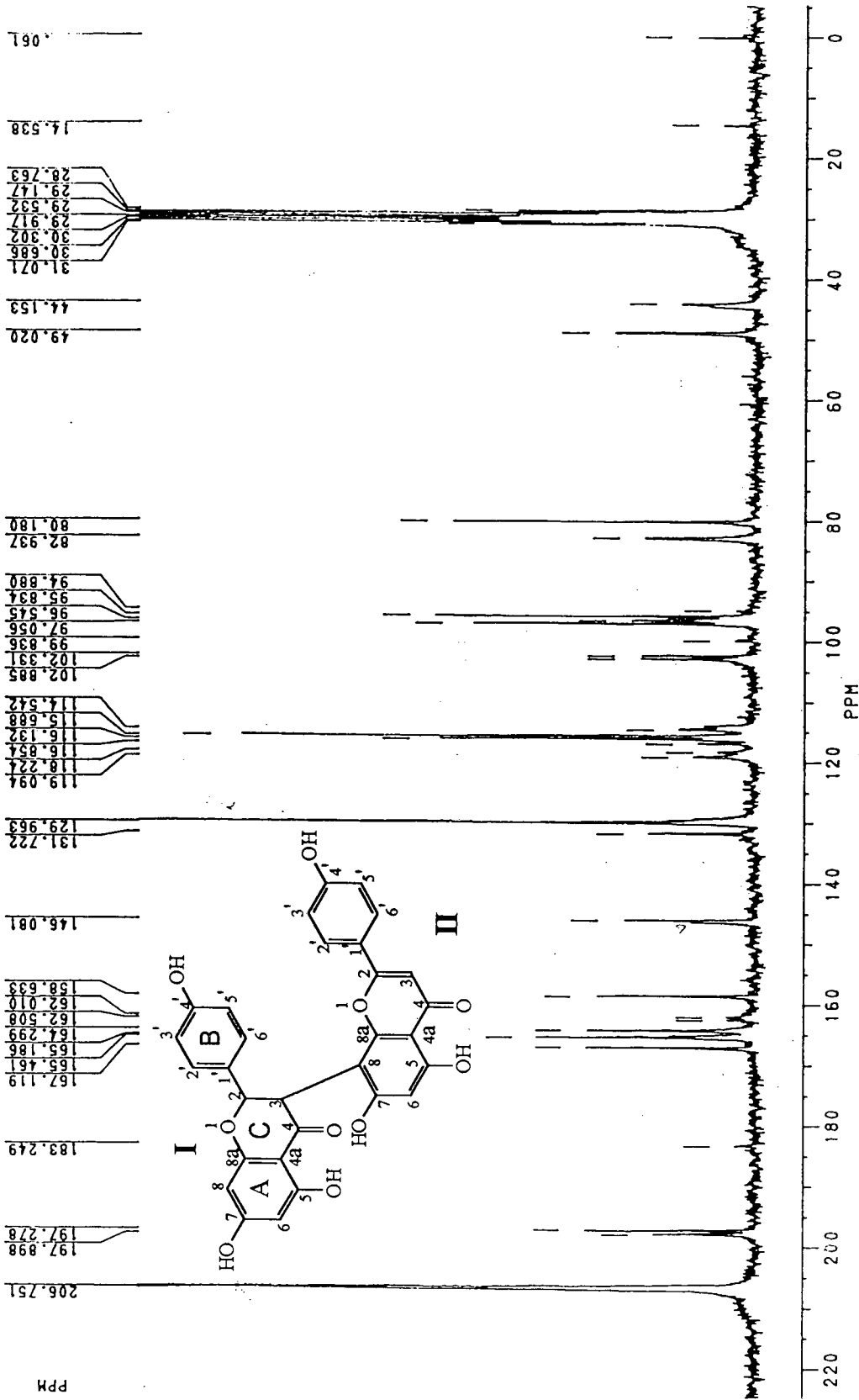
ESPECTRO 1 - Espectro de IV ( KBr ) da Volkensiflavona.

VERDI, RG-2-17 EM ACETONA / JUNH15.012

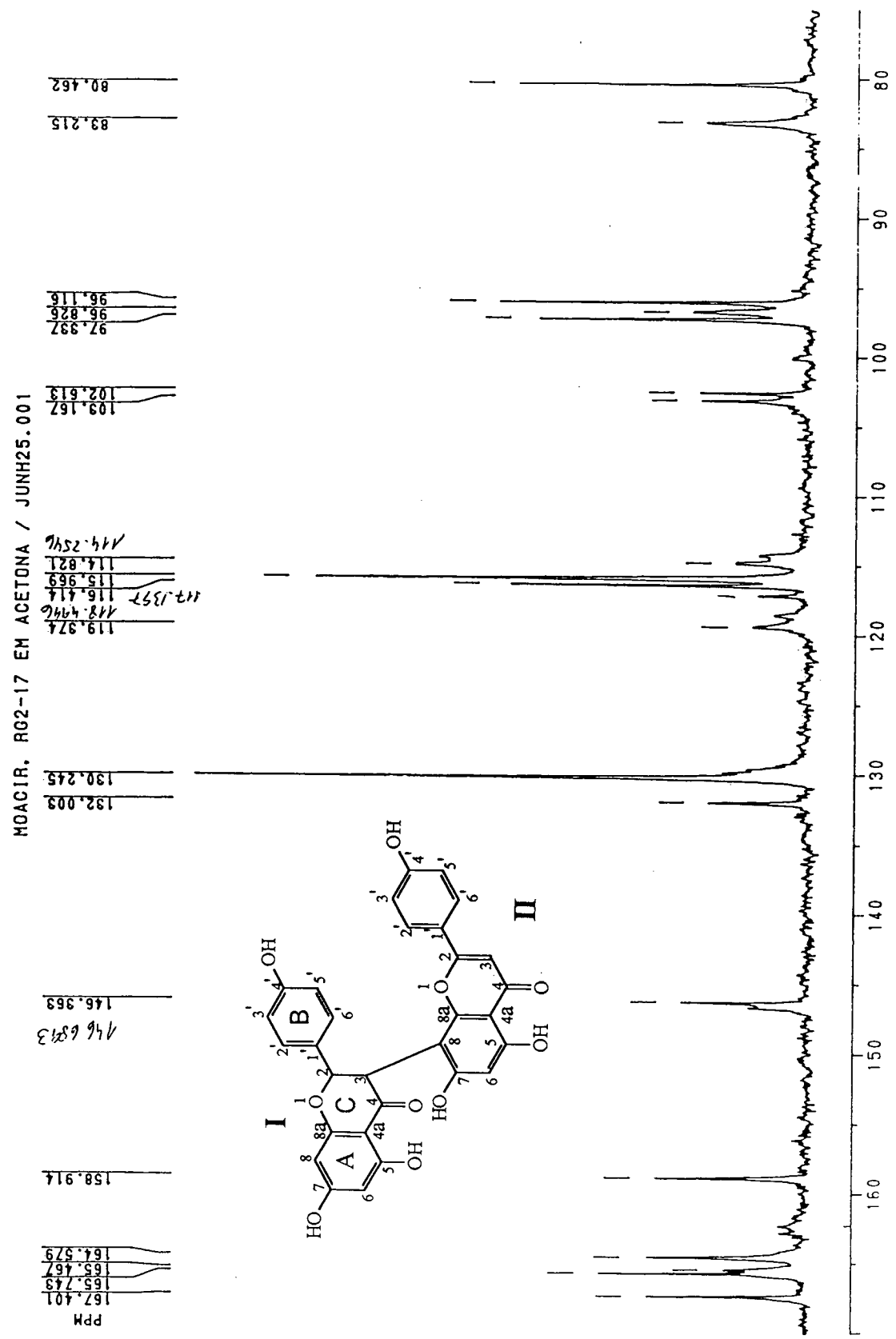


ESPECTRO 2 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, acetona d<sub>6</sub>) da Volkensiflavona.

MOACIR, RG2-17 EM ACETONA / JUNH25.001

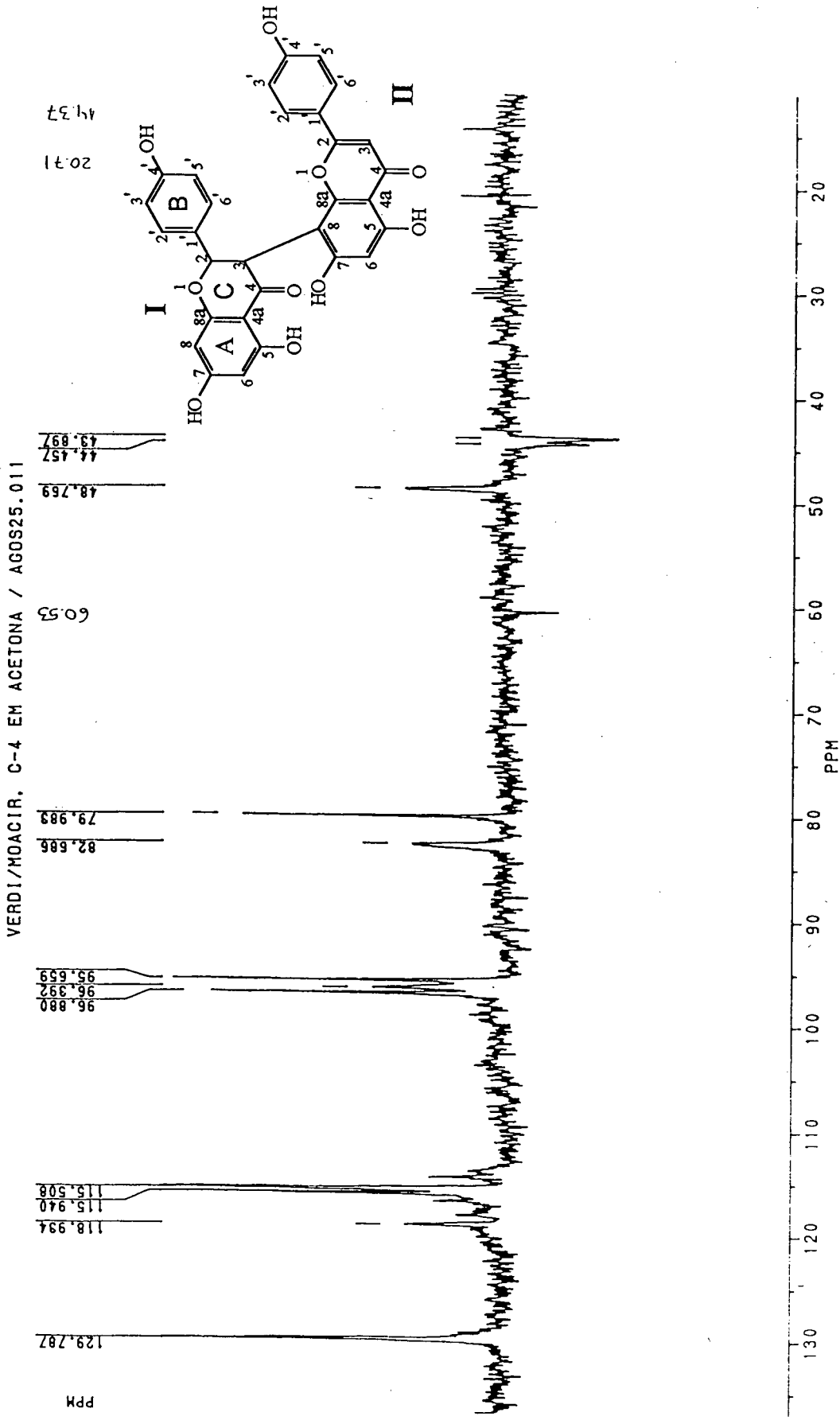


ESPECTRO 3 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) da Volkensiflavona.

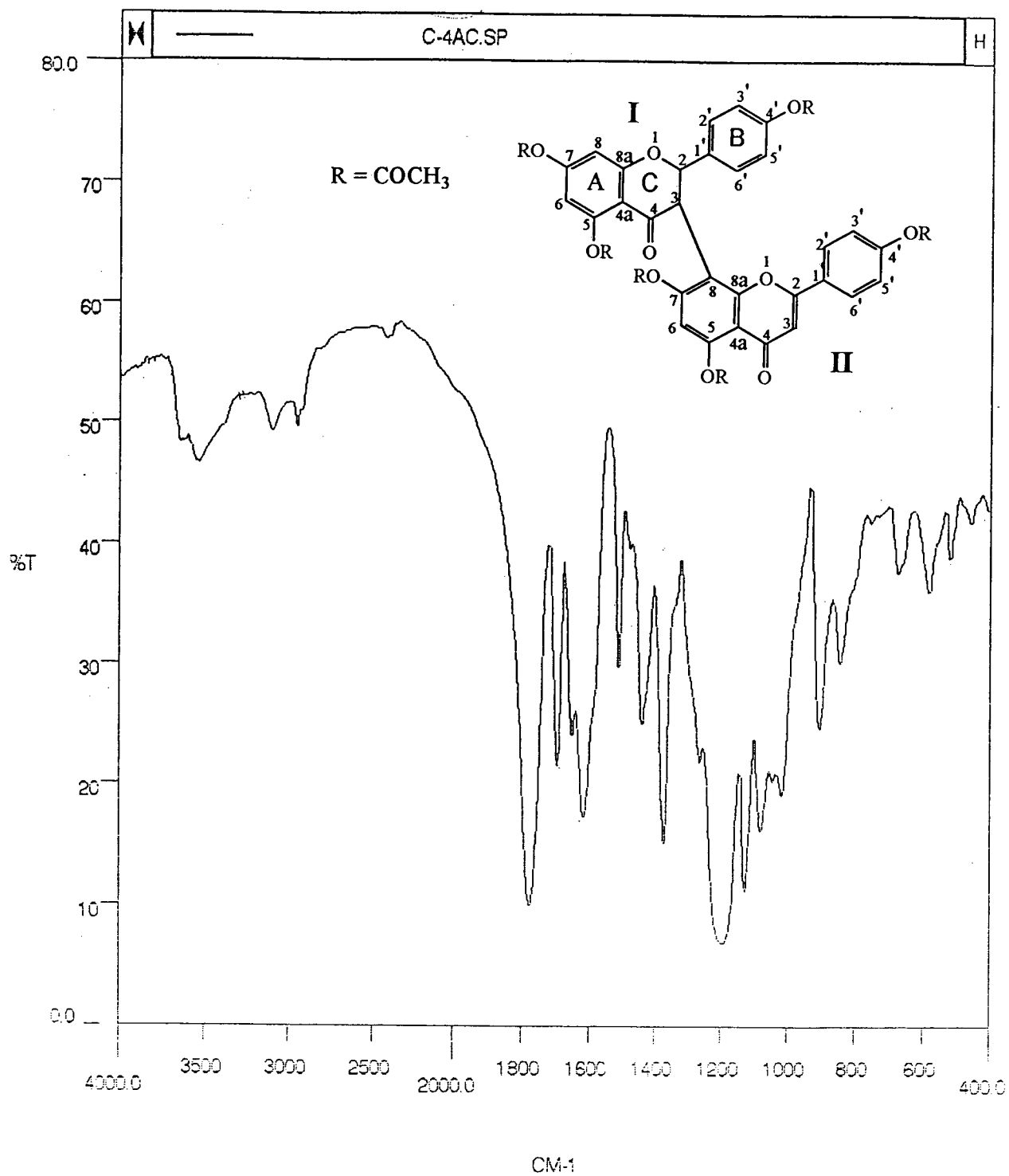


ESPECTRO 3a - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) da Volkensiflavona na região de 80 a 170 ppm.

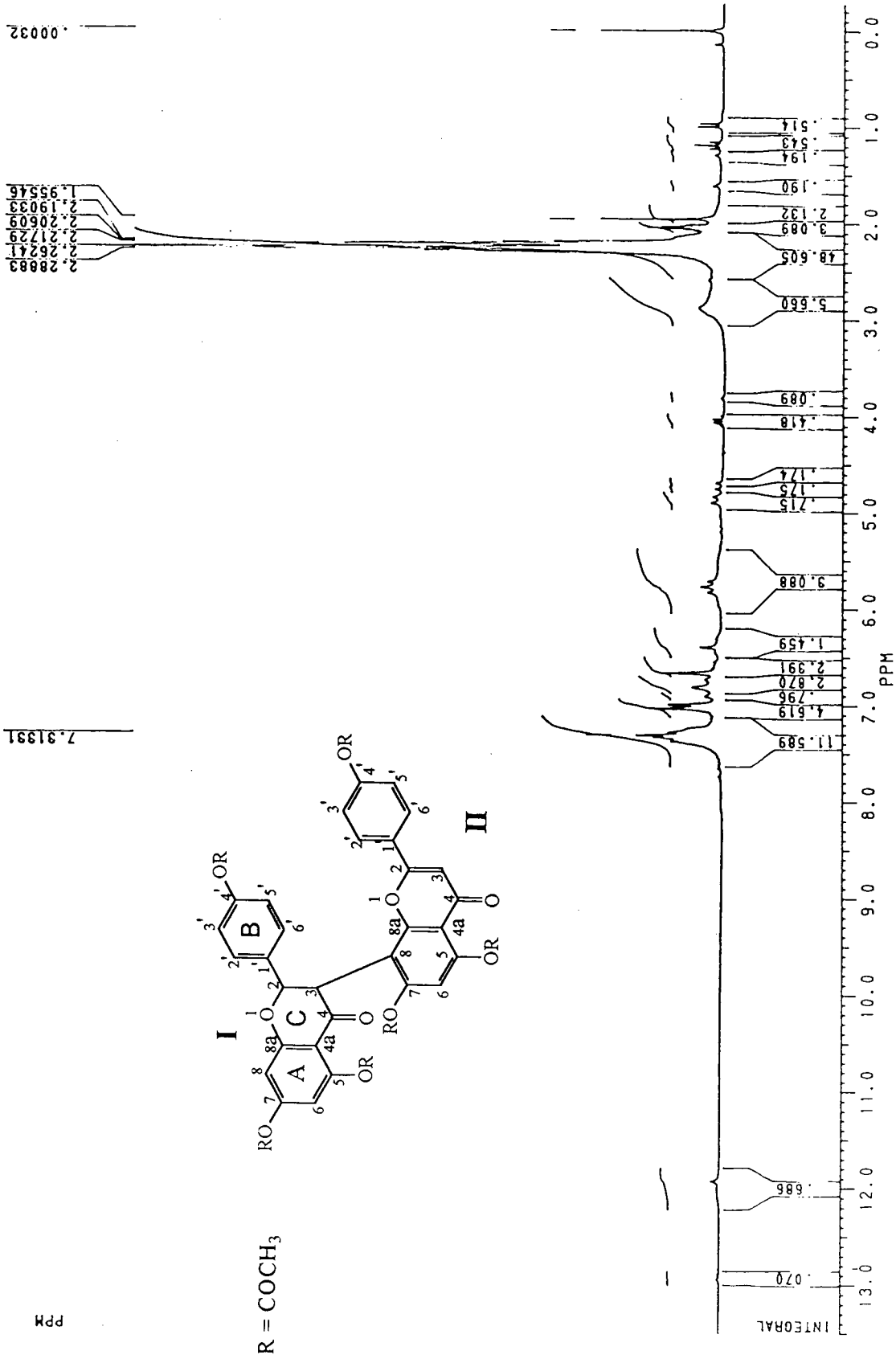




ESPECTRO 4 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) da Volkensiflavona.

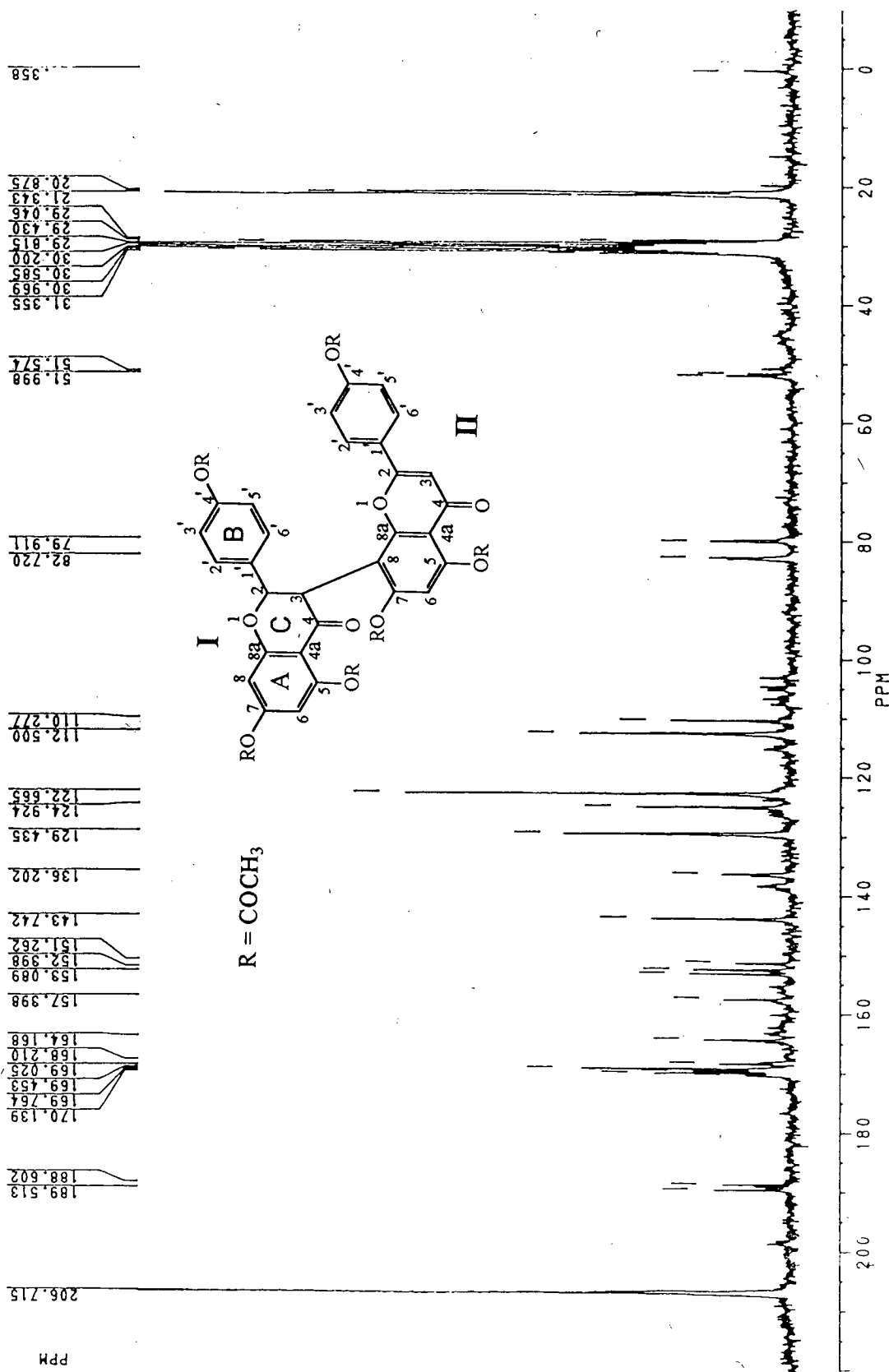


ESPECTRO 5 – Espectro de IV (KBr) da Volkensiflavona Peracetilada.

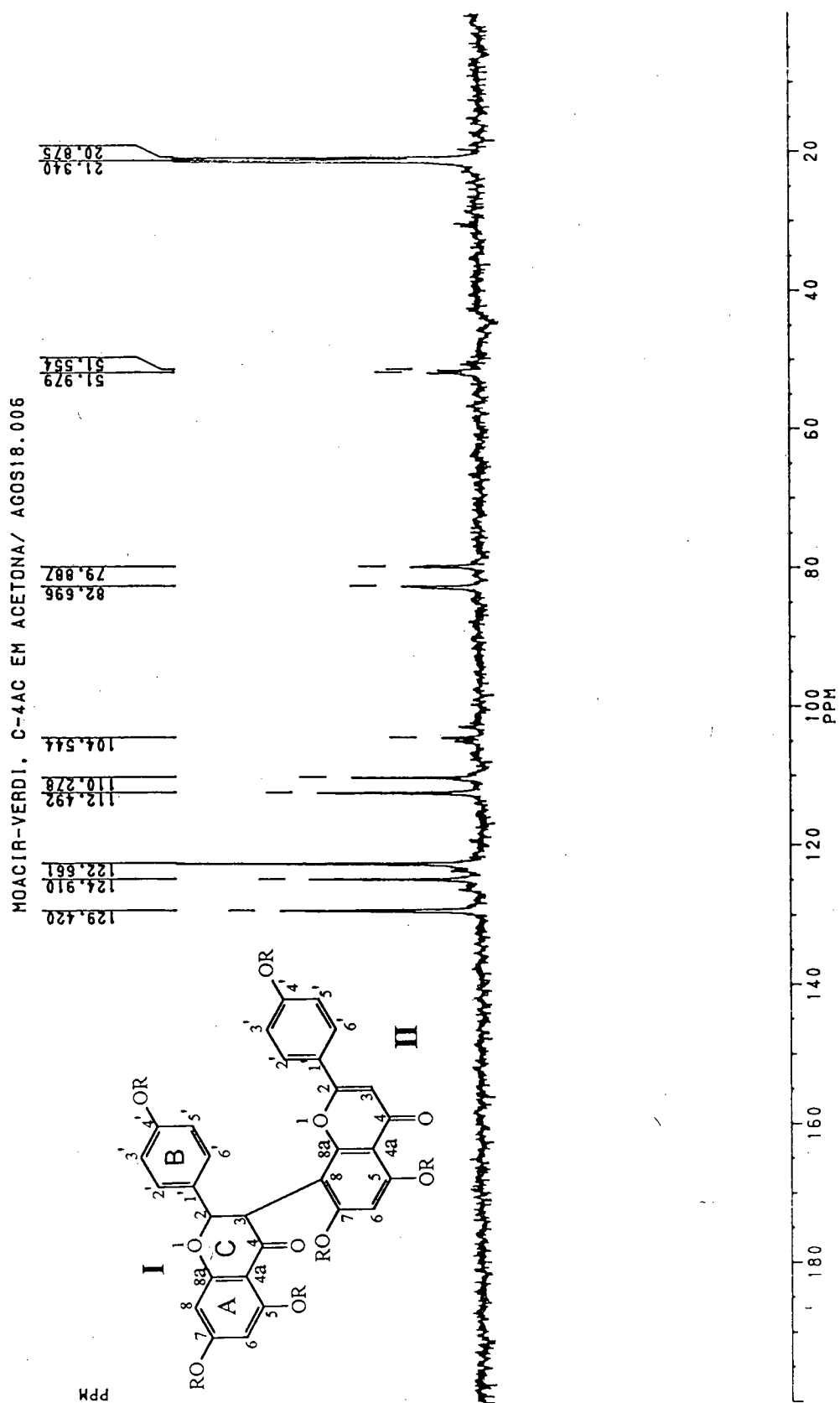


ESPECTRO 6 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, acetona d<sub>6</sub>) da Volkensiflavona Peracetilada.

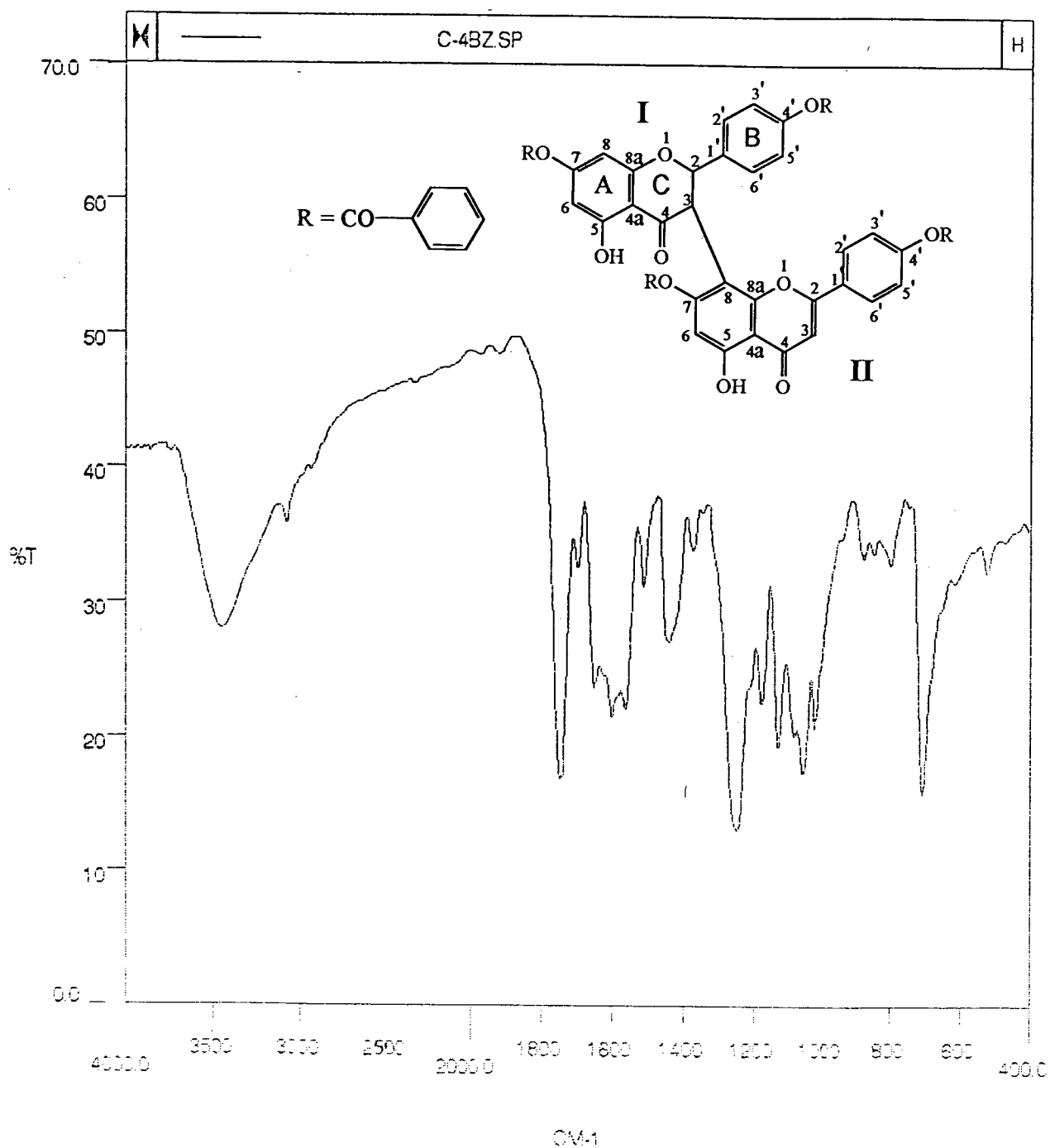
VERDI, C-4AC EM ACETONA / JULH28.011



ESPECTRO 7 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) da Volkensiflavona.

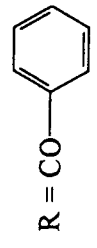
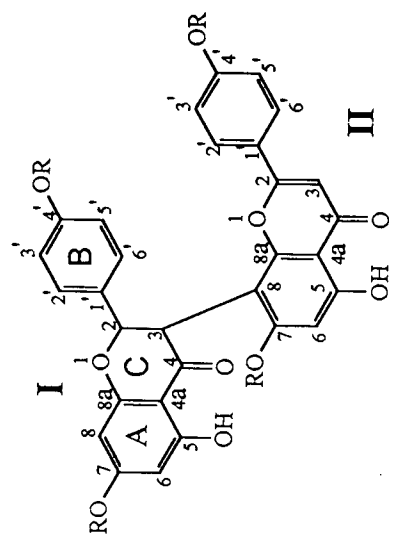
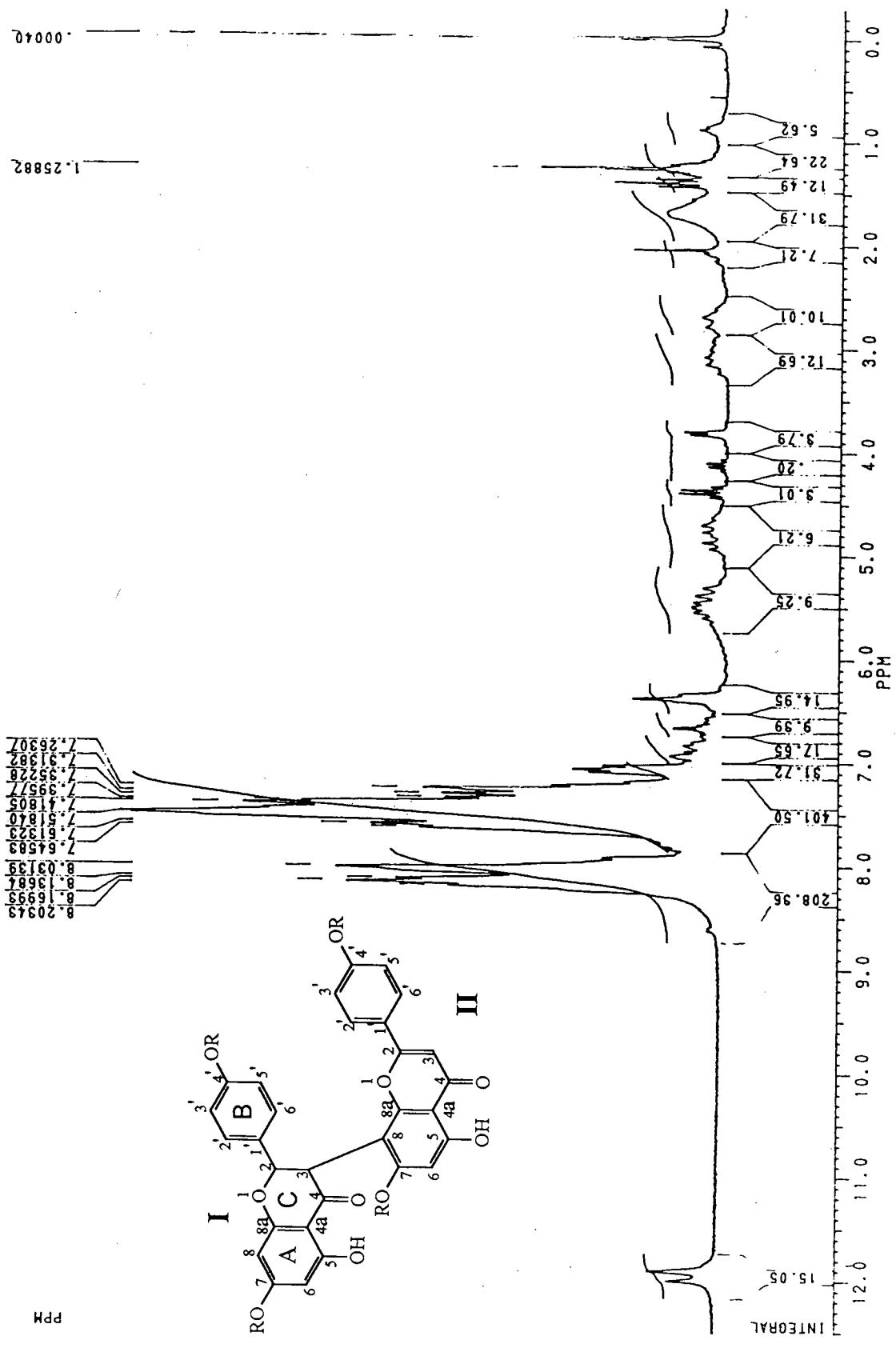


ESPECTRO 8 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) da Volkensiflavona Peracetilada.

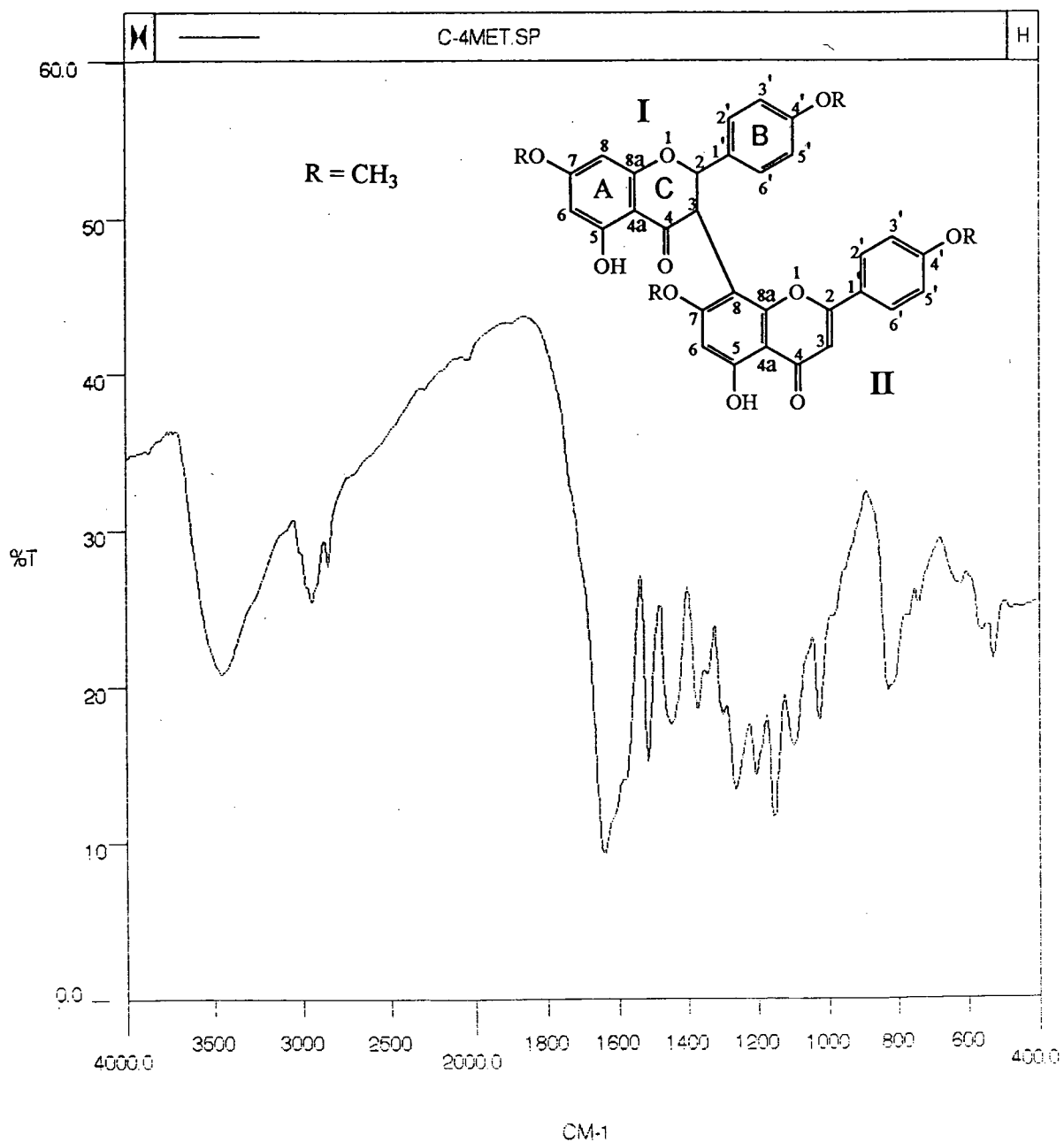


ESPECTRO 9 – Espectro de IV (KBr) da Volkensiflavona Benzoilada.

LUIZ GONZAGA, C-4, 5-BZ EM CDCL3 / OUTU22.008



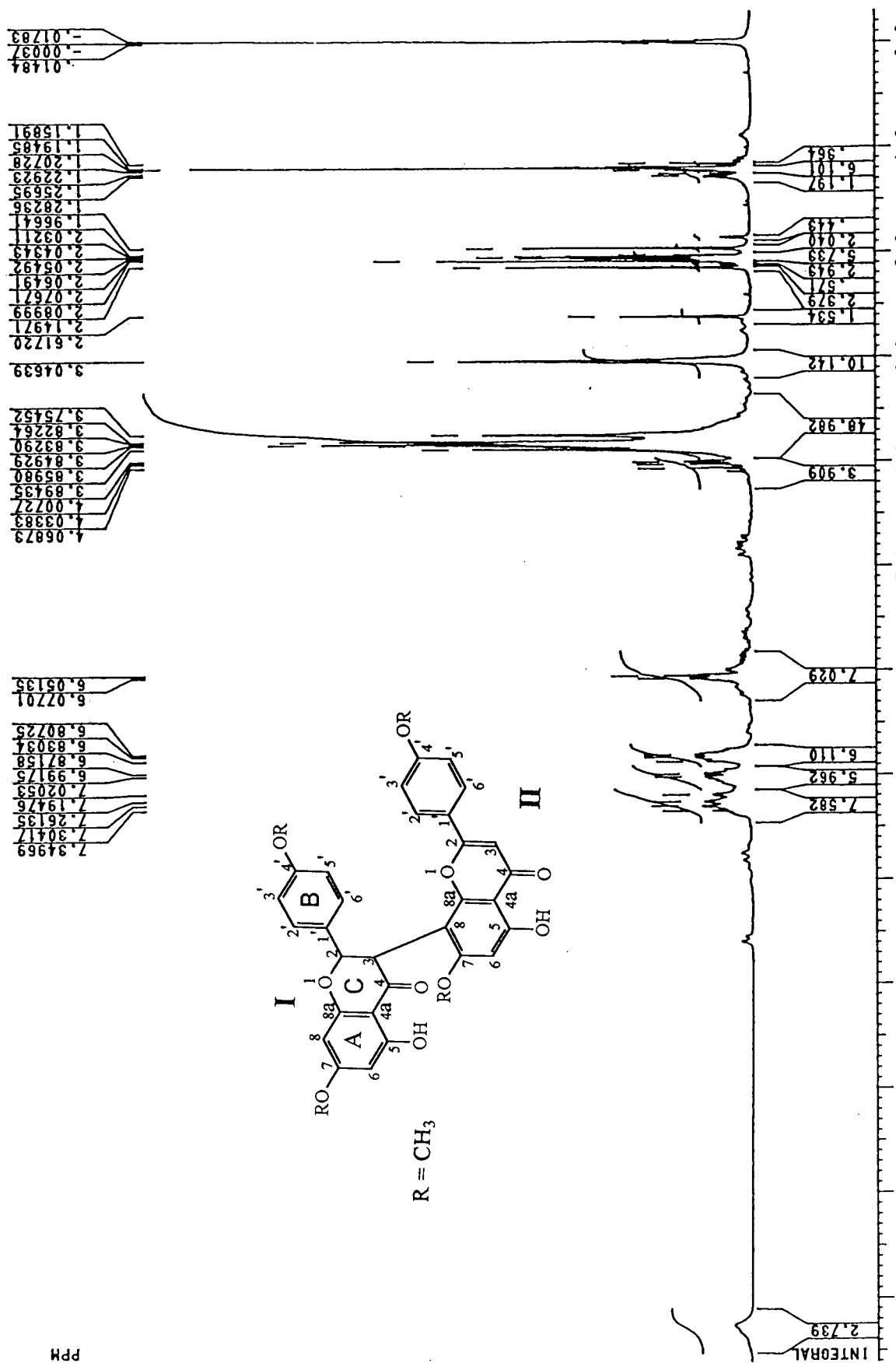
ESPECTRO 10 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Volkensiflavona Benzoilada.



ESPECTRO 11 – Espectro de IV (KBr) da Volkensiflavona Metilada.



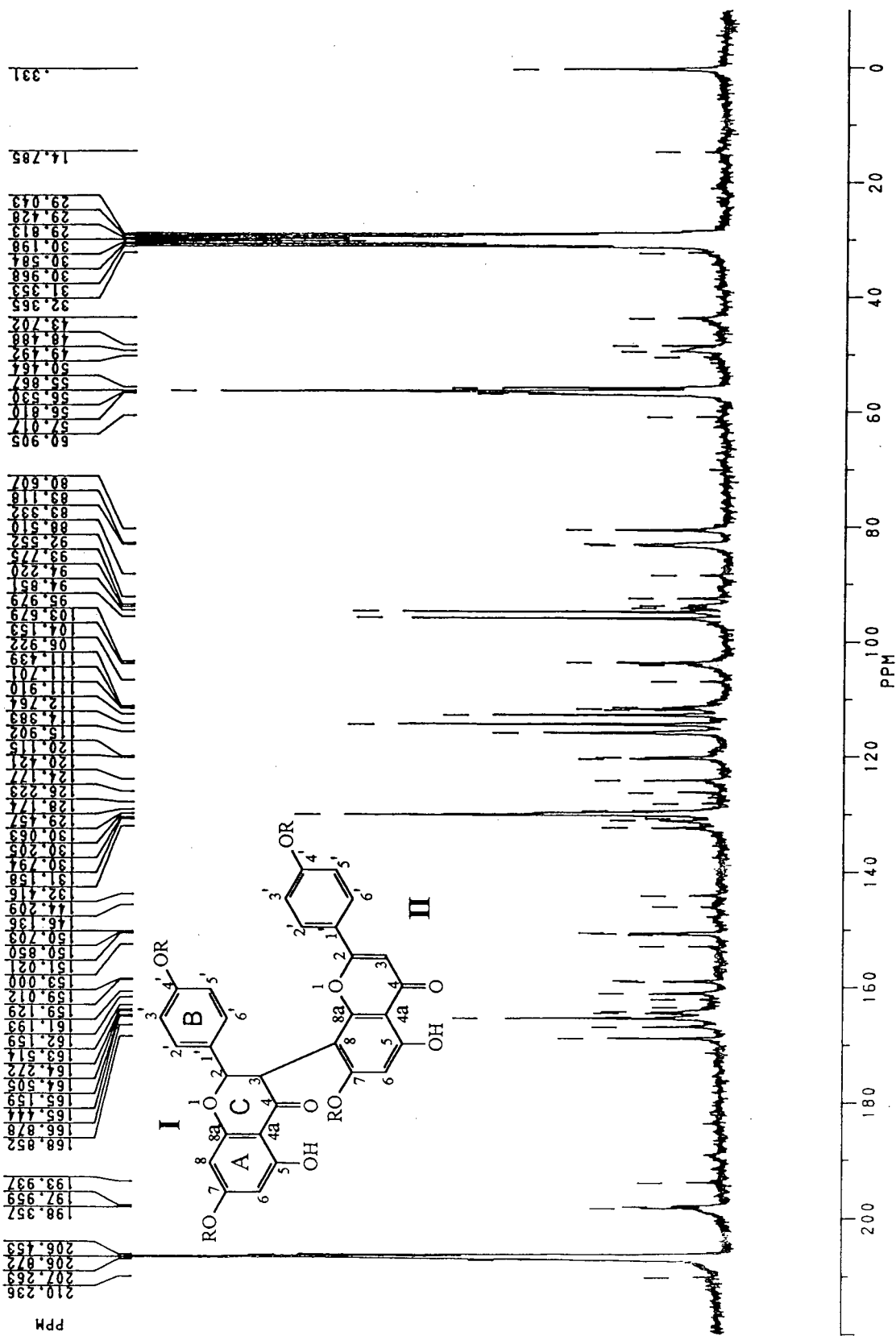
LUIZ VERDI, C-4MET EM ACETONA / NOVE26.003



ESPECTRO 12 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Volkensiflavona Metilada.

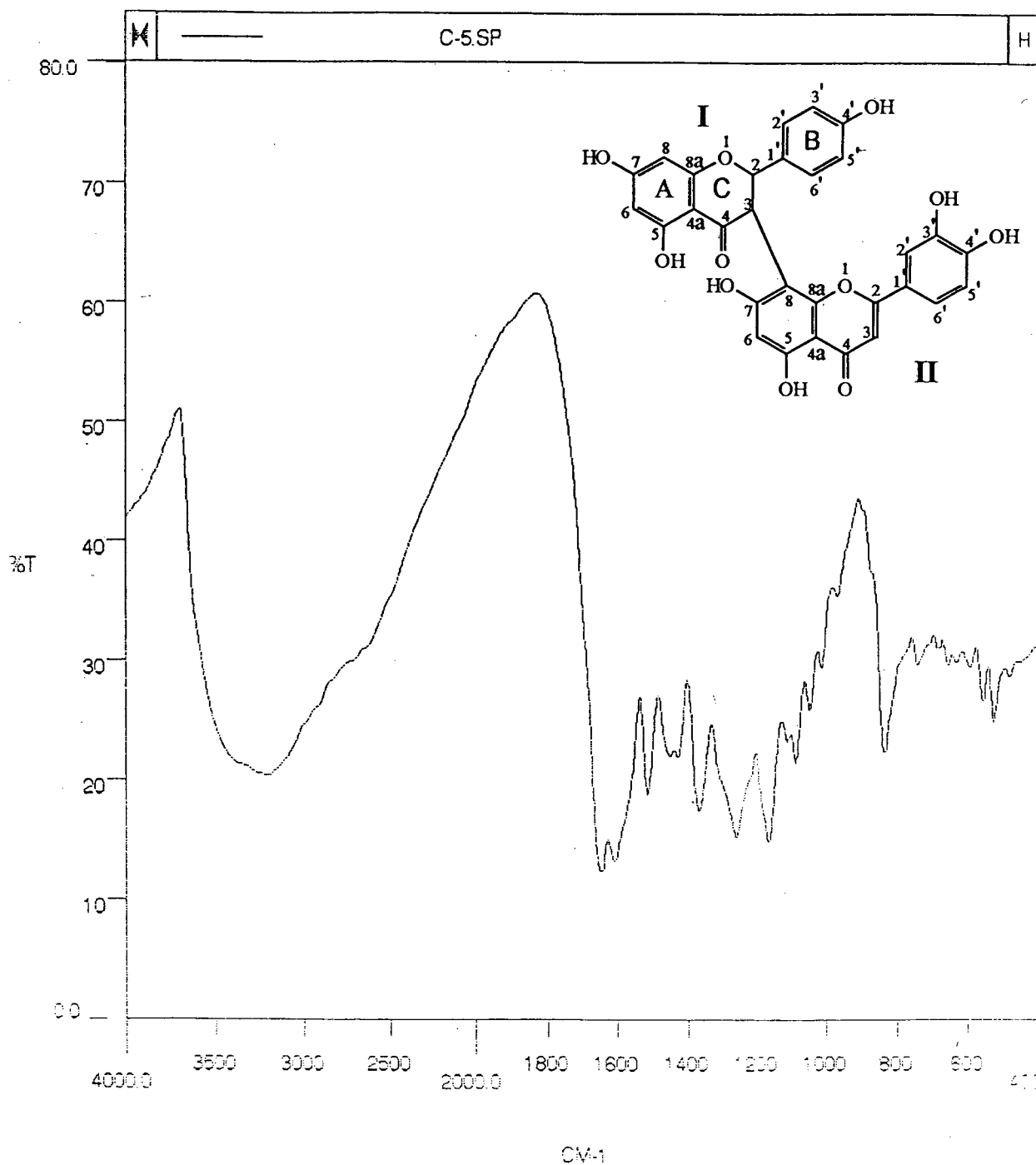
PPM

VERDI, C-4NA EM ACETONA / ABR116.001



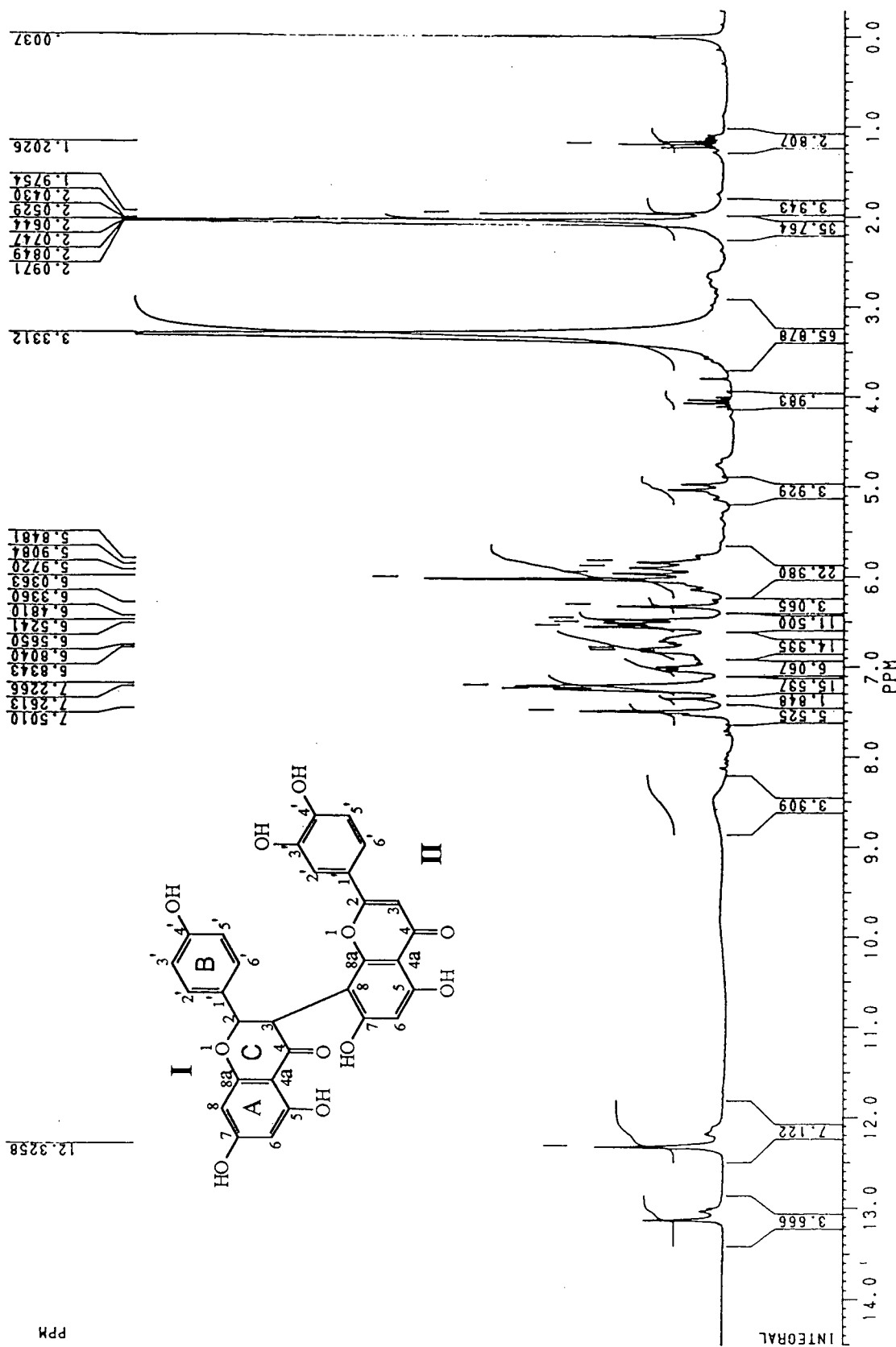
R = CH<sub>3</sub>

ESPECTRO 13 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) da Volkensiflavona Metilada.

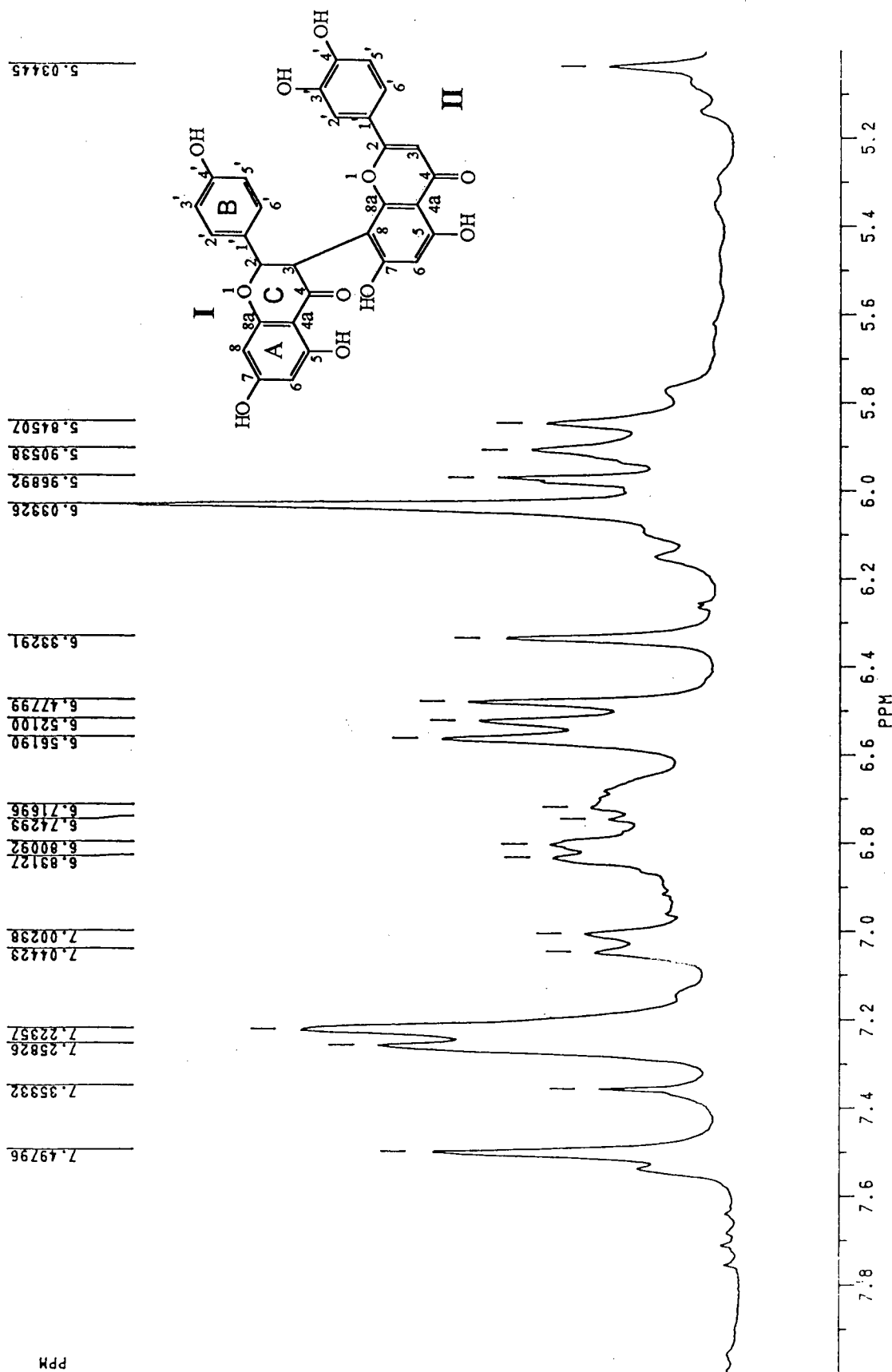


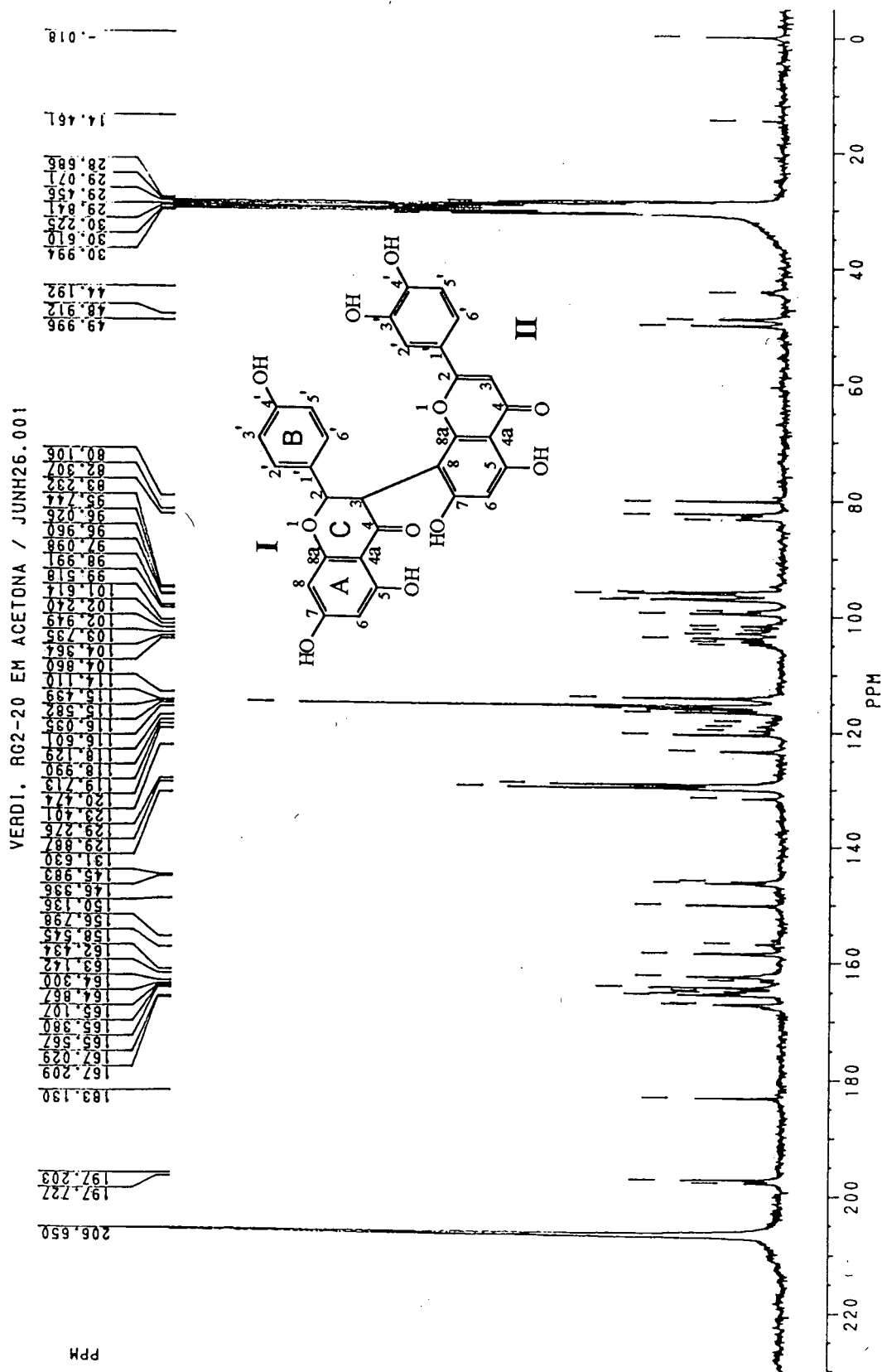
ESPECTRO 14 – Espectro de IV (KBr) do Fukugetin.

VERDI, RG-2-20 EM ACETONA / JUNH15.013



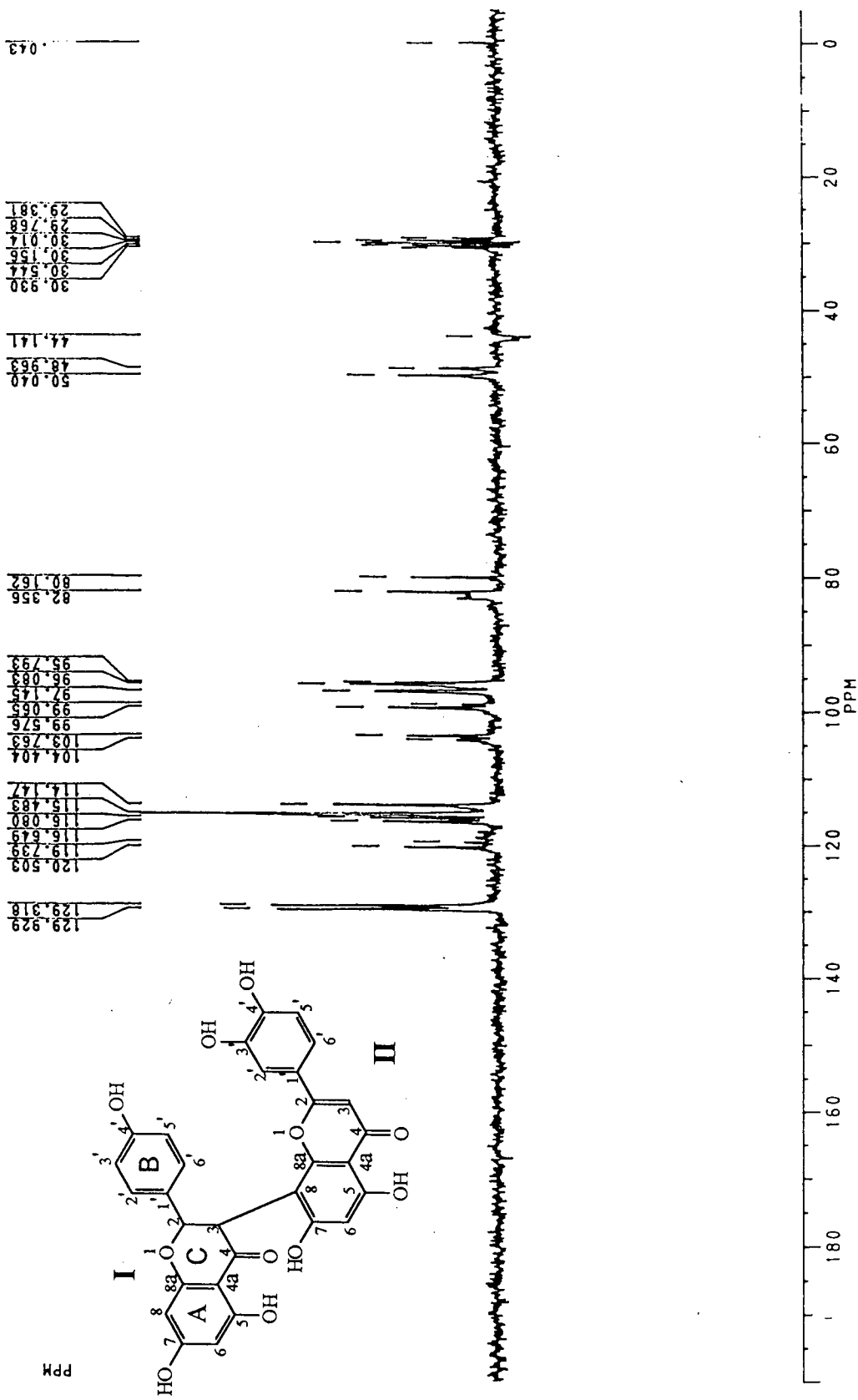
VERDI, RG-2-20 EM ACETONA / JUNH15.013

ESPECTRO 15a - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, acetona  $d_6$ ) do Fukugetin expandido na região de 5 a 7,6 ppm.

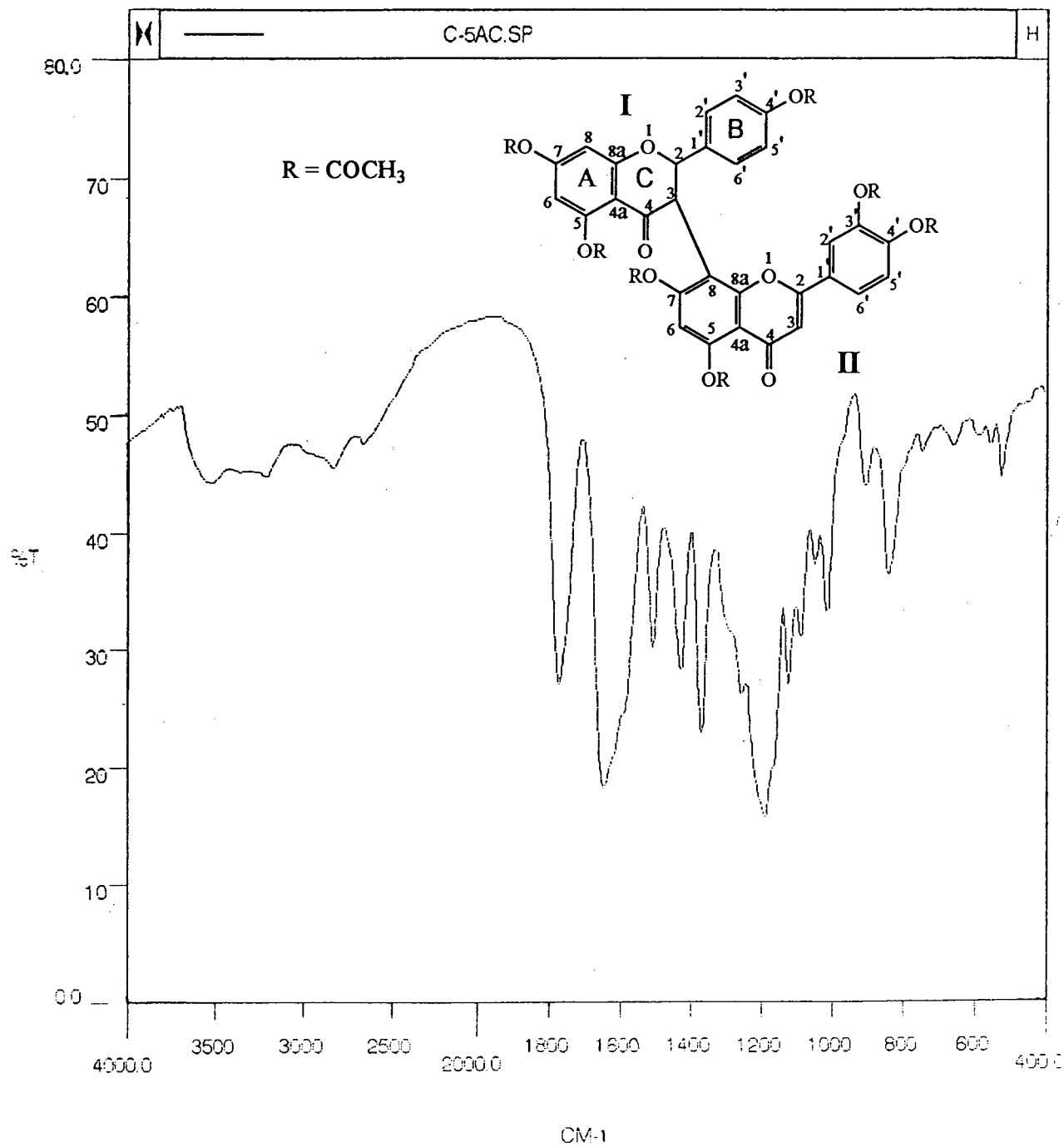


ESPECTRO 16 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugetin.

MOACIR, RG-2-20 EM ACETONA / JULH13.001



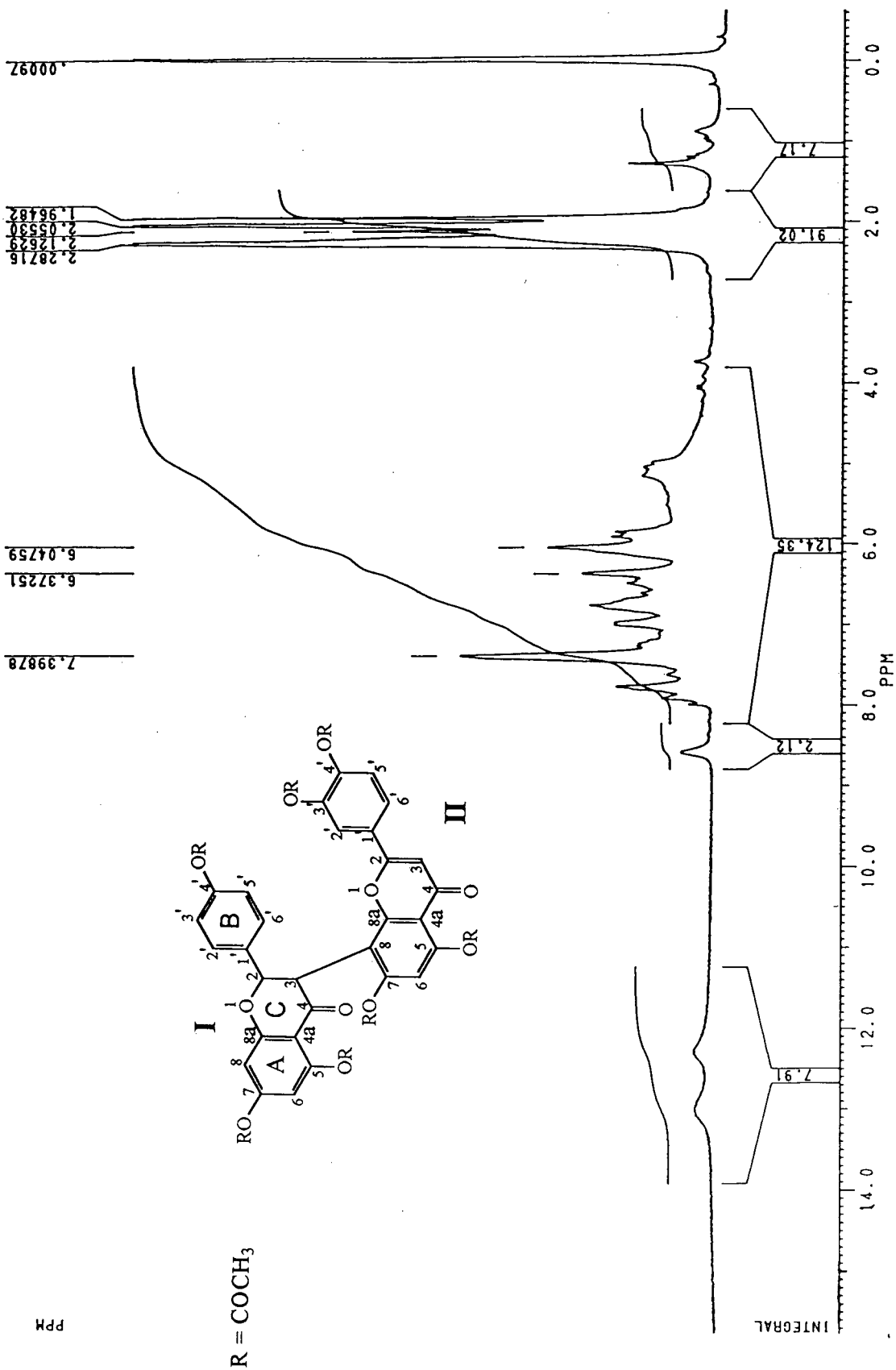
ESPECTRO 17 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugetin.



ESPECTRO 18 - Espectro de IV ( KBr ) do Fukugetin Peracetilado.

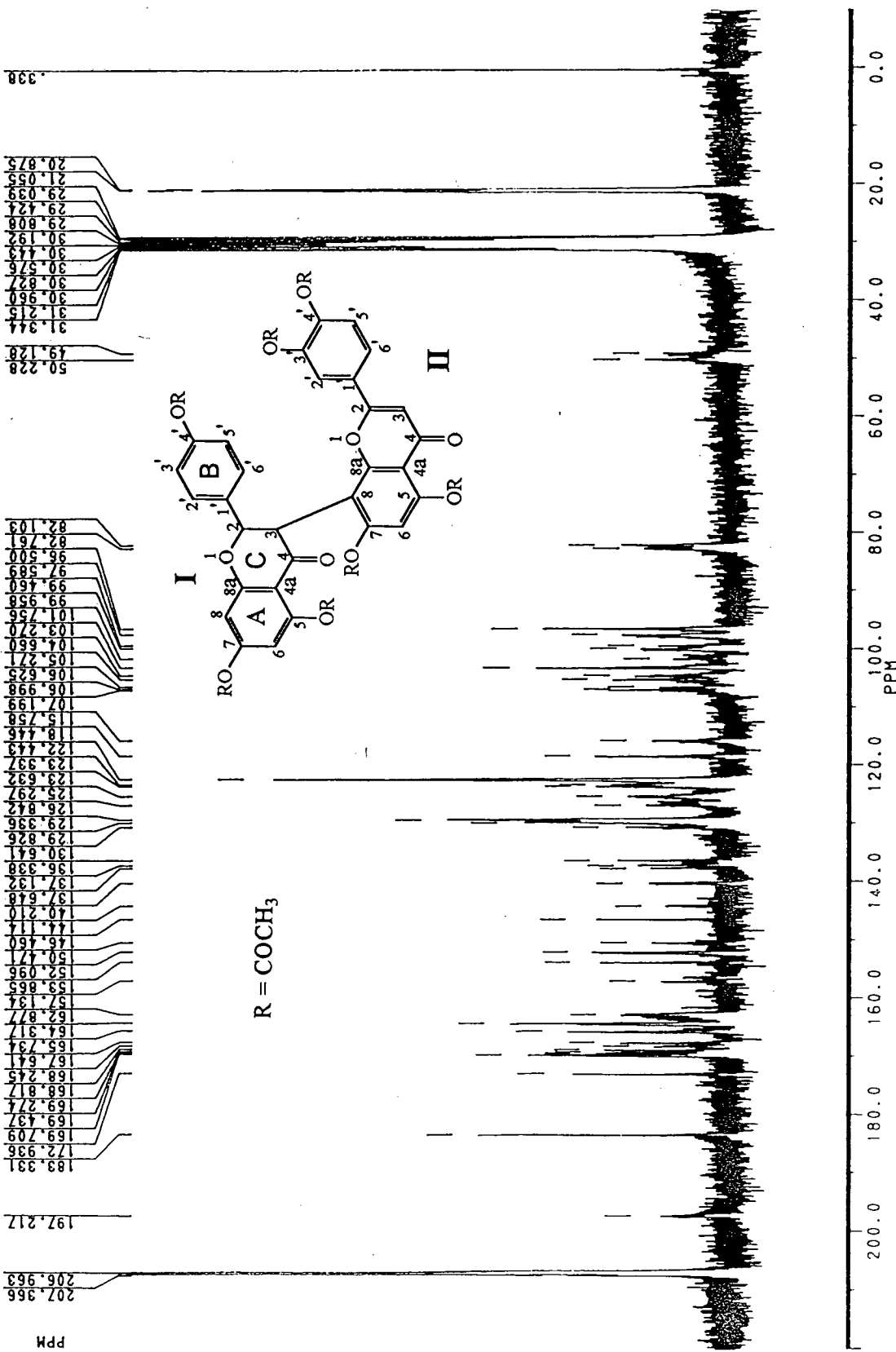


VERDI. C-5A EM ACETONA / MARC24.004

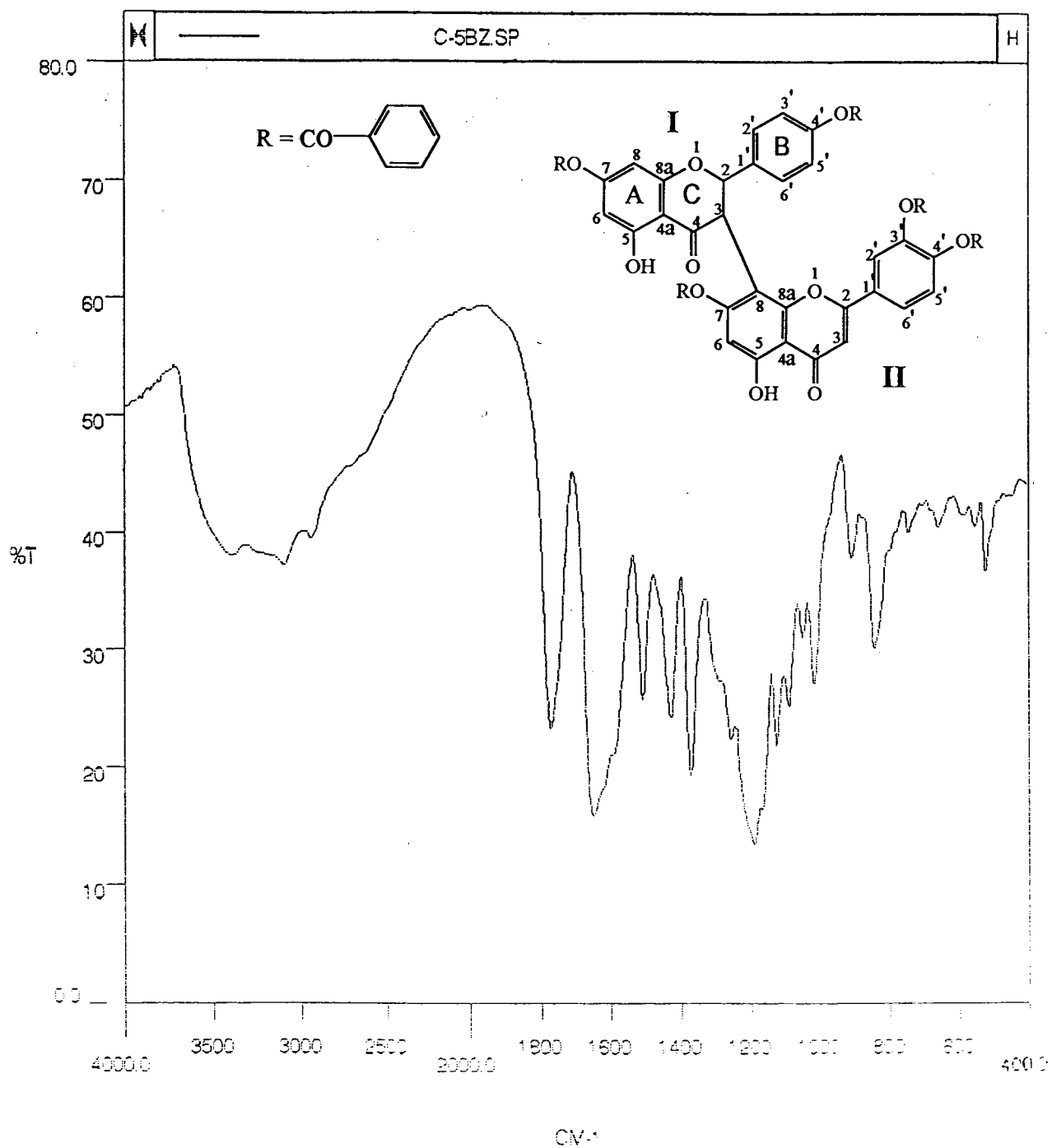


ESPECTRO 19 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugetin Peracetilado.

VERDI, C-5A EM ACETONA / ABR103.010

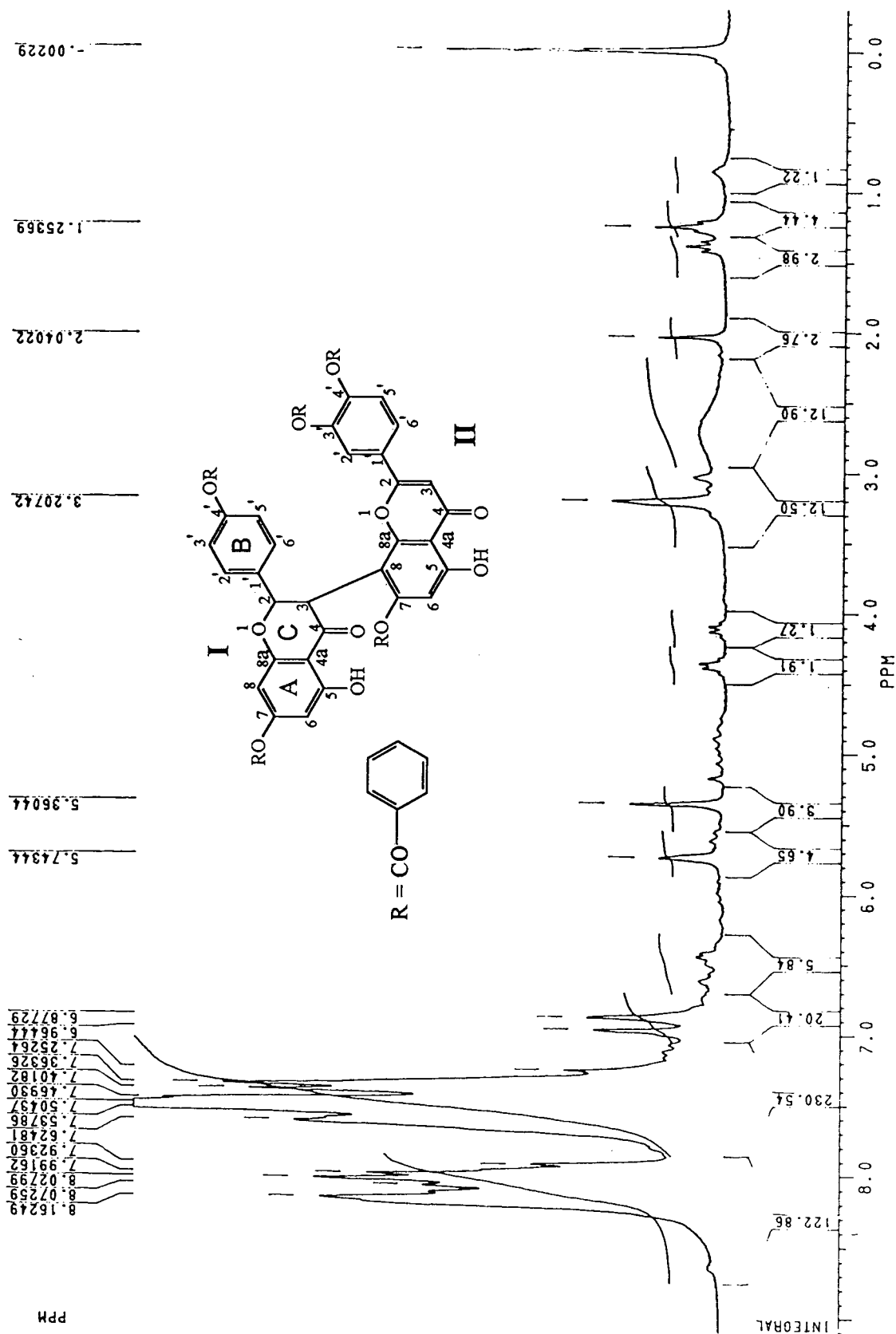


ESPECTRO 20 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugetin Peracetilado.

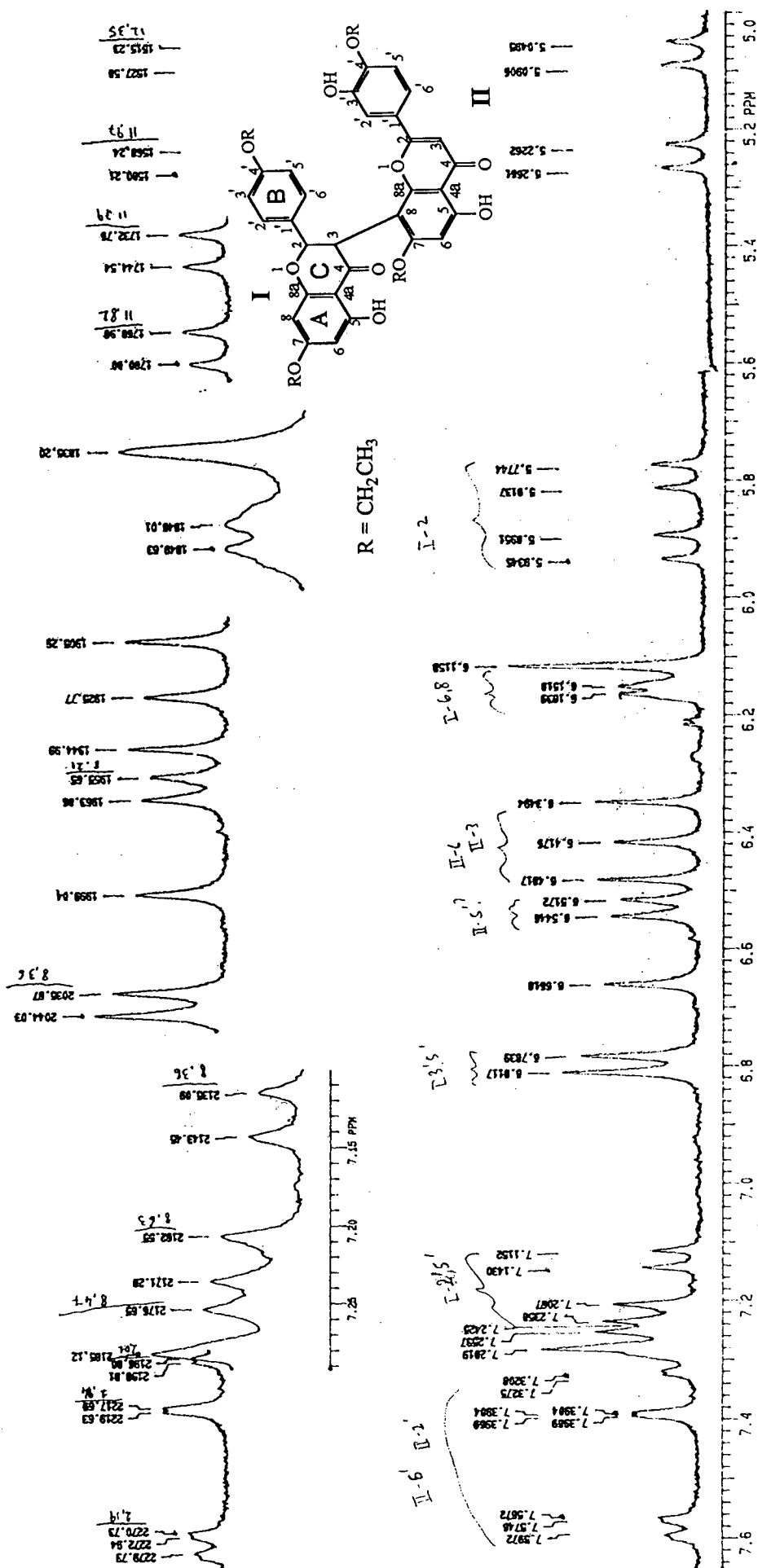


ESPECTRO 21 – Espectro de IV (KBr) do Fukugetin Benzoilado.

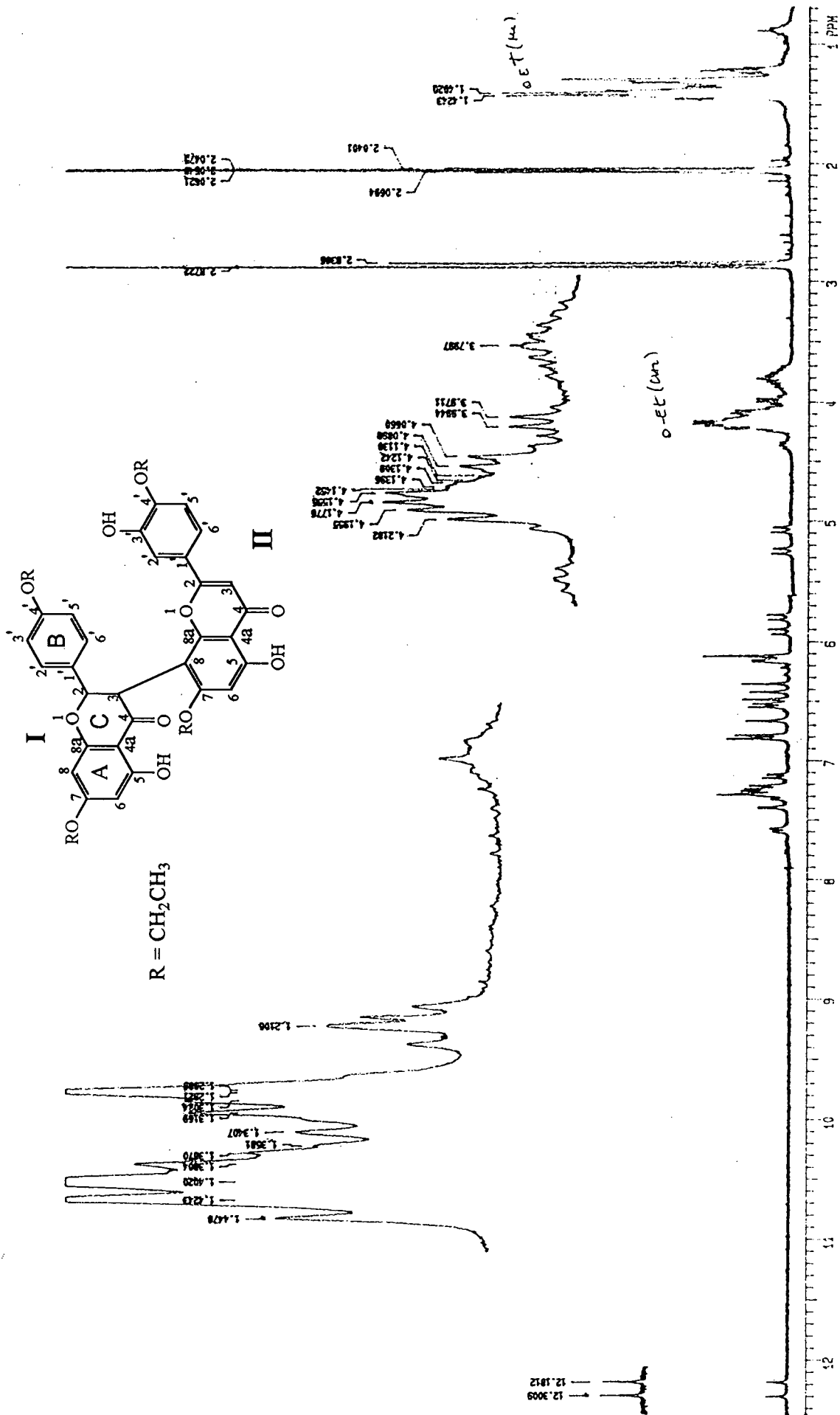
LUIZ GONZAGA, C-5-BZ-EM CDCL3 / OUTU22.007

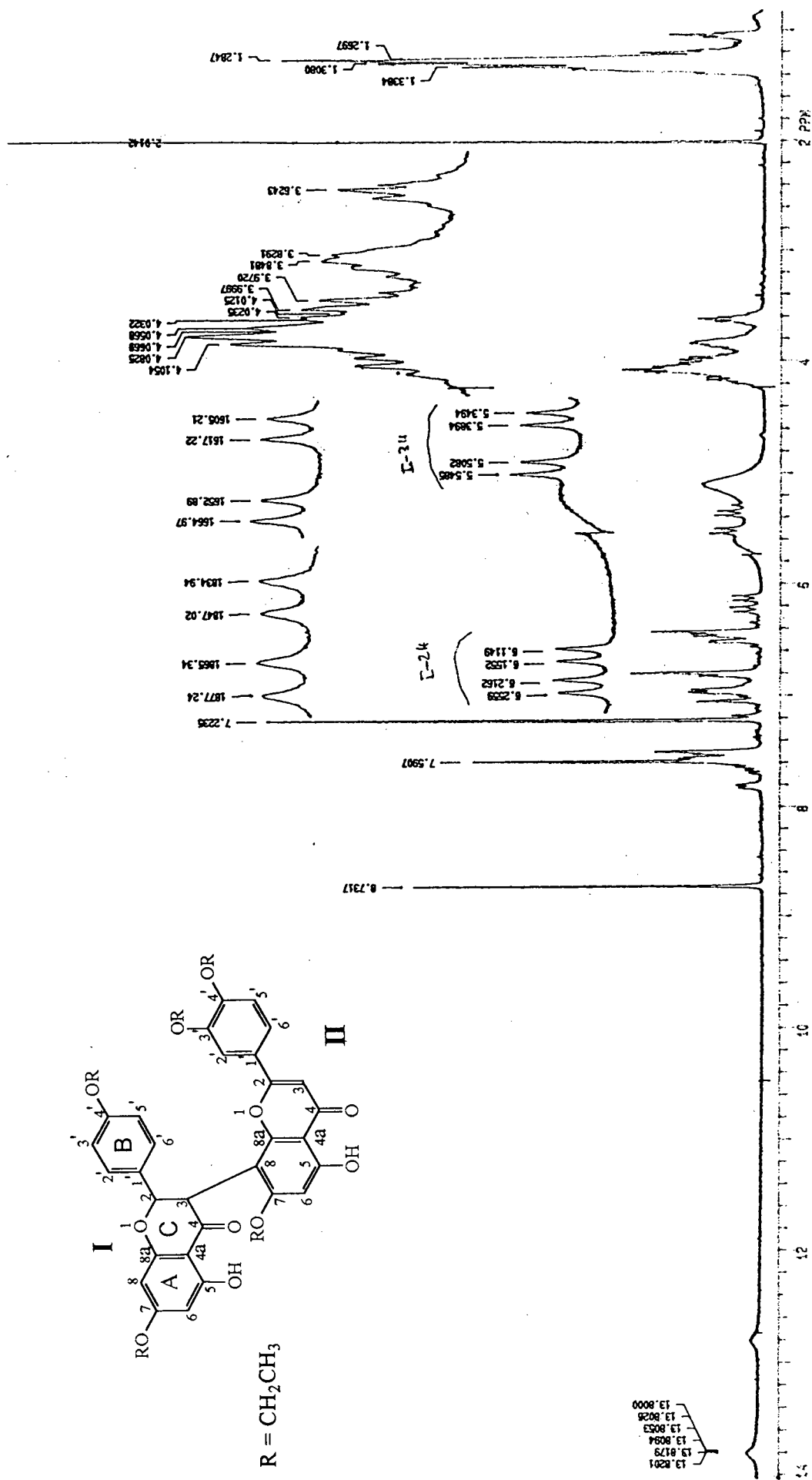


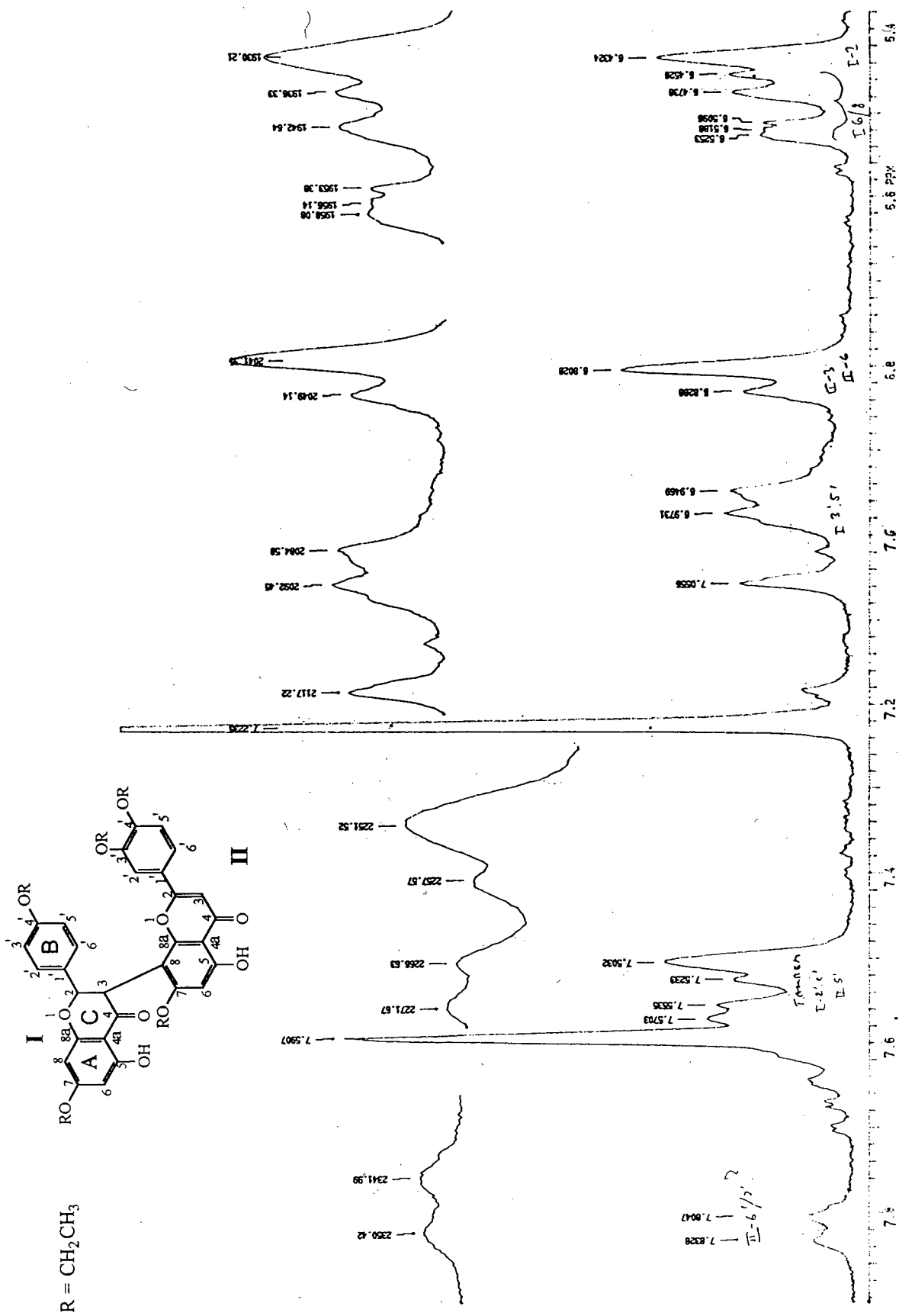
ESPECTRO 22 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugetin Benzoilado.



ESPECTRO 23 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do Fukugetin Etilado - 5<sub>3</sub>.

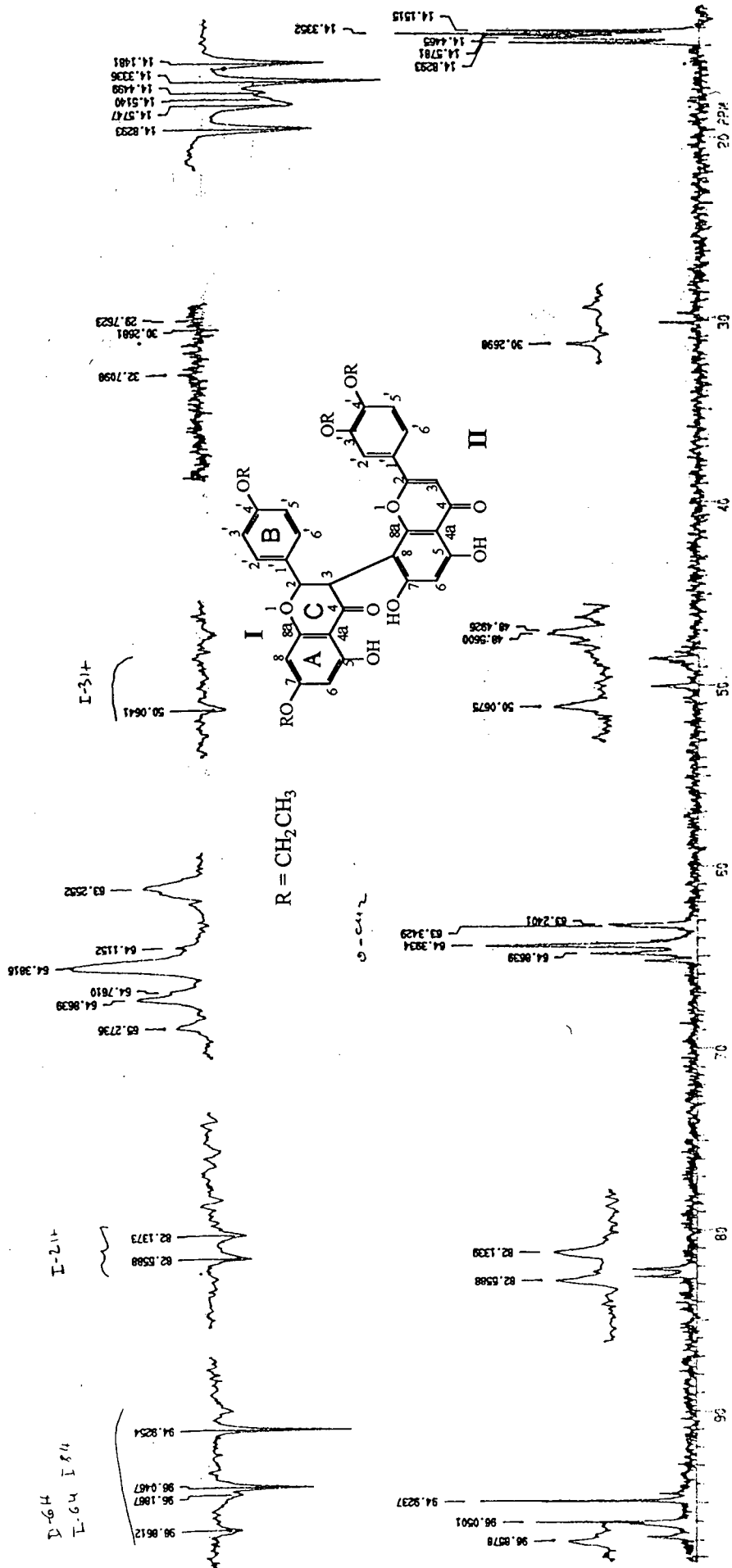






ESPECTRO 25a - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, piridina d<sub>5</sub>) do Fukugetin Etilado - 5<sub>1</sub> expand. na região de 5-8 ppm.

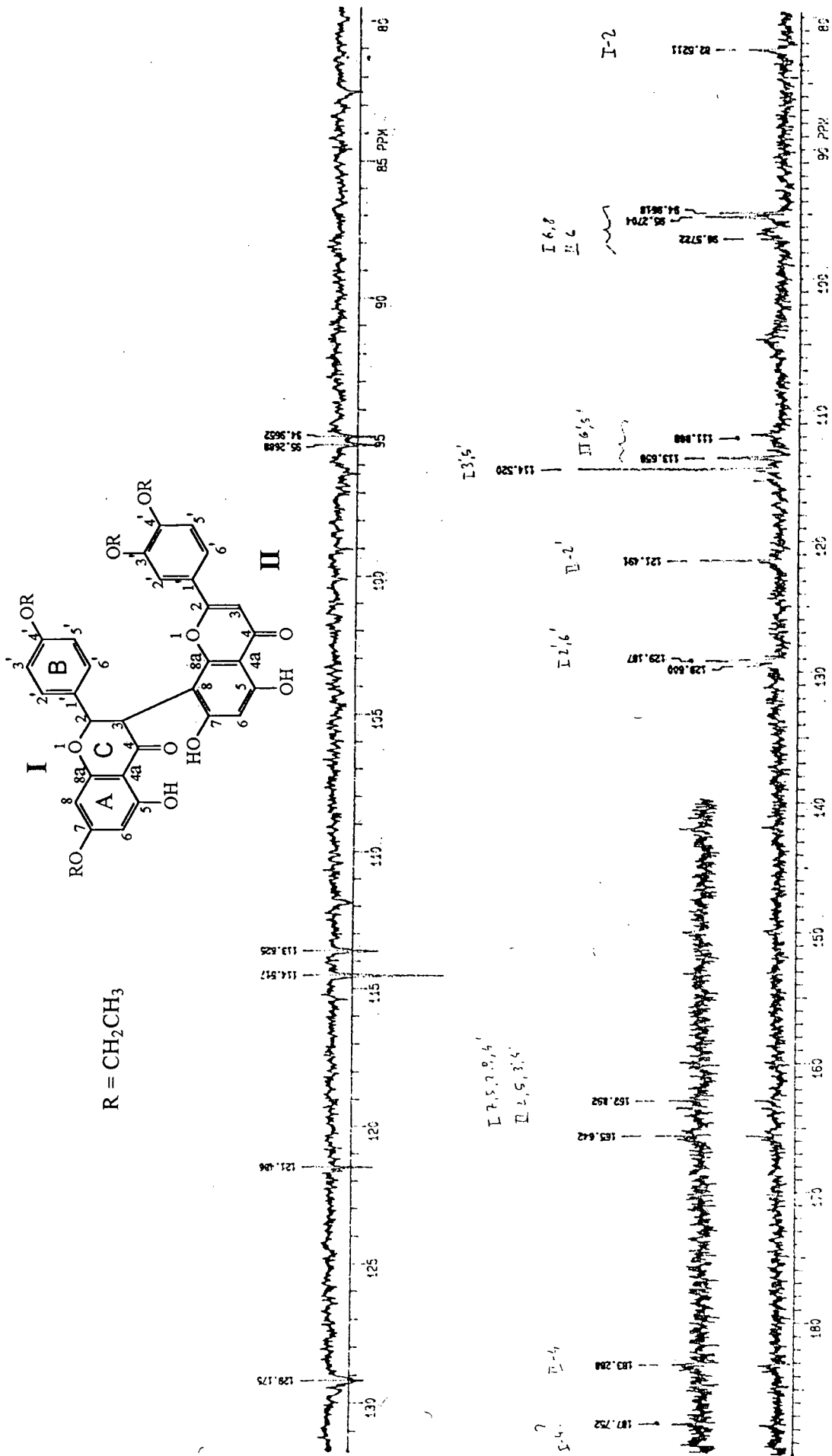




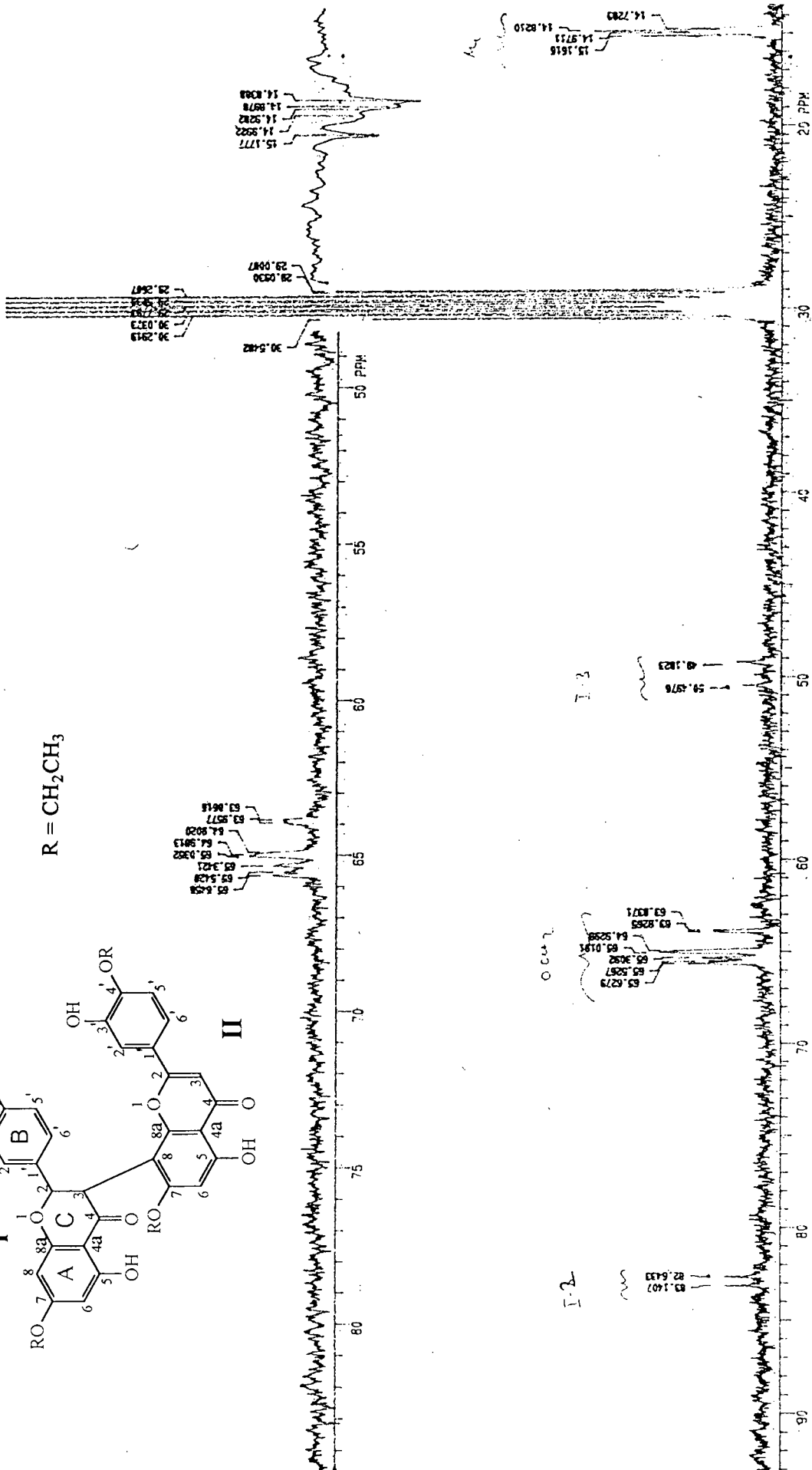
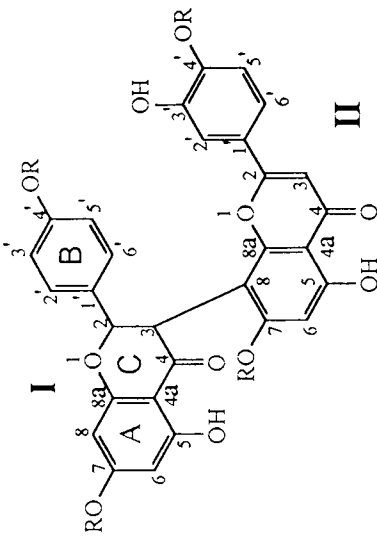
ESPECTRO 26 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do Fukugetin Etilado - 5<sub>2</sub>.



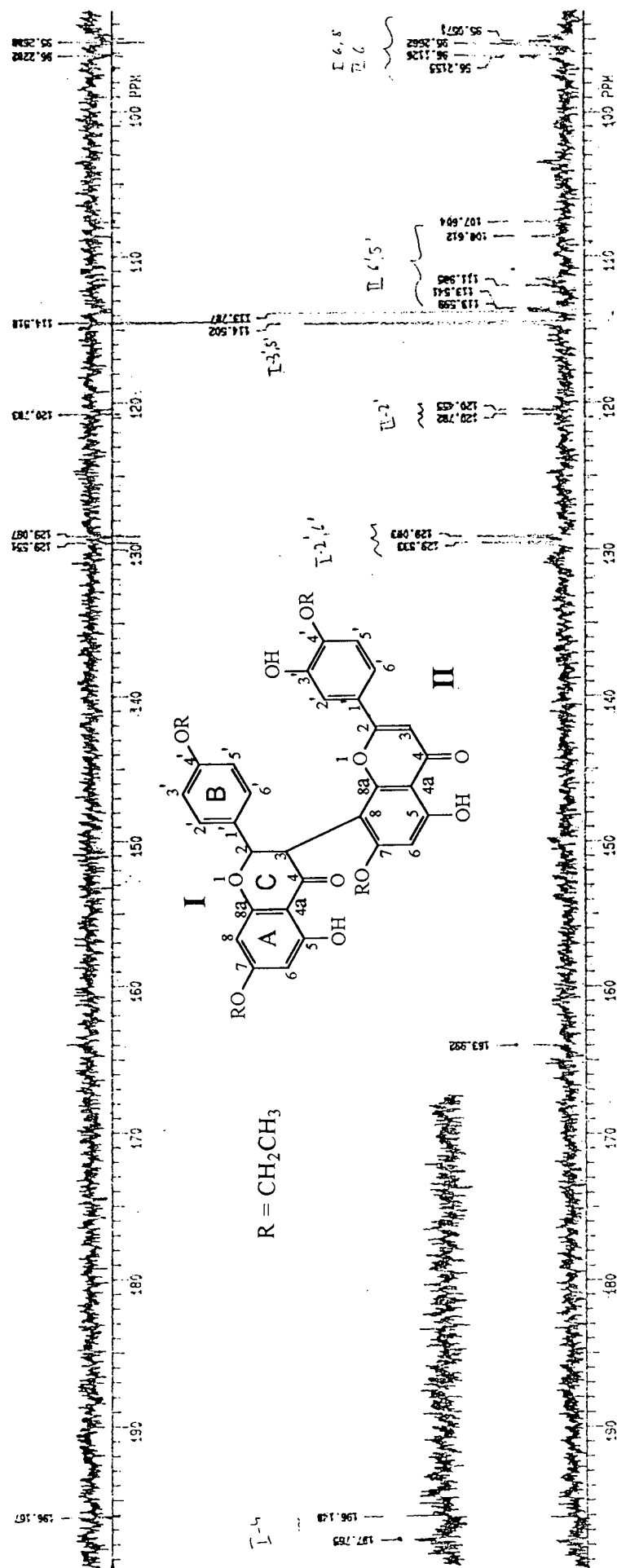




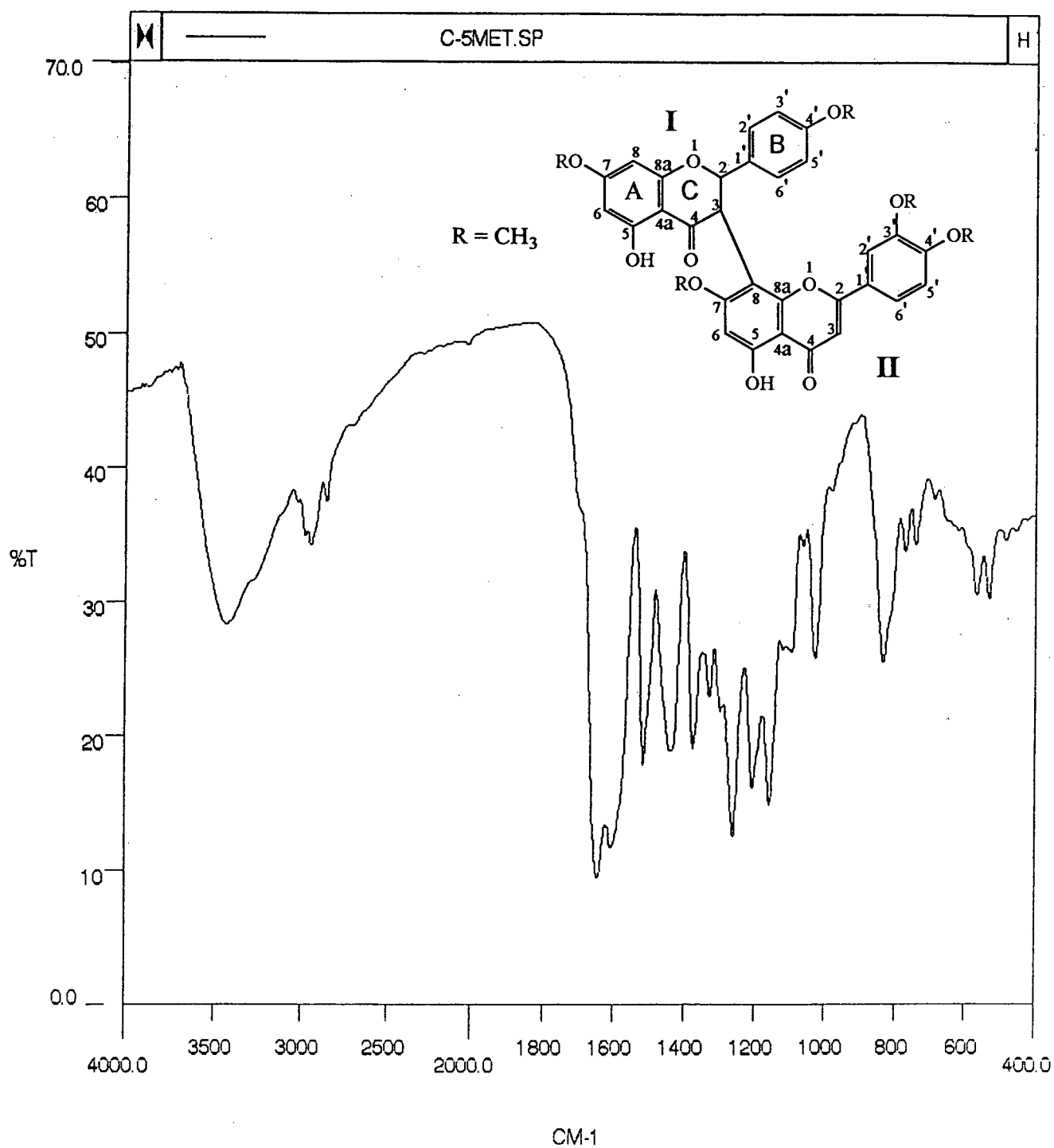
ESPECTRO 29 - Espectro de RMN  $^{13}C$ /APT (75 MHz,  $CD_3OD$ ) do Fukugetin Etilado - 52.



ESPECTRO 30 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/APT (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do Fukugetin Etilado - 5<sub>3</sub>.

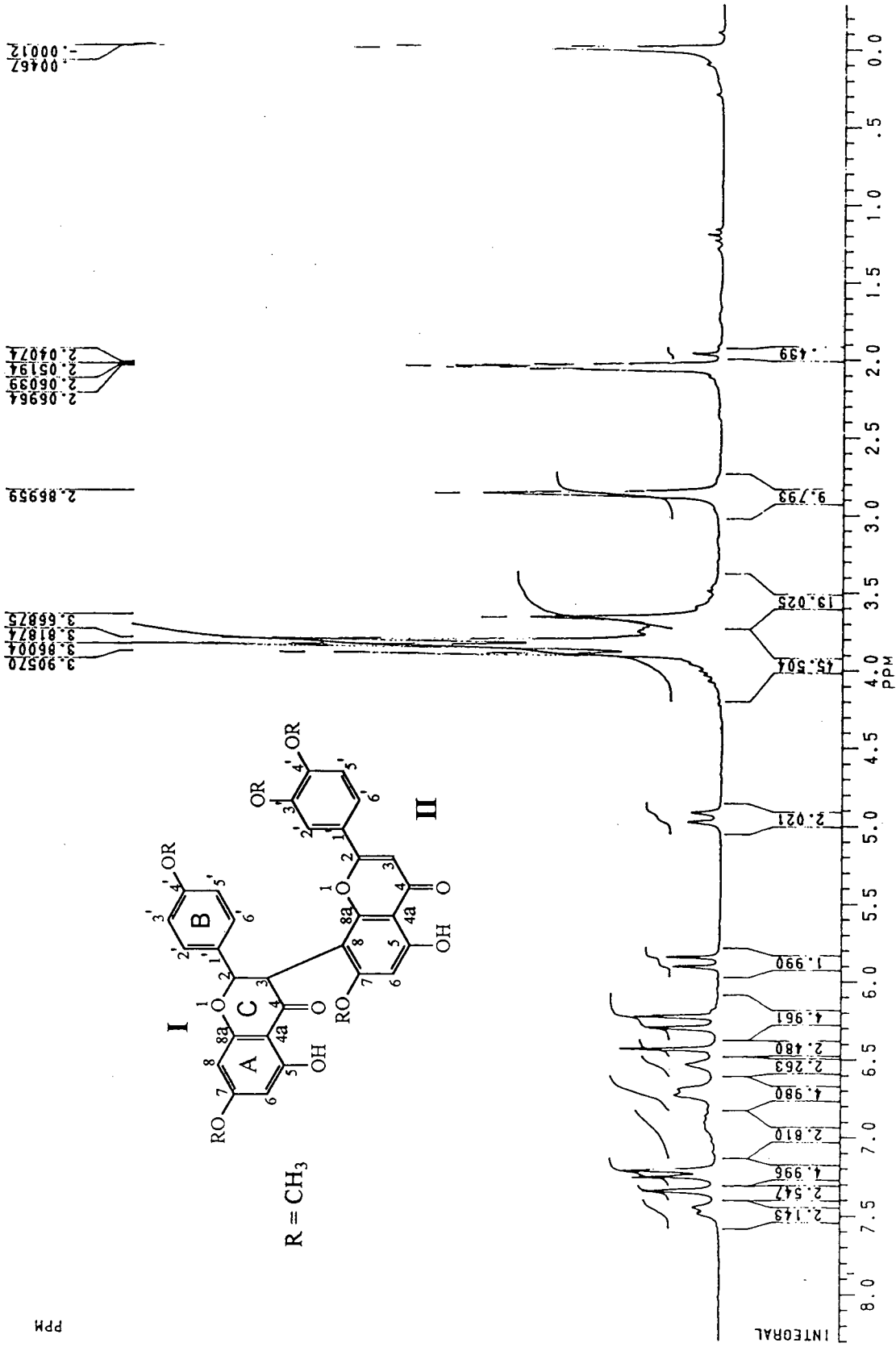


ESPECTRO 31 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/APT (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do Fukugetin Etilado - 5<sub>3</sub>.



ESPECTRO 32 – Espectro de IV (KBr) do Fukugetin Metilado.

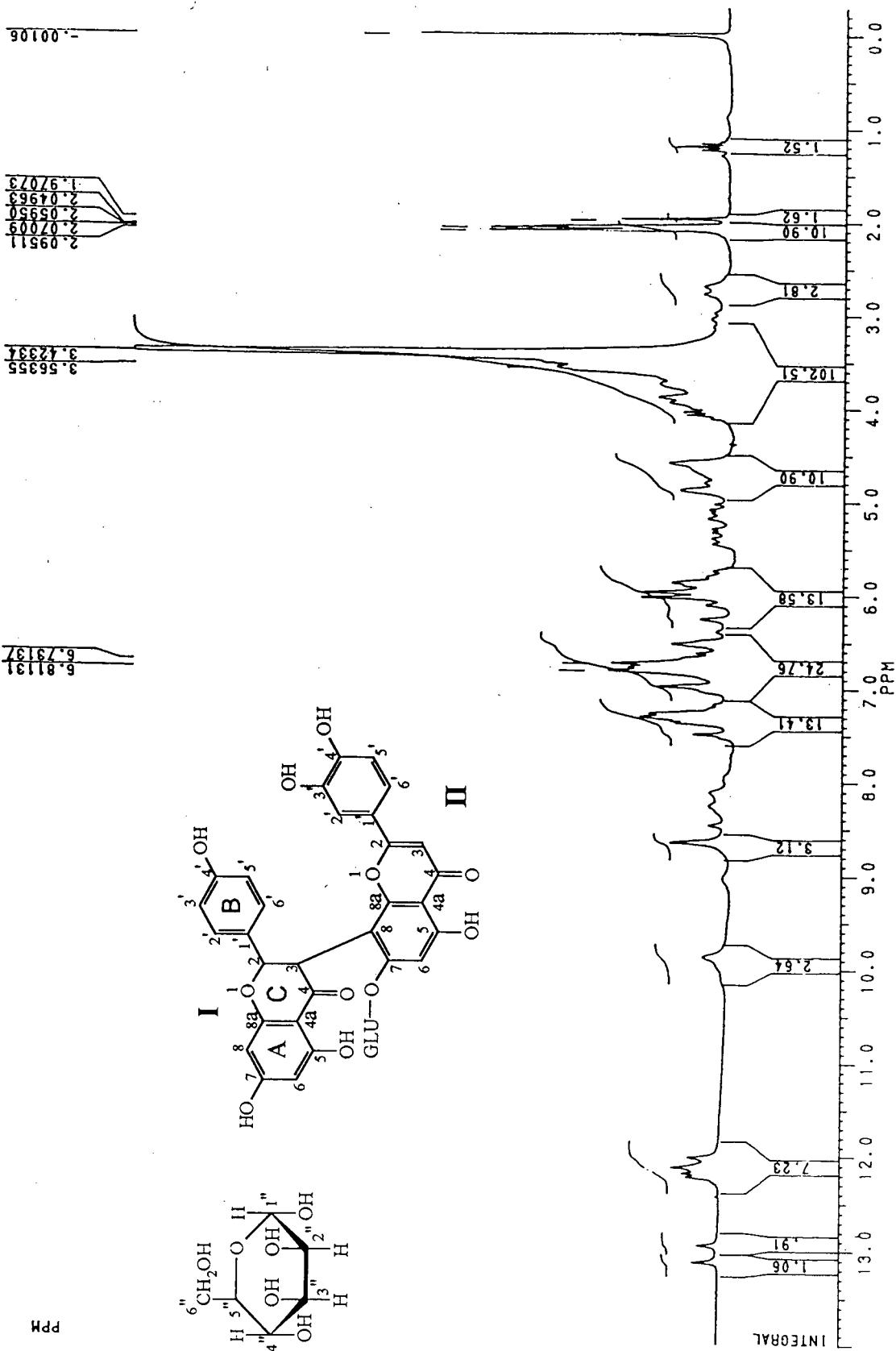
LUIZ GONZAGA, C-5 MET. EM ACETONA / OUTU22.010



ESPECTRO 33 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugetin Metilado.

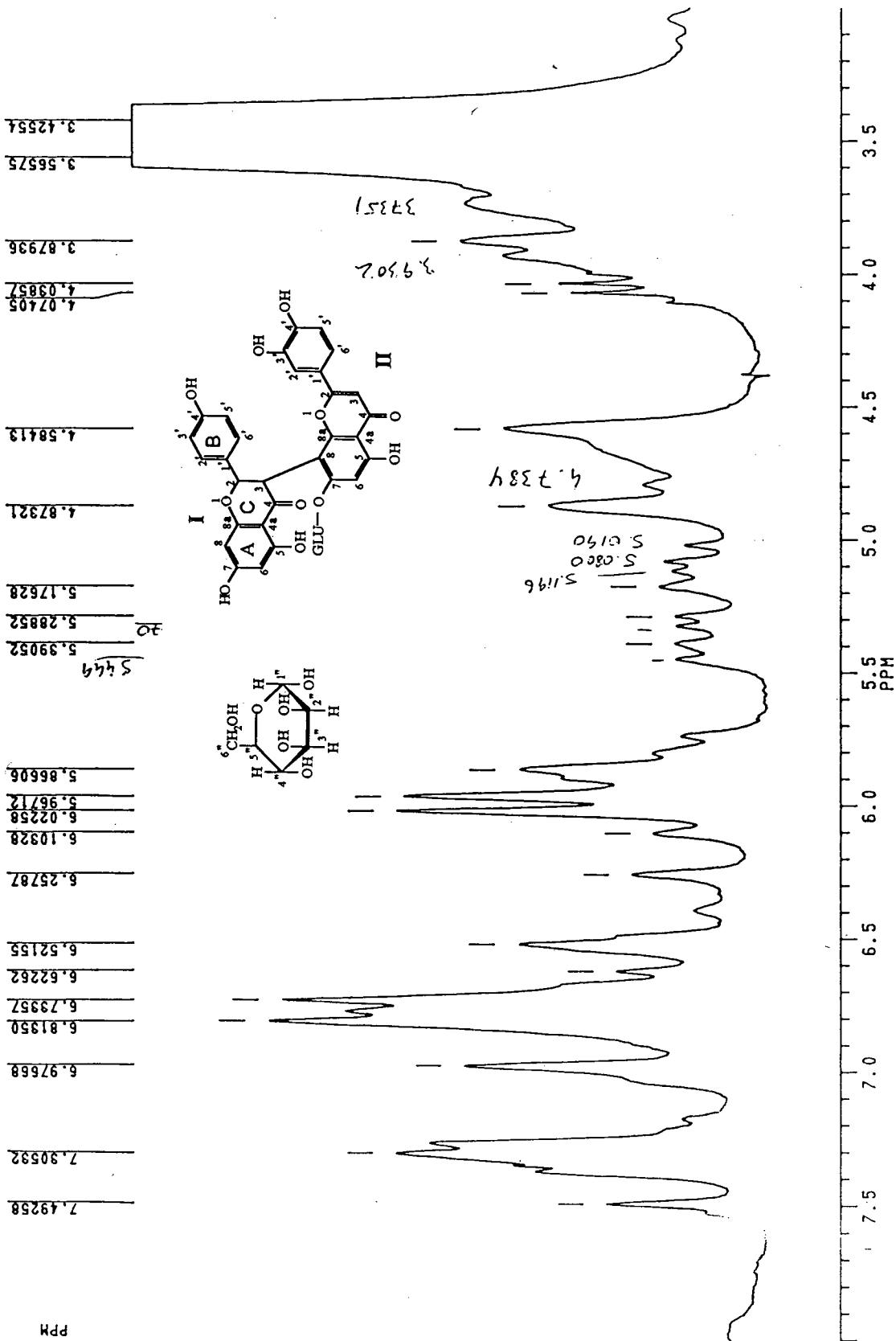


VERDI. RGI-12 EM ACETONA / JUNH15.016



ESPECTRO 34 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugeside.

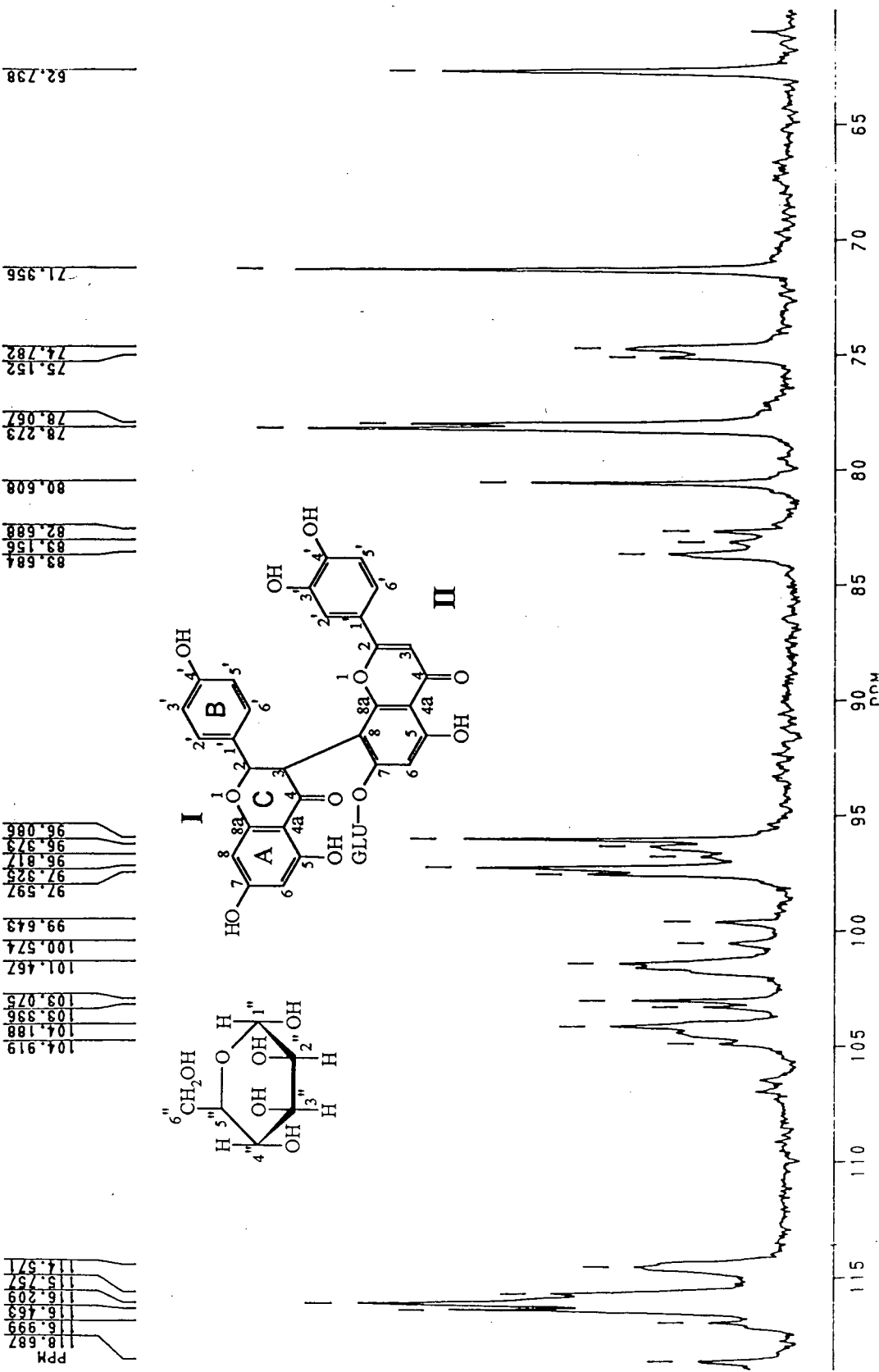
VERDI. RG1-12 EM ACETONA / JUNH15.016



ESPECTRO 34a - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugeside expandido na região de 3,5 a 7,5 ppm.

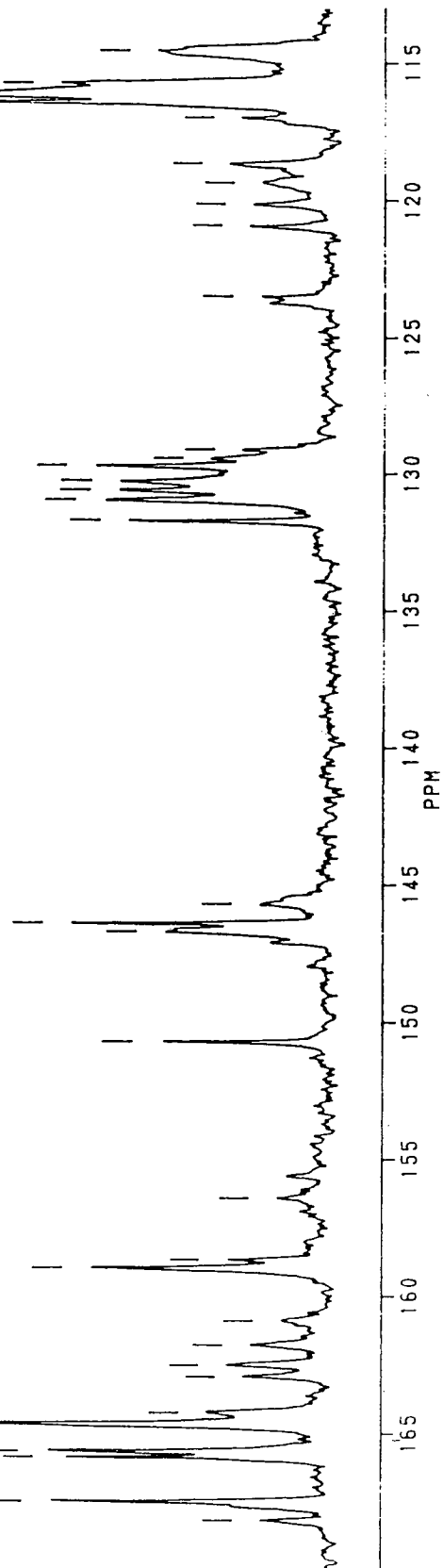
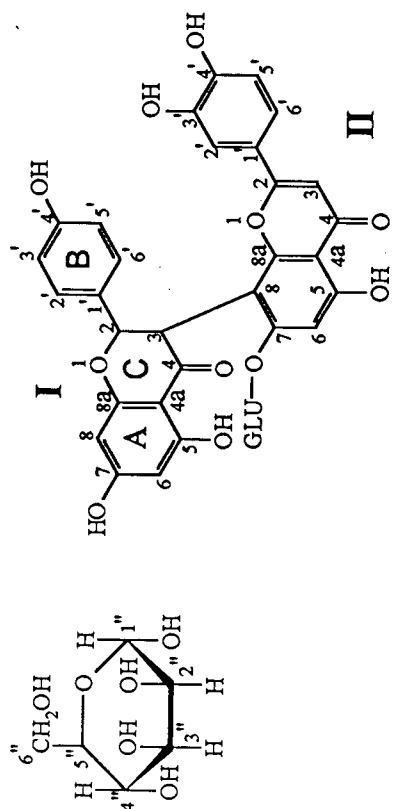
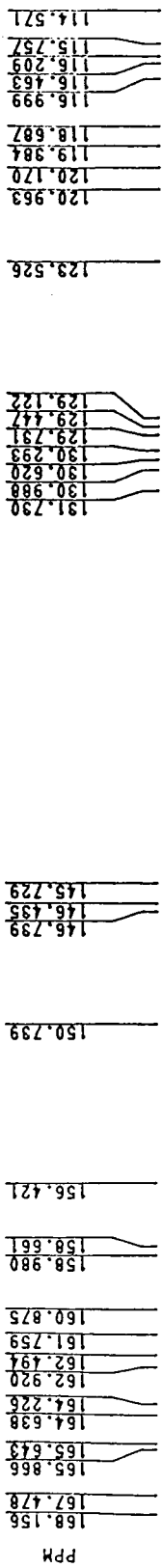


VERDI, RG1-12 EM ACETONA / JUNH24.001



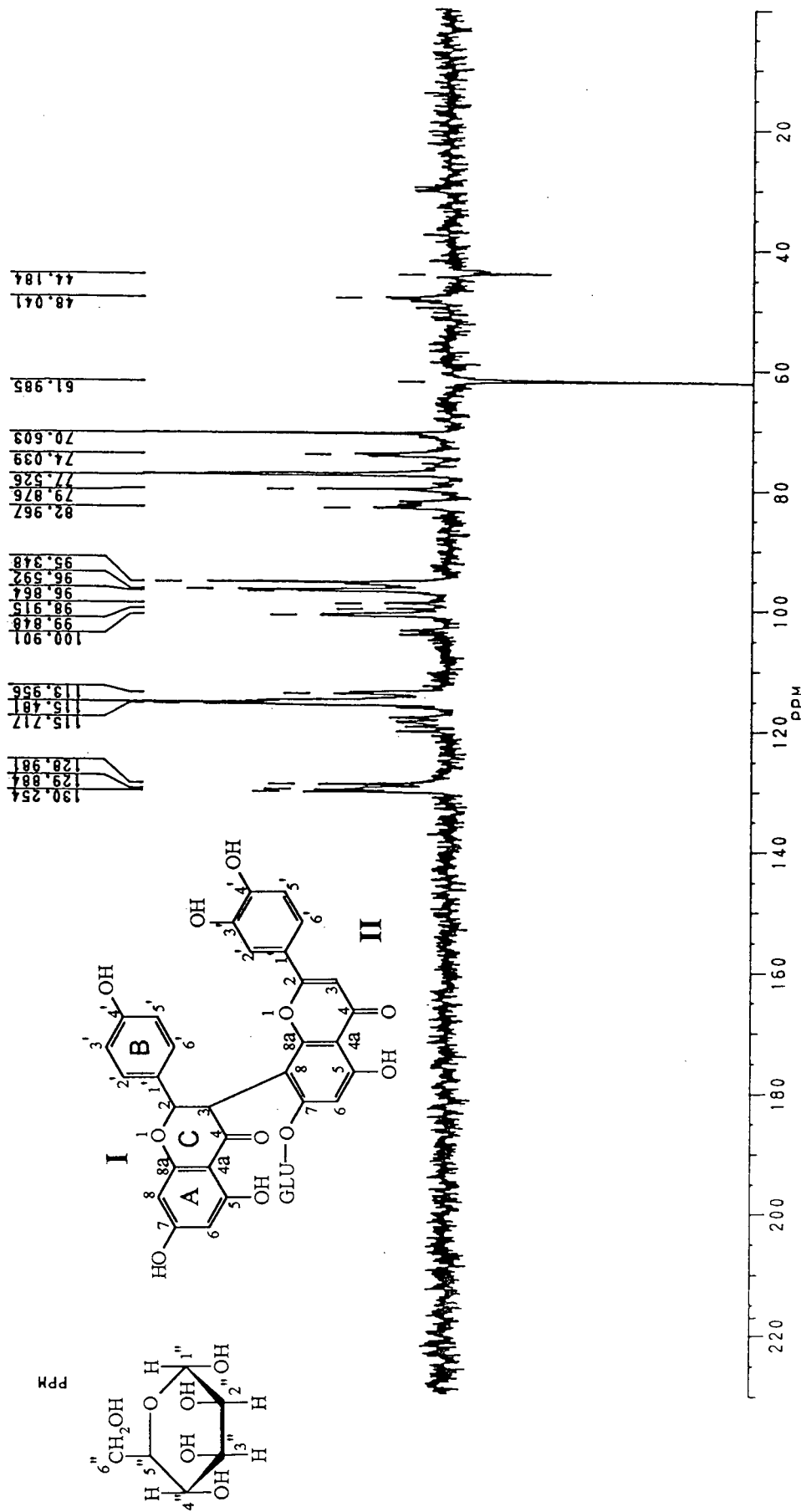
ESPECTRO 35a - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugeside expandido na região de 60 a 120 ppm.

VERDI, RG1-12 EM ACETONA / JUNH24.001



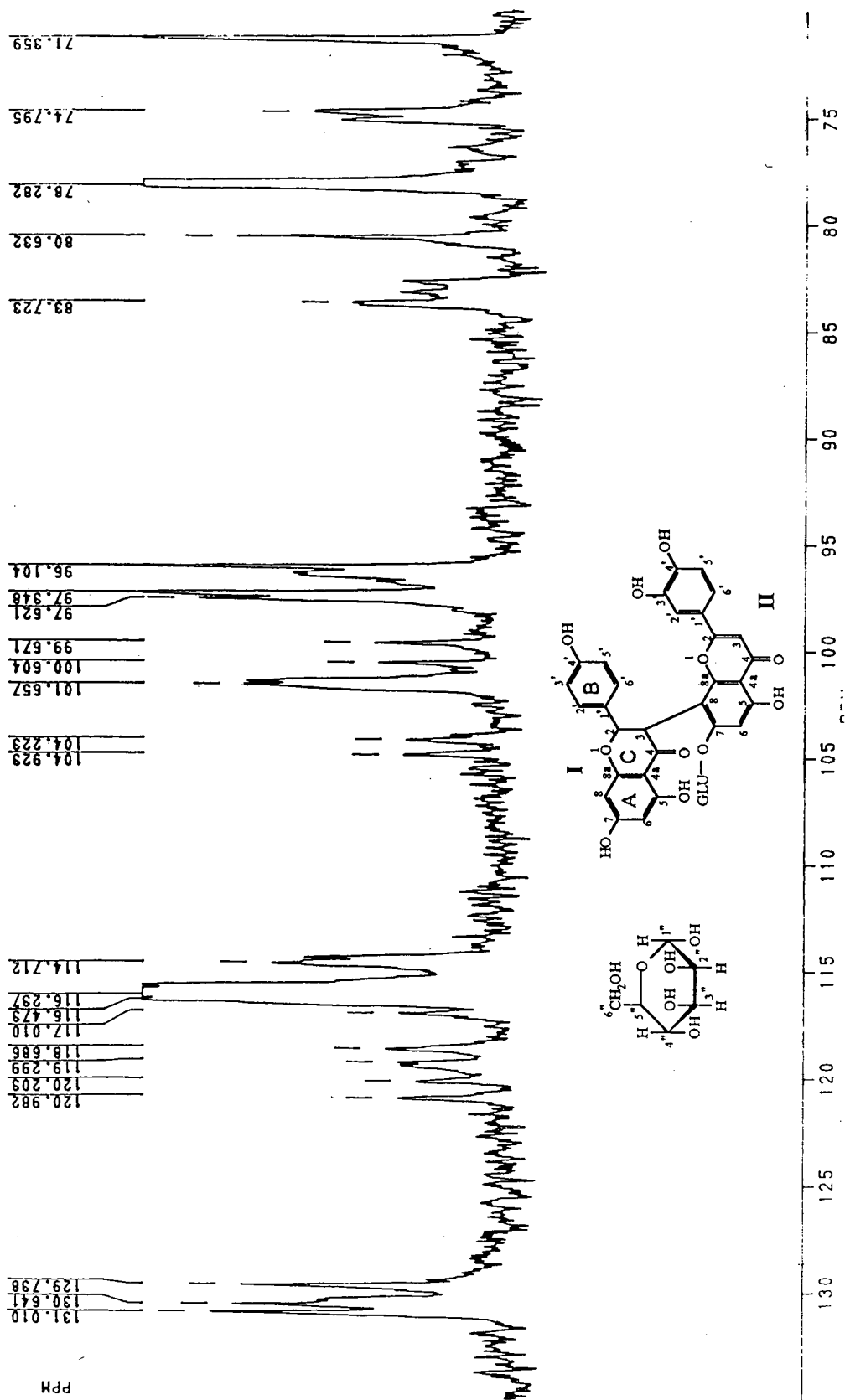
ESPECTRO 35b - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugeside na região de 110 a 170 ppm.

VERDI, RG1-12 EM ACETONA / JULH02.003

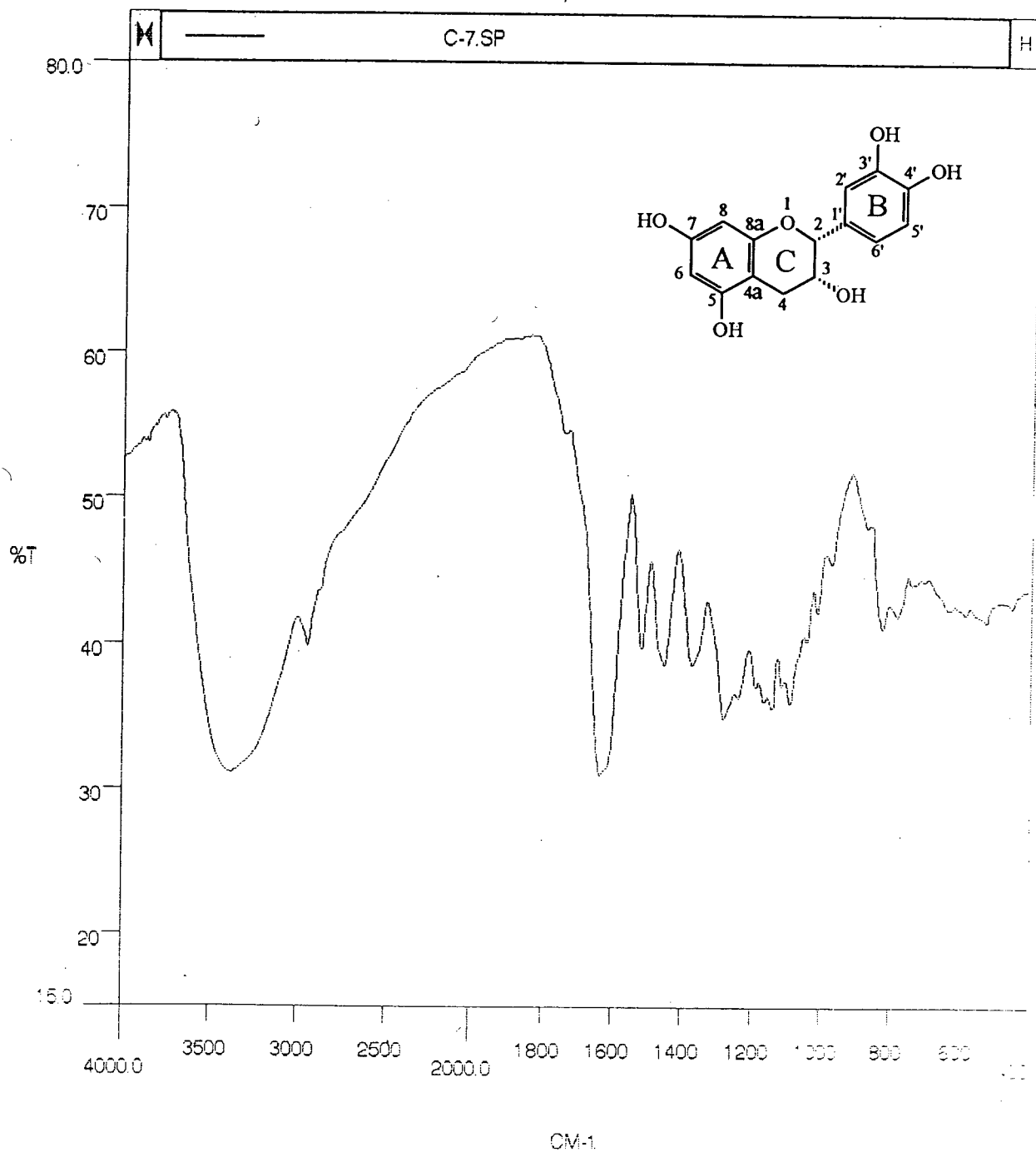


ESPECTRO 36 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugeside.

VERDI, R01-12 EM ACETONA / JULH02.003



ESPECTRO 36a - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT (50 MHz, acetona d<sub>6</sub>) do Fukugeside na região de 70 a 135 ppm.

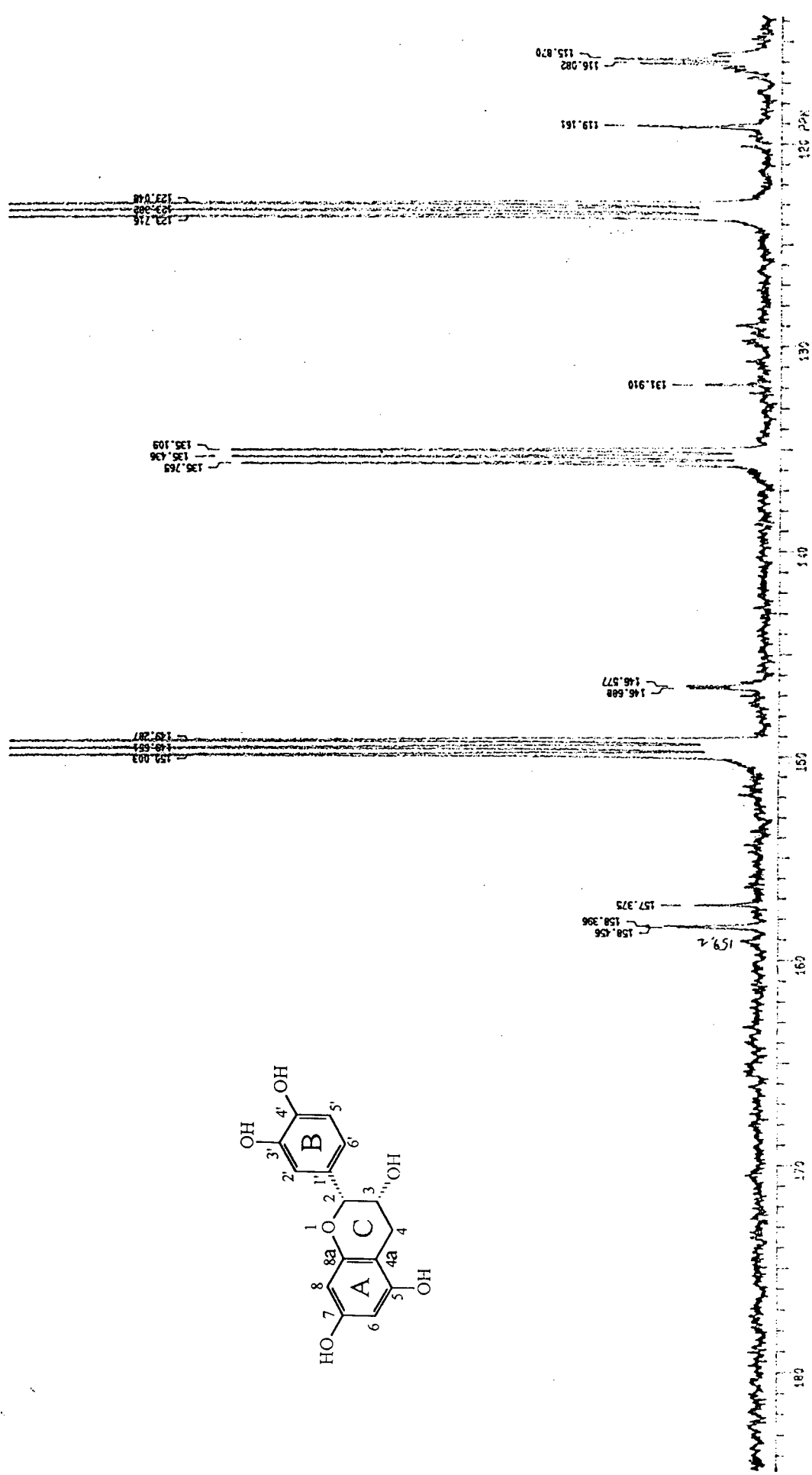


ESPECTRO 37 – Espectro de IV (KBr) da Epicatequina.

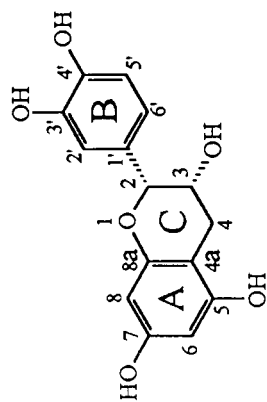




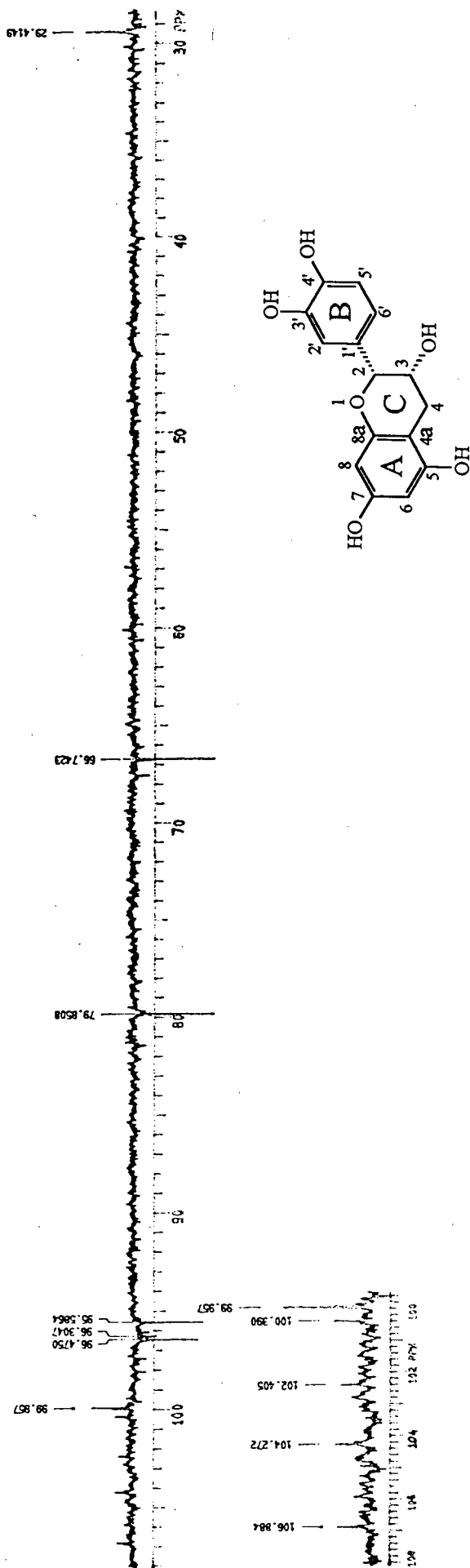




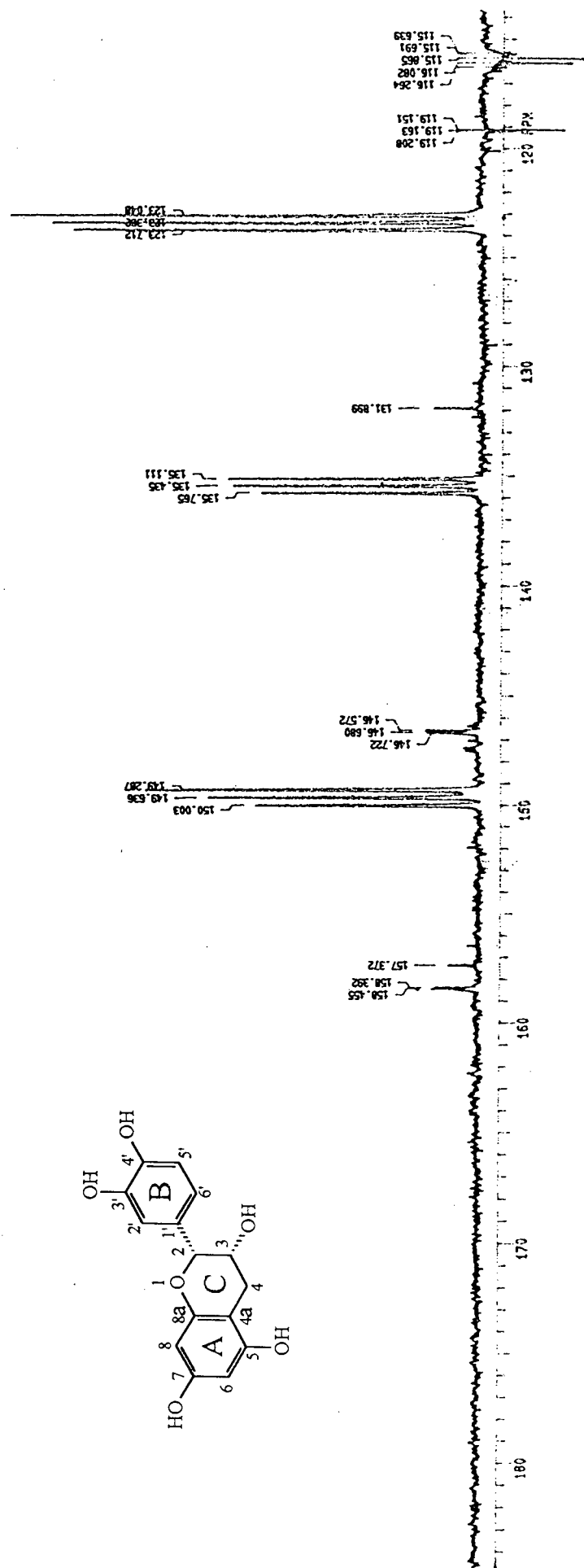
ESPECTRO 39 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, piridina d<sub>5</sub>) da Epicatequina.



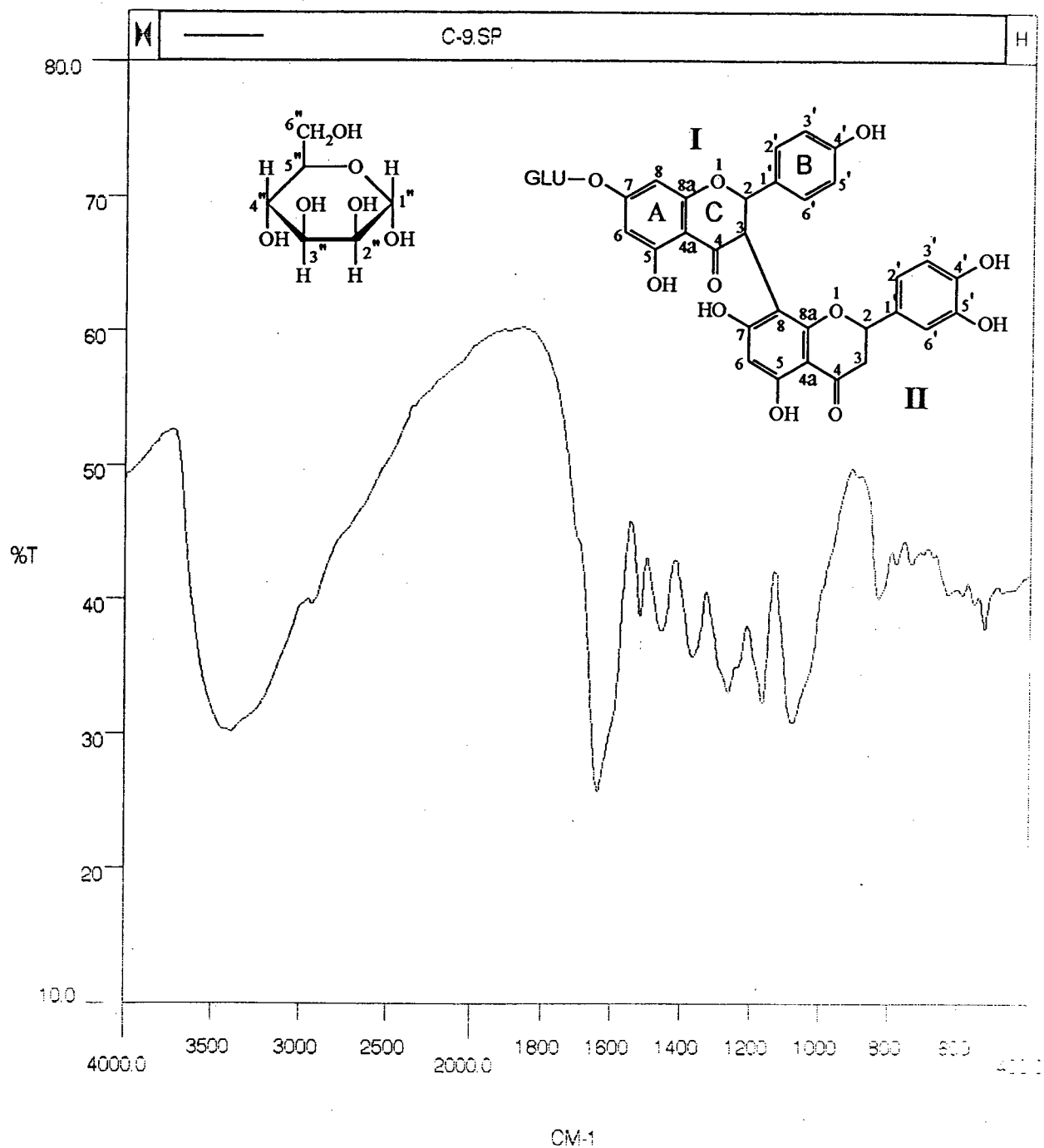
ESPECTRO 39a - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, piridina  $\text{d}_5$ ) da Epicatequina na região de 60 a 100 ppm.



ESPECTRO 39b - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/APT (75 MHz, piridina d<sub>5</sub>) da Epicatequina na região de 30 a 100 ppm.



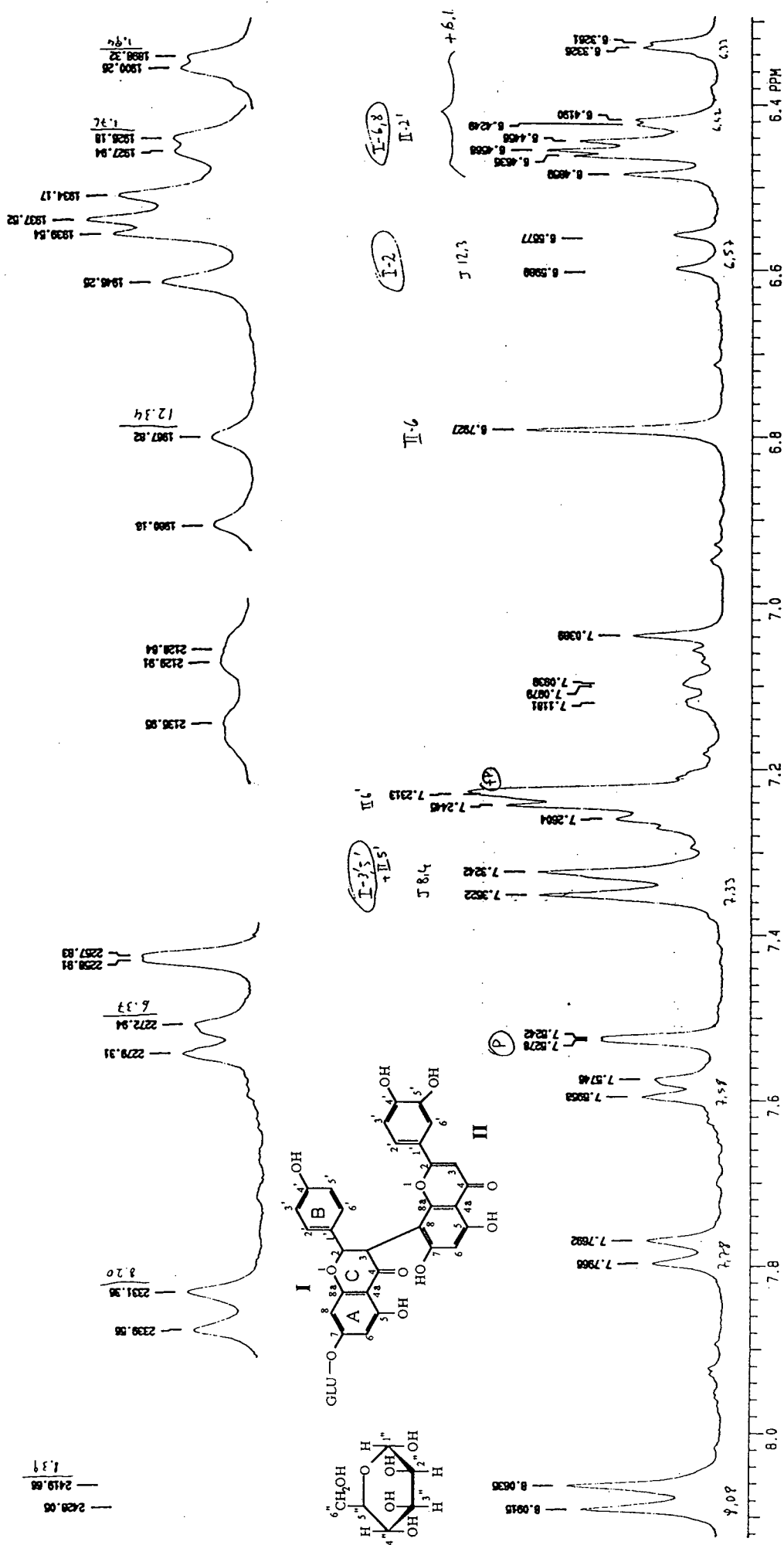
ESPECTRO 39c - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /APT (75 MHz, piridina  $d_5$ ) da Epicatequina na região de 110 a 180 ppm.



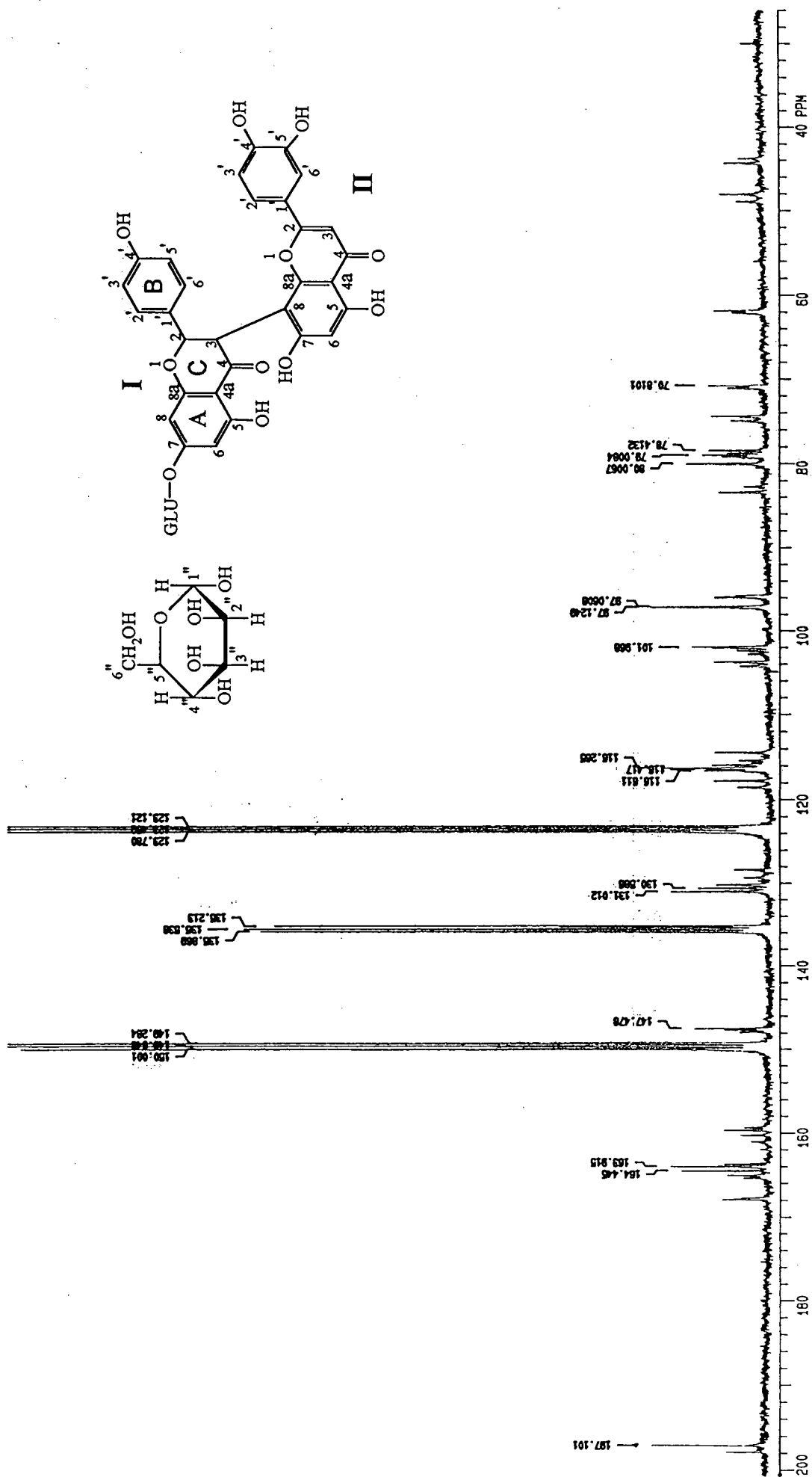
ESPECTRO 40 – Espectro de IV (KBr) do GB 2a-7-glucoside.



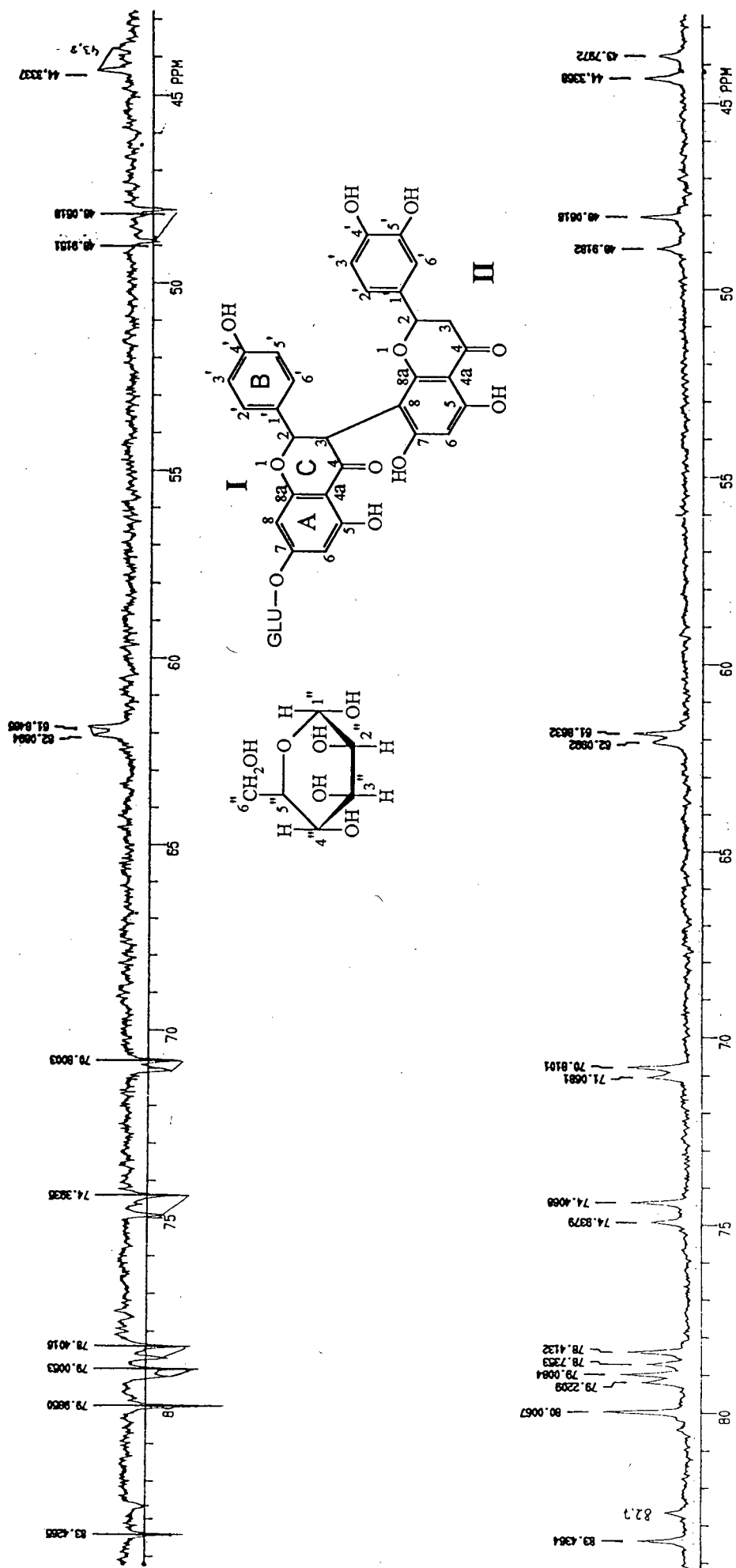




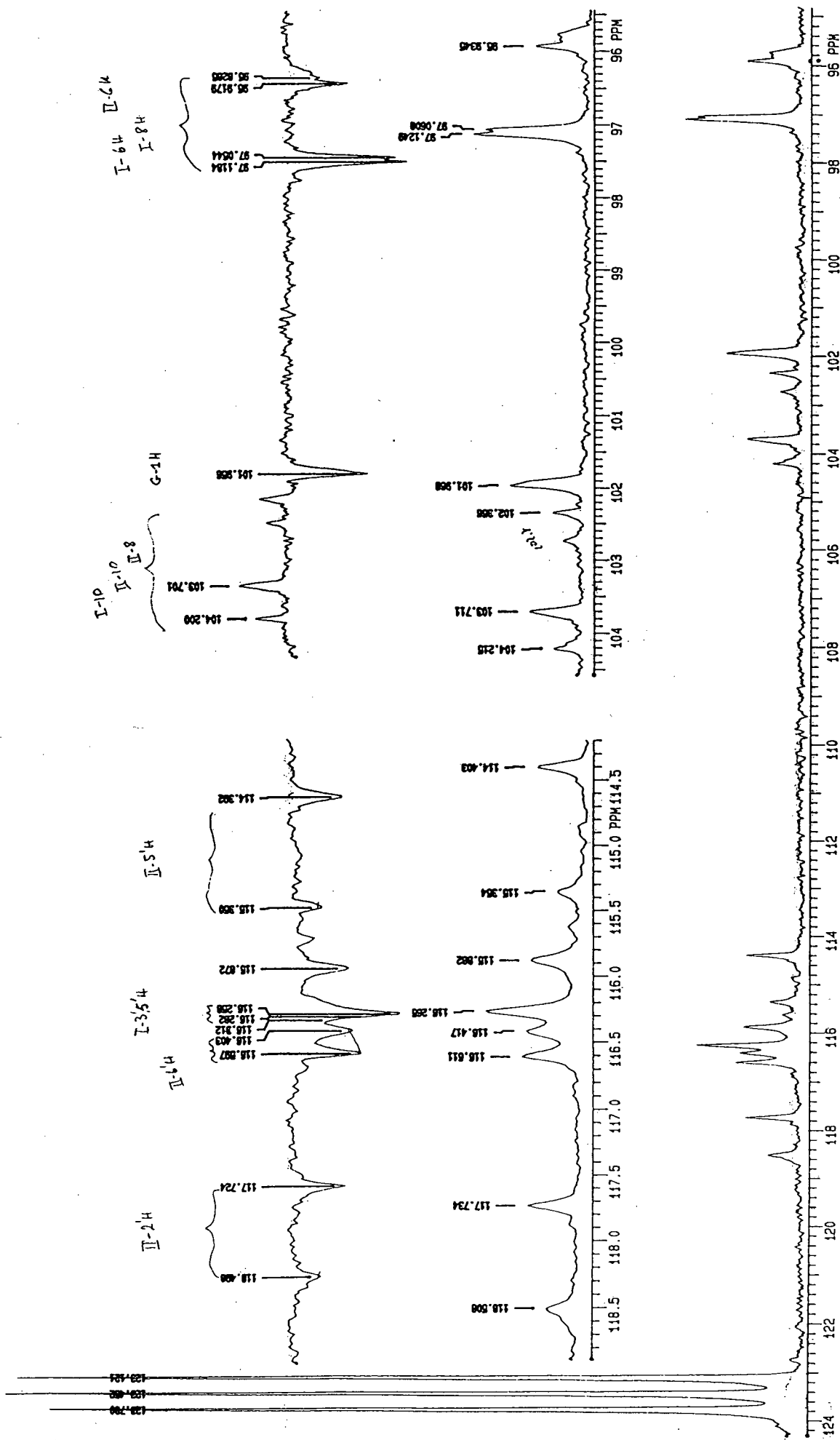
ESPECTRO 41a - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, piridina d<sub>5</sub>) do GB 2a-7-glucoside na região de 6 a 8,5 ppm.



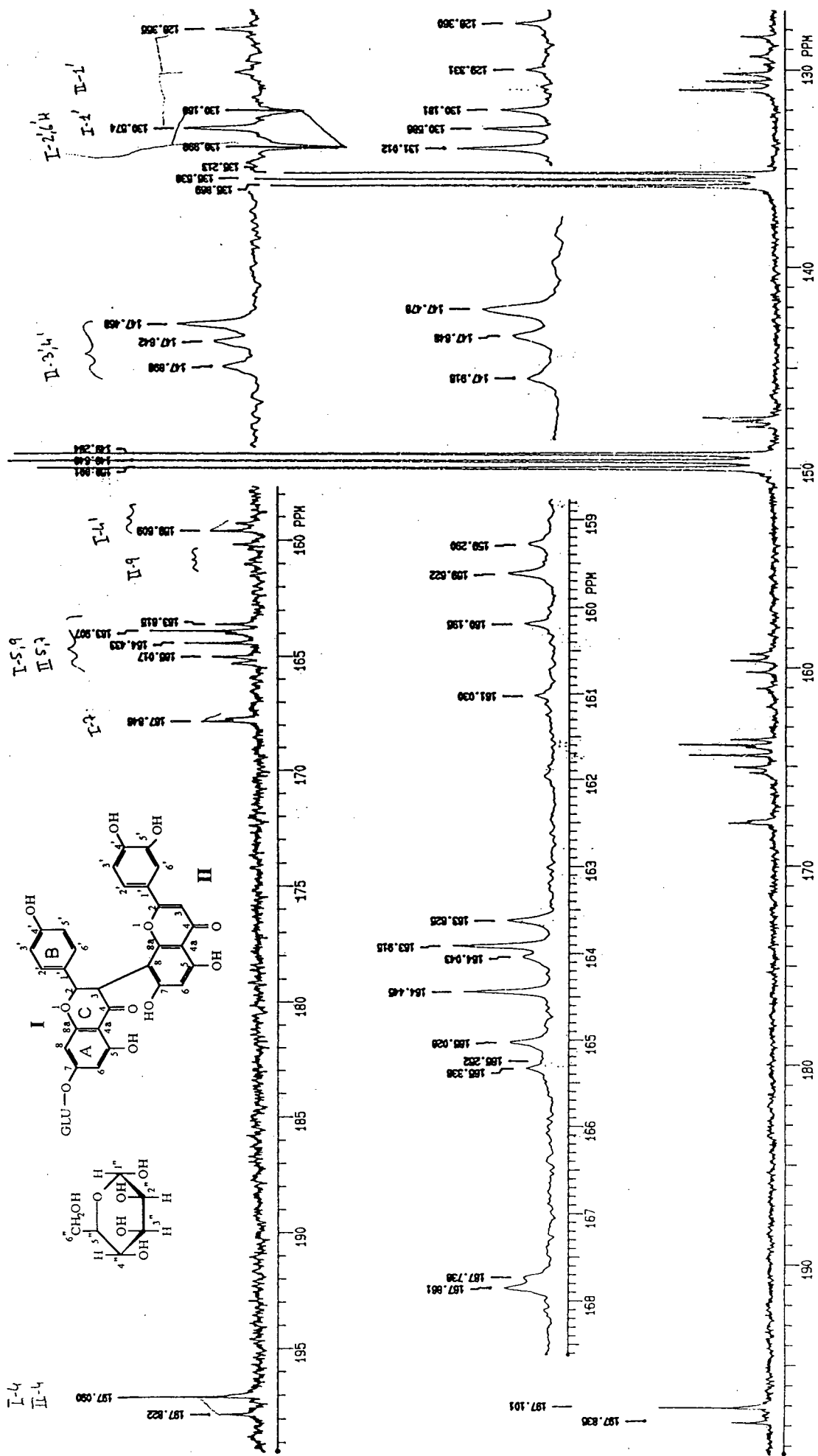
ESPECTRO 42 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, piridina d<sub>5</sub>) do GB 2a-7-glucoside.



ESPECTRO 42a - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /APT (75 MHz, piridina  $\text{d}_5$ ) do GB 2a-7-glucoside na região de 40 a 85 ppm.



ESPECTRO 42b - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /APT (75 MHz, piridina  $d_5$ ) do GB 2a-7-glucoside na região de 90 a 125 ppm.



ESPECTRO 42c - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /APT (75 MHz, piridina  $d_5$ ) do GB 2a-7-glucoside na região de 120 a 200 ppm.