

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICO-QUÍMICA

IDENTIFICAÇÃO DE GLICOSÍDEOS NA HYMENAEA MARTIANA HAYNE, ARZEIK.
ESTRUTURAS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

TESE SUBMETIDA A UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

ELIANE CARNEIRO

FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA - BRASIL
MARÇO - 1989.

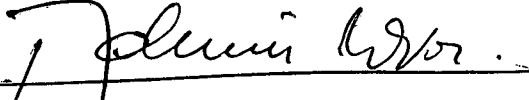
IDENTIFICAÇÃO DE GLICOSÍDEOS NA HYMENAEA MARTIANA HAYNE, ARZEIK.
ESTRUTURAS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.

ELIANE CARNEIRO

ESTA TESE FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO ORIENTA
DOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA.



PROF. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES
ORIENTADOR



PROF. Dr. ADEMIR NEVES
COORDENADOR


BANCA EXAMINADORA:



PROF. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES



PROF. Dr. RICARDO NUNES



PROF. Dr. JOÃO BATISTA CALIXTO

AOS MEUS PAIS JOAQUIM E MALVINA

AGRADECIMENTOS

Especialmente ao Prof. Dr. Rosendo A. Yunes pela orientação e estímulo demonstrados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto pela realização dos testes farmacológicos durante a fase experimental e importantes contribuições apresentadas.

Ao Prof. Dr. Franco Delle Monache, da Università Católica S. Cuore (Roma), pela valiosa colaboração, paciência, interesse e pela obtenção de espectros necessários na execução da presente tese.

Ao Prof. Moacir Pizzolatti pela colaboração nos trabalhos práticos, boa vontade e incentivos prestados.

Ao Prof. Ademir Reis pela determinação da espécie botânica.

Aos Prof. Yara Medeiros e Giles A. Rae pelo auxílio especial especialmente na parte farmacológica.

Ao Vorner pelo carinho e compreensão.

Aos colegas e amigos Alexandre, Rose, Obdúlio, Edésio, Inês, Marisa e César pela colaboração e companheirismo.

Aos bioquímicos Dario, Márcia, Osvaldo e Glaura e as técnicas Regina e Bernadete pela compreensão e apoio.

Aos demais professores e amigos que de alguma forma tenham contribuído na execução deste trabalho.

Ao pessoal da Secretaria e as bibliotecárias.

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

I.V.	infravermelho
U.V.	ultravioleta
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
ν_{max}	frequência máxima
λ_{max}	comprimento de onda máxima
ϵ	absortividade molar
nm	nanômetro
cm ⁻¹	unidade de número de onda (centímetro recíproco)
eV	eletrons-volt
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
J	constante de acoplamento
S	simplete
d	dublete
t	triplete
q	quadruplete
m	multiplete
p.f.	ponto de fusão
EtOH	etanol
MeOH	metanol
CHCL ₃	clorofórmio
C ₆ H ₆	benzeno
D ₂ O	água deuterada
CDCL ₃	clorofórmio deuterado
C ₅ D ₅ N	piridina deuterada
NaOMe	Metóxido de sódio
NaOAc	Acetato de sódio
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado

C_6D_6	Benzeno Deuterado
TMS	Tetrametilsilano
Esp.	Espectro
Fig.	Figura
Tab.	Tabela
ppm	Parte por milhão da frequência aplicada
Esq.	Esquema
p.	página
col.	colaborador
lit.	literatura
tem. amb.	temperatura ambiente
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
mod.	modelo
For. Sulfúr.	Formoldeído Sulfúrico
Dicl.	Diclorometano
H.	Hymenaea
Verm.	Vermelho
Lib.	Liberção
Hist.	Histamina
Glucuron	Glucuronidase

ÍNDICE GERAL

	PAG.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xxi
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
CAPÍTULO I	
I - INTRODUÇÃO	
1.1 - Considerações Gerais.....	1
1.2 - O Gênero <i>Hymenaea</i>	3
1.2.1 - Denominação Popular.....	3
1.2.2 - Distribuição Geográfica.....	
1.2.3 - Uso Industrial.....	6
1.2.4 - Uso Medicinal.....	7
1.3 - Revisão Química do Gênero.....	8
1.4 - Espécie em Estudo e Sua Distribuição Geográfica	18
1.5 - Posição Sistemática da <i>Hymenaea martiana</i> (Hayne, Arzeik).....	19
1.6 - Resumo da Espécie.....	20
1.7 - Considerações Gerais Sobre a Química de Flavonói- des.....	21
1.8 - Considerações Gerais Sobre Glicosídeos.....	24
1.8.1 - Flavonóides Glicosídeos.....	28
1.8.1.1 - Flavonóides O-Glicosídeos.....	28
1.8.1.2 - Flavonóides C-Glicosídeos.....	30

1.9	-	Análise Espectrométrica de Flavonóides.....	32
1.9.1	-	Análise de Flavonóides por Espectrometria U.V. e Visível.....	32
1.9.2	-	Ressonância Magnética Nuclear de Flavonóides (RMN ¹ H).....	42
1.9.2.1	-	Prótons dos Anéis.....	44
1.9.2.1.1	-	Prótons do Anel A.....	44
1.9.2.1.2	-	Prótons do Anel B.....	45
1.9.2.1.3	-	Prótons do Anel C.....	47
1.9.2.2	-	Prótons do Açúcar.....	49
1.9.2.2.1	-	Favonóides Monoglicosados.....	49
1.9.3	-	Ressonância Magnética Nuclear de Flavonóides (RMN ¹³ C).....	50
1.9.3.1	-	Efeitos de Substituintes.....	53
1.9.3.2	-	Indentificação de Açúcares.....	55
1.10	-	Atividade Biológica de Flavonóides.....	59
1.10.1	-	Atividade Antiviral.....	60
1.10.2	-	Atividade Antinflamatória.....	62
1.10.3	-	Atividade Anti-Histamínica.....	64
1.10.4	-	Atividade Sobre a Antiagregação Plaquetária.....	72
1.10.5	-	Atividade Anti-Hipertensiva.....	74
1.10.6	-	Atividade Cardiovascular.....	77

1.10.7	- Atividade Enzimática em Diabetes.....	78
1.10.8	- Atividade Antitumoral.....	79
1.10.9	- Atividade Antiulcerogênica.....	81
1.10.10	- Atividade Anti-Hepatotóxica.....	83
1.10.11	- Atividade Antidiarréica.....	84
1.10.12	- Atividade Hormonal.....	85
1.10.13	- Atividade Anestésica.....	86
1.10.14	- Atividade Antibacteriana.....	86
1.10.15	- Atividade Antifúngica.....	86
1.11	- Objetivos.....	89

CAPÍTULO II

II - PARTE EXPERIMENTAL

2.1	- Material Botânico.....	90
2.2	- Extração dos Princípios Ativos.....	95
2.2.1	- Obtenção do Extrato Acetato de Etila Bruto	95
2.2.2	- Fracionamento do Extrato Acetato de Etila Bruto.....	95
2.2.3	- Purificação da Fração Éter de Petróleo....	98
2.2.4	- Acetilação da Fração Acetato de Etila....	99
2.2.5	- Purificação da Fração Acetato de Etila Ace tilada.....	99
2.2.5.1	- Primeiro Fracionamento da Fração Acetato de Etila Acetilada.....	100
2.2.5.2	- Segundo Fracionamento da Fração Acetato de Etila Acetilada.....	102

2.2.5.2.1 - Separação dos Com - postos da Fração HMAA-4.....	104
2.2.5.2.1.1 - Sepa- ração dos compos tos da Fração HM4-8	106
2.2.5.2.2 - Separação dos Com - postos da Fração HMAA-5.....	109
2.2.6 - Purificação da Fração Acetato de Etila	112
2.2.6.1 - Separação dos Compostos da Fra- ção HA-5.....	114
2.2.6.1.1 - Separação dos Com- postos da Fração H-3.....	115
2.3 - Isolamento e Identificação dos Compostos Isola - dos.....	117
2.3.1 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)....	117
2.3.2 - Cromatografia Preparativa.....	117
2.3.3 - Visualização dos Cromatogramas.....	118
2.3.4 - Ponto de Fusão.....	119
2.3.5 - Identificação dos Compostos Através de Mé todos Espectrométricos (IV,IV,RMN ¹ H,RMN ¹³ C).	122

CAPÍTULO III

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Composto HM-17A.....	123
3.1.1 - Dados Espectrométricos de HM-17A.....	123
3.1.2 - Identificação Espectrométrica de HM-17A	124
3.1.2.1 - Espectro U.V. de HM-17A.....	125
3.1.2.2 - Espectro I.V. de HM-17A.....	125
3.1.2.3 - Espectro RMN ¹³ C de HM-17A....	126
3.1.2.4 - Espectro RMN ¹ H de HM-17A.....	128
3.1.2.5 - Comparação de HM-17A com uma Amostra de Eucryfina.....	129
3.2 - Composto HM-17C.....	136
3.2.1 - Dados Espectrométricos de HM-17C.....	136
3.2.2 - Identificação Espectrométrica de HM-17C	137
3.2.2.1 - Espectros U.V. de HM-17C.....	138
3.2.2.2 - Espectros I.V. de HM-17C.....	139
3.2.2.3 - Espectros RMN ¹³ C de HM-17C...	139
3.2.2.4 - Espectros RMN ¹ H de HM-17C....	145
3.2.2.5 - Ponto de Fusão.....	146
3.3 - Composto HM-17B.....	154
3.3.1 - Dados Espectrométricos de HM-17B.....	154
3.3.2 - Identificação Espectrométrica de HM-17B	155
3.3.2.1 - Espectros U.V. de HM-17B.....	156

3.3.2.2 - Espectros I.V. de HM-17B.....	157
3.3.2.3 - Espectros RMN ¹³ C de HM-17B...	157
3.3.2.4 - Espectros RMN ¹ H de HM-17B....	160
3.4 - Análise Farmacológica de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne, Arzeik.....	171
3.4.1 - Introdução.....	171
3.4.2 - Análise Farmacológica do Extrato da <i>Hymenaea martiana</i>	172
3.4.2.1 - Estudo "in vitro".....	172
3.4.2.2 - Estudo "in vivo".....	174
3.4.3 - Análise Farmacológica das Frações Semipurificadas e Compostos Puros da <i>Hymenaea martiana</i>	176
3.4.3.1 - Estudo "in vitro".....	176
CAPÍTULO IV	
VI - CONCLUSÃO.....	195
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	197

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1 - Distribuição de algumas espécies de <i>Hymenaea</i>	4
Figura 2 - Distribuição de espécie de <i>Hymenaea</i>	5
Figura 3 - Distribuição de espécie de <i>Hymenaea</i>	5
Figura 4 - Compostos da resina foliar das espécies ama- zônicas do gênero <i>Hymenaea</i>	16
Figura 5 - Espectros de absorção U.V. de diferentes ti- pos de flavonóides com padrões de hidroxila- ção.....	33
Figura 6 - Regiões habituais de deslocamentos químicos de flavonóides.....	43
Figura 7 - Espectro RMN ¹³ C da rutina.....	52
Figura 8 - Espectro RMN ¹³ C de kaempferol 3-O-glucosídeo em DMSO-d ₅ (95 °C).....	55
Figura 9 - Espectro RMN ¹³ C de tricetina 6-C-glupirano - sídeo (Isoafinetina) em DMSO-d ₆ (30 °C).....	56
Figura 10 - <i>Hymenaea martiana</i> , no Zoológico Municipal da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	91
Figura 11 - <i>Hymenaea martiana</i> , no Zoológico Municipal da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	92
Figura 12 - Cascas de <i>H. martiana</i>	93
Figura 13 - Ramos com flores e inflorescências da <i>H. mar</i> <i>tiana</i>	94
Figura 14 - Esquema de coluna usada para fracionamento do extrato em acetato de etila bruto.....	96

Figura 15 - Esquema de obtenção e purificação do extrato em acetato de etila bruto de <i>Hymenaea martiana</i> ...	97
Figura 16 - Dados espectrométricos de RMN C^{13} de cromona e eucryfina.....	128
Figura 17 - Dados espectrométricos de RMN H^1 de HM-17A.....	129
Figura 18 - Espectro U.V. (EtOH) de Eucryfina (5,7-dihidroxi-3 (α -O-L-ramnopiranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).....	130
Figura 19 - Espectro I.V. (KBr) de eucryfina (5,7-dihidroxi-3(α -O-L-ramnopiranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).....	131
Figura 20 - Espectro RMN C^{13} (75,6 MHz, C_5D_5N) de eucryfina (5,7-dihidroxi-3 (α -O-L-ramnopiranosil) -4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).....	132
Figura 20a- Espectro RMN C^{13} (22,63 HMz, CD_3OD) de eucryfina (5,7-dihidroxi-3- (α -O-1-ramnopiranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1-) (HM-17A).....	133
Figura 21 - Espectro RMN H^1 (300 MHz, C_5D_5N) de Eucryfina (5,7-dihidroxi-3-(α -O-L-ramnopiranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).....	134
Figura 21a- Espectro RMN H^1 (300 MHz, C_5D_5N) de Eucryfina (5,7-dihidroxi-3-(α -O-L-ramnopiranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).....	135
Figura 22 - Dados espectrométricos de RMN C^{13} de HM-17C.....	142
Figura 23 - Dados espectrométricos de RMN H^1 de HM-17C.....	146
Figura 24 - Espectro U.V. (EtOH) de Astilbina (3-O- α - L-ramnosídeo de dihidroquercitina) (HM-17C).....	147
Figura 24a- Espectro U.V. (EtOH) de Astilbina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidroquercitina) (HM-17C).....	148
Figura 25 - Espectro I.V. (KBr) de Astilbina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidroquercitina) (HM-17C).....	149
Figura 26 - Espectro RMN C^{13} (75,6 HMz, C_5D_5N) de Astilbina	

(3-O- α -L-ramnosídeo de dihidroquercitina) (HM-17C).....	151
Figura 26a- Espectro RMN ¹³ C (75,6 MHz, CDCl ₃) de Astilbina hexaxetilada (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidro- quercitina hexacetilado) (HM-17C).....	152
Figura 27 - Espectro RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de Astilbina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidroquercitina) (HM-17C).....	153
Figura 28 - Dados espectrométricos de RMN ¹³ C de HM-17B....	160
Figura 29 - Dados espectrométricos de RMN ¹ H de HM-17B.....	162
Figura 30 - Espectro U.V. (MeOH) de Engelitina (3-O- α -L- ramnosídeo de dihidrokaempferol) (HM-17B).....	163
Figura 30a- Espectro U.V. (MeOH) de Engelitina (3-O- α -L- ramnosídeo de dihidrokaempferol) (HM-17B).....	164
Figura 31 - Espectro I.V. (KBr) de Engelitina (3-O- α -L- ramnosídeo de dihidrokaempferol) (HM-17B).....	165
Figura 32 - Espectro RMN ¹³ C (75,6 MHz, C ₅ D ₅ N) de Engeliti- na (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidrokaempferol) (HM-17B).....	166
Figura 33 - Espectro RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de Engelitina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidrokaempferol) (HM-17B).....	167
Figura 33a- Espectro RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de Engelitina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidrokaempferol) (HM-17B).....	168
Figura 34 - Espectro I.V. (KBr) da Fração Acetato de etila	169
Figura 35 - Espectro I.V. (KBr) da Fração de Etila Acetila da.....	170

- Figura 36a- Curva concentração-resposta médias para a bradicinina no útero isolado de rata, na ausência ou na presença de concentrações crescentes do extrato bruto hidroalcoólico de H. martiana. Cada ponto representa a média de 5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias 178
- Figura 36b- Gráfico de Schild evidenciando o antagonismo do extrato bruto de H. martiana sobre a resposta contrátil à bradicinina no útero isolado de rata..... 178
- Figura 37a- Curva concentração-resposta médias para lisil-bradicinina no útero isolado de rata, na ausência ou na presença de concentrações crescentes do extrato bruto hidroalcoólico da H. martiana. Cada ponto representa a média de 5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das mé - dias..... 179
- Figura 37b- Gráfico de Schild evidenciando o antagonismo do extrato bruto da H. martiana sobre a resposta contrátil à lisil-bradicinina no útero iso - lado de rata..... 179
- Figura 38a- Curva concentração-resposta médias para a acetilcolina no útero isolado de rata, na ausência ou na presença de concentrações crescentes do extrato bruto hidroalcoólico da H. martiana. Cada ponto representa a média de 5 experimen - tos e as linhas verticas os erros padrão das médias..... 180
- Figura 38b- Gráfico de Shild evidenciando o antagonismo do extrato bruto da H. martiana sobre a resposta contrátil à Acetilcolina no útero isolado de rata..... 180

- Figura 39 - Curvas concentração-reposta médias para serotonina, nas $F_{2\alpha}$, angiotensina II e ocitocina no útero isolado de rata, na ausência ou na presença de diversas concentrações do extrato bruto da *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 181
- Figura 40 - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradicinina, acetilcolina e histamina no íleo isolado de cobaia na ausência e na presença de diversas concentrações do extrato bruto da *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 5 a 7 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 182
- Figura 41 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico da *H. martiana* administrado por via oral ou intraperitonal sobre o desenvolvimento do edema de pata de rato causado por carragenina (A), dextrana (B) e PAF-acéter (C). Cada ponto representa a média de 5 a 7 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 183
- Figura 42 - Curvas concentração-resposta para a bradicinina no útero isolado de rata na ausência e na presença da fração semipurificada (HM 4-8) obtida da *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 184
- Figura 43 - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradicinina no útero isolado de rata na ausência e na presença de Eucryfina (A) e Astilbina (B) isolados da *H. martiana*. Cada pont

- to representa a média de 5 a 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 185
- Figura 44 - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a Acetilcolina no útero isolado de rata na ausência ou na presença de diversas concentrações de Eucryfina (A) e Astilbina (B). Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 186
- Figura 45a- Curvas concentração-resposta médias obtidas para a Bradicinina no útero isolado de rata na ausência e na presença de astilbina (acetilado). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 187
- Figura 45b- Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradicinina no útero isolado de rata na ausência e na presença de Astilbina (acetilado) . Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verdicais os erros padrão das médias..... 187
- Figura 46 - Curvas concentração-resposta para a Acetilcolina (A) e Ocitocina (B) no útero isolado de rata na ausência ou na presença de Astilbina acetilado. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 188
- Figura 47 - Curva concentração-resposta para a Bradicini na (A) e Acetilcolina (B) no útero isolado de rata na ausência ou na presença de Eucry-

fina acetilado. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 189

Figura 48 - Curva concentração-reposta para a Bradicinina (A) e Acetilcolina (B) no útero isolado de rata na ausência ou na presença de Engelitina . Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias..... 190

ÍNDICE DE TABELAS

	PAG.
Tabela 1 - Sesquiterpenos isolados da resina foliar do gênero <i>Hymenaea</i>	15
Tabela 2 - Classificação dos flavonóides.....	22
Tabela 3 - Absorções das Bandas I e II nos espectros U.V. de flavonóides (em nm).....	36
Tabela 4 - Interpretação dos espectros U.V. de flavonóides com NaOAc.....	37
Tabela 5 - Interpretação do espectro U.V. de flavonóides com NaOAc/ BO_3H_3	38
Tabela 6 - Interpretação do espectro U.V. de flavonóides com AlCl_3 e AlCl_3/HCl	39
Tabela 7 - Interpretação do espectro U.V. de flavonóides com NaOMe.....	41
Tabela 8 - Deslocamentos químicos de tipos de prótons de flavonóides.....	42
Tabela 9 - Deslocamentos químicos de prótons do C-6 e C-8 em 5,7-dihidroflavonóides.....	44
Tabela 10 - Deslocamentos químicos de prótons dos C-5, 6 e 8 em 7-hidroflavonóides.....	45
Tabela 11 - Deslocamentos químicos de H-2' e H-6' em 3', 4-dioxiflavonóides.....	46
Tabela 12 - Deslocamentos químicos de H-2', 3', 5' e 6' em flavonóides 4' oxigenados.....	47
Tabela 13 - Deslocamentos químicos de prótons dos C-2 e C-3 em flavanonas e dihidroflavonóis.....	48

Tabela 14 - Deslocamentos químicos para tipos de carbono de flavonóides.....	51
Tabela 15 - Deslocamentos químicos devidos a efeitos de substituinte no C-1 e posição o,m,p- de um flavonóide.....	53
Tabela 16 - Espectro RMN ¹³ C de vários flavonóides agliconas.....	54
Tabela 17 - Ressonâncias dos carbonos de açúcares, em espectro RMN ¹³ C, de alguns flavonóides C- e O-glicosídeos.....	58
Tabela 18 - Valores de IC ₅₀ de flavonóides citrus para a inibição de liberação de histamina de basófilos estimulados por antígeno, TPA, A23187 e de liberação de beta-glucuronidase por neutrófilos estimulados por f-Met-LeuPhe.....	69
Tabela 19 - Inibição de aldose redutase por flavonóides da espécie <i>Brickellia glutinosa</i>	79
Tabela 20 - Primeiro fracionamento da fração acetato de etila acetilada.....	101
Tabela 21 - Segundo fracionamento da fração acetato de etila acetilada.....	103
Tabela 22 - Fracionamento da fração HMAA-4.....	105
Tabela 23 - Separação cromatográfica da fração HM4-8 desacetilada.....	107
Tabela 24 - Fracionamento da fração HMAA-5.....	110
Tabela 25 - Fracionamento da fração acetato de etila	113
Tabela 26 - Separação cromatográfica da fração HA-5.....	115
Tabela 27 - Identificação por CCD e p.f. dos compostos isolados da <i>Hymenaea martiana</i>	120

Tabela 28 - Rendimento das frações semipurificadas e dos compostos puros obtidos das cascas de <i>H. martiana</i> (3,7 kg).....	121
Tabela 29 - Dados espectrométricos de I.V., U.V., RMN ¹ H e RMN ¹³ C de HM-17A.....	123
Tabela 30 - Dados espectrométricos de RMN ¹³ C de HM-17A em piridina d ₅ e de Eucryfina em CD ₃ OD(δ).....	127
Tabela 31 - Deslocamentos químicos de tipos de prótons de HM-17A em piridina -d ₅	128
Tabela 32 - Dados espectrométricos de I.V., U.V., RMN ¹ H e RMN ¹³ C de HM-17A.....	136
Tabela 33 - Dados espectrométricos de RMN ¹³ C de dihidroflavonóis 5,7,3',4' (OH) ₄ (dihidroquercitina) e o composto (HM-17C)(δ).....	141
Tabela 34 - Dados espectrométricos de RMN ¹³ C de HM-17C hexacetilado em CDCl ₃ (δ).....	144
Tabela 35 - Deslocamentos químicos de tipos de prótons de HM-17C em piridina -d ₅	145
Tabela 36 - Dados espectrométricos de I.V., U.V., RMN ¹ H e RMN ¹³ C de HM-17B.....	154
Tabela 37 - Dados espectrométricos de RMN ¹³ C de HM-17B em piridina -d ₅ (δ).....	158
Tabela 38 - Dados espectrométricos de RMN ¹³ C de HM-17B, As _u tilbina e Naringenina (δ).....	159
Tabela 39 - Deslocamentos químicos de tipos de prótons de HM-17B em piridina -d ₅	161
Tabela 40 - Valores aparentes de PA ₂ (g/ml) para o extrato bruto hidroalcoólico obtido da <i>Hymenaea martiana</i> em relação às respostas contráteis à	

bradicinina, lisil-bradicinina e acetilcolina no útero isolado de rata.....	191
Tabela 41 - Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>Hymenaea martiana</i> sobre o edema causado pelo ácido ara quidônico (2 mg) na orelha de camundongo.....	192
Tabela 42 - Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>Hymenaea martiana</i> sobre as contorções abdominais produ zidas por acetilcolina (6 mg/Kg, i.p.) em ca mundongos.....	193
Tabela 43 - Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>Hymenaea martiana</i> sobre as contorções abdominais produ zidas por ácido acético (0,6%, i.p.) em camun dongos.....	194

RESUMO

A espécie vegetal *Hymenaea martiana* Hayne, Arzeik (Leguminosae), conhecida como "jatobá", é amplamente usada pela medicina popular, especialmente para o tratamento de infecções gastrointestinais, urinárias e das vias respiratórias.

Neste trabalho foram estudadas química e farmacologicamente cascas desta planta com os objetivos de comprovar algumas destas ações medicinais, isolar e determinar os compostos com atividade farmacológica. Para isto, foi preparado um extrato inicial de acetato de etila, sendo filtrado sobre sílica gel com éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e metanol. As frações de clorofórmio e fundamentalmente a de acetato de etila apresentaram atividade farmacológica. Por esta razão, a fração acetato de etila bruta ou previamente acetilada, foi fracionada sobre coluna de sílica gel, isolando-se vários compostos, dos quais foram identificados três glicosídeos, sendo os dois últimos de natureza flavonoídica: eucryfina (5,7-dihidroxi-3- (α -O-L-ramnosil)-4-H-1-benzopirano-4-1), astilbina (3-O- β -L-ramnosídeo de dihidroquercitina) e engelitina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidrokaempferol). Estes compostos são inéditos na espécie estudada e a identificação foi realizada por métodos espectroscópicos: U.V., I.V., RMN H^1 e RMN C^{13} e no caso de eucryfina também por comparação com substância padrão.

O extrato bruto de *Hymenaea martiana*, assim como os compostos identificados foram testados farmacologicamente. O extrato bruto ("in vitro") antagonizou de maneira competitiva a resposta contrátil à bradicinina, lisil-bradicinina e acetilcolina no útero de rata. Além disso, o extrato inibiu de modo não competitivo as respostas contráteis a angiotensina II, prostaglandina $F_{2\alpha}$ e ocitocina no útero de rata e à bradicinina, acetilcolina

íleo isolados de cobaia. Este extrato também apresentou efeitos a nalgésicos e antiedematogênicos, quando administrado por via oral ou intraperitoneal em ratos e camundongos, sendo mais potente por via intraperitoneal. Desta forma, parte das ações medicinais atribuídas popularmente foram confirmadas.

Os compostos purificados (astilbina, eucryfina e engelitina) (20 - 240 μ M) produziram poucas modificações sobre as respostas contráteis à bradicinina e acetilcolina no útero isolado de rata. No entanto, a acetilação de ambos: eucryfina e astilbina, modificou completamente o perfil de ação desses compostos. Assim, esses compostos acetilados inibiram as respostas contráteis à bradicinina, acetilcolina e também ocitocina nesse mesmo tecido

ABSTRACT

Hymenaea martiana, Hayne, Arzeik (Leguminosae) named popularly as "jatobá" is used in popular medicine for the therapy of gastrointestinal, urinary and respiratory tract infections.

In this work, the bark of this plant have been studied chemical and pharmacologically in order to verify the above mentioned therapeutic indications and to isolate and determine the pharmacologically active compounds. A ethyl acetate extract was prepared and filtered on silica gel using petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and methanol as solvents. The chloroform and, especially, the ethyl acetate fractions showed pharmacological activity. In this way the ethyl acetate fraction and a previously acetylated ethyl acetate fractions were chromatographed on silica gel yielding different compounds. Three of them were identified as the glycosides: eucryphin (5,7-dihydroxy-3-(α -O-L-rhamnopyranosyl)-4 H-1-Benzopyran-4-one; astilbin (3-O- α -L-rhamnoside of dihydroquercetin) and engelitin (3-O- α -L-rhamnoside of dihydrokaempferol). The identification was carried out using spectroscopic methods: UV, IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR and in the case of eucryphin by comparison with an authentic sample.

Pharmacological tests were conducted with the crude extract and identified compounds of *H. martiana*. In the rat isolated uterus, the crude extract competitively antagonized contractions caused by bradykinin, lysyl-bradikinin and acetylcholine. Responses of this tissue to angiotensin II, prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ and oxytocin and of the guinea-pig isolated ileum to bradykinin and acetylcholine were antagonized in a non-competitive fashion by the crude extract. The extract was also found to cause a -

nalgesia and to suppress carrageenin-induced edema when given orally to mice and rats, respectively. These "in vivo" effects were more prominent following intraperitoneal administrations. Thus, the pharmacological profile of the crude extract appears to substantiate some of popular medicinal properties ascribed to this plant.

The purified compounds (eucryphine, astilbine and engelitine) (20-240 μ M) promoted only slight modifications of the responses of the rat uterus to bradykinin, and acetylcholine. However, acetylation of astilbine and eucryphine yielded compounds capable of markedly inhibiting the responses to these agonists and to oxytocin.

CAPÍTULO I

I - INTRODUÇÃO

1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

As espécies vegetais constituem fonte inesgotável de produtos químicos, através das quais são realizadas pesquisas fitoquímicas sobre novos compostos. No entanto, somente, nestes últimos quinze anos é que se vem observando um crescente interesse na pesquisa de produtos naturais, biologicamente ativos, como área de grandes possibilidades científicas e tecnológicas. O objetivo destes estudos visa não somente a obtenção de produtos naturais que possam atuar como medicamentos, como, principalmente, por procurar novos compostos ativos, que permitam, por via de síntese ou modificação estrutural, o fornecimento de fármacos mais potentes e que atuem por mecanismos diferentes dos atualmente conhecidos na medicina.

Dentre as famílias estudadas, destaca-se a Leguminosae, que deu lugar a muitos trabalhos sobre compostos químicos isolados de suas espécies. Esta família é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, abrangendo mais de seiscentos gêneros, reunindo mais de treze mil espécies. Divide-se em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionadeae, que estão espalhadas por todo mundo, especialmente, nas regiões tropicais e subtropicais. São plantas de hábito muito variado, apresentando-se como grandes árvores de matas tropicais ou arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e várias trepadeiras¹.

A família apresenta grande valor econômico. É bas

tante conhecida a importância que espécies como: feijão, *C. floribunda* Benth, soja, *Glycine hispida* Maxin; amendoim, *Arachis hypogaea* L., desempenham na alimentação. Esta importância se justifica pela composição química das espécies, muito ricas em proteínas (vinte a quarenta por cento)²⁻⁸, aminoácidos essenciais como lisina, metionina, cistina, triptofano⁵⁻⁷ e ácidos graxos, no óleo das sementes, como ácido linoleico, palmítico e oleico⁴.

Cita-se, além do exposto, a cerejeira, *Torresia cecilioides* (Leguminosae-faboidea), madeira muito durável, amplamente comercializada na indústria de mobiliário. As suas sementes contém cerca de quatro por cento de cumarina, empregada na aromatização de tabaco e roupas⁹. Além disso, existem diversas plantas desta família, servindo para ornamentação, destacando-se a espécie do gênero *Acácia*, *Cassia Grandis* L., árvore de grande porte, com lindas flores róseas e o Pau Ferro, *Caesalpinia ferrea*, de tronco ornamental e flores amarelas, plantadas em vias públicas, jardins e praças⁹.

A faveira, *D. Dimorphandra mollis* Benth e *D. Gardneriana* Tul. (*Caesalpinia*), bastante conhecidas no cerrado brasileiro, apresentam no interior de suas favas, rutina e biflavonóides, que possuem amplo emprego na indústria farmacêutica⁹.

O estudo do gênero *Hymenaea* (leguminosae, *Caesalpinioideae*), espécie *Hymenaea martiana*, objeto de nosso trabalho, deve-se não só ao fato de seu vasto emprego na medicina popular, como será descrito posteriormente, como também por ser o Brasil, o centro de maior distribuição.

1.2 - O GÊNERO HYMENAEA

1.2.1 - Denominação Popular

Segundo Adolfo Ducke, as espécies brasileiras do gênero *Hymenaea* são, coletivamente, designadas pelos nomes populares de "jutai" (amazônia), "jataí" (Rio de Janeiro e estados vizinhos) e "jatobá" (nordeste e centro), sendo que o último destes nomes se encontra divulgado no país inteiro, mesmo nas regiões onde os dois primeiros são de uso corrente¹⁰.

1.2.2 - Distribuição Geográfica

O gênero *Hymenaea* (Caesalpinioideae) tem uma ampla distribuição anfi atlântica, com 13 espécies neotrópicas e uma africana, *H. verrucosa*, ocorrendo na costa oriental da África. Evidências recentes sugerem uma origem africana do gênero, com migração pelo Atlântico, ocorrida durante a era terciária, quando os continentes estavam mais próximos e a vegetação da mata pluvial tinha uma dispersão muito maior que atualmente. O centro de sua distribuição neotrópica é a bacia amazônica, mas estendendo-se de 23° N no México Central, por todo o ocidente, e por 26°S na América do Sul, ocorrendo em toda região, exeto no Chile e Uruguai¹³.

O gênero é dividido em duas seções taxonômicas, que são: seção *Trachylobium*, incluindo as espécies *Hymenaea Verrucosa*, *H. Parvifolia* e *H. Oblongifolia*, cujas variedades são: *oblongifolia*, *davissi*, *latifolia* e *palustris*; a outra seção é *Hymenaea* com as espécies: *H. Aurea*, *H. Courbaril* (variedades: *courba* -

ril, stilbocarpa, subsesilis, altíssima, longifolia, villosa), *H. Eriogyne*, *H. Intermedia* (variedades: intermedia e adenotricha), *H. Martiana*, *H. Maranhensis*, *H. Reticulata*, *H. Rubriflora* (variedades: rubriflora e glabra), *H. Stigonocarpa* (variedades: stigonocarpa, pubescens e brevipetolata), *H. Torrei* e *H. Velutina*. A *H. Maranhensis* foi mais recentemente descrita e incluída na taxonomia do gênero, e é originária do município de Loreto, no Maranhão, Brasil.

Para melhor visão da distribuição do gênero, centrada na Amazônia, são apresentadas as figuras 1 a 3 seguintes, com algumas espécies e variedades ¹²⁻¹⁴.

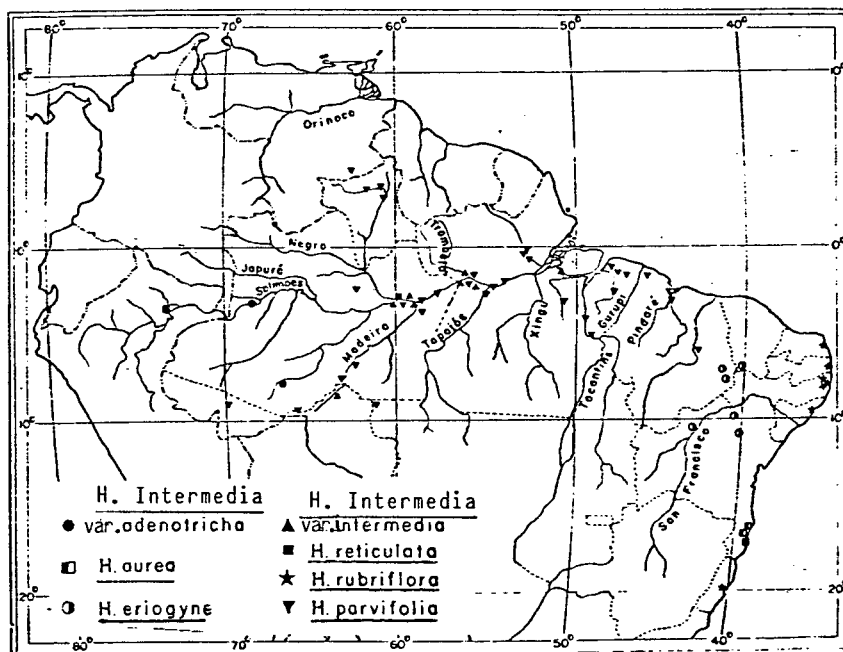
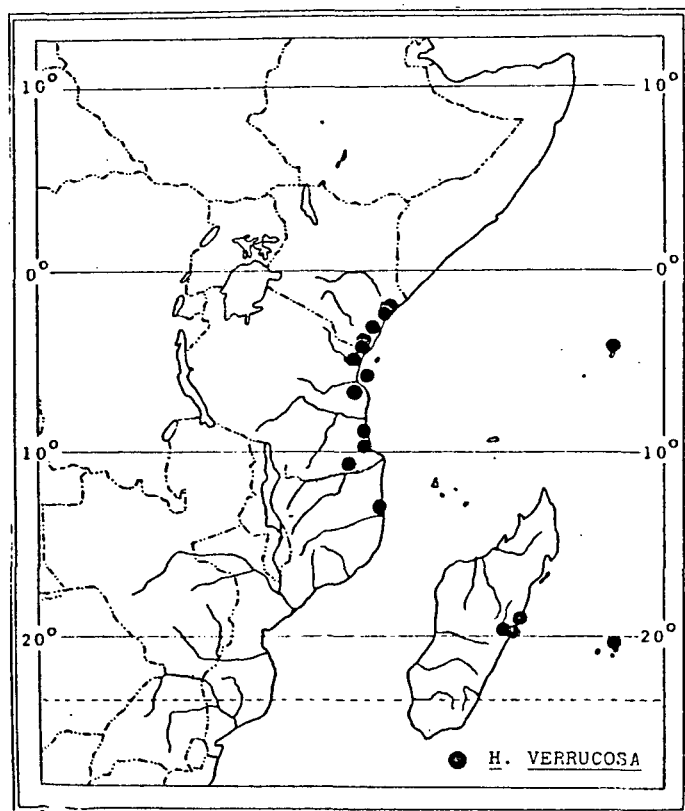
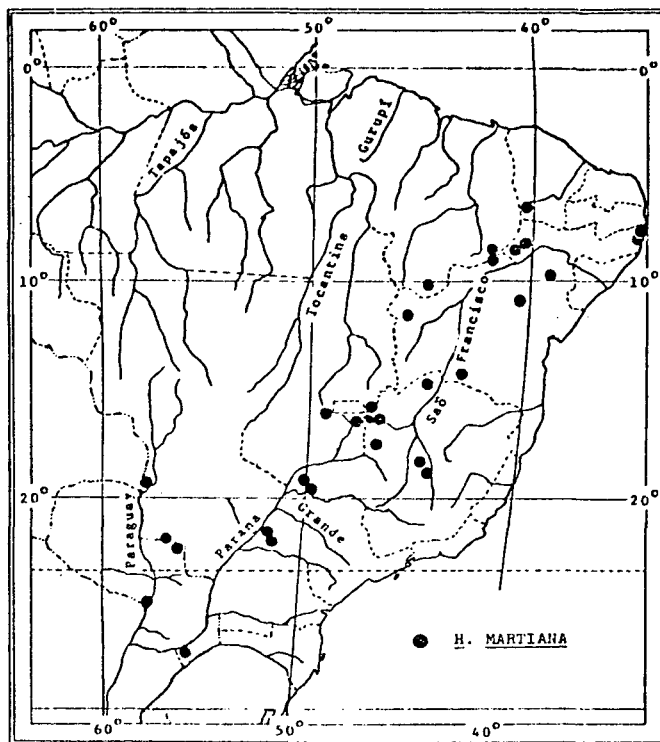


FIGURA 1 - Distribuição de algumas espécies de *Hymenaea*.

Fig. 2 e 3 - Distribuição de espécies de Hymenaea.



1.2.3. - Uso Industrial

A produção abundante de resina é um fenômeno dos angiospermas, em habitat tropicais e subtropicais. Entre as leguminosas, a subfamília Caesalpinioideae é uma das que apresenta maior importância entre as produtoras de resina¹⁵. Assim, o gênero *Hymenaea* (Caesalpinioideae, Datarie), se tornou muito conhecido por este fato, inclusive sendo denominado "brazilian copal" (secção *Hymenaea*) e de "zanzibar copal" (secção *trachylobium*)¹⁶. Esta resina denominada "jutahycica"^{11,17} é usada comercialmente, na fabricação de vernizes¹³ e na indústria cerâmica, após pulverizada, misturando-se à argila¹⁸. Outro emprego da resina é como antifúngico ou inseticida^{19,20}, dadas as propriedades tóxicas existentes na resina foliar, especialmente verificados nas espécies *H. Stignocarpa*²¹, *H. Intermedia*, *H. Parvifolia*¹³⁻¹⁵, *H. Courbaril*^{13,22,23}, *H. Rubriflora*, *H. Reticulata*, *H. Verrucosa* e *oblongifolia*¹³. A ação antifúngica é atribuída ao tanino contido no gênero²³.

As árvores do gênero *Hymenaea* dão madeiras bastante resistentes, isto se deve entre outros fatores, pela presença do sílicio verificado em espécies como *H. Oblongifolia*, var. *davissi*²⁴. As madeiras são de boa qualidade, o que as tornam excelentes para a obtenção de celulose e papel, destacando-se as espécies *parvifolia*, *oblongifolia* e *courbaril*^{25,26}. As sementes de *H. Parvifolia*, misturadas a outros agentes cremosos são utilizadas na industrialização da borracha²⁷. Enquanto que na indústria têxtil, cascas de *H. courbaril* servem para tratamento de fibras naturais e sintéticas²⁸.

1.2.4 - Uso Medicinal

O emprego medicinal do gênero restringe-se à medicina popular, existindo muito poucas comprovações científicas, especialmente farmacológicas, que justifiquem suas ações medicinais mencionadas popularmente. A espécie em questão, devido as suas ações mencionadas pela medicina popular, vem sendo comercializada como fitoterápico, através dos extratos fluídos obtidos das cascas, inclusive pelos Laboratórios Klein Ltda. para o "tratamento de inflamação da bexiga (cistite), uretrite e prostatite"²⁹. O material botânico empregado neste trabalho foi fornecido por esta empresa.

Entre as diversas ações medicinais atribuídas pela medicina popular para a *H. Martiana*, destacam-se suas propriedades adstringentes, sedativa e flatulenta, justificando o uso de suas cascas para diarreias, desinterias e dispepsias. Emprega-se, popularmente, a resina para o tratamento da fraqueza geral, laringite, asma e bronquite¹⁰. Também é muito conhecido e utilizado, especialmente no nordeste brasileiro, o famoso "vinho de jatobá", como poderoso fortificante^{10,30}.

Estudos farmacológicos realizados com extratos hidroalcoólicos das cascas de *Hymenaea martiana*, em nosso laboratório, demonstraram uma ação antinflamatória e inibidora das respostas da musculatura lisa isolada a vários neurotransmissores. Estes resultados já contribuem, pelo menos parcialmente, para justificar o vasto emprego da planta pela medicina popular. Embora raros os trabalhos farmacológicos sobre o gênero, relata-se um estudo de atividade antineoplásica, com espécies de *Hymenaea*³² e em outra publicação, esta propriedade é atribuída a presença de tanino contido nas folhas das mesmas³¹.

1.3. - REVISÃO QUÍMICA DO GÊNERO

As espécies do gênero *Hymenaea* já estudadas do ponto de vista químico são: *H. courbaril*, *H. intermedia*, *H. martiana*, *H. oblongifolia*, *H. parvifolia*, *H. reticulata*, *H. rubriflora*, *H. stigonocarpa* e *H. verrucosa*. Nestas espécies foram isolados e identificados compostos de natureza tânica^{23,33,34}, fenólica^{23,34}, e principalmente terpênica^{16,17,19,23,35-37}. No entanto, são escassos os estudos farmacológicos que comprovem quais destes compostos seriam responsáveis pelas ações medicinais, atribuídas, popularmente. Por outro lado, existem evidências de que os taninos, contidos na casca de espécie do gênero *Hymenaea*, possam estar relacionados com alguns dos efeitos terapêuticos já mencionados³⁸.

O gênero, é muito rico em substâncias tânicas, porém foram pouco investigadas quimicamente, havendo, apenas, o relato sobre o isolamento dos compostos designados de: prodelfinidinas e procianidinas³⁴, os quais apresentavam sete ou mais subunidades de catequina e pesos moleculares superiores a 2000.

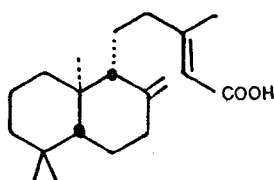
Quanto a presença de esteróides, o único encontrado em levantamentos bibliográficos realizados foi o isolamento de sitosterol em cascas de *H. courbaril*³⁷.

Algumas espécies de *Hymenaea* são muito ricas em carboidratos, sobretudo no óleo de suas sementes, com destaque para a *H. courbaril*, que atinge o índice de 67,7%³⁹.

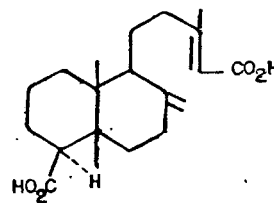
O gênero contém grandes quantidades de compostos que foram estudados e publicados, em tese de doutoramento, por Leo Mac Closkey³⁴. Nos compostos fenólicos, também foi investigada a ação anti-herbívoros¹⁹.

Compostos terpenóides são os produtos naturais mais abundantes e característicos do gênero. Ourisson, Langenheim e colaboradores estudaram a sistemática, aspectos taxonômicos, evolutivos e químicos do gênero, a partir destes produtos^{15,17,19, 35-37,40,41}. Os estudos envolvem uma análise dos diterpenos e sesquiterpenos, isolados, por eles mesmos, e outros pesquisadores, em várias espécies sul-americanas, inclusive brasileiras, e africanas atingindo um total de oito espécies de *Hymenaea*. Entre outros foram isolados ácidos diterpênicos e, principalmente, hidrocarbonetos sesquiterpênicos, que serão relatados a seguir.

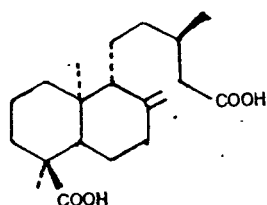
Ácidos diterpênicos são encontrados, principalmente, na resina do tronco, raízes e frutos. O ácido diterpênico, denominado ácido copálico (1) tem o esqueleto do ácido agatanedicarboxílico (2) e foi isolado a partir de resinas do tronco e raízes de *H. courbaril*¹⁷. Já o ácido enantiopinifólico (ácido enantio-labd-8(20)-en-15,18-dioico)(3) foi obtido a partir da resina do tronco de *H. verrucosa*⁴⁰ e *H. oblongifolia*¹⁶. Outro ácido isolado desta última foi o ácido guamaico (enantio-labd-8(20),13-dien-15,18-dioico) (4)¹⁶.



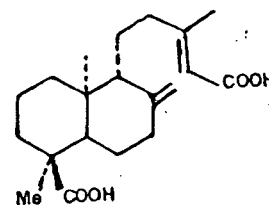
Ácido copálico (1)



Ácido agatanedicarboxílico (2)

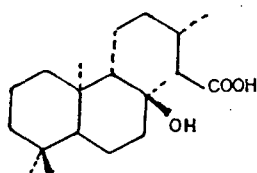


Ácido enantiopinifólico (3)

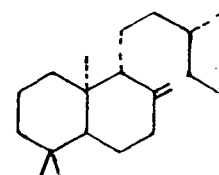


Ácido guamaico (4)

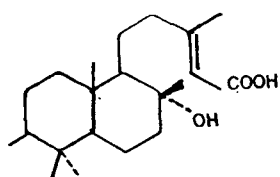
Da resina do tronco de *H. parvifolia* isolou-se o ácido enantio 13 epilabdanóico(5)¹⁶. Todos estes diterpenos possuem esqueletos labdane(6) e são bicíclicos^{16,17,36}. Outros diterpenos bicíclicos, isolados da espécie *H. courbaril*, tronco e casca, são: ácido labd-13-en-8-ol-15-oico(7)³⁵, ácido epurea-7,13-dien 15 oico(8), ácido labd-13-en-8-β-ol-15-oico(9) e ácido labd-8-β-ol-15-oico(10)³⁷, sendo que os três últimos haviam sido isolados anteriormente da *H. verrucosa*⁴⁰.



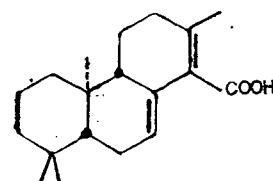
ácido enantio-13-
epilabdanóico (5)



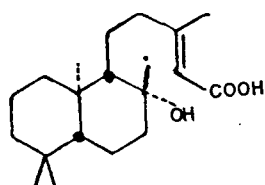
esqueleto labdane (6)



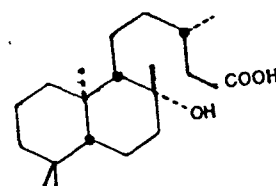
ácido labd-13-en-8-ol-15-
oico (7)



ácido epurea-7,13-
dien-15-oico (8)

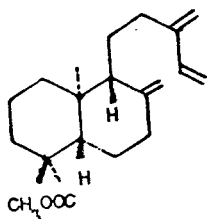


ácido labd-13-en-8
β ol-15 oico (9)

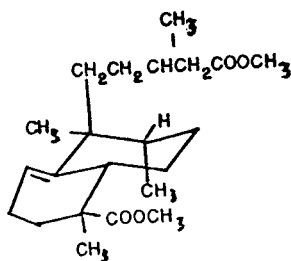


ácido labdan-8-β
ol-15-oico (10)

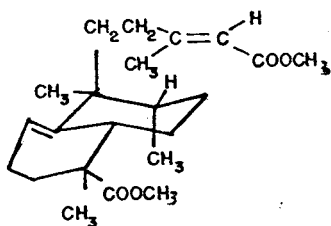
Foi demonstrado que as estruturas dos diterpenos isolados da resina das sementes de **H. courbaril** são mais rearranjadas que a daqueles isolados de seu tronco. Entre os primeiros estão os diterpenos bicarbocíclicos, abaixo apresentados (11-14)³⁶.



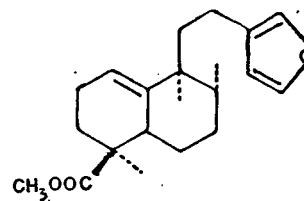
(11)



(12)



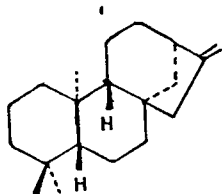
(13)



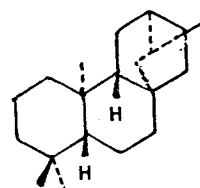
(14)

Diterpenos bicarbocíclicos de semente de **H. courbaril**.

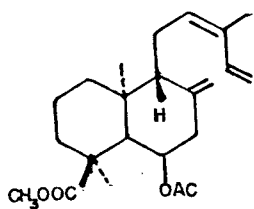
Em contraste com os compostos diterpênicos bicíclicos com arranjo labdane, os diterpenos encontrados nas sementes de *H. verrucosa* são tetra e penta cíclicos, com esqueletos kaurene (15) e trachilobane (16). Nesta mesma espécie, também, foi isolado um diterpeno com esqueleto labdane, o ácido zanzibárico (17)



esqueleto kaurene (15)

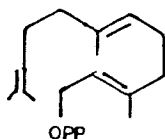


esqueleto trachylobane (16)

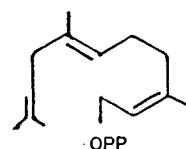


ácido zanzibárico (17)

Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram isolados a partir da resina foliar de várias espécies, e da resina das sementes de *H. courbaril*. Estes são derivados por ciclização de trans-trans e trans-cis-farnesil pirofosfatos (18-19), a intermediários que, por ciclização, originam os compostos sesquiterpênicos conhecidos^{13,36}.

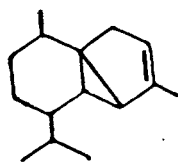
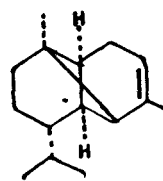
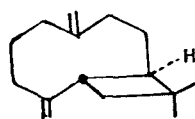


Trans-trans farnesil
pirofosfato (18)

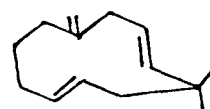
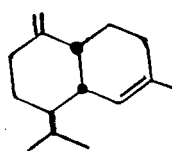
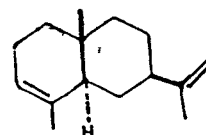
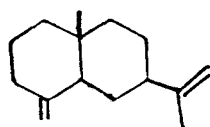
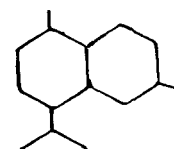
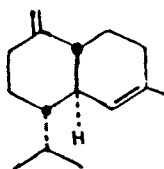


Trans-cis farnesil
pirofosfato (19)

Entre estes sesquiterpênicos devemos indicar: α cubeno, α copaeno (21), β copaeno, cariofileno (22), β humuleno (23), γ muroleno (24), α selineno (25), β selineno (26), δ cadineno (27), γ cadineno (28)^{13,43}.

 α cubebeno (20) α copaeno (21)

cariofileno (22)

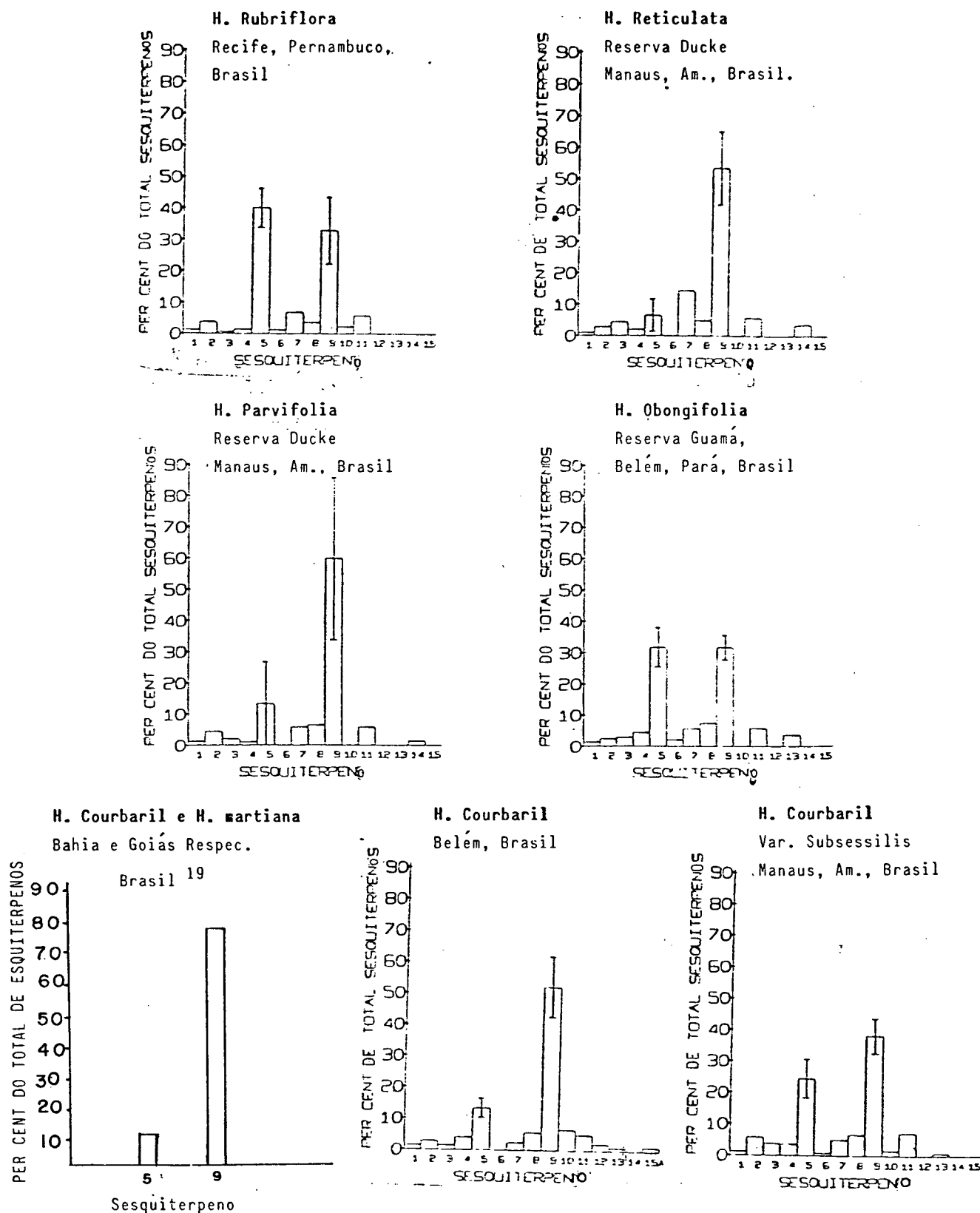
 β humuleno (23) γ muroleno (24) α selineno (25) β selineno (26) δ cadineno (27) γ cadineno (28)

Entre as espécies, estes compostos são idênticos qualitativamente, porém, variam quantitativamente^{13,36,42}, como pode ser observado na tabela 1 e figura 4¹³. Os sesquiterpenos predominantes nas espécies são: cariofileno α e β selineno, sendo que ao primeiro é atribuída atividade antifúngica^{13,19,21,23} e aos sesquiterpenos, em geral, a atividade inseticida, exercida pelas propriedades tóxicas e dissuadoras a insetos herbívoros²².

TABELA 1 - Sesquiterpenos isolados da resina foliar do gênero *Hymenaea*¹³.

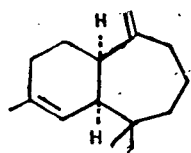
Composto Número:	Sesquiterpeno
1	α cubebeno
2	α copaeno
3	não identificado
4	β copaeno
5	cariofileno
6	não identificado
7	β humuleno
8	γ muroleno
9	α + β selineno
10	não identificado
11	γ cadineno
12	δ cadineno
13	não identificado
14	não identificado

FIGURA 4 - Compostos da resina foliar das espécies amazônicas do gênero *Hymenaea**

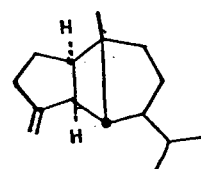


* Cada gráfico mostra a média de oito amostras, exceto *H. reticulata* (cinco amostras), *H. rubriflora* (três amostras), *H. martiana* e *H. Courbaril*-Bahia (seis amostras).

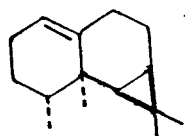
Além destes sesquiterpenos, outros foram isolados e identificados a partir da resina das sementes de *H. courbaril*, recebendo as seguintes denominações: ciclo.sativeno, α himachaleno (29), selene-4 (11), 7 (11) dieno e o já conhecido cariofileno, em maiores quantidades, enquanto que β bourboneno (30), calareno (31), selina-4 (14), 7-dieno, α calacoreno (32) e os citados humulenos, δ cadinenos e ainda α muroleno, α calacoreno em quantidades minoritárias^{36,43}.



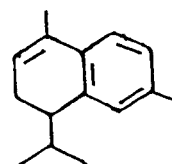
α Himachaleno (29)



β Bourboneno (30)



Calareno (31)



α Calacoreno (32)

1.4.- ESPÉCIE EM ESTUDO E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Hymenaea martiana Hayne, Arzneck é geralmente encontrada como uma árvore de médio porte (fig. 10 e 11), na região do cerrado dos estados de Goiás e norte de Minas Gerais. Além disso, ela também se estende pelas regiões de caatinga de quatro estados do nordeste (Piauí, Ceará, Pernambuco e Bahia) e pelo sul do Paraguai e Argentina. Embora esta espécie cresça em ecossistemas relativamente secos, aparecem mais frequentemente nas margens dos rios. A floração ocorre nos meses de outubro a janeiro e a frutificação por volta de agosto¹². Em levantamentos realizados por Lee e Langenheim¹² a espécie foi localizada nos seguintes estados e municípios: Alagoas (União dos Palmares), Bahia (Vila Nova, Barra, Caeteté, Barreiro, Rio Corrente, São Raimundo Nonato, Jacobina), Ceará (Juazeiro), Goiás (Luziânia e Rodovia Brasília-Pires-Rio Corumbá, Serra-Dourada, Rodovia Luziânia a Vianópolis e Ilha do Catalão), Mato Grosso (Saloba, Corumbá), Minas Gerais (Paraopeba, Rodovia Brasília-Rio Abaeté, Famosa, Ituitutaba, Rio das Velhas, Paracatu), Pernambuco (Paulista, Buíque, Cabrobó, Olinda, Parnamirim). No sul do Paraguai e na Argentina, no município de Candelária, a espécie também ocorre.

1.5 - POSIÇÃO SISTEMÁTICA DE HYMENAEA MARTIANA (Hayne, Arzeik)¹²

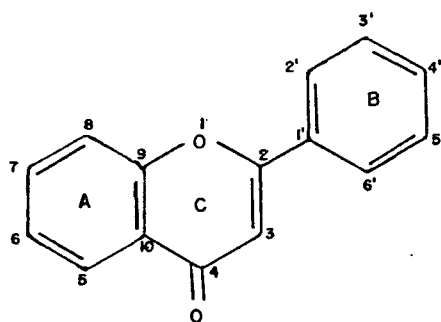
Divisão	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae
Subclasse	Archiclamydeae
Ordem	Rosales
Família	Leguminosae
Subfamília	Caesalpinioideae
Tribo	Datarie
Gênero	Hymenaea
Secção	Hymenaea
Espécie	Hymenaea martiana
Sinonímia Vulgar	Jatobá

1.6 - RESUMO DA ESPÉCIE

Árvore de médio ou grande porte, com 15 metros de altura. Folhas com pecíolos de 12-18 mm, densamente pubescentes e folhinhas com pedicelos curvados de 4-6 mm; são de formato ovado a obovado-oblongo, medindo de 5,5-7,5 x 2,5-4,5 cm., com a superfície adaxial das folhas adultas lustrosa, esparsamente pilosa e a superfície abaxial bem acinzentada, coriácea, obtusa, a base oblíqua, com o lado interno agudo e o externo moderadamente arredondado. São muito floradas, ramagem intensamente acinzentada tomentosa e os pedicelos longos, 4-7 mm. Flores de tamanho médio, hipantio campanulado, com uma haste basal longa, de 4-6 mm, discóide, proeminente, com massa adicional de tecido nectarífero; cálice lobado ovado a obovado, cerca de 12-14 x 8-10 mm; pétalas ovoides-obovadas, sésseis, sub-iguais, aprox. 15 x 6-8 mm, brancas, estames longos, aprox. 25 mm, anteros, aprox. 6 mm; ovário longo-estipado, geralmente com um tufo de pêlos na base, menos comumente glabro, estipe e estilete longos, 6 e 18 mm, respectivamente; óvulos em número de 8-12. Frutos oblongos, condensados cilindricamente, muito lisos, algumas vezes com suturas bem elevadas, lustrosos, preto-amarronzados a marrons de aprox. 9-12 x 3-4,5 x 2,5-3,5 cm. Sementes (4-6) obovóides, a elipsóides, marrons escuras, com sulcos horizontais.

1.7.- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A QUÍMICA DE FLAVONÓIDES

Flavonóides são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal, que possuem um esqueleto carbonado, disposto numa configuração: $C_6-C_3-C_6$, que corresponde a dois anéis aromáticos (anéis A e B), ligados com uma unidade de três carbonos (anel C), que pode ou não formar um terceiro anel⁴⁶.



São conhecidos cerca de duzentos flavonóides naturais⁵¹.

Estes se apresentam sob forma livre, ou ligados a açúcares, sendo designados, neste caso, de flavonóides glicosídeos. Os flavonóides podem, numa só planta, apresentar várias combinações glicosídicas.

A classificação do tipo de flavonóide numa planta, é baseada, inicialmente, num estudo das propriedades de solubilidade e reações coloridas por eles apresentadas. São reconhecidas cerca de dez classes de flavonóides, apresentadas na tabela 2. Os flavonóides estão presentes em todas as famílias e em todas as partes do vegetal, mas algumas classes de flavonóides são mais amplamente distribuídas que outras. As flavonas e flavonóis são universais, enquanto que as isoflavonas e biflavonóis são encontrados em poucas famílias de plantas⁴⁴. O tipo de flavonóide, assim como a sua localização, numa planta, vão influenciar na escolha do método de isolamento do mesmo⁴⁵.

TABELA 2 - Classificação dos Flavonóides.

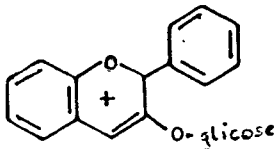
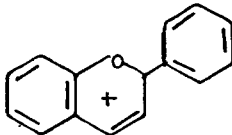
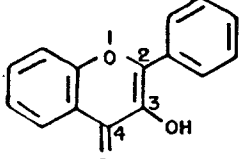
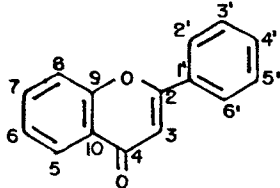
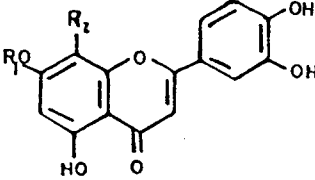
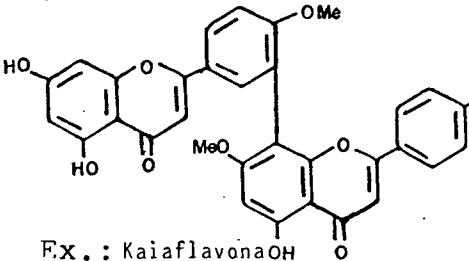
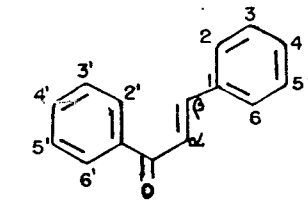
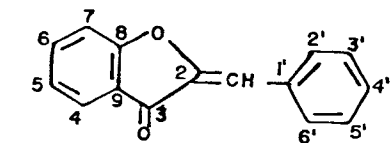
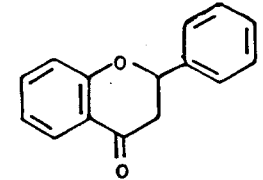
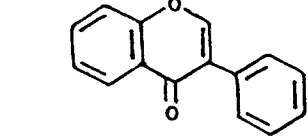
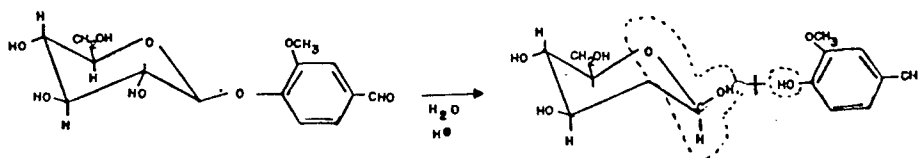
Tipo de Flavonóide	Distribuição	Prop. Características
1 - Antocianinas	- Pigmentos florais (verm., escarlate, azuis); - Em folhas e outros tecidos.	- Hidrossolubilidade; - Em cromatografia em papel, móvel em BAA. (Benzeno:Acetona:Água).
		
Antocianina Típica (ligada a açúcar)		
2 - Proantocianidinas	- Em plantas flores- tais (pouco coloridos).	- Fornecem antocianidinas por aquecimento (0,5h.) em 2M HCl.
		
Antocianidina		
3 - Flavonóis e Dihidroflavonóis*	- Pigmentos florais (pouco corados); - Muito presentes em folhas.	- Após hidrólise ácida. Observa-se na luz UV, pontos amarelos brilhantes em cromatogramas.
		
*(Dihydroflavonóis são flavonóis dihidrogenados em 2 e 3) ver p. 34.		
4 - Flavonas	- Como flavonóis	- Idem acima, exceto pela cor dos pontos ser marrom.
		
5 - Glicoflavonas	- Como flavonóis	- Contém ligação C-C açúcar; - Em cromatogramas, é móvel em água, diferindo das flavonas normais.
		
Ex.: Orientin - R ₁ = H, R ₂ = gli.		

TABELA 2 - (Continuação).

Tipo de Flavonóide	Distribuição	Prop. Características
<p>6 - Biflavonóis</p>  <p>Ex.: KaiaflavonaOH</p>	<p>- quase exclusivos de Gymnospermas, são pouco corados.</p>	<p>- Em cromatogramas BAA. apresentam pontos com alto valor de Rf.</p>
<p>7 - Chalconas</p> 	<p>- pigmentos florais amarelos.</p>	<p>- Após tratamento com amônia fornecem uma cor vermelha.</p>
<p>8 - Auronas</p> 	<p>- Idem anterior.</p>	<p>- Idem anterior</p>
<p>9 - Flavanonas</p> 	<p>- Em folhas e frutos (são pouco corados);</p> <p>- São mais concentrados no gênero Citrus.</p>	<p>- Após tratamento com Mg/HCl, fornecem cor vermelha intensa.</p>
<p>10 - Isoflavonas</p> 	<p>- Em raízes, sendo pouco corados;</p> <p>- Exclusivos da família Leguminosae.</p>	<p>- Em cromatogramas, são móveis em água;</p> <p>- Apresentam cor inespecífica em testes usuais.</p>

1.8.- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE GLICOSÍDEOS

Glicosídeos são compostos formados por carboidratos (açúcares), em combinação com outra classe de substâncias químicas. Todos podem ser hidrolisados, fornecendo então o açúcar e o composto ligado a este, chamado componente aglicona do glicosídeo. O açúcar e a aglicona se encontram ligados graças a uma reação de substituição do grupo hidroxila anomérico (pertence ao carbono anomérico, que é o carbono de um grupo hemiacetal: $\text{RO}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{OH}$) do açúcar, por um grupo R (R=C,N) ou OR (R=H, CH_3 , etc.) da aglicona. No glicosídeo apresentado na equação (1), ocorre a substituição do grupo OH do carboidrato pelo grupo OR da aglicona vanilina⁴⁷.



Equação (1) - Hidrólise ácida do glicosídeo glicovanilina.

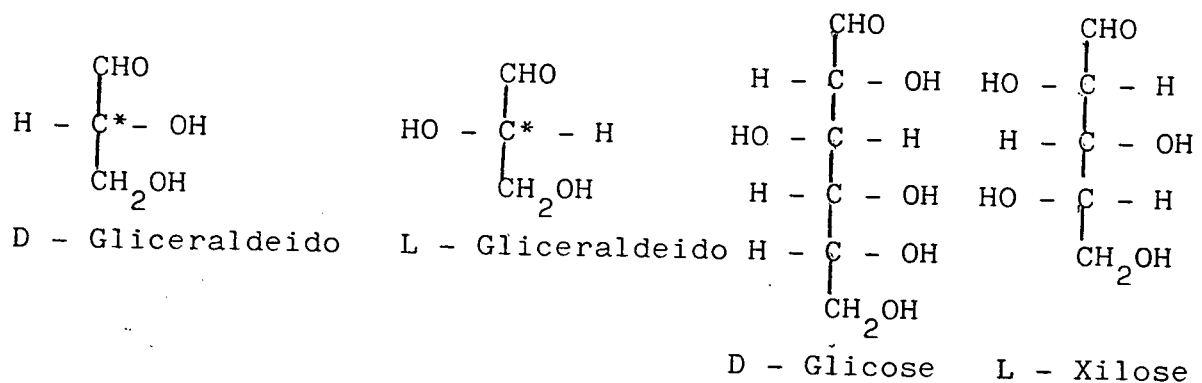
Na formação do glicosídeo, deve-se considerar o tipo de açúcar envolvido, se este for a glicose, o derivado é um glicósido; se for a frutose, um frutósido, etc.⁴⁷.

Muitas agliconas apresentam variados e importantes papéis. Estas podem funcionar como corantes, responsáveis pelas cores das plantas, como as antocianinas e antoxantinas; podem tam

bém apresentar atividades farmacológicas, como as derivadas de perhidrofenantreno, as digitoxigeninas, gitoxigeninas, digoxigeninas, que pertencem a classe de glicosídeos com atividade cardíaca os glicosídeos cardiotônicos, salientando-se além disso, que as agliconas ainda exercem outras funções relevantes^{48,49}.

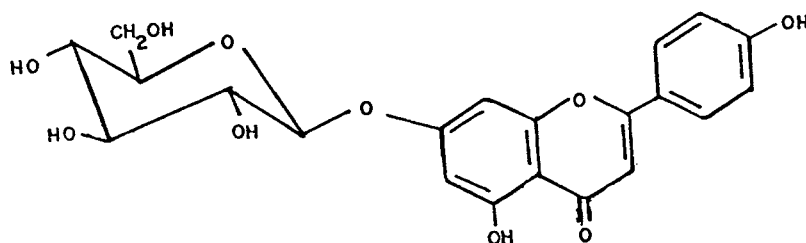
A configuração dos glicosídeos seguem as mesmas convenções adotadas para os açúcares anômeros, ou seja, aqueles que diferem apenas na configuração do Carbono hemiacetal ($\text{RO} - \underset{\text{OH}}{\text{C}} - \text{OH}$), anomérico⁴⁷. Estas convenções baseiam-se nos seguintes princípios: 1 - O açúcar gliceraldeído possui um átomo de carbono assimétrico*, permitindo assim a existência de dois isômeros óticos: levorrotatório e um dextrorrotatório. Como é muito difícil prever-se a rotação efetiva de um isômero ótico, adota-se a convenção proposta por E. Fischer. Na forma plana de um açúcar, quando a hidroxila está para a direita, tem-se um D-açúcar, quando a hidroxila está para a esquerda, tem-se um L-Açúcar.

Os símbolos D e L, indicam, portanto, a configuração, isto é, a disposição dos grupos, no espaço, e nunca o poder rotatório do composto. Assim, um açúcar pode ser D (dextroconfigurado) e desviar o plano de luz polarizada para a esquerda e vice-versa⁵⁰.



Note que a ciclização surge um novo centro de assimetria na molécula, no carbono 1. Portanto, é lícito supor-se que existe duas glicoses: α e β . Então a convenção adotada é simples: o anômero α é o que tem a mesma configuração do OH no carbono anomérico e no carbono que determina a configuração do próprio açúcar (carbono assimétrico mais distante do grupo aldeído).

Como a configuração dos glicosídeos segue estas convenções acima relatadas, então se um glicosídeo de um D-açúcar tem a D-configuração no carbono anomérico (C-1), ele é designado como um α -D-glicosídeo e se tem a L-configuração, no carbono anomérico, é chamado de β -D-glicosídeo, que é mais comum para glicosídeos naturais^{47,50}.



Apigenina 7-O- β -D-glicosídeo⁴⁶

1.8.1 - FLAVONÓIDES GLICOSÍDEOS

São glicosídeos cuja parte aglicona é constituída por flavonóide(s). Portanto, um flavonóide glicosídeo é composto de flavonóide(s) ligado(s) a açúcar(es)⁴⁵.

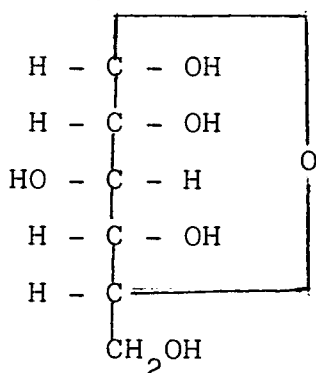
A glicosilação do flavonóide pode ser de seus grupos hidroxila, resultando os flavonóides O-glicosídeos, ou de seu núcleo, produzindo os flavonóides C-Glicosídeos, discutidos nos itens seguintes⁴⁶.

Os flavonóides encontrados, na natureza, geralmente se apresentam como flavonóides glicosídeos. Numa mesma planta, normalmente, ocorrem em várias combinações glicosídicas, sendo rara a ocorrência de um único flavonóide numa planta. Dentre os flavonóides, a quercitina, é o flavonóide mais comum, admitindo mais de setenta combinações glicosídicas já analisadas e identificadas. Além disso, numa mesma planta, frequentemente, existem diferenças consideráveis entre os glicosídeos achados em seus vários órgãos^{45,51}.

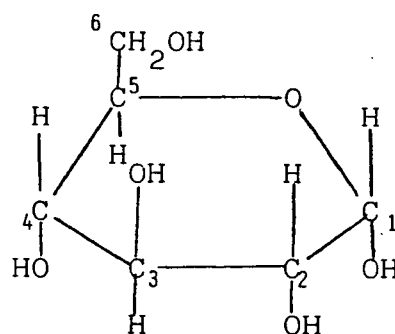
1.8.1.1 - FLAVONÓIDES O-GLICOSÍDEOS

Os flavonóides O-glicosídeos são mais comumente encontrados na natureza, onde um ou mais grupos hidroxila do flavonóide, unem-se a um ou mais açúcares por uma ligação química hemiacetal ($\text{RO}-\underset{\text{O}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{OH}$). A glicosilação torna o flavonóide menos reativo e mais hidrossolúvel, permitindo com isso que o mesmo seja armazenado nas células vegetais.

O açúcar geralmente envolvido, é a glicose. Além deste, não é raro o aparecimento de galactose, ramnose, xilose e arabinose. Outros açúcares, ocasionalmente, encontrados são: aldo se, manose, frutose, apiose e os ácidos glicurônico e galacturônico. Esses açúcares classificam-se como monossacarídeos, ou seja, açúcares não hidrolissáveis, de fórmula geral $C_nH_{2n}O_n$, compostos de três a sete carbonos. Os monossacarídeos associados a flavonóides, geralmente, encontram-se na forma piranose, a mais estável, havendo poucos relatos de seu encontro na forma furanose, menos estável. Os açúcares glicose, galactose, ácido glucurônico e xilose são D-açúcares e são geralmente β ligados ao grupo hidroxila, enquanto que ramnose e arabinose são L-açúcares e geralmente α ligados ^{45,50}.



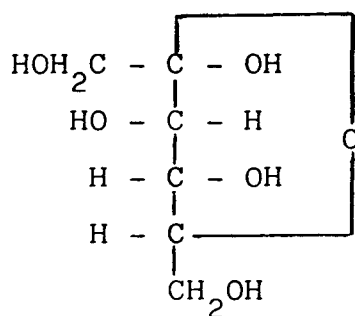
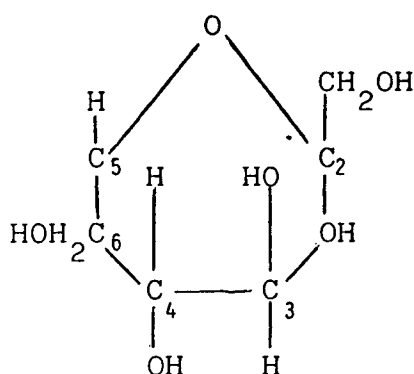
α -D-glicose



α -D-glicopiranoose

Monossacarídeos de forma piranose, essa forma é derivada da ciclicização de aldohexoses (açúcares com 5 carbonos e grupo aldeído), que originará um ciclo tipo pirano. Como consequência, as hexoses recebem o sufixo piranose.

Monossacarídeos de forma furanose: essa é originária da ciclicização de aldopentoses (açúcares com 5 carbonos e grupo aldeído) e de ceto hexoses (açúcares com 6 carbonos e grupo cetona), que resultará na formação de um ciclo de cinco átomos do tipo furano. Os açúcares correspondentes recebem o sufixo furanose.

 α -D-frutose α -D-frutofuranose

Também são frequentes as associações de flavonóides com açúcares dissacarídeos, aqueles que por hidrólise fornecem duas moléculas de monossacarídeos, com fórmula geral $C_n(H_2O)_{n-1}$. Os mais comumente envolvidos são sofrorose e rutinose.

A ocorrência de associações com tri e tetrassacarídeos (aqueles que por hidrólise fornecem três a quatro moléculas de monossacarídeos) são menos comuns. O único flavonóide conhecido com quatro açúcares é o Kaempferol 3-soforotriosídeo-7-ramnosídeo, isolado da espécie *Solanum Tuberosum*⁴⁵.

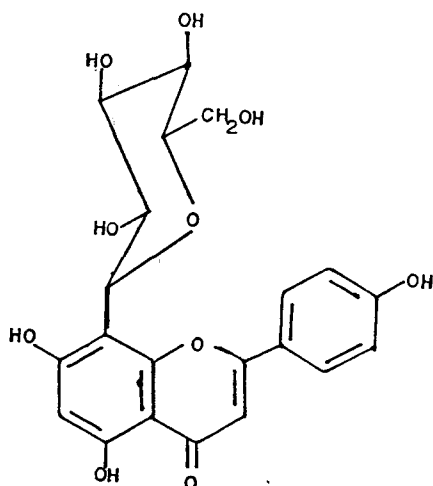
1.8.1.2 - FLAVONÓIDES C-GLICOSÍDEOS

Os flavonóides C-glicosídeos, são aqueles que apresentam um ou mais açúcares ligados pelo carbono ao flavonóide diretamente ao núcleo benzênico deste último, pela ligação C-C, que é ácido resistente. O açúcar geralmente está ligado ao carbono nas posições 6 e 8 do núcleo do flavonóide.

Os açúcares mais encontrados em flavonóides C-glicosídeos são principalmente a glicose, também galactose, ramnose, xilose e arabinose.

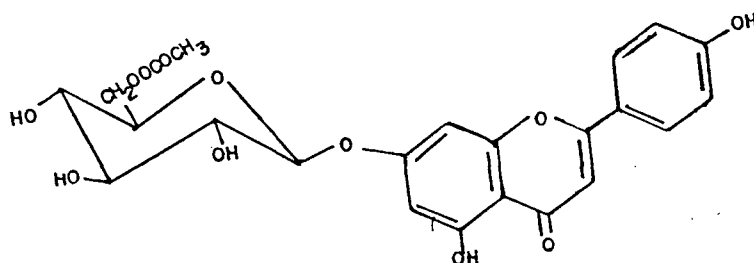
Os flavonóides agliconas mais envolvidos são: flavonas, ocasionalmente isoflavonas, flavanonas e flavonóis.

Como ocorre com os O-glicosídeos, os C-glicosídeos são frequentemente encontrados após derivação por O-glicosilação (no açúcar ou hidroxilas fenólicas) ou por acilação (geralmente de um açúcar hidroxila)⁴⁶.



Flavonóide C- Glicosídeo

Apigenina 8-C β -D-glucopiranosideo (vitexina)



Flavonóide O-glicosídeo

Apigenina 7 - O - β - D - (6'' - O - acetila)glucopiranosídeo

1.9 - ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DE FLAVONÓIDES

1.9.1 - ANÁLISE DE FLAVONÓIDES POR ESPECTROMETRIA U.V. E VISÍVEL

Os flavonóides contém sistemas aromáticos conjugados e por isso apresentam bandas intensas de absorção no espectro ultravioleta (U.V.) e regiões visíveis do espectro⁴⁵.

A espectroscopia ultravioleta é muito usada para flavonóides, porque ajuda na identificação dos mesmos, pela posição precisa e intensidade das bandas, no espectro, em metanol, e também indica o local de substituição dos grupos hidroxila e tipo de oxigenação do flavonóide, devido às mudanças no espectro, causadas por reagentes de substituição como: NaOMe, NaOAc, AlCl₃ ... (tab. 4 a 6).

O espectro U.V., típico da maioria dos flavonóides, é constituído de duas absorções máximas, que ocorrem na região de: 240-285 nm (Banda II) e outra em 300-400 nm (Banda I) (ver fig. 5).

Na interpretação dos dados fornecidos pelo U.V. torna-se importante consultar catálogos de referências existentes (ver referências 52-54).

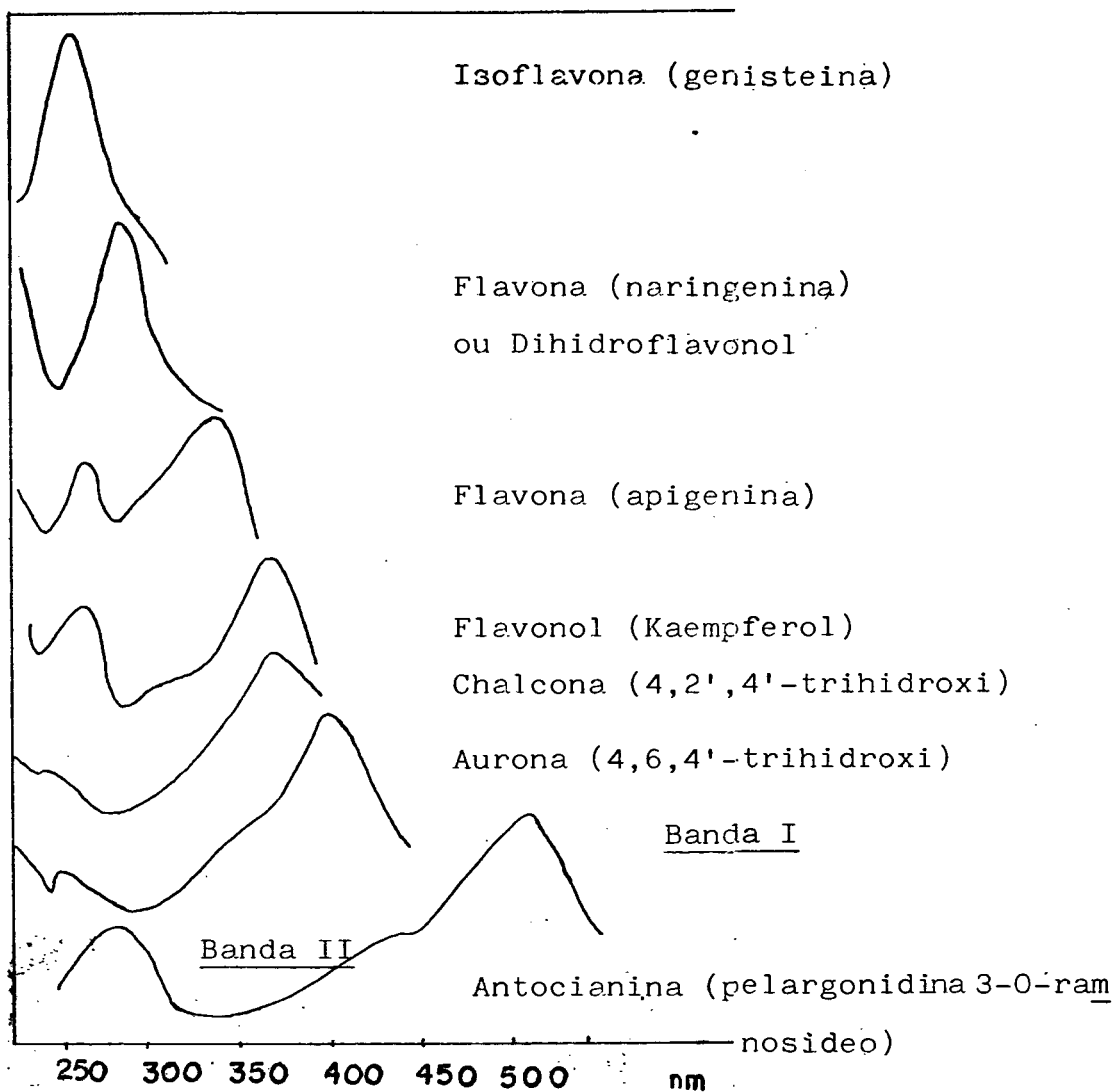
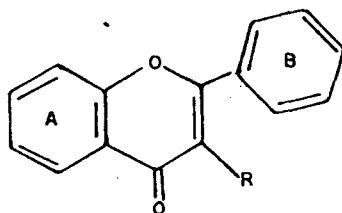


FIG. 5 - Espectros de absorção U.V. de diferentes tipos de flavonóides⁴⁶ com padrões de hidroxilação.

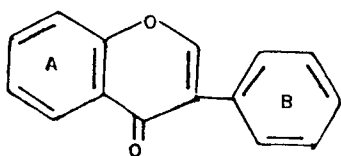
As regiões de absorção no espectro U.V. para flavonas são de 304-350 nm e entre 352-385 nm para flavonóis (ver figura 5.)⁴⁵.



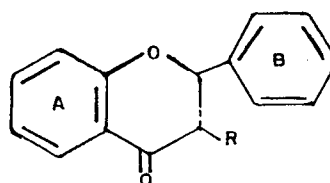
R=H flavona

R=OH flavonol

As isoflavonas, flavanonas e dihidroflavonóis apresentam espectros, facilmente, distinguíveis dos de flavonas, por exibirem a banda I em baixa intensidade, aparecendo, frequentemente, como um ombro (inflexão) da banda II. Estes flavonóis possuem em comum a ausência de conjugação entre os sistemas aromáticos (anéis A e B), explicando-se assim a alteração fundamental do cromóforo. Em isoflavonas, a banda II aparece na região entre: 245-270 nm e a banda I como uma inflexão entre 300-340 nm. Flavanonas e dihidroflavonóis apresentam sua absorção máxima (banda II), na região entre 270-295 nm (ver figura 5)⁴⁵.



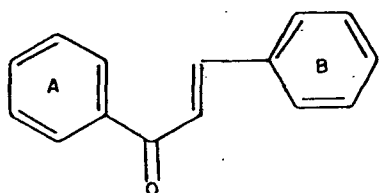
Isoflavona



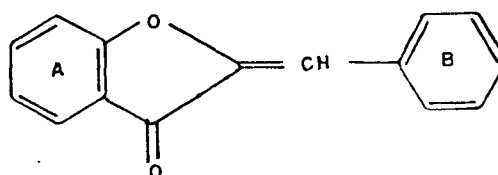
R=H Flavanona

R=OH Dihidroflavonol

Os espectros U.V. de chalconas e auronas são caracterizados pela presença de uma absorção da banda I dominante e uma da banda II relativamente menor. Em chalconas, a banda II ocorre na região entre 220-270 nm, enquanto que a banda I, entre 340-390 nm, e no espectro geralmente há a presença de um pico menor ou inflexão entre 300-320 nm (ver fig. 5)⁴⁵.

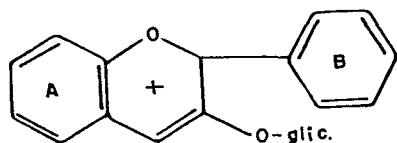


Chalcona

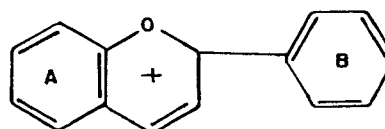


Aurona

Para as antocianinas e antocianidinas, a absorção da banda I ocorre entre 465-550 nm e a banda II, na região de 270-280 nm (ver figura 5)⁴⁵.



Antocianina (típica)



Antocianidina

Em geral, mudanças no espectro U.V. de flavonóides podem ser causadas por alterações no modo de oxigenação, substituição ou hidroxilação nos anéis. Se estas ocorrerem no anel A refletem na banda II e sendo nos anéis B e C refletem na banda I, causando efeitos batocrômicos das bandas no espectro. Metilação e glicosilação causam pouco efeito hipsocrômico da banda I, enquanto que acetilação do flavonóide tende a anular o efeito dos grupos hidroxila fenólicos no espectro⁴⁶.

Na tabela 3 são apresentadas as absorções no U.V. de vários tipos de flavonóides⁴⁶.

TABELA 3 - Absorções das bandas I e II nos espectros de U.V. de flavonóides (em nm)⁴⁶

Tipo de Flavonóides	Banda I	Banda II
Flavonas	310-350	250-280
Flavonóis	350-385	250-280
Isoflavonas	310-330 (inflexão)	245-275
Flavanonas e Dihidroflavonóis	300-330 (inflexão)	275-295
Chalconas	340-390	230-270
Auronas	380-430	230-270
Antocianinas e Antocianidinas	465-560	270-280

TABELA 4 - Interpretação do espectro U.V. de flavonóides com NaOAc⁴⁶

Tipo de Favonóide	Deslocamento Banda I	Observado Banda II	Interpretação
Flavonas Flavonóis Isoflavonas		+ 5 a 20 nm (redução se há 6- ou 8-oxigenação)	7-OH
		Redução da intensidade com o tempo	grupos alcalisensíveis; 6,7 ou 7,8 ou 3,4'diOH
Flavanonas e Dihidroflavonóis		+ 35 nm + 60 nm	7-OH (com 5-OH) 7-OH (sem 5-OH)
		Decréscimo da intensidade com o tempo	grupos alcalisensíveis: 6,7 ou 7,8-diOH
Chalconas Auronas	Deslocamento batocrômico ou ombro no comprimento de onda-longo.		4' e/ou 4-OH (chalconas) 4' e/ou 6-OH (auronas)

TABELA 5 - Interpretação do espectro U.V. de flavonóides com NaOAc/
 $\text{BO}_3\text{H}_3^{46}$

Tipo de Flavonóide	Deslocamento observado		Interpretação
	Banda I	Banda II	
Flavonas Flavonóis	+12 a 36 nm (relativo ao espectro em MeOH)		o-diOH no anel B
Auronas Chalconas	Deslocamento menor		o-diOH no anel A (6,7 ou 7,8)
Isoflavonas Flavanonas Dihidroflavonóis		+10 a 15 nm (relativo ao espectro em MeOH)	o-diOH no anel A (6,7 ou 7,8)

TABELA 6 - Interpretação do espectro U.V. de flavonóides com AlCl_3 e AlCl_3/HCl ⁴⁶

Tipo de Flavonóide	Deslocamento Banda I	Observado Banda II	Interpretação
Flavonas e Flavonóis (AlCl_3/HCl)	+35 a 55 nm		5-OH
	+ 17 a 20 nm		5-OH com 6-oxigenação
	não muda		5-OH com 6-prenila
	+50 a 60 nm		3-OH (com ou sem 5-OH)
(AlCl_3)	AlCl_3/HCl +30 a 40 nm		o-diOH no anel B
	AlCl_3/HCl +20 a 25 nm		o-diOH no anel A
Isoflavonas, Flavonas e Dihidroflavonóis (AlCl_3/HCl)		+10 a 14 nm	5-OH(isoflavonas)
		+20 a 26 nm	5-OH(flavonas, dihidroflavonóis)
(AlCl_3)		AlCl_3/HCl +11 a 30 nm	o-diOH no anel A (6,7 e 7,8)
		AlCl_3/HCl +30 a 38 nm (sensível a NaOAc)	Dihidroflavonol sem 5-OH

TABELA 6 (Continuação)

Tipo de Flavonóide	Deslocamento Banda I	Observado Banda II	Interpretação
Auronas			
Chalconas (AlCl ₃ /HCl)	+48 a 64 nm		2'-OH (chalco nas)
	+40 nm		2'-OH (Chalco nas) com 3'-oxige- nação
	+60 a 70 nm		4-OH (auronas)
(AlCl ₃)	AlCl ₃ /HCl +40 a 70 nm		o-diOH no anel B
	Aumento menor		o-diOH no anel A
Antocianidinas	+25 a 35 nm (em pH 2-4)		o-diOH
Antocianinas (AlCl ₃)	Deslocamentos maiores		múltiplos o-diOH (3-dio xi-antociani- dinas)

TABELA 7 - Interpretação do espectro U.V. de flavonóides com NaOMe⁴⁶

Tipo de Flavonóide	Deslocamento Observado Banda I Banda II	Interpretação
Flavonas Flavonóis	Redução contínua da intensidade.	3,4'-OH, o-diOH no anel A, anel B: 3-OH
	+45-65 nm não diminui na intensidade	4'-OH
	+45-65 nm diminui a intensidade	3-OH, 4'-OH não está livre
Isoflavonas		não desloca Anel A sem OH
Dihidroflavonóis Flavanonas		Diminui a in- tensidade com o tempo Anel A: o-diOH
	Deslocamento de 280-325 nm, nas e dihidroxi- aumento de in- tensidade em 330-340 nm + 60 nm	5,7-OH (flavano- de 280-325 nm, nas e dihidroxi- aumento de in- flavonóis 7-OH, sem 5-OH livre.

1.9.2 - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE FLAVONÓIDES (RMN ¹H)

A ressonância magnética nuclear é um método fundamental para a análise de estruturas de flavonóides. Com a aplicação desta tecnologia é possível: definir o tipo de oxigenação presente, determinar o número e posição dos grupos metoxila, distinguir entre isoflavonas, flavanonas e dihidroflavonóis e determinar o número e tipo de açúcares presentes⁴⁶.

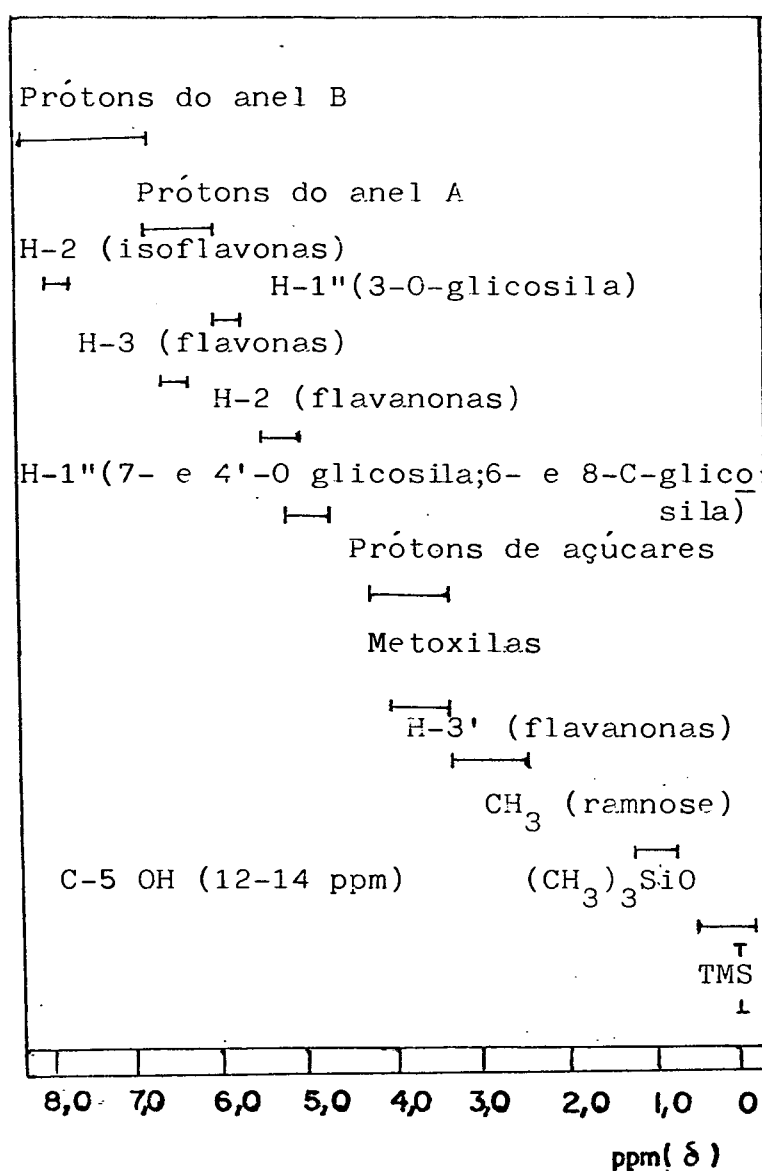
Os sinais aparecem entre 0 e 9 ppm, referidos a TMS, e definem, de certo modo, o tipo de H que representam, como mostra a tabela 8 e figura 6.

Deslocamento químico (ppm)	Tipo de próton
0	TMS
±1	CH ₃ de ramnose
±1,7	grupo prenila
±2,0	CH ₃ de acetato e aromático
2,0-3,0	H-3 de flavanonas
±3,9	grupos metoxi aromáticos
3,5-4,0	maioria de H de açúcares
4,2-6,0	H-1" de açúcares
5,0	H-2 de dihidroflavonóis
6,0-8,0	H de anéis A e B
7,5-8,0	H-2 de isoflavonas

TABELA 8 - Deslocamentos químicos de tipos de prótons de flavonóides⁴⁶.

Segundo a tabela anterior vimos que as flavanonas apresentam H-3 entre 2-3 ppm, isoflavonas H-2 entre 7,5-8,0 ppm e dihidroflavonóis H-2 em 5,0 ppm. Isto permite distinguir estes flavonóides.

Figura 6 - Regiões habituais de deslocamentos químicos de flavonóides⁴⁵

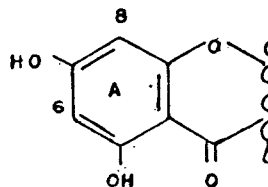


O espectro RMN ¹H pode ser realizado fazendo os éteres trimetilsilano de flavonóides e usando CCl₄ como solvente⁵² ou usando os compostos sem modificação em DMSO-d₆, CDCl₃ ou C₆D₆⁴⁵.

1.9.2.1 - PRÓTONS DOS ANÉIS

1.9.2.1.1 - PRÓTONS DO ANEL A

- Em 5,7-dihidroxi-flavonóides

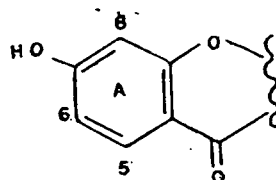


Os prótons em posição 6 e 8 aparecem separadamente como dubletes ($d, J=2,5$ Hz) na região de 5,7-6,9 ppm. O H-6 aparece em campos maiores que H-8 e quando o hidroxila de posição 7 está glicosilado, este muda para campos mais baixos⁴⁵ (ver tab. 9).

Flavonóide	H-6 (ppm)	H-8 (ppm)
1. Flavonas, flavonóis, isoflavonas 7-glicosídeos de 1.	6,0-6,2 d. 6,2-6,4 d.	6,3-6,5 d. 6,5-6,9 d.
2. Flavanonas e dihidroflavonóis 7-glicosídeos de 2.	5,75-5,95 d. 5,9-6,1 d.	5,9-6,1 d. 6,1-6,4 d.

TABELA 9 - Deslocamentos químicos de prótons do C-6 e C-8 em 5,7-dihidroxi-flavonóides⁵².

- Em 7-hidroxi-flavonóides



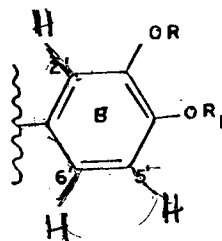
O H do C-5 é fortemente desprotegido pelo grupo carbonila em posição 4 e assim aparece em 8,0 ppm como um dublete (d, J=9 Hz), devido ao acoplamento orto com o H-6. O H-6 aparece como um quarteto (q, J=9 Hz e J=2,5 Hz) em campos menores que em 5,7-dihydroxiflavonóides⁴⁵ (ver tab. 10).

Flavonóide	H-5(ppm)	H-6(ppm)	H-8(ppm)
Flavonas, flavonóis, isoflavonas	7,9-8,2 d.	6,7-7,1 q.	6,7-7,0 d.
Flavanonas e dihidroflavonóis	7,7-7,9 d.	6,4-6,5 q.	6,3-6,4 d.

TABELA 10 - Deslocamentos químicos de prótons dos C-5,6 e 8 em 7-hidroxiflavonóides⁵².

1.9.2.1.2 - PRÓTONS DO ANEL B

- Em 3', 4'-dioxiflavonóides



O próton do C-5' aparece como um dublete (d, J=8,5 Hz), na região de 6,7-7,1 ppm. O H-2' surge como um dublete (d, J=2,5 Hz) e o H-6' como um quarteto (q, J=2,5 e 8,5 Hz), sendo que ambos ocorrem na região de 7,2-7,9 ppm e, geralmente, estão sobrepostos. Pelos deslocamentos químicos dos H-2' e H-6', a metilação de OH-3' pode ser distingüida daquela do OH-4' (tabela 11).

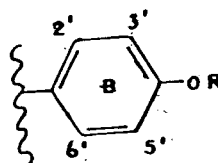
Em 3', 4'-dioxiisoflavonas, flavanonas e dihidro -

flavonóis os prótons em posição 2', 5' e 6' aparecem como um multiplete complexo, geralmente com dois picos, na região de 6,7-7,1 ppm⁴⁵.

Flavonóide	H-2' (ppm)	H-6' (ppm)
Flavonas (3',4'-OH e 3'-OH,4'-OMe)	7,2-7,3 d.	7,3-7,5 q.
Flavonóis (3',4'-OH e 3'-OH,4'-OMe)	7,5-7,7 d.	7,6-7,9 q.
Flavonóis (3'-OMe,4'-OH)	7,6-7,8 d.	7,4-7,6 q.
Flavonóis (3',4'-OH,3-O-glicosila)	7,2-7,5 d.	7,3-7,7 q.

TABELA 11 - Deslocamentos químicos de H-2' e H-6' em 3', 4'-dioxi flavonóides⁵².

- Em flavonóides 4'-oxigenados



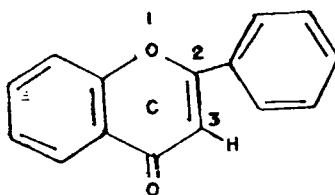
Os prótons de C-2', 3', 5' e 6', devido a livre rotação do anel B, aparecem como dois pares de dubletes (d, J=8,5 Hz) orto acoplados na região de 6,5-7,9 ppm. Os prótons de C-3' e 5' geralmente ocorrem em campos mais altos que H-2' e H-6' devido ao efeito de blindagem do oxigênio substituído e à influência de desblindagem das funções do anel C nos H-2' e 6'. A posição do H-2', 6' depende da oxigenação do anel C⁴⁵. (ver tabela 12).

TABELA 12 - Deslocamentos químicos de H-2', 3', 5' e 6' em flavonóides 4' oxigenados⁵².

Flavonóide	H-2',6' (ppm)	H-3',5' (ppm)
Flavanonas	7,1-7,3 d.	6,5-7,1 d.
Dihidroflavonóis	7,2-7,4 d.	6,5-7,1 d.
Isoflavonas	7,2-7,5 d.	6,5-7,1 d.
Chalconas (H-2,6 e H-3,5)	7,4-7,6 d.	6,5-7,1 d.
Auronas	7,6-7,8 d.	6,5-7,1 d.
Flavonas	7,7-7,9 d.	6,5-7,1 d.
Flavonóis	7,9-8,1 d.	6,5-7,1 d.

1.9.2.1.3 - PRÓTONS DO ANEL C

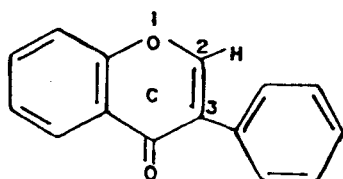
- Em flavonas



O H-3 aparece como um singlete, na região de 6,3 ppm. Este sinal pode ser confundido com os H-6 e H-8 em 5,6,7-, 5,7,8- ou 5,6,7,8-oxiflavonas, que ocorrem na mesma região de H-3⁴⁵.

Para diferenciá-los, se faz uma trimetilsilanização do OH-5, que provoca deslocamentos químicos diferentes nestes prótons. Assim, o H-3 muda para campos menores que H-8, e o H-6 não é afetado^{55,56}.

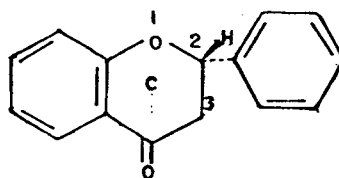
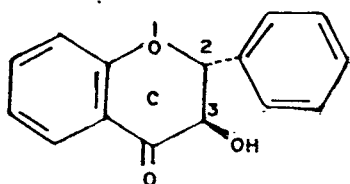
- Em isoflavonas



O próton em posição 2 aparece em campos mais baixos que a maioria dos prótons aromáticos, na região de 7,6-7,88 ppm, devido a sua posição β em relação ao grupo carbonila e por estar num carbono ligado a oxigênio⁴⁵.

Quando é utilizado DMSO- d_6 como solvente, ocorre migração do sinal para campos menores: 8,5-8,7 ppm, e com $CDCl_3$ aparece em 7,8-8,1 ppm⁵².

- Em flavanonas e Dihidroflavonóis



Em flavanonas, o H-2 aparece como um quarteto ($q, J_{trans} = 11$ Hz, $J_{cis} = 5$ Hz) na região 5,2 ppm. Os prótons em posição 3, originam quartetos em campos maiores, devido a interação spin-spin entre eles ($J = 17$ Hz) e com o H-2. Os quartetos aparecem na região de 2,8 ppm, sobrepostos, não sendo possível diferenciá-los⁴⁵.

Em dihidroflavonóis, os prótons do C-2 e C-3 são dispostos trans-diaxialmente entre si, e, portanto, aparecem como dubletes (d, J=11 Hz). O H-2 aparece em 4,9 ppm e o H-3 em campo mais alto, em 4,3 ppm. A glicosilação do 3-OH, causa uma mudança para campos menores que os de H-2 e H-3⁴⁵ (ver tabela 13).

Flavonóide	H-2 (ppm)	H-3 (ppm)
Flavanonas	5,0-5,5 q.	2,8 q.q.
Dihidroflavonóis	4,8-5,0 d.	4,1-4,3 d.
Dihidroflavonol (3-O-glicosilâ)	5,0-5,6 d.	4,3-4,6 d.

TABELA 13 - Deslocamentos químicos de prótons dos C-2 e C-3 em Flavanonas e dihidroflavonóis⁵².

1.9.2.2 - PRÓTONS DO AÇÚCAR

1.9.2.2.1 - FLAVONÓIDES MONOGLICOSADOS

O próton do açúcar, em posição 1 (H-1"), geralmente aparece em campos mais baixos que os demais prótons deste. O deslocamento químico exato do H-1" informa o local da glicosilação ou até mesmo a natureza do açúcar⁵². Ex: H-1" em flavonol-3-O-glicosídeos ocorre em 5,7-6,0 ppm, enquanto que em flavonóide 7,5- e 4'-O-glicosídeo e 6 e 8-C-glicosídeo aparece na região de 4,8-5,2 ppm.

É possível diferenciar flavonol-3-O-glucosídeos de 3-O-ramnosídeos, pelo H-1", que, neste último, aparece em 5,0-5,1

ppm. Esta mesma distinção não é possível com dihidroflavonol-3-O-glicosídeos, pois em ramosídeos e glucosídeos o H-1" aparece em 4,0-4,3 ppm⁵².

A constante de acoplamento do "H-1" com H-2" em glicosídeos β -ligados é de 7 Hz ao acoplamento diaxial e isto é bem observado em açúcares com rotação limitada em relação ao núcleo do flavonóide⁵². Em ramosídeos- α -ligados, o acoplamento diequatorial entre H-1" e H-2" fornece um aumento da constante de acoplamento de 2 Hz⁵⁵.

Diferente dos demais ramosídeos é o sinal de ramosose-C-metila, que aparece como dublete (J=6,5 Hz) ou multiplete, em 0,8-1,2 ppm⁵².

1.9.3 - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE FLAVONÓIDES (RMN¹³C)

A ressonância magnética nuclear do ¹³C, também se constitui num método de grande importância na elucidação de estruturas de flavonóides.

Por este método é possível se estabelecer o número de átomos de carbono da molécula, do flavonóide (n^oC oxigenados), do açúcar; a identificação de açúcares C- e O- ligados e de substituintes acila e sítios de acilação; a determinação dos pontos de ligação interglicosídica e de sítios de C- ligações. Segundo vários autores, a maior explicação de RMN de ¹³C para flavonóides é na determinação de açúcares, que de outra forma requeriria tecnologias mais demoradas e complicadas⁴⁶.

O espectro é realizado considerando-se como compos

to de referência o tetrametilsilano (TMS), cujo sinal aparece em 0 ppm e usando como solvente soluções de d_6 -DMSO, $(CD_3)_2CO$ ou piridina- d_5 .

Os sinais ocorrem entre 0-200 ppm, sendo que cada carbono diferente corresponde a um único sinal (ver tabela 14 e figura 7).

TABELA 14 - Deslocamentos químicos para tipos de carbono de flavonóides⁴⁶

Tipo de Carbono	Deslocamentos químicos habituais (Referência:TMS, sinais em ppm)
Carbonila (4-ceto, acila)	210-170
Aromático e olefínico:	
a-oxigenado	165-155 (sem oxigenação em o/p) 150-130 (com oxigenação em o/p)
b-não oxigenado	135-125 (sem oxigenação em o/p) 125-90 (com oxigenação em o/p)
Alifático:	
a-oxigenado (açúcares)	83-69 (C-1 de O-glicosídeo, ± 100 ppm)
b-não oxigenados (C-2 e 3 de flavanonas)	80-40 (epicatequina C-4, 28 ppm)
Metilenodioxí	100
Metoxila	55-63 (60-63=o-dissubstituído)
Metila de acetila	17-20
Isoprenila ($-CH_2CH=C(CH_3)_2$)	21 (CH_2), 122(CH), 131(C), 18(CH_3)

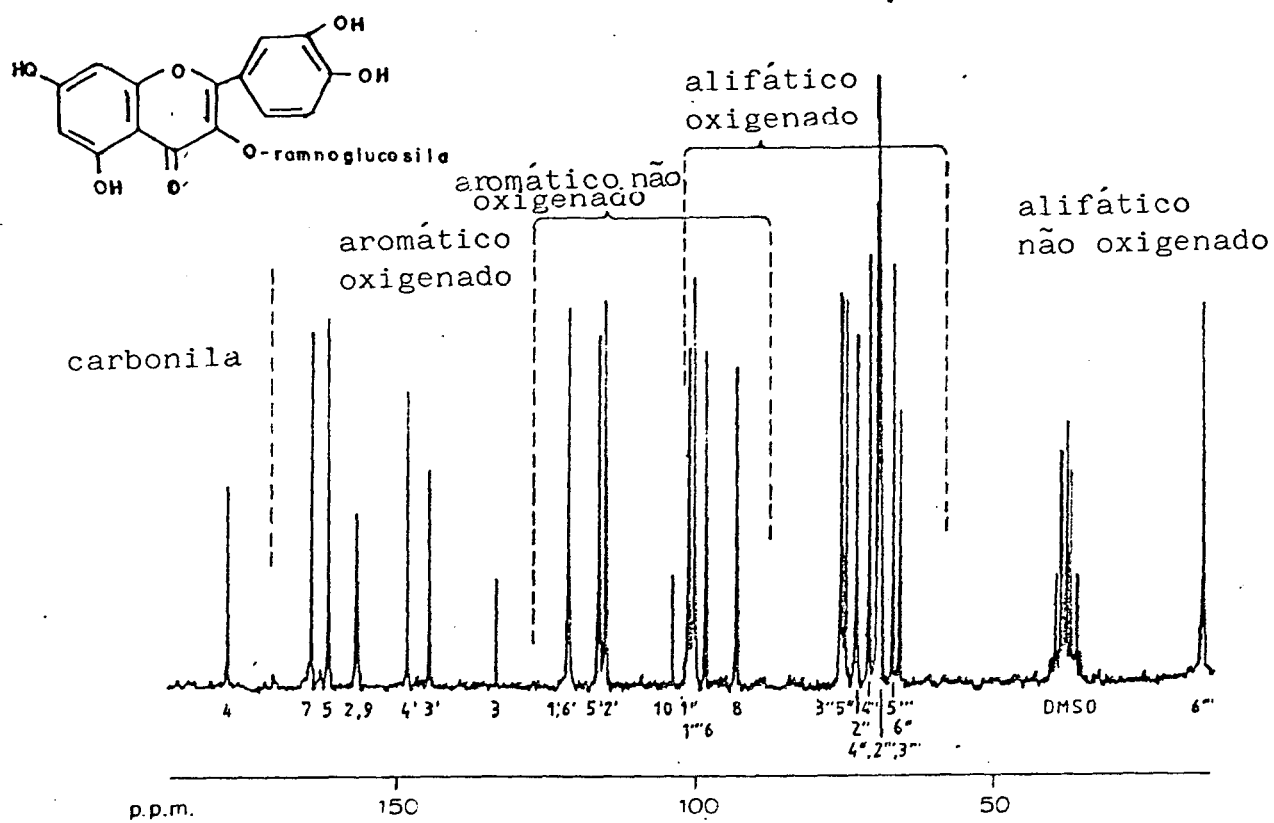


FIG. 7 - Espectro RMN ^{13}C da rutina⁴⁶.

1.9.3.1 - EFEITOS DE SUBSTITUINTES

Os deslocamentos químicos dos sinais são muito afetados pela introdução de substituintes, como pode ser verificado na tabela 14. Esses efeitos são previsíveis em suas estenções e tem conduzido a formulação do "efeito do substituinte", dado que define o efeito esperado (nas ressonâncias do C aromático) pela introdução de um novo substituinte no anel aromático^{62,63}.

Os deslocamentos químicos causados em flavonóides por efeito de novos substituintes no "C-1" (onde está ligado o substituinte) e nas posições orto, meta e para ao mesmo são dados (em ppm) na tabela 15.

Substituinte	C-1	orto	meta	para
Hidroxila	+26,9	-12,7	+ 1,4	- 7,3
Metoxila	+31,4	-14,4	+ 1,0	- 7,7
Metila	+8,9	+ 0,7	- 0,1	- 2,9
Acetoxila	+23,0	- 6,4	+ 1,6	- 2,3

TABELA 15 - Deslocamentos químicos devidos a efeito de substituinte no C-1 e posições o,m,p- de um flavonóide⁴⁶.

Utilizando-se estes dados de efeito de substituinte é possível calcular com relativa precisão o espectro de um flavonóide desconhecido, através de um similarmente substituído conhecido. Para isto é necessário executar-se várias comparações com espectros de referência, disponíveis na literatura⁶⁴⁻⁶⁷, e também verificar a tabela 16.

TABELA 16 - Espectro RMN¹³C de vários flavonóides agliconas^{a46}

Flavonóide	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	CH ₃
Flavonas																
Apigenina	163.8	102.8	181.8	161.9	98.8	164.1	94.0	157.3	103.7	121.3	128.4	116.0	161.5	116.0	128.4	
Luteolina	164.5 ^c	103.3	182.2	162.1	99.2	164.7 ^c	94.2	157.9	104.2	122.1	113.8	146.2	150.1	116.4	119.3	
Tricetina	164.2	103.2	181.6	161.6	99.0	164.2	93.9	157.5	104.0	120.9	106.0	146.5	137.9	146.5	106.0	
Flavonóis																
Kaempferol	146.8	135.6	175.9	160.7	98.2	163.9	93.5	156.2	103.1	121.7	129.5	115.4	159.2	115.4	129.5	
Quercetina	146.9	135.5	175.8	160.7	98.2	163.9	93.3	156.2	103.1	122.1	115.3 ^c	145.0	147.6	115.6 ^c	120.0	
Patuletina	147.1 ^c	135.5	176.1	151.8 ^c	130.9	157.2	93.7	151.4 ^c	103.5	122.1	115.2 ^e	145.1	147.8 ^d	115.7 ^e	120.1	60.3
Myricetin (3-O-galactose)	156.2	133.9	177.4	161.2	98.6	164.0	93.3	156.2	104.0	120.2	108.8	145.3	136.6	145.3	108.8	
Isoflavonas																
Formononetina	153.1	124.4	174.8	127.4	115.3	162.7	102.2	157.6	116.8	123.3	130.2	113.7	159.1	113.7	130.2	55.2
Genisteína	153.6	122.4	186.2	162.1	98.6	164.3	93.7	157.5 ^c	104.6	121.4	130.0	115.2	157.6 ^c	115.2	130.0	
Dihidroflavonas																
Aaringenina	78.2	42.0	195.6	163.3	95.8	166.4	94.9	162.7	101.9	128.9	127.6	115.1	157.4	115.1	127.6	
Eriodictiol	78.4	42.2	196.0	163.6	95.9	166.7	95.1	162.9	102.0	129.7	114.5 ^d	145.3 ^c	145.7 ^c	115.6 ^d	119.2	
Dihidroflavonol																
Dihidroquercetina	83.1	71.7	197.1	163.3	96.1	166.8	95.1	162.5	100.6	128.1	115.3	144.9 ^c	145.7 ^c	115.3	119.2	
Aurena																
Sulfuretina ^f	145.6	180.9	125.3	115.9	167.3	98.2	165.9	113.7	112.6 ^c	123.3	111.5 ^c	145.3	147.7	117.9	124.2	
Chalcona																
Isolicuiritigenina ^b	C-β	C-α	C-0	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-1'	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
	143.8	117.8	191.4	164.6 ^c	102.6	165.4 ^c	107.9	132.3	113.2	125.8	130.6	115.8	159.9	115.8	130.6	

a - solvente: DMSO-d₆, deslocamentos químicos dados em ppm, ref. TMS, para saber a numeração dos carbonos - ver p. 21).

b - sistemas com numeração diferente - ver tab. 2, p. 22).

c,d,e - valores podem variar em algum outro aspecto.

1.9.3.2 - IDENTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES

O espectro RMN ^{13}C é sem dúvida muito útil para de_{finição} de modos de oxigenação de flavonóides - ver tabela 14 e fi_{guras} 8 e 9 (cujos espectros apresentam diferentes modos de oxige_{nação} do anel B), que é muito importante na definição do açúca_{ren} volvido e seus substituintes. Isso é válido principalmente para flavonóides C-glicosídeos, cujos açúcares são de difícil identi_{fi} cação por qualquer outro método⁴⁶.

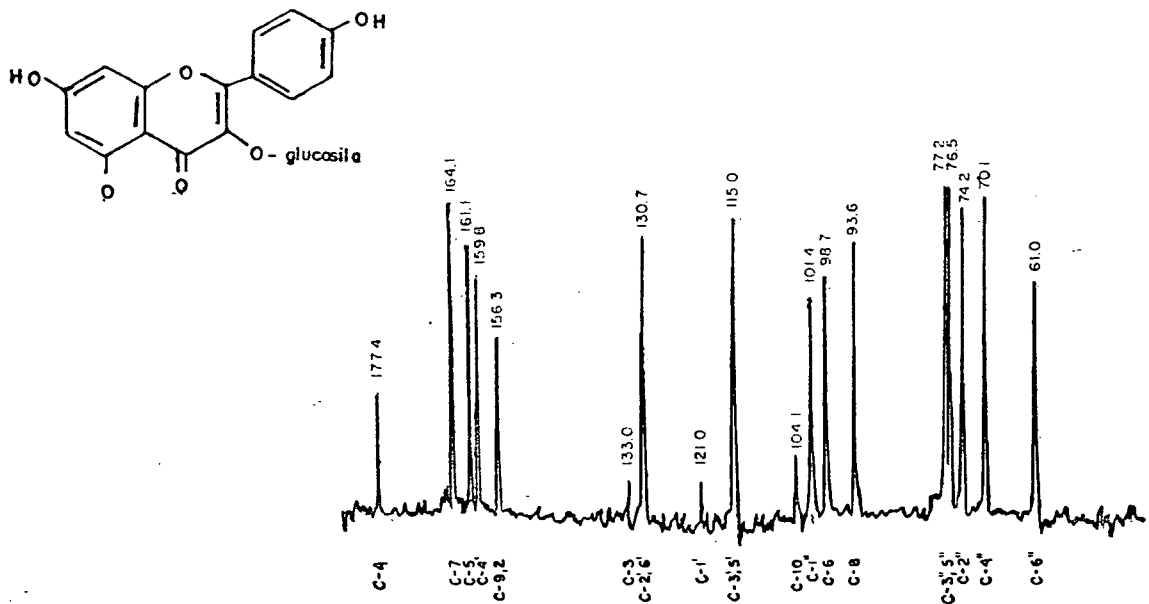


Fig. 8 - Espectro RMN ^{13}C de Kaempferol 3-O-glucosídeo em DMSO- d_6 (95°C)⁴⁶

- 1 - sinal do carbono carbonílico aparece em campo mais baixo (177, 4 ppm)
- 2 - sinais dos carbonos aromáticos oxigenados são agrupados em 156-164 ppm, com C-3 a 133 ppm.
- 3 - sinais dos carbonos aromáticos não oxigenados aparecem em 93-131 ppm.
- 4 - sinais dos carbonos do açúcar em 61-77 ppm com C-1, em campo mais baixo, em 101, 4 ppm.

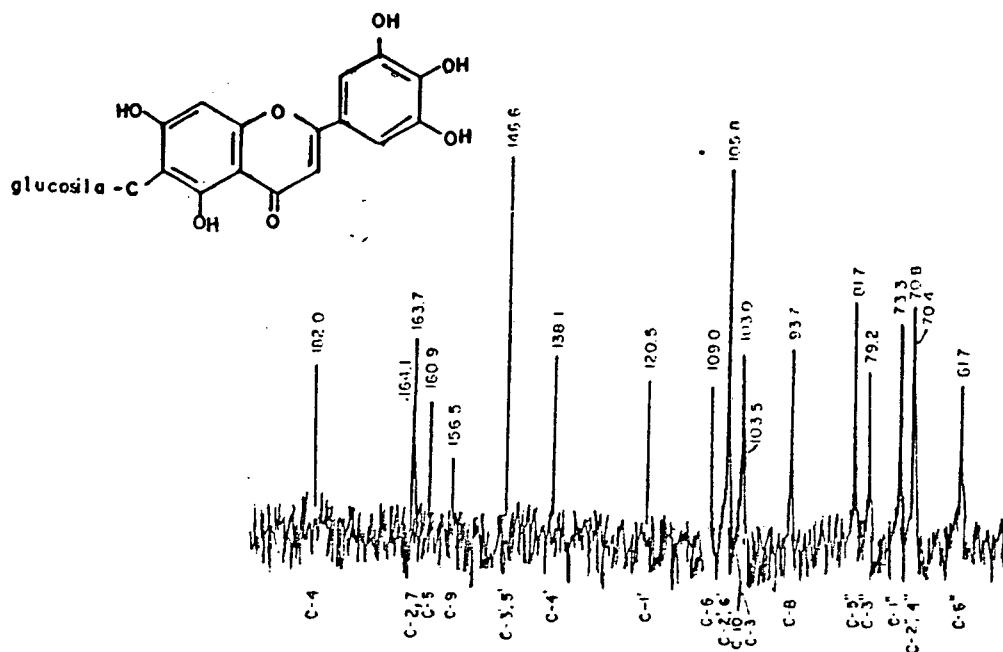


FIG. 9 - Espectro RMN ^{13}C de tricetina 6-C-glucopiranosídeo (Isoaifinetina) em DMSO-d_6 (30°C) ⁴⁶.

- 1 - A presença de um substituinte C-ligado ao C-6 é evidente pelo deslocamento do sinal do C-6 para 109 ppm (da posição normal de 98 ppm em 5,7-dihidroxi flavonóides - ver fig. 8)
- 2 - Os padrões dos sinais dos carbonos do açúcar identificam o açúcar como glicose - ver tabela 17.
- 3 - Em contraste a um glicosídeo O-ligado, os sinais de todos os seis carbonos do açúcar aparecem na região de 60-82 ppm.

Todos açúcares normalmente encontrados, sejam eles O ou C ligados fornecem diferentes padrões de sinais no espectro RMN¹³C - ver tabela 17⁶⁸. Substituintes adicionais nestes açúcares são rapidamente identificados por espectro RMN¹³C, bem como são os pontos de ligação (pelos deslocamentos dos sinais).

Em termos gerais, os deslocamentos induzidos pela substituição do açúcar em flavonóides são os seguintes^{66,69}:

- 1 - O-glicosilação de uma hidroxila do flavonóide produz um deslocamento de 2 ppm, para campos maiores, no sinal do carbono adjacente do flavonóide e um deslocamento de 1-4 ppm, para campos menores, nos sinais dos carbonos orto e especialmente para-relacionados a este.
- 2 - C-glicosilação de um flavonóide aglicona causa um deslocamento de 10 ppm, para campos menores, do sinal do carbono glicosilado, sem contudo, afetar significativamente, os outros sinais.
- 3 - Glicosilação de um açúcar pela glucose causa um deslocamento de 8 ppm, para campos menores, no sinal do carbono glicosilado, acompanhado por um deslocamento de 1-3 ppm, para campos maiores, nos sinais dos carbonos adjacentes. A glicosilação por ramnose, causa deslocamentos menores, 3-6 ppm para campos menores e 1-2 ppm para campos maiores, respectivamente.
- 4 - Acilação (acetatos, benzoatos, etc.) de um açúcar geralmente produz um deslocamento de cerca de 2 ppm, para campos menores, no sinal do carbono acetilado, acompanhado de um deslocamento de 1-3 ppm, para campos maiores, dos sinais dos carbonos adjacentes.

TABELA 17 - Ressonâncias dos Carbonos de açúcares, em espectro RMN ^{13}C , de alguns flavonóides C- e O-glicosídeos⁶⁸.

Tipo de Glicosídeo ^{a,b}	C-1"	C-2"	C-3"	C-4"	C-5"	C-6"
O-glucosídeo(7-ligado)	100,2	73,3	76,6	69,8	77,4	60,9
C-glucosídeo(8-ligado)	73,9	71,4	78,8	70,8	81,4	61,5
O-galactosídeo(3-ligado)	102,3	71,3	73,4	68,0	75,8	60,8
C-galactosídeo(8-ligado)	73,9	68,5	75,4	69,1	80,5	61,3
O- α -ramnosídeo(3-ligado)	101,9	70,4	70,6	71,5	70,1	17,3
C- α -ramnosídeo(8-ligado)	77,3	75,0	75,5	72,2	72,2	18,1
O-xilosídeo(2"-O-ligado)	102,4	73,7	75,9	69,4	65,5	
C-xilosídeo(6-ligado)	74,6	70,3	78,5	70,0	70,0	
O- α -arabinosídeo(3-ligado)	101,8	71,7	70,8	65,9	64,1	
O- α -arabinofuranosídeo (3-ligado)	108,1	82,1	77,2	86,2	61,0	
C- α -arabinosídeo(8-ligado)	74,4	68,2	74,5	68,9	71,0	
O-glucuronídeo(3-ligado)	101,1	73,7	75,9	71,3	75,9	169,7
O-allosídeo(3-ligado)	99,9	71,6	71,6	67,2	75,1	61,3
O-apiosídeo(2"-O-ligado)	109,0	76,5	79,1	74,0	64,4	

a - piranosídeos (β -ligados, solvente d_6 -DMSO).

b - o sítio de ligação pode afetar a ressonância do C-1 de O-glicosídeos (normalmente ± 2 ppm), e outras ressonâncias em C-glicosídeos (normalmente $\pm 0,5$ ppm).

1.10 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FLAVONÓIDES

Numerosas investigações indicam claramente que sob condições experimentais particulares certos flavonóides, dependendo de suas estruturas, apresentam atividades antiinflamatória, antialérgica, antiviral e outras. Por outro lado, existem evidências experimentais indicando que alguns flavonóides, possuem atividade mutagênica e carcinogênica⁷⁰. Porém esta potência mutagênica, demonstrada pelo teste de Ames⁷¹, é menos acentuada do que a encontrada em substâncias similares. O efeito mutagênico pode ser consequência entre a semelhança dos nucleosídeos (composto formado de uma base nitrogenada ligada a um açúcar, encontrados nos ácidos nucléicos-DNA e RNA) e flavonóides, que podem levar a inserção do sistema benzopirano dos últimos, entre as bases dos nucleosídeos. Isto parece possibilitar que o teste de Ames seja incapaz para distingüir entre repressão de gens normalmente inativos e verdadeiras mutagêneseis, uma vez que a observação que induziu o resultado positivo era somente o aparecimento de novas características que podem ter muitas outras consequências do que oncogenesis em animais. De fato, não existem relatos de ações tóxicas com o uso de flavonóides em doses moderadas (menos de 1 g/dia/paciente adulto).

Como vimos há muito o que esclarecer sobre a atividade biológica de flavonóides. Também são muitas as dúvidas sobre a absorção, distribuição, metabolização e excreção dos flavonóides. Enquanto que muitos experimentos "in vitro" são descritos para esses compostos, estudos "in vivo" de efeitos de flavonóides são menos frequentes. A quercitina, um composto frequentemente ativo em muitos sistemas "in vitro", é pobremente absorvida no homem, não se conhecendo também dados importantes sobre sua farmacocinética⁷⁰.

Enfim, são numerosos os estudos comprovando as ações biológicas de flavonóides naturais, especialmente envolvendo sistemas imunológicos, inflamatórios, alérgicos, entre outros, que serão comentados a seguir.

1.10.1 - ATIVIDADE ANTIVIRAL

Biflavonóides, compostos flavonóides e derivados destes têm provado ser antiviróticos eficazes em condições "in vitro" e "in vivo". Os flavonóides são ingredientes de produtos farmacêuticos antigripais e estruturas análogas de flavonóides têm mostrado um efeito favorável no curso de hepatite viral aguda-humana. O mecanismo da atividade antiviral destes agentes não está ainda bem esclarecido⁷².

Os flavonóides como a quercitina, morina, rutina, quercitrina foram examinados em suas atividades em ratos infectados por diferentes tipos de vírus. Assim foi observado que a quercitina e morina, por via oral, protejeram ratos contra diversas infecções virais, enquanto que a rutina e quercitrina eram ineficazes. A quercitina, não só apresentou-se eficaz para o tratamento da infecção por vírus "mengo", como também, mostrou-se eficiente em infecções induzidas por vírus EMC, col.SK e MM em animais de experimentação. Em contraste, ratos infectados por vírus sindbis e herpes simplex tipo 1, não foram protegidos por tratamento com quercitina, sugerindo uma atividade antiviral seletiva para infecções por cardiovírus. A toxicidade apresentada pela quercitina é baixa em ratos adultos (doses orais simples de mais de 10 g/kg de peso são bem toleradas). Muito embora tenha sido observado efeito negativo em ratos, a quercitina e outros flavonóides naturais demonstraram um efeito antiviral contra herpes em culturas de células⁷³. A quercitina também apresenta uma ação an

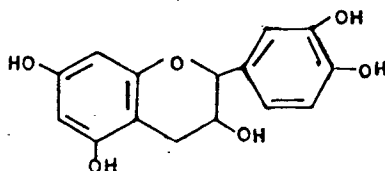
ti-infectiva e anti-replicativa "in vitro" contra vírus respiratório sincicial, parainfluenza tipo 3, herpes simplex tipo 1 e antipólio tipo 1. A hesperitina não possui atividade antinfetiva, mas apresenta efeitos anti-replicantes contra cada vírus. Já a catequina mostrou propriedades antinfetivas contra vírus sincicial respiratório e herpes simplex tipo 1 e ausência de atividade anti-replicativa, enquanto a naringenina não apresentou atividades antinfetivas nem anti-replicativas. Outros flavonóides sintéticos, como a dicloroflavona, possuem poderosa atividade anti-rinovírus, embora esta ação não tenha sido ainda comprovada "in vivo", no homem.⁷⁰

Recentemente, um flavonóide isolado de uma planta medicinal chinesa, identificado como 4',5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona, também exibiu uma acentuada atividade inibitória "in vitro" contra rinovírus e vírus coxsackie em cultura de tecido. Este composto inibiu a replicação intracelular viral, possivelmente por interferir com a iniciação da síntese de RNA viral.⁷⁰

Estudos realizados "in vitro" com os flavonóides quercitina, rutina e hesperidina, demonstram que o primeiro apresentou uma atividade inibitória à citotoxicidade das células humanas NK (Natural Killer). Estas células são um tipo de linfócitos, que podem espontaneamente lisar uma variedade de células normais e malignas. Estes estudos têm despertado grande interesse em função de suas possíveis funções em mamíferos na defesa contra transformações neoplásicas espontâneas e infecções virais.⁷⁴

O flavonóide cianidanol-3 (33) tem sido amplamente usado no tratamento de hepatite viral aguda humana e é conhecido por apresentar atividades hepato-protetoras em vários tipos de experimentos. Este composto tem efeitos sobre a diminuição de ní

veis de excreção biliar e normalizar o nível de bilirrubinas no plasma, sendo observados em hepatites induzidas por galactosamina. Este flavonóide além de sua potencialidade em hepatite, poderia reduzir o efeito tóxico de certas drogas contra-indicadas em enfermidades hepáticas humanas⁷⁵.

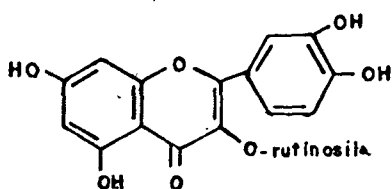


(33) Cianidanol-3

1.10.2 - ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA

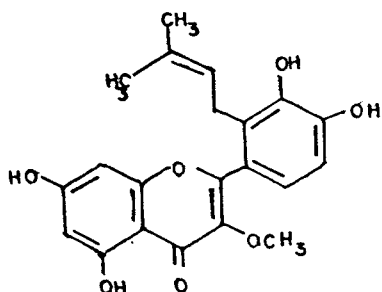
A inflamação é um processo inespecífico, mediado por diversas substâncias endógenas, entre elas as prostaglandinas (derivadas do ácido araquidônico), que pela atração de leucócitos para o local da inflamação, produz dor, aumento de permeabilidade vascular e da temperatura corporal. A inibição da síntese de prostaglandinas conduz ao alívio da dor local e efeito antipirético. Esta ação inibitória pode ser obtida por vários flavonóides⁷¹.

O flavonóide β -hidroxietil rutina (34) é amplamente usado (nome comercial: Venoruton) para tratamento de cataratas, varizes e outros problemas de fragilidade capilar, envolvidos em processos inflamatórios. Quando aplicado como um gel em veias varicosas, a β -hidroxietil rutina pode reduzir a dor.

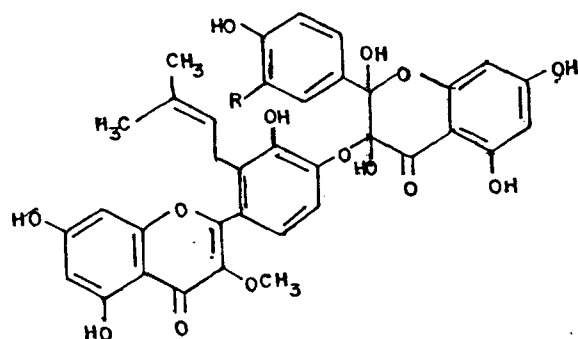
(34) β -hidroxietyl rutina

Biflavonóides e compostos naturais relacionados , entre eles, "silimarina", isolado do fruto da espécie *Silybum marianum*, é conhecido há muito tempo por mostrar uma atividade antiinflamatória, especialmente em hepatite de várias origens⁷⁶.

Em culturas de células da espécie *Podophyllum verisipelle* (Berberidaceae), foi demonstrado "in vitro" uma atividade antiinflamatória pelos flavonóides isolados desta denominados de podoverines A, B, C (35,36,37). Podoverine A e B inibiram neste sistema ("in vitro") com atividade superior à apresentada pela quercitina ($IC_{50}=1,1 \times 10^{-5}$ mol/l). Os dois primeiros tiveram as seguintes atividades inibitórias: Podoverine A: $IC_{50}=4,7 \times 10^{-6}$ e B: $IC_{50}=6,4 \times 10^{-6}$ mol/l⁷⁷.



Podoverine A (35)



(36) R=OH, podoverine B

(37) R=H, podoverine C

O flavonol glicosídeo, Hypolaetin-8-O-glucosídeo, isolado da espécie espanhola, *Sideritis mugronensis* Borja (Labiatae), apresentou atividade antiinflamatória crônica em abscessos induzidos por carragenina ($ED_{50}=59,69$ mg/kg), comparável a atividade de fenilbutazona ($ED_{50}=51,61$ mg/kg) e ação protetora contra úlcera gástrica induzida pelo frio ($ED_{50}=57,32$ mg/kg), em comparação com a ação da cimetidina ($ED_{50}=23,88$ mg/kg)⁷⁸.

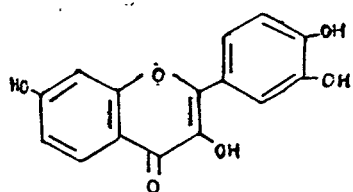
1.10.3 - ATIVIDADE ANTI-HISTAMÍNICA

A liberação de histamina e outros mediadores químicos pelos mastócitos e basófilos está diretamente envolvida nos fenômenos alérgicos agudos como na anafilaxia, asma brônquica e nas respostas inflamatórias. Os mastócitos estão amplamente distribuídos por todo o corpo humano. Enquanto que os basófilos são células sanguíneas brancas (leucócitos) granulócitos, estando envolvidos na defesa contra penetração de microrganismos nas células⁷⁹.

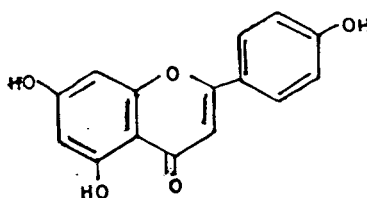
Estudos têm demonstrado que a quercitina e outros flavonóides possuem uma potente atividade inibitória sobre a liberação da histamina "in vitro", em mastócitos de rato e em basófilos humanos. A quercitina, um flavonóide natural, quimicamente relacionado com o cromoglicolato de sódio, por possuírem em comum o núcleo benzopirano, sendo que a segunda é uma droga de grande valor no tratamento da asma brônquica e um efetivo inibidor da liberação de histamina por basófilos de pacientes alérgicos. O efeito inibitório da quercitina "in vitro" é detectável em concentrações entre 5,0 e 50 μ M e é concentração-dependente, mais efetivo a baixos níveis de liberação de histamina e reversível em células não antigênicas ativadas. Também foi avaliada a ação de

outros flavonóides de diferentes classes químicas, na liberação de histamina por basófilos humanos. Nestes estudos foram demonstradas interessantes relações estrutura-atividade. O relato envolvendo 11 flavonóides de cinco classes diferentes, avaliando a liberação histamínica em basófilos humanos e estimulados por seis diferentes secretores é apresentado. Os flavonóis (3-hidroxi: quercitina (43) e fisetina (38) e a flavona apigenina (39), inibem mais ativamente essa ação.

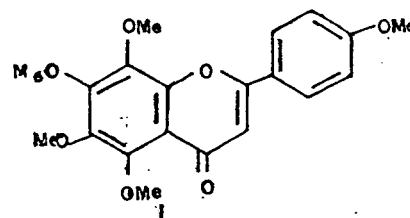
Das flavonas apigenina (39) e tangeritina (40), a primeira foi muito ativa contra todos os estímulos empregados.



(38) Fisetina



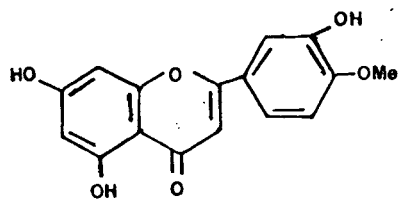
(39) Apigenina



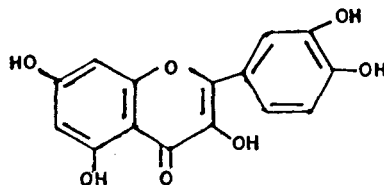
(40) Tangeretina

Já a flavanona, hesperitina (41) e o dihidroflavonol, taxifolina (42) (dihidroquercitina) mostraram pouca ou nenhuma atividade inibitória contra qualquer dos agentes secretores. Assim, comparando-se a atividade diferenciada apresentada por um flavonol, como a quercitina (43) e um dihidroxiflavonol (taxifolina) (42), sugere-se que a saturação da ligação C_2-C_3 conduzindo decréscimo da planaridade do anel heterocíclico, está associada com a falta de atividade inibitória. Também os glicosídeos, rutina (um 3-O-glicosídeo) e naringerina (um 7-O-glicosídeo) (44 e 45) são inativos, possivelmente por causa de uma inabilidade em atravessar a membrana das células ou porque os grupos glicosídicos impessam estericamente uma porção da molécula necessária para a atividade inibitória. Enquanto que os flavonóides análogos

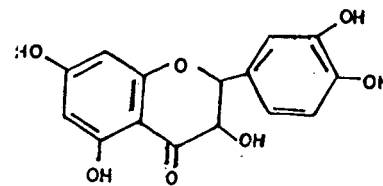
de cadeia fechada, chalcona (46) e florentina (47), são bons inibidores⁷⁰.



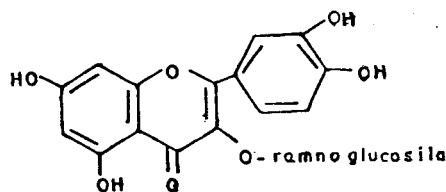
(41) hesperitina



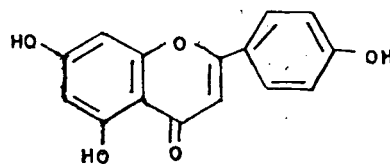
(42) taxifolina



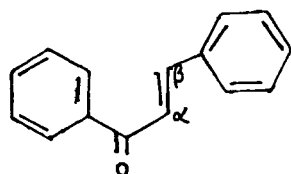
(43) quercitina



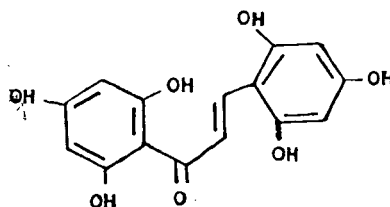
(44) rutina



(45) naringenina



(46) chalcona

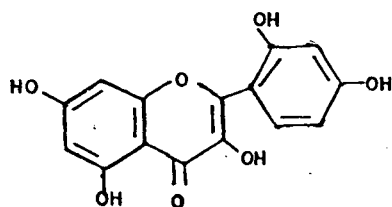


(47) florentina

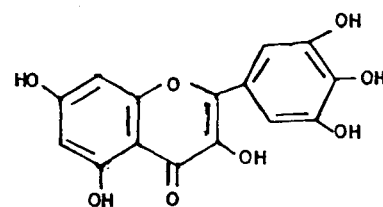
Uma atividade inibitória da liberação de histamina por basófilos humanos, entre 5,0 e 50 uM foi observada para os flavonóides quercitina, apigenina, fisetina e florentina e uma atividade menos expressiva para os seguintes: tangeritina e chalcona⁷⁰.

A atividade anti-histamínica de outros flavonóides em basófilos de pacientes com febre do feno, foi comparada em relação a quercitina (o mais potente inibidor) e apresentada a seguir, baseando-se em avaliações estrutura atividade. O flavonóide morina (48), que difere da quercitina somente nas posições

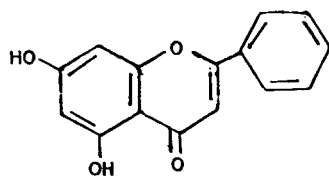
das hidroxilas do anel B (2', 4' versus 3', 4' respectivamente), foi totalmente destituído de atividade. Por outro lado, a mirecitina (49), que possui um grupo OH ligado ao anel B em posição 5', comparada a quercitina foi fracamente menos ativa que esta. A apigenina (39), já citada anteriormente, difere da quercitina pela ausência de 3 e 3'-OH, apresentou atividade inibitória significativa. Já os flavonóides que não apresentam o grupo OH no anel B (crisina e galangina -50 e 51) foram essencialmente inativos. Por tudo isso, conclui-se que os derivados da flavona (mas não flavanonas) com grupo OH em 4' ou 3',4' e com grupo C-4-ceto-5 - OH) acoplado foram os mais ativos, neste modelo experimental e a atividade foi aumentada na presença adicional de grupos C-3-OH. Este modo de hidroxilação permite a formação de quelatos, relacionada com a atividade inibitória da quercitina e outros flavonóides⁸¹.



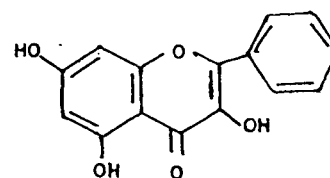
(48) morina



(49) mirecitina



(50) crisina

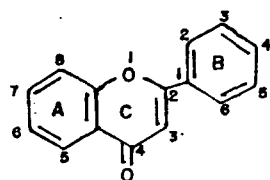


(51) galanina

Outro trabalho onde foram analisadas relações estrutura atividade, foi realizado com flavonóides de gênero *Citrus*⁸². Vários flavonóides deste gênero mostraram-se muito ativos na inibição da liberação de histamina (por basófilos humanos) e da enzima betaglucuronidase (por neutrófilos humanos) estimulados pelos secretores: antígeno, TPA, inóforo A23187 e f-MetLeuPhe, respectivamente.

Nesta condição os dados apresentados neste trabalho sugerem que certos flavonóides do citado gênero, possuam "in vivo" atividade antialérgica e antiinflamatória. Os flavonóides inibidores de ambos efeitos são: apigenina (39), luteolina, eriodictiol, diosmetina e isorhamnetina. Outros só apresentam a inibição da liberação de histamina, como: tetrametoxiflavona, 5,6,7,4' (TETRA), heptametoxiflavona 3,5,6,7,8,3',4' (HEPTA), tangeretina (40), sinensetina, nobiletina. Já as flavonas, eriodictiol e hesperitina (41), contendo ligação C₂-C₃ no anel C foram inativos, bem como o flavonóide glicosídeo, rutina, em ambas as atividades. Como já mencionado anteriormente, a atividade anti-histamínica de flavonas e flavonóis é determinada pelo tipo de substituintes no anel B em 4' ou 3',4'. Compostos com OH em 4' ou 3',4' em ambos efeitos foram ativos, como luteolina, eriodictiol, diosmetina. Também ficou provado que a atividade dos flavonóides *Citrus* é também influenciada por substituintes no anel A. Pois os compostos com OH, ao invés de grupos metoxila, no anel A apresentaram ambos efeitos, enquanto que aqueles que eram polimetoxilados em A, só antagonizavam a liberação histamínica (ver tabela 18).

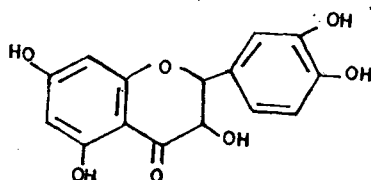
TABELA 18 - Valores de IC₅₀ de flavonóides citrus para a inibição de liberação de histamina de basófilos estimulados por antígeno, TPA, A23187, e de liberação de beta-glucuronidase por neutrófilos estimulados por f-Met-Leupe⁸².



Composto	Flavonóide											IC ₅₀ Liberação (β glucuron. p/ neutrófilos)					
	Posição do substituinte Anel A				Anel B				Anel C			IC ₅₀ Lib. Hist.		Antígeno	TPA	Ionophoro	f-Meti euPhe
	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	3	C2-C3	Antígeno	TPA				
Flavonas																	
Apigenina	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-	-	i ^a	13	11	37	23		
Luteolina	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-	-	i	<5 ^b	19	19	10		
Acacetina	OH	-	OH	-	-	OMe	-	-	-	-	i	-	-	-	-		
Chrisoeriol	OH	-	OH	-	-	OMe	OH	-	-	-	i	<5	13	<5	5		
Diosmetina	OH	-	OH	-	-	OH	OMe	-	-	-	i	15	11	5	27		
TETRA ^C	OMe	OMe	OMe	-	-	OMe	-	-	-	-	i	-	-	43	-		
Tangeritina	OMe	OMe	OMe	OMe	-	OMe	-	-	-	-	i	-	29	50	-		
Sinensetina	OMe	OMe	OMe	-	-	OMe	OMe	-	-	-	i	44	26	-	-		
Nobiletina	OMe	OMe	OMe	OMe	-	OMe	OMe	-	-	-	i	-	20	30	-		
Flavonóides																	
Kaempferol	OH	-	OH	-	-	OH	-	-	OH	i	-	-	-	14	-		
Isorhamnetina	OH	-	OH	-	-	OMe	OH	-	OH	i	<5	21	7	11			
HEPTA	OMe	OMe	OMe	OMe	-	OMe	OMe	-	OMe	i	25	42	-	-			
Flavanonas																	
Eriodictiol	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-	-	s	-	-	-	-		
Hesperetina	OH	-	OH	-	-	OH	OMe	-	-	-	s	-	-	-	-		
Dihidrochalconas glicosídeos																	
Neohesperidina														a.	i= isaturado		
Dihidrochalconas															s= saturado		

A quercitina (43) e outros flavonóides também foram efetivos inibidores de liberação de histamina, induzida por vários secretores, por mastócitos de ratos. A quercitina, inibiu a liberação de histamina em mastócitos da mucosa intestinal de ratos previamente infectados com o nematode: *Nippostrongylus brasiliensis*. Em contraste, a droga cromoglicato de sódio, química

mente semelhante a quercitina foi inativa neste sistema, enquanto que o efeito da quercitina foi imediato. Os flavonóides acacentina (Tabela 17), apigenina, crisina (50) e florentina (47) também demonstraram atividade significativa, mas menos potente que a quercitina. Já os flavonóides catequina (52), flavona (38), morina (48) e taxifolina (42) foram inativos. Estes resultados assemelham-se àqueles previamente relatados em basófilos humanos. Em contraste, todos os compostos, exceto taxifolina, demonstraram atividade significativa contra mastócitos peritoneais. Acacentina e crisina foram os inibidores mais efetivos, sendo mais ativos do que quercitina. Rutina (44) e florenzina (gliconas da quercitina e de florentina) foram inativos em ambos os sistemas⁷⁹.

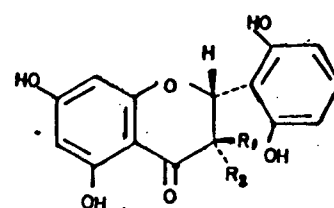
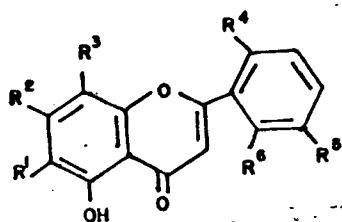


(52) catequina

A quercitina, além de ser semelhante estruturalmente ao cromoglicato de sódio (CNa), como foi visto, também se assemelha ao ácido nordihidroguaiurético (NDGA), que é um inibidor da substância de anafilaxia de reação lenta (SRS-A), que é um importante mediador na indução de broncoespasmos de asma alérgica humana. Estudos relatados confirmam que a quercitina e CNa inibem a liberação de histamina induzida por antígeno em células peritoneais de rato sensibilizadas. A droga NDGA não apresentou esta propriedade. Também foi descoberto que a quercitina inibe a biossíntese de SRS-A em fragmentos sensivelmente ativos de pulmão de cobaia. Em resumo, a quercitina além de ser um potente inibidor da liberação de histamina, também apresenta o mesmo efei

to em SRS-A "in vitro". Isto, portanto, contribui para o seu estudo como droga que possa ser terapêuticamente útil no tratamento de asma brônquica⁸³.

Os efeitos anti-histamínicos também foram observados em outros flavonóides. Estes foram isolados da espécie Scutellaria baicalensis, muito usada na medicina chinesa para o tratamento de doenças inflamatórias e alérgicas, aterosclerose, etc. Foi demonstrado que os flavonóides: wogonina (53), wogonina-7-O-D-glucurínídeo (54), baicaleína (55), skullcapflavona II (56), (2-S)-2',5',6',7'-tetrahidroxiflavanona (57), (2-R,3R)-2',3,5,6',7-pentahidroxiflavanona (58) e 2',5,5',7-tetrahidroxi-6',8-dimetoxiflavona (59), inibiram a liberação de histamina em mastócitos de rato induzida pelo composto conhecido por 48/50 (um polímero sintético). Foi descoberto que a atividade inibitória dos três últimos compostos e de skullcapflavona II era superior a da baicaleína, uma droga com ações antialérgicas reconhecidas por Koda e colaboradores⁸⁴. Estas evidências reforçam a hipótese de que os flavonóides podem ser clinicamente úteis como drogas antialérgicas⁸⁴.



- (53) wogonina: $R^1=R^4=R^5=R^6=H$,
 $R^2=OH$, $R^3=OCH_3$
- (54) wogonina-7-O-D-glucoronideo:
 $R^1=R^4=R^5=R^6=H$, $R^2=O-D\text{-ácido}$
 glucurônico, $R^3=OCH_3$
- (55) baicaleina: $R^1=R^2=OH$, $R^3=R^4=$
 $R^5=R^6=OH$
- (56) skullcapflavona II: $R^1=R^2=R^3=R^4=$
 OCH_3 , $R^5=H$, $R^6=OH$
- (57) (2S)-2',5,6',7-tetrahi-
 droxiflavanona: $R^1=R^2=H$
- (58) (2R,3R)-2',3,5,6',7-pen-
 tahidroflavanona: $R^1=$
 OH , $R^2=H$
- (59) 2',5,5',7-tetrahidroxi-6',8-
 dimetoxiflavona: $R^1=H$, $R^2=R^4=R^5=$
 OH , $R^3=R^6=OCH_3$

1.10.4 - ATIVIDADE SOBRE A ANTIAGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A inibição de agregação plaquetária é de grande valor terapêutico na prevenção de trombooses e ateroscleroses. Os flavonóides têm demonstrado serem efetivos inibidores "in vivo" e "in vitro" de agregação plaquetária em várias espécies animais⁸⁵. Assim, foi demonstrado que os flavonóides protegeram "in vivo" o endotélio das paredes dos vasos, diminuindo a adesão de plaquetas em filtros de lã de vidro e em superfícies cobertas de colágeno. Estes resultados mostraram que os melhores inibidores da agregação eram compostos com baixa polaridade (grupo CH_3 , maior atividade de flavonas em relação a moléculas hidroxiladas). Outro relato mostra que os flavonóides O-(β -hidroxietil) rutinosídeos, inibiram a agregação plaquetária humana em ratos em plasma citrata -

do rico em plaquetas, induzida pela adrenalina ou ADP (adenosina difosfato). Outros flavonóides também inibem a agregação plaquetária humana, bovina ou em coelhos. Quercitina e outros flavonóides inibiram a secreção de serotonina (substância que causa a agregação plaquetária) da plaqueta induzida por colágeno, trombina ou tanino. Os melhores inibidores são ativos na faixa $10\mu\text{M}$ ⁸⁵. A quercitina e rutina também foram agentes antiagregantes muito potentes "in vivo".

É sugerido que a inibição da agregação "in vivo" pode ser o resultado da inibição das vias das ciclooxigenases ou lipoxigenases⁸⁶. O flavonóide isolado da planta *Arnica Montana* L. (Asteraceae) também apresentou esta atividade antiagregante. A flavona isolada, denominada de hispidulina (4',5,7-trihidroxi-6-metoxi-flavona) inibiu a agregação plaquetária induzida por adenosina-5'-monofosfato, ácido araquidônico, PAF-aceter e colágeno. A potência desta flavona foi comparada com teofilina, inibidor muito conhecido⁸⁷. Por outro lado, More e colaboradores⁸⁵, não encontraram nenhuma ação anti-agregante nos flavonóides rutina, quercitina e naringenina, induzida por ADP, em plasma humano rico em plaquetas. Quando as plaquetas foram lavadas em solução com baixa concentração de albumina, então a quercitina apresentou atividade inibitória. Estudos de correlação estrutura-atividade na inibição sobre estas agregações plaquetárias em plaquetas humanas lavadas, permitem concluir-se que para que um flavonóide possa apresentar esta atividade deve ter:

- 1 - a presença de ligação dupla C_2-C_3 é essencial;
- 2 - glicosídeos são muito menos ativos do que as agliconas correspondentes;
- 3 - um alto número de grupos hidroxila pode diminuir a atividade.

Outros compostos relacionados a flavonóides que

podem inibir agregação plaquetária são chalconas, flavanonas substituídas, pterocarpanos ou benzopirranonas substituídas. Os biflavonóides, amentoflavonas, também apresentam esta atividade inibitória, tanto em sua forma normal como acetilada (amentoflavona hexaacetilada).

Os flavonóides podem, portanto, constituir em uma importante classe de compostos antiplaquetários, de valor terapêutico. Porém, alguns obstáculos ou dificuldades permanecem:

- 1 - eles são fracamente ativos "in vitro";
- 2 - doses muito altas podem ser necessárias para a obtenção de um efeito inibitório.

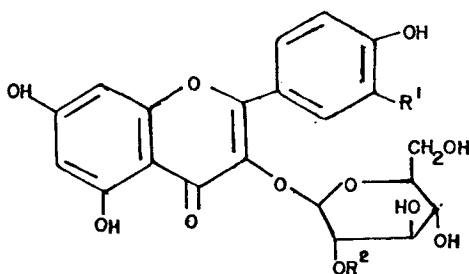
Entre as vantagens da atividade antiplaquetárias dos flavonóides estão as propriedades bioquímicas, como a inibição da via de cicloxigenases, impedindo a formação do tromboxano A_2 , baixa toxicidade e ampla variedade de estruturas químicas disponíveis.

1.10.5 - ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

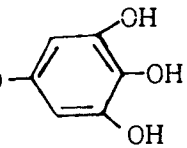
É bem conhecido o processo em que a enzima renina é liberada na corrente sanguínea, age com a α_2 globulina chamada de angiotensinogênio para produzir o decapeptídeo angiotensina I. Essa substância tem atividade farmacológica limitada, mas é ativada por uma "enzima conversora de angiotensina" (ECA) para produzir o octapeptídeo altamente ativo, a angiotensina II.

A angiotensina II é bem conhecida por ter uma atividade hipertensiva^{49,88}. A avaliação da inibição da ECA "in vitro" é extremamente importante para o desenvolvimento de drogas

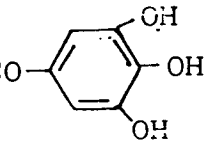
hipotensoras. Algumas drogas usadas no tratamento da hipertensão, por exemplo, o captopril e o nonapeptídeo (SQ 20,881), são efetivos inibidores "in vitro" da atividade da ECA. Este mesmo efeitos, porém com estruturas bem diferentes destes inibidores, é apresentado por quatro flavonóides isolados da espécie **Diospyros Kaki**⁸⁸. Os flavonóides são: astragalina (60), kaempferol-3-O-(2"-O-galloil)-glucosídeo (61), isoquercitrina (62) e quercitina-3-O-(2"-O-galloil)-glucosídeo (63), que inibem a atividade da ECA de forma dose-dependente. Estes compostos produziram 67%, 53%, 33% e 48% de inibição em uma concentração de 300 µg/ml, respectivamente.



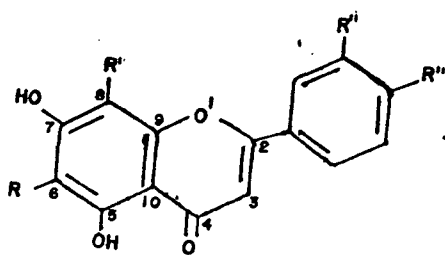
(60) astragalina $R^1=R^2=H$

(61) kaempferol 3-O-(2"-O-galloil)-glucosídeo: $R^1=H, R^2=CO-$ 

(62) isoquercitrina: $R^1=OH, R^2=H$

(63) quercitina 3-O-(2"-O-galloil)-glucosídeo: $R^1=OH, R^2=CO-$ 

Outros flavonóides glicosídeos também apresentaram esta atividade hipotensora. Entre os isolados das cascas do limão, os compostos ativos foram: 6,8-di-C-glucosildiosmetina (64) e 6,8-di-C-glucosil apigenina (65) e limoncitrol-3 β -D-glucosídeo (66)⁸⁹⁻⁹⁰.



(64): $R=R'=glucose, R''=OH, R'''=OCH_3$

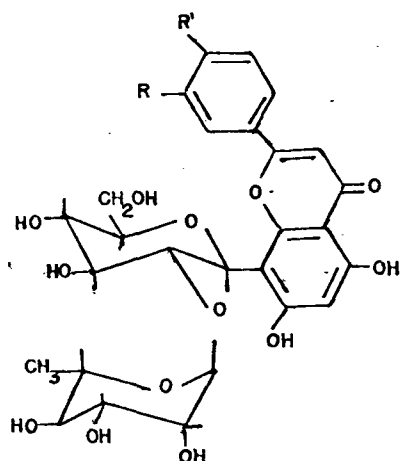
(65): $R=glucose, R', R''=H, R'''=OH$

(66): $R=R'=R''=OCH_3, R'''=OH$, em posição 3=O-glucose

Já na espécie Fortunella japonica os flavonóides glicosídeos com atividade hipotensora (em ratos), são: 6,8-di-C-glucosil-apigenina; 3,6-di-C-glucosilacacentina; 2''-O α -L-ramnosilvitexina (67) e 2''-O- α -L-ramnosilorientina (68)⁹¹.

(67): $R=H, R'=OH$

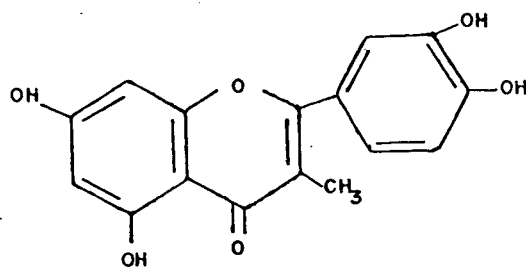
(68): $R=R'=OH$



A investigação do antagonismo de efeito espasmogênico da angiotensina e outros dois polipeptídeos (bradicinina e eledoisina) foi realizada com determinados flavonóides onde se demonstrou que as agliconas eram mais potentes que os glicosídeos. Contra a angiotensina, os mais potentes por ordem foram: eriodictiol, quercitina, morina, rhamnetina e 4-metilesculetina; contra bradicinina foram: quercitina, rhamnetina e homoeriodictiol, e contra eledoisina: quercitina, morina, rhamnetina e catequina. Avaliações estrutura-atividade revelaram que os compostos mais ativos possuíam grupos hidroxila livre nas posições 5 e 7 do núcleo gama-benzo-pirona⁹².

1.10.6 - ATIVIDADE CARDIOVASCULAR

A flavona 3-metilquercitina (3-MQ) (69) isolada de várias espécies do gênero euphorbia, além de apresentar pronunciada atividade antiviral e inibição da agregação plaquetária, foi recentemente demonstrado um efeito cardiovascular em coelhos. A 3-MQ determinou vasodilatação direta da artéria central da orelha do coelho, porém este efeito era significativamente menor do que o da papaverina, um conhecido vasodilatador. Esta flavona e a quercitina também demonstraram efeito cronotrópico positivo no átrio direito da cobaia, e a primeira, além disso, possuía um efeito antiarrítmico no átrio esquerdo da cobaia em concentrações de 1×10^{-5} e 2×10^{-5} g/ml⁹³.



(69) 3- metilquercitina

1.10.7- ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIABETES

É conhecido que o diabete mellitus causa aumento dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos, o que acarreta a longo prazo aterosclerose severa.

A pressão dorsal, bem como a pressão osmótica de dulcitol, que não pode ser metabolizado por células humanas, pode produzir distúrbios visuais e deficiências na absorção intestinal. A enzima que reduz a glucose a dulcitol é a aldose-redutase. Esta enzima é inibida pelos flavonóides por um mecanismo ainda desconhecido. Apresenta-se a seguir alguns destes⁷¹.

Em flavonóides isolados da espécie **Brickellia glutinosa**, foi demonstrado uma atividade inibitória desta enzima aldose-redutase e comparada a compostos potencialmente ativos, a quercitina e alrestatina (ver tabela 19) Os flavonóides isolados ativos são: centaureina, penduletina, quercitina 3-metileter, quercetagina 3,6,7-trimetil eter, quercitina 3,7-dimetil eter. Os dois primeiros são os que apresentaram menor atividade inibitória (ver tabela 19)⁹⁴.

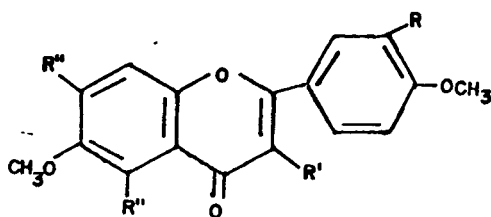
TABELA 19 - Inibição de aldose redutase por flavonóides da espécie *Brickellia glutinosa*

Composto	Porcentagem de inibição			
	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M
Centaureina	72	47	0	
Penduletina	97	64	21	0
Quercitina 3-metileter	100	95	78	28
Quercitina 3,7-dimetileter	100	97	71	16
Quercetagetina 3,6,7-trimetil eter	100	88	63	26
Quercitrina ^a	100	91	82	57
Alrestatina ^a	100	92	44	17

a - não isolados de *B. glutinosa*.

1.10.8 - ATIVIDADES ANTITUMORAL

Os flavonóis eupatina (70) e eupatorentina (71) e a flavona eupatilina (72) isolados da espécie *Eupatorium semiserratum*, exibiram citotoxicidade moderada quando testados contra carcinoma de nasofaringe humano. Outros dois flavonóis (metilados) (5,7,3'-trihidroxí-3,4'-dimetoxiflavona e 5,7,3'-trihidroxí-3,6,4'-trimetoxiflavona) isolados da espécie *Bacharis sarothroides* foram ativos contra carcinoma 9KB humano⁷⁶.

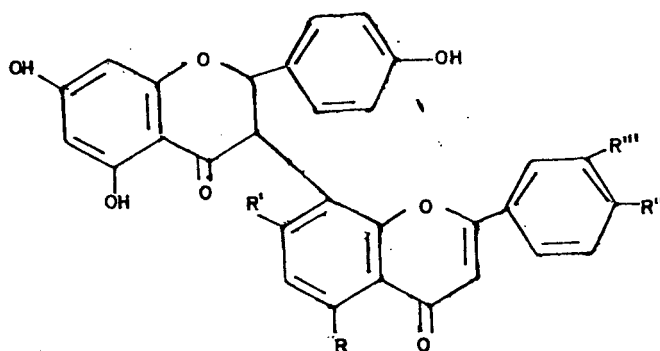


(70): $R=R'=R''=OH, R'''=CH_3O$

(72): $R=OCH_3, R'=H, R''=R'''=OH$

(71): $R=R'=OH, R''=R'''=CH_3O$

Também a apigenina e os biflavonóis morelloflavona (73) volkensiflavona (74) e fugugelina apresentaram atividades antitumorais. A quarcetage-trina e a patuletrina foram ativas contra carcinoma pulmonar de Lewis ("in vivo"). Mesmo havendo vários trabalhos publicados sobre este efeito antitumoral dos flavonóides, estes ainda não são utilizados normalmente nos tratamentos de câncer⁷⁶.

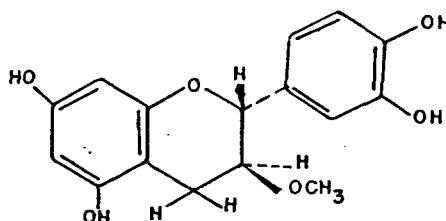


(73): $R=R'=R''=R'''=OH$

(74): $R=R'=R''=OH, R'''=H$

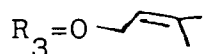
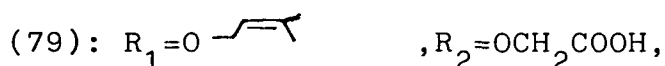
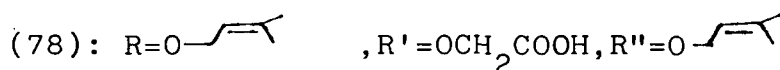
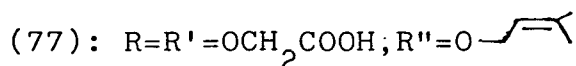
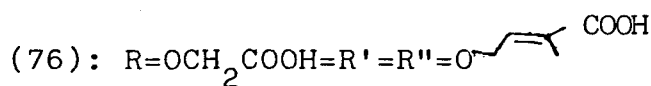
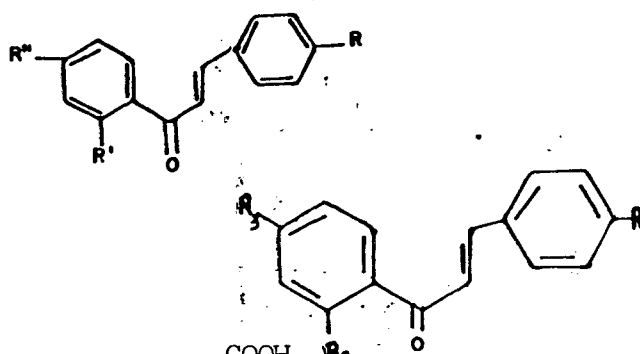
1.10.9 - ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

O composto meciadanol (O-metil-3 (+) catequina) (75) é um flavonóide que apresentou um acentuado efeito protetor contra úlceras pépticas induzidas em ratos. Os métodos para induzir ulcerações, empregaram: instilação de etanol, ligação pilórica seguida por dieta ulcerogênica indiana e a instilação de óleo de arroz no esômagão após ligação pilórica. Meciadanol foi capaz de reduzir a incidência, números e áreas de ulcerações, proteção de mastócitos contra degranulação e preservar a vascularização normal. Esta droga tem sido bem tolerada em animais e voluntários humanos. Estes resultados indicam que meciadanol pode ser útil no tratamento de úlceras pépticas humanas⁹⁵.



(75) Meciadanol

Este efeito também foi observado com as dihidrochalconas derivadas da droga antiulcerogênica, conhecida por sofalcone, e suas atividades comparadas. As dihidrochalconas ativas, foram: 2',4-bis(carboximetoxi)-4'-(3-carboxi-2-buteniloxi)dihidrochalcona (76), 2',4-bis(carboximetoxi)-4'-(3-metil-2-buteniloxi)dihidrochalcona (77) e 2'-carboximetoxi-4,4'-bis(3-metil-2-buteniloxi)dihidrochalcona (78). O composto mais ativo foi o (78), cuja atividade foi igual ou ligeiramente menor que a da sofalcone (79)⁹⁶.

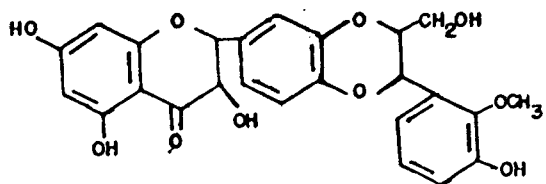


Outro flavonóide também derivado sinteticamente de droga antiulcerogênica é o "solon". Este derivou-se de soforadina, muito empregada na medicina chinesa para o tratamento de doenças digestivas. O composto solon foi administrado oralmente e intraperitonealmente em ratos e inibiu de forma dose-dependente, úlceras gástricas, induzidas pela aspirina acidificada, imersão na água e obstrução intensa. Em humanos solon também foi gastroprotetor e reduziu dose-dependente as lesões gástricas causadas pelo stress, e induzidas por etanol absoluto administrado oralmente⁹⁷.

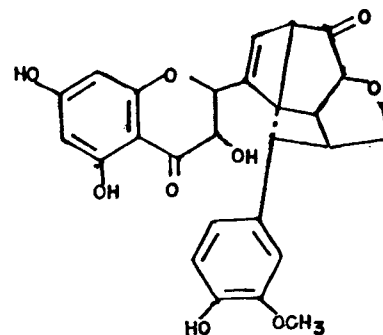
1.10.10 - ATIVIDADE ANTI-HEPATOTÓXICA

Propriedades medicinais têm sido atribuídas ao extrato aquoso de frutos da espécie Silybum marianum L. Gaerth (Compositae) por mais de 2000 anos. O componente ativo é uma mistura de flavonolignanas, chamados silibina (80), silidianina (81) e silicristina (82), referidas coletivamente como silimarina. Estes compostos isoméricos representam a condensação de uma molécula de taxifolina e álcool coniferílico, e possuem atividade anti-hepatotóxica de acordo com estudos em espécies animais realizados. A silimarina é uma das poucas drogas não imunodepressoras e tem sido utilizada no tratamento de doenças do fígado.

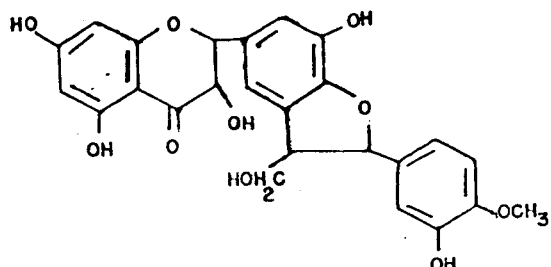
Produtos comerciais contendo silimarina têm um efeito estabilizante da membrana citoplasmática do hepatócito, impedindo a ação de várias toxinas no fígado. Silimarina pode também causar deslocamentos de algumas toxinas do fígado e tem uma atividade regeneradora de células, através da estimulação da produção de RNA-ribossomal e síntese de proteínas - pré requisitos para a síntese de DNA. Para haver regeneração celular é necessário proliferação e síntese de DNA. Portanto, de modo geral, os efeitos da silimarina, são: estabilizar as membrans celulares do fígado e conferi-lhes impermeabilidade a toxinas⁷⁶.



(80) Silibina



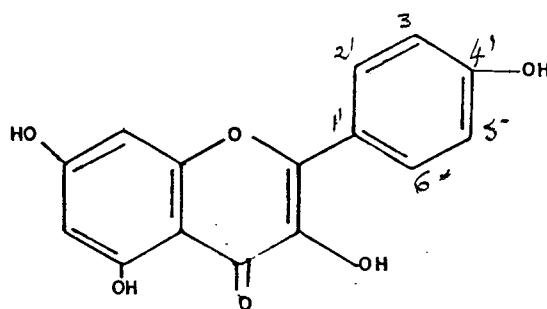
(81) Silidianina



(82) Silicristina

1.10.11 - ATIVIDADE ANTIDIARREICA

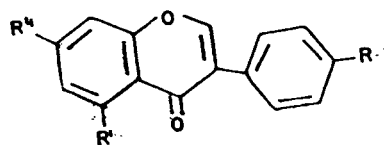
A presença dos flavonóides galanina (51), miriceti na (49), Kaempferol (81), quercitina (43) e ácido gálico nos frutos da espécie *Comptonia peregrina* parece estar relacionada ao uso destes frutos contra diarréia na Europa Central desde o século XIX⁷⁶.



(83) Kempferol

1.10.12 - ATIVIDADE HORMONAL

O flavonóide genisteina, uma isoflavona (84), isolado da espécie *Trifolium subterraneum*, demonstrou-se responsável pela diminuição da fertilidade em ratos devido a sua atividade estrogênica, observada por Bennetts. Além desta isoflavona, muitas outras possuem esta atividade, entre elas estão: daidzeina (85), tectrigerina 7-glucosídeo, irigenina, irilone 4-glucosídeo e biochanina 7-glucosídeo (86). Entre estes compostos, daidzeina (85) foi o flavonóide com maior atividade estrogênica em experimentos em útero de rata⁷⁶.



(84) genisteina: $R=R'=R''=OH$

(85) daidzeina: $R=R''=OH, R'=H$

(86) biochanina 7-glucosídeo: $R=OCH_3, R'=OH, R''=O-glucose$

Por outro lado, uma mistura de hesperidinas sintéticas fosforiladas produziu um efeito antifertilizante em alguns ratos de um grupo de estudo; além disso, somente um destes compostos possuía a ação antifertilizante⁷⁶. Outros compostos isolados da família das Melissas (ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínido) também apresentaram além de suas propriedades antivirais, e feitos anti-hormonais devido as suas propriedades de se fixarem em glicoproteínas como os hormônios hipofisários⁹⁸.

1.10.13 - ATIVIDADE ANESTÉSICA

A ação anestésica local de flavonóides tem sido usada para o tratamento de picadas de insetos e em cirurgias o - rais. A potência dos flavonóides em relação a este efeito, foi demonstrado ser comparável a da cocaína. O alívio da dor pode ser interpretado como uma supressão da síntese de prostaglandina pela inibição de fosfolipase A₂ (contida em muitos venenos) e ciclooxigenases⁷¹.

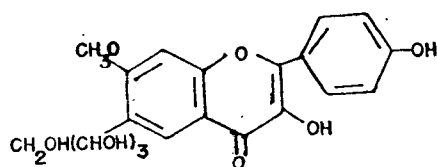
1.10.14 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana contra *Pseudomonas maltophilia* e *Enterobacter cloacae* foi apresentada pelo flavonóide glicosídeo, denominado de quercitina-3-O-galactosil (1→6)-glucosídeo, isolado das partes aéreas da espécie *Vicia angustifolia*. Esta atividade foi comparada a vários outros flavonóides glicosídeos. O flavonol-glicosídeo quercitina-3-O-ramnosídeo apresentou o efeito mais potente. Também foram ativos: quercitina-3'-O-glucosídeo, quercitina-3-O-galactosídeo, quercitina-7-O-glucosídeo e quercitina-3-O-galactosil (1→6) glucosídeo, já citado acima⁹⁹.

1.10.15 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

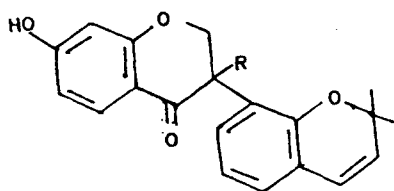
Uma afinidade parece existir, nas plantas, entre a presença de compostos fenólicos e a característica do vegetal em resistir a infecções virais e fungais. Por exemplo, a presença de apigenina 7- e 4'-glucosídeos, luteolina-7- e 4'-glucosídeos e 7-ramnoglucosídeos e quercitina-3-glucosídeos tem sido cor

relacionados com a resistência de espécies do gênero *Pyrus* a doenças tipo ferrugem no vegetal⁷⁶. A propriedade antifúngica dos flavonóides contribui para a durabilidade da madeira. Por exemplo, compostos com potente ação antifúngica, inclui dihidroquercitina em pinheiro Douglas e dihidrorobinetina, Keyakinina (87) e Keiakinol (que é a flavona correspondente) na espécie *Robinia pseudocarpa*⁷⁶.



(87) Keyakinina

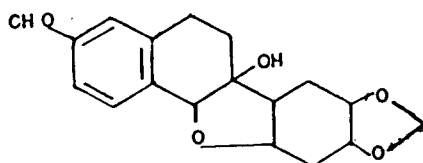
Da mesma forma, naringenina, nobiletina, tangeritina e 5,4'-dihidroxila 6,7,8,3'-tetrametoxiflavona protegem as folhas de algumas plantas do gênero *citrus*, contra a doença "mal seco" que é causada pelo fungo *Deuterophoma tracheiphila*. As isoflavonas isoladas da espécie *C. lindemuthianum* (88 e 89) são também fungicidas⁷⁶.



(88) R=H

(89) R=OH

Alguns fungos podem degradar fitoalexinas; por exemplo, **Fusarium solani**, um fungo patogênico da ervilha, metaboliza pisantina (90), uma fitoalexinapterocarpanóide, produzido pela planta⁷⁶.



(90) pisatina

1.11 - OBJETIVOS

A espécie *Hymenaea martiana* é uma planta com ampla disseminação em nosso território e empregada pela medicina popular para tratamento de diferentes doenças. Porém, nenhum trabalho químico-farmacológico foi publicado, conforme literatura consultada - Internacional Pharmaceutical Abstracts, que justifique suas ações medicinais. Considerando as premissas estabelecidas, foi desenvolvido este trabalho, visando alcançar os seguintes objetivos:

- 1 - determinação preliminar de atividade farmacológica no extrato bruto;
- 2 - extração, isolamento e purificação de compostos biologicamente ativos neste extrato;
- 3 - identificação dos compostos isolados;
- 4 - análise farmacológica dos compostos purificados;
- 5 - modificação estrutural desses compostos, visando melhorar suas ações farmacológicas.

CAPÍTULO II

II - PARTE EXPERIMENTAL

2.1 - MATERIAL BOTÂNICO

Foram utilizadas cascas do tronco da espécie Hymenaea martiana, coletadas no município de Caeteté, no Estado da Bahia. A identificação foi realizada pelo botânico Ademir Reis, do herbário Flordor Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina.

FIGURA 10 - *Hymenaea martiana*, no Zoológico Municipal da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.



FIGURA 11 - *Hymenaea martiana*, no Zoológico Municipal da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.



FIGURA 12 - Cascas de *H. martiana*.



FIGURA 13 - Ramos com folhas e inflorescências da *H. martiana*.

2.2 - EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS

2.2.1 - OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA BRUTO

As cascas do tronco de *Hymenaea martiana* (3,7 kg) foram moídas e submetidas a processo de extração exaustiva, por maceração, em acetato de etila à temperatura ambiente, durante dez dias, com repetidas reposições de solvente. O extrato total, em acetato de etila, foi concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida, fornecendo um material de coloração marrom (363,5 g), correspondendo então a 9,83% do material vegetal. Este extrato, depois de concentrado, recebeu a denominação de extrato inicial de acetato de etila bruto, que submetido a testes farmacológicos, demonstrou atividade.

2.2.2 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA BRUTO

Uma parte do extrato acetato de etila bruto (220 g), seco, foi misturado a cerca de 50 g de sílica gel 60 (70-230 mesh), procedência Merck. A mistura foi submetida a um fracionamento preliminar, através de uma coluna, contendo 200 g. desta sílica. A coluna com 8,5 cm de diâmetro por 18 cm de altura foi eluída com solventes de polaridade crescente, inicialmente, com éter de petróleo e, logo após, com clorofórmio, acetato de etila e metanol (figura 14 e 15). As frações foram coletadas em erlenmeyer de 2000 ml as duas primeiras e de 4000 ml, as demais. Estas foram concentradas e uma amostra de 50-100 mg de cada fração utilizada para testes de atividade farmacológica. As frações que apresentaram atividade farmacológica foram a de clorofórmio e a de acetato de etila (ver figura 15).

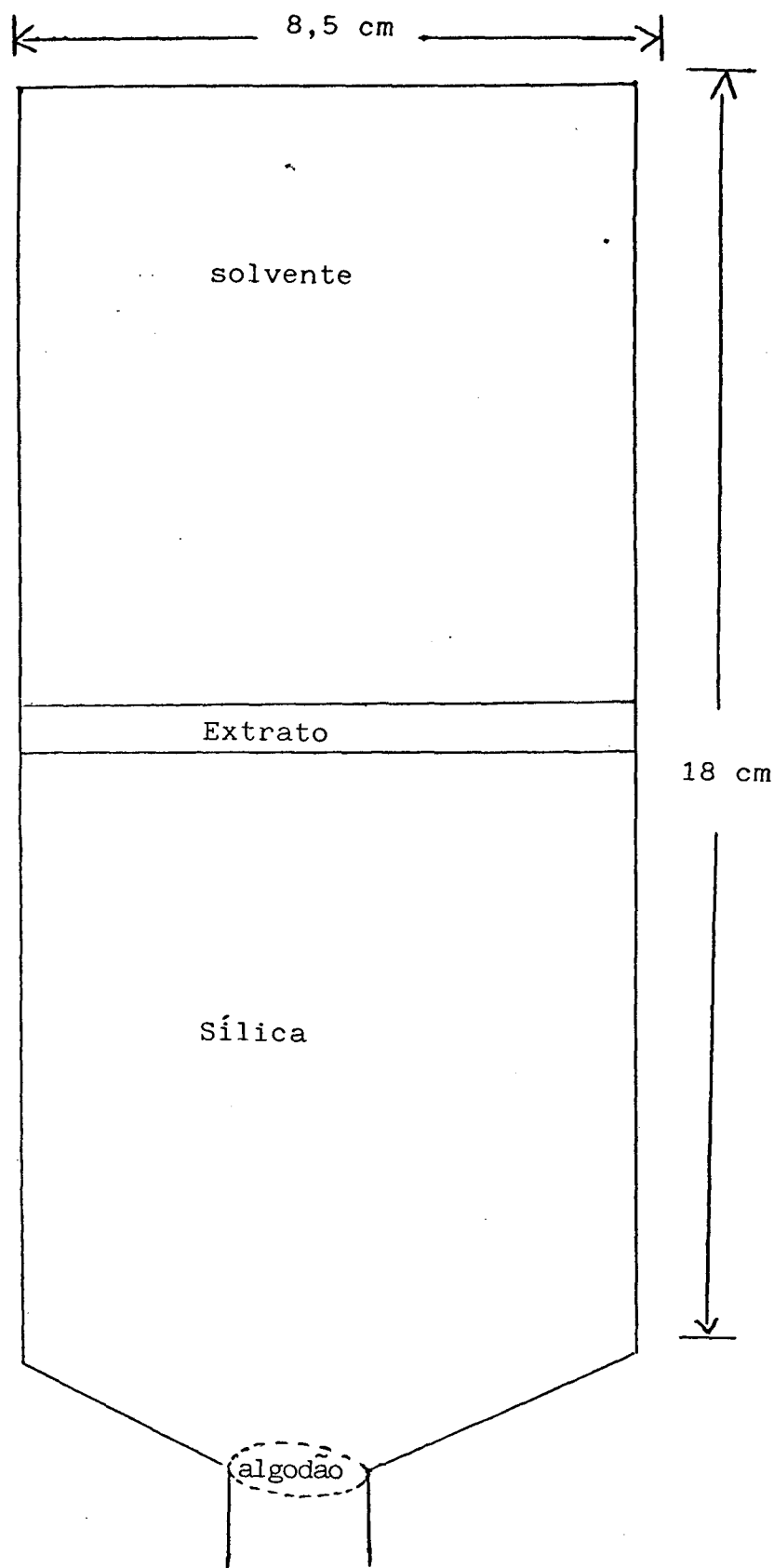


FIGURA 14 - Esquema da coluna usada para fracionamento do extrato em acetato de etila bruto.

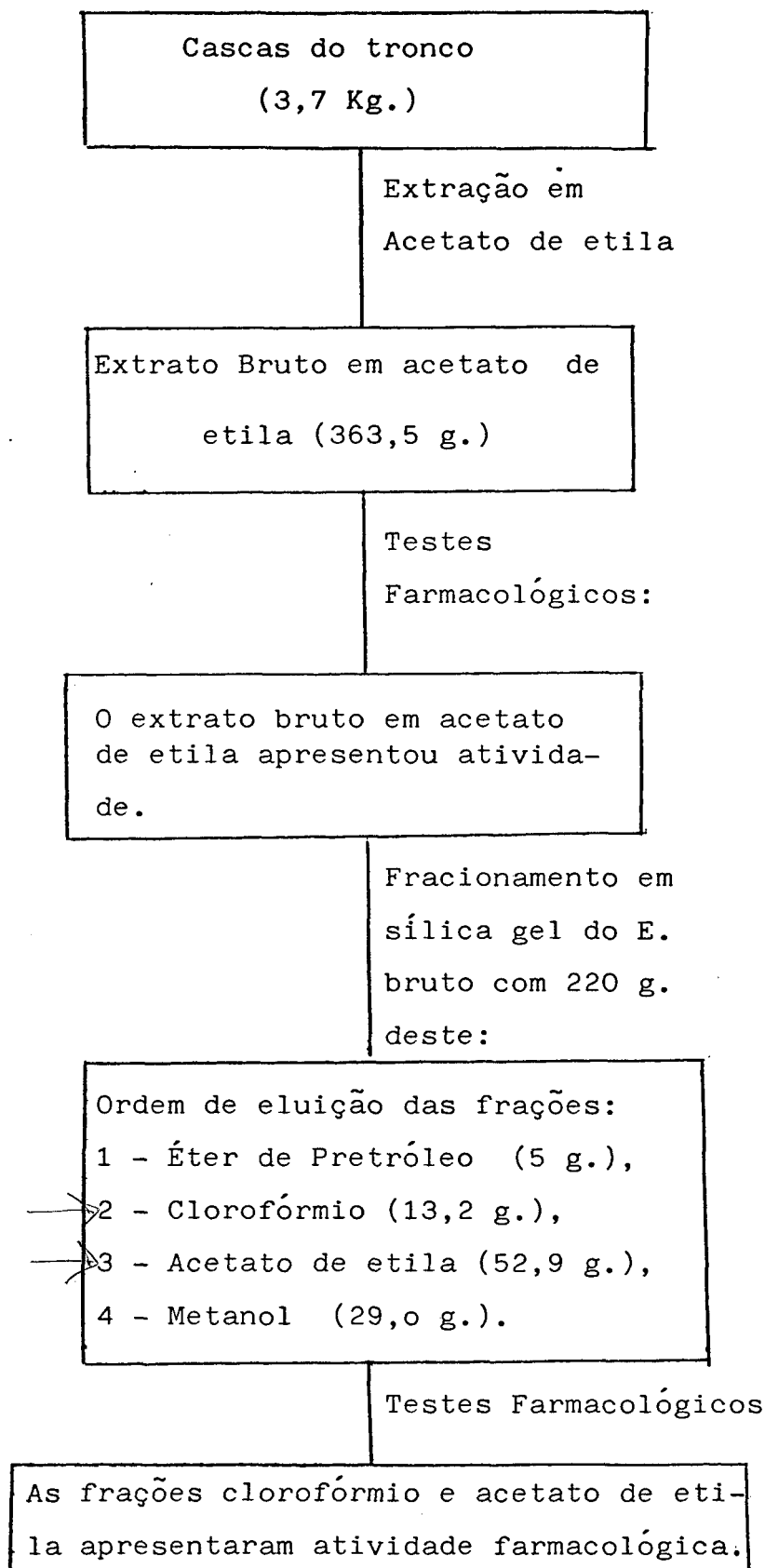


FIGURA 15 - Esquema de obtenção e purificação do extrato em acetato de etila bruto de *Hymenaea martiana*

2.2.3 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ÉTER DE PETRÓLEO

A fração éter de petróleo, mesmo não apresentando atividade farmacológica, foi trabalhada por permitir, sem maiores dificuldades, a separação de alguns de seus compostos.

Esta fração, após concentração, forneceu um resíduo oleoso de coloração laranja e odor agradável, pesando cerca de 5 gramas. Misturado a este material oleoso, havia um sólido branco, que foi purificado com repetidas lavagens com hexano. Obteve-se assim, um sólido branco puro (10 mg) de p.f. 75,7-77,0 °C, recebendo o código HM-1. Este composto não apresentou atividade farmacológica.

I.V. γ KBr cm^{-1} 2910,2850,1645,1570,1415,1305,1245,1170,1110,800.
max.

U.V. λ MeOH nm: 265 e 325.
max.

E.M. (70 eV) 451 M^+ (19,0),196(54,0),179(58),164(58),73(81),58(88),
43(100).

Após tratamento da fração éter de petróleo com acetato de etila, obteve-se um precipitado branco, que, após filtração, forneceu um sólido branco (10 mg), de p.f. 71,0 °C, tendo sido codificado como HM-2. Este composto também não apresentou atividade farmacológica.

I.V. γ KBr cm^{-1} 2920,2850,1715,1470,730.
max.

U.V. λ MeOH nm: 265.
max.

E.M. (70 eV) 422 M^+ (5),394(43),367(52),129(27),97(29),73(63), 57

(80),43(100).

Estes compostos não foram ainda identificados por falta de dados, os espectros não são apresentados.

2.2.4 - ACETILAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

Como a separação dos compostos desta fração era difícil em camada delgada e para se trabalhar com solventes menos polares, realizou-se uma acetilação da mesma. A acetilação empregou uma amostra de 23,75 g, que foi adicionada a 250 ml de uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1) e deixada em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. Após este período, à mistura foi adicionada a água/gelo, sob agitação constante e deixada por mais de 48 horas. A seguir, devido a formação de um precipitado, a mistura foi filtrada, lavada sucessivas vezes com água destilada e recristalizada em metanol. Após a secagem da amostra à vácuo, foi feita CCD e I.V. demonstrando que a reação ocorreu. Com o material acetilado, realizaram-se testes farmacológicos, que apresentaram atividade (ver figura 34 e 35, p. 169 e 170).

2.2.5.- PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA ACETILADA

A fração acetato de etila acetilada foi purificada e teve seus compostos isolados, através de vários fracionamentos em colunas cromatográficas.

2.2.5.1 - PRIMEIRO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA ACETILADA

Parte da fração acetato de etila acetilada (10,5 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica de sílica gel 60 (153,6 g), (70-230 mesh), ativada a 105 °C por 1:30 h. e desativada a 15% em água. A coluna foi eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila, acetato e metanol (tabela 20). As frações de 500 ml cada foram reunidas em grupos com base em análise comparativa por CCD.

TABELA 20 - 1ª Fracionamento da fração acetato de etila acetilada

Eluente	%	Frações Recolhidas	Frações Reunidas	Código
Hexano:diclorometano				
	50:50	1		
Hexano:diclorometano: acetato de etila				
	45:45:10	2	1-4	HMAA-a*
	42,5:42,5:15	3	5	
	42:42:16	4	6	
	41:41:18	5	7	
	40:40:20	6-17	8	
	39:39:22	18-24	9-10	
	37,5:37,5:25	25-32	11	
	36,5:36,5:27	33-35	12-16	
	35:35:30	36-39	17-22	
	34:34:32	40-41	23-42	
	30:30:40	42		
Acetona	100	43	43	
Metanol	100	44-45	44-45	

* Fração estudada.

A fração HMAA-a, após concentração em evaporador rotatório à pressão reduzida, apresentou-se em forma de um material sólido misturado a um óleo escuro. Sucessivas lavagens com éter etílico-éter de petróleo (1:5), deixaram um sólido branco (10 mg) de p.f. 105 °C, recebendo o código HM-4 (acetilado). Testes farmacológicos realizados, com este composto, demonstraram que o mesmo apresentava uma atividade farmacológica, porém pouco específica.

Considerando que a separação dos compostos da fração acetato de etila acetilada não foi satisfatória, realizou-se um segundo fracionamento da mesma.

2.2.5.2 - SEGUNDO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA ACETILADA

Este segundo fracionamento da fração acetato de etila acetilada foi realizado através de uma coluna cromatográfica de sílica gel 60(70-230 mesh), 216 g, ativada a 105 °C por 1:30h. e desativada a 15% em água, medindo 35 cm de altura por 4 cm de diâmetro e a amostra empregada foi de 6,7 g (relação amostra: sílica = 1:32). Na eluição desta coluna eliminou-se o diclorometano do sistema de solventes, que havia sido empregado no 1º fracionamento, a mistura do solvente usada foi: hexano, acetato de etila e metanol (Tab. 21) e a relação amostra: sílica, também se alterou neste segundo fracionamento, pois era de 1:15 no primeiro e aqui de 1:32. Assim obteve-se melhores resultados na separação cromatográfica. As frações recolhidas em erlemeyer de 500 ml foram concentradas e monitoradas em cromatografia de camada delgada, reunindo-se as idênticas cromatograficamente.

Testadas todas essas frações reunidas, foi deter-

minado que as frações HMAA-4 e HMAA-5 eram as mais ativas. Além disso, estas frações apresentavam alguns compostos com o mesmo Rf e outros com Rf diferentes; por esse motivo, procurou-se promover a separação dos mesmos.

TABELA 21 - 2º fracionamento da fração acetato de etila acetilada

Eluente	%	Frações Recolhidas	Frações Reunidas	Código
	95:5	1		
	90:10	2- 3		
	85:15	4- 5	1-11	HMAA-1
	80:20	6- 7		
	75:25	8-12	12-14	HMAA-2
Hexano:aceta			15-18	HMAA-3
to de etila	70:30	13-16	19-25	HMAA-4*
	65:35	17-20		
	60:40	21-28	26-30	HMAA-5*
	55:45	29-36	31-34	HMAA-6
	50:50	37-44	35-45	HMAA-7
	45:55	45-46		
	40:60	47-48		
Acetato de				
etila	100	49-50	46-52	HMAA-8
Metanol	100	51-52		

* Frações purificadas por coluna cromatográfica.

2.2.5.2.1 - SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS DA FRAÇÃO HMAA-4

A fração HMAA-4 (1,9 g), foi eluída através de uma coluna possuindo 65 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro, contendo 200 g de sílica gel 60 (70-230 mesh), ativada a 105 °C por 1:30 h. e desativada a 15% em água. A amostra foi misturada a cerca de 1 g de sílica e aplicada sobre 1,0 ml de acetato de etila, depositado sobre a sílica. A seguir, todo o acetato de etila foi eluído e adicionou-se 10 ml de hexano e iniciou-se a eluição da coluna. A eluição foi realizada com hexano-acetato de etila e as frações, após concentradas, foram reunidas mediante monitoramento por CCD (tabela 22).

TABELA 22 - Fracionamento da fração HMAA-4

Eluente	%	Frações Recolhidas	Volume (ml) da fração	Frações Reunidas	Código
	80:20	1- 4	250		
	75:25	5- 6	250	1-17	HM4-1
	70:30	7-10	250	18-25	HM4-2
	65:35	11-12	250	26-27	HM4-3
	60:40	13-26	120	28-31	HM4-4
Hexano:	65:35	27-42	120	32-33	HM4-5*
acetato	50:50	43-57	120	34-35	HM4-6
de etila				36-45	HM4-7
				46-47	HM4-8**
				48	HM4-9
				49-50	HM4-10
				51-56	HM4-11
				57-66	HM4-12
	40:60	58-66	120		
Acetato					
de etila	100	67-68	500		
Metanol	100	69	1000	67-69	HM4-13

* Fração estudada

** Fração purificada.

Na fração HM4-5 concentrada, obteve-se um sólido branco (37 mg) de p.f. 117-121 °C, codificado como HM-14 (acetilado).

A fração HM4-8 constituía-se de um sólido esbranquiçado (256 mg), que em CCD com benzeno-acetona (85:15), apresentou três compostos denominados HM-17A, HM-17B e HM-17C. Esta fração, assim como a primeira, apresentava atividade farmacológica, então tentou-se separar os três compostos citados acima, através da metodologia citada a seguir:

2.2.5.2.1.1 - SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FRAÇÃO HM4-8

Esta fração estava acetilada e foi realizada uma desacetilação, visando obter os compostos desacetilados. Para isso, 256 mg na fração HM4-8 foi acrescida de 10 ml de metanol, 1 ml de água e 300 mg de hidróxido de sódio. A mistura foi deixada por três horas à temperatura ambiente. Após, foi neutralizada com ácido sulfúrico concentrado (0,2 ml), evaporada e extraída com acetato de etila. Obteve-se um sólido de coloração escura (100 mg), que foi submetido a fracionamento por coluna cromatográfica de sílica gel, visando a separação dos compostos HM-17A, HM-17B e HM-17C. A coluna foi eluída com clorofórmio-metanol, em polaridade crescente (tabela 23). As frações foram concentradas e reunidas de acordo com a CCD.

TABELA 23 - Separação cromatográfica da fração HM4-8 desacetilada

Eluente	%	Frações Recolhidas	Frações Reunidas	Código
			1-27	HMD-1
			28-42	HMD-2*
Clorofórmio:			43-47	HMD-3
metanol	90:10	1-55	48-57	HMD-4
	80:20	56-80	58-61 e	HMD-5
			71-81	
			62-70	HMD-6*
Metanol	100	81-82	82	HMD-7

* Frações estudadas. A fração HMD-2 corresponde ao composto HM-17A e a fração HMD-6 ao composto HM-17C.

Após a vaporização do solvente da fração HMD-2, obteve-se um sólido de coloração verde (40 mg), cujo p.f. foi 231-233 °C (lit. 231-233 °C)⁷¹.

A substância foi codificada como HM-17A e submetida a testes farmacológicos apresentando atividade.

I.V. γ KBr cm^{-1} (figura 19, p. 131)
max.

U.V. λ EtOH
EtOH + AcONa
EtOH + AlCl₃
max. nm (figura 18, p. 130)

RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N) (figura 21 e 21a, p. 134 e 135)

RMN¹³C (75,6 MHz, C₅D₅N) (figura 20, p. 132 e 20a, p. 133)

Da fração HMD-6, isolou-se um composto de coloração amarelada (40 mg), bastante purificado com p.f. 183 °C e codificado HM-17C. Testes farmacológicos desta substância revelaram que a mesma não possuía atividade.

I.V. γ KBr cm^{-1} (figura 25, p. 149 e 25a, p. 150)
max.

U.V. λ EtOH
EtOH + AcON_a + H₃BO₃
EtOH + AlCl₃
EtOH + AlCl₃ + HCl
max. nm (figura 24 e 24a, p. 147 e p. 148)

RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N) (figura 27, p. 153)

RMN¹³C (75,6 MHz, C₅D₅N) (figura 26, p. 151 e 26a, p. 152).

2.2.5.2.2. - SEPARAÇÃO DE COMPOSTO DA FRAÇÃO HMAA-5

Uma amostra da fração HMAA-5 (1,9 g) foi dissolvida em benzeno e aplicada em uma coluna cromatográfica de sílica gel 60 (70-230 mesh), 260 g, com as seguintes dimensões: 85 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro. A sílica utilizada foi antes ativada a 105 °C por 1:30 h. e desativada em 15% de água. A coluna foi eluída com os solventes benzeno-acetona, acetona e metanol (tabela 24). As frações recolhidas, após concentradas em rotavapor, foram matografadas em camada delgada e as idênticas reunidas.

TABELA 24 - Fracionamento da fração HMAA-5

Eluente	%	Frações Recolhidas	Volume (ml) da fração	Frações Reunidas	Código			
Benzeno	100	0	200	0- 1	HM5-1			
	90:2	1	400					
	96:4	2 - 3	200	2- 3	HM5-2			
	94:6	4 - 7	100	4	HM5-3			
	92:8	8 -33		100(8-14)	5	HM5-4*		
				50(15-33)	6- 7	HM5-5		
					8-10	HM5-6		
					11-14	HM5-7*		
					15-17	HM5-8		
					18-26	HM5-9*		
					27-29	HM5-10		
					30-31	HM5-11		
				90:10	34-54	50	32-35	HM5-12*
							36-40	HM5-13
	41-49	HM5-14						
	50-52	HM5-15						
88:12	55-57	50	53-63	HM5-16*				
85:15	58-69	50	64-69	HM5-17				
Acetona	100	70	100	70	HM5-18			
Metanol	100	71	100	71	HM5-19			

* Frações estudadas.

Da fração HM5-4 foi obtido um sólido amarelo (5 mg) de p.f. 82-85 °C, por CCD, mostrou-se puro. A substância recebeu o código HM-13 (acetilado) e apresentou atividade farmacológica.

A fração HM5-7 apresentava-se como um sólido amarelado, com traços de substâncias oleosas, e, cromatograficamente, continha o composto já isolado anteriormente e codificado como HM-14 (acetilado) - ver p.106 .

A fração HM5-9, uma vez concentrada, forneceu um sólido branco (250 mg) com p.f. 121-122 °C. Codificado como HM-17C (acetilado) e que também já havia sido obtido da fração HMAA-4. Este composto também se desacetilou de acordo com a metodologia da p.106 .O composto HM-17C (acetilado) apresentou atividade farmacológica, enquanto que o mesmo não foi observado para o composto HM-17C desacetilado (ver figura 25 e 25a, p.149 e 150).

A fração HM5-12, eluída em benzeno:acetona a 8%, uma vez concentrada, apresentou-se como um sólido amarelo-pálido (74 mg), de p.f. 116-118 °C e recebeu o código HM-18 (acetilado). A substância submetida a testes farmacológicos revelou ser ativa.

Da fração HM5-16 foi obtido um composto de coloração amarelada (88 mg) com p.f. 131-135 °C e codificado como HM-19C (acetilado). Testes farmacológicos deste demonstraram sua atividade.

Como pode ser observado, a mudança no sistema de solvente de hexano-acetato de etila, utilizado na coluna da fração HMAA-4, para o sistema benzeno-acetona, na coluna da fração

HMAA-5, conduziu a melhores resultados na separação cromatográfica dos compostos. Enquanto que na primeira coluna se isolou os compostos HM-14 (acetilado), HM-17A e HM-17C (acetilados), na segunda, além destes, exceto o segundo, se obteve os compostos HM-13, HM-18 e HM-19 (acetilados).

Visando obter maiores quantidades dos compostos isolados e identificados (desacetilados), HM-17A e HM-17C, isolados da coluna da fração HM4-8 desacetilada, foi realizada uma coluna com a fração acetato de etila não acetilada, utilizando-se o mesmo sistema empregado na separação cromatográfica anterior.

2.2.6 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

A fração acetato de etila (3,5 g) foi misturada a 10 g de sílica gel 60(70-230 mesh). A mistura foi submetida a uma coluna cromatográfica de sílica gel (60,0 g), medindo 60 cm de altura por 2,1 cm de diâmetro. A coluna foi eluída em cloro-fórmio e metanol (Tabela 25) e as frações (30) de 100 ml, exceto a primeira (600 ml), após concentradas foram monitoradas por CCD, reunindo-se as cromatograficamente idênticas.

TABELA 25 - Fracionamento da fração acetato de etila

Eluente	%	Frações Recolhidas	Frações Reunidas	Código
Clorofórmio:				
metanol	95:5	1- 5	1- 4	HA-1
	90:10	6- 9	5- 6	HA-2*
			7-10	HA-3
	85:15	10-14	11-15	HA-4*
	40:60	15-30	16-17	HA-5*
			18-24	HA-6*
			25-30	HA-7

* Frações estudadas.

A fração HA-2, foi concentrada em evaporador rotatório, fornecendo um composto sólido de cor branca (44 mg) com p.f. 305 °C. A substância acetilada comparada por CCD ao composto HM-4 (acetilado), revelou ser idêntica a este (ver p. 99).

A fração HA-4, um sólido esverdeado (112 mg), apresentou-se razoavelmente purificado e também já havia sido isolado anteriormente, sendo codificado como HM-17A (ver p. 108).

A fração HA-5, eluída da coluna em clorofórmio-metanol a 60%, após evaporação, forneceu um sólido amarelado (462 mg), que após CCD em clorofórmio-metanol a 20% revelou a presença de 3 compostos já citados anteriormente (p. 104), conhecidos por: HM-17A, HM-17B e HM-17C. Com esta fração, farmacologicamente ativa, foi tentada uma separação destes compostos.

A fração HA-6, uma vez concentrada, forneceu um sólido amarelado (1850 mg) e comparado por CCD ao composto HM-17 C, revelou ser igual a este (ver p.108).

Acetilação do composto HM-17C

Foi realizada de acordo com a metodologia seguida na acetilação da fração acetato de etila (p.99), sendo que a amostra (composto HM-17C) empregada foi de 30 mg e mistura piridina-anidrido acético (1:1) foi de 1,5 ml. Após a secagem da amostra à vácuo, foi feita CCD e IV, demonstrando que a acetilação ocorreu. Com o material acetilado, realizaram-se testes farmacológicos, que apresentaram atividade como já se tinha observado na p. 111 (ver figura 25 e 25a, p.149 e p. 150).

2.2.6.1 - SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FRAÇÃO HA-5

Esta fração (462 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica (30 x 1,1 cm) de sílica gel (14,5 g), visando a separação dos compostos HM-17A, HM-17B e HM-17C. A coluna foi eluída com clorofórmio-metanol, em polaridade crescente (tabela 26). As frações foram concentradas e reunidas de acordo com a CCD.

TABELA 26 - Separação cromatográfica da fração HA-5

Eluente	%	Frações Recolhidas	Frações Reunidas	Código
Clorofórmio:metanol				
	98:2	1-65	1-63	H-1
	90:10	66-125	63-75	H-2
			76-84	H-3*
	80:20	126-155	85-105	H-4
	60:40	156-170	106-115	H-5
			116-170	H-6*

* Frações estudadas.

Da fração H-3 concentrada, obteve-se um sólido amarelado (80 mg), contendo os compostos HM-17A e HM-17B, segundo CCD, então trabalhou-se com esta fração, visando a separação destes compostos, como será descrito abaixo.

A fração H-6 constituía-se de um sólido amarelado (259 mg), que por CCD em clorofórmio-metanol a 20%, demonstrou ser equivalente ao composto HM-17C, isolado em colunas anteriores.

2.2.6.1.1 - SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FRAÇÃO H-3

Os compostos desta fração: HM-17A e HM-17B foram isolados através de cromatografia preparativa. Foi empregada uma

fração de 75 mg, aplicada sobre uma placa com sílica gel PF 254+366 com 1,5 mm de espessura. As placas foram desenvolvidas em sistema de solvente Clorofórmio-metanol a 10%. Uma vez realizada a corrida cromatográfica (2 vezes), a placa foi seca e examinada sob luz U.V.. Foi demonstrada a separação destes dois compostos, obtendo-se assim, 20 mg do composto HM-17A e 40 mg do composto HM-17B. O primeiro já isolado anteriormente, porém o segundo era desconhecido. O composto HM-17B, constituía-se de um sólido amarelo, com p.f. 173-175 °C, que não apresentou atividade farmacológica e espectroscopicamente:

I.V. ν KBr cm^{-1} (figura 31, p. 165)

max.

U.V. λ MeOH

MeOH + NaOMe

MeOH + NaOMe + AcONa

MeOH + AlCl_3 + HCl

max. nm (figura 30 e 30a, p. 163 e 164).

RMN¹H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (figura 33 e 33a, p. 167 e 168).

RMN¹³C (75,6 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (figura 32, p. 166).

2.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

2.3.1. - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada é o método mais prático, mais fácil e mais usado para analisar a pureza ou a complexidade dos compostos orgânicos.

Para a realização desta técnica, foram utilizadas placas de vidro de 5 x 20 cm e 20 x 20 cm, revestidas com sílica -gel HF₂₅₄₊₃₆₆, com 300 µ de espessura. Os compostos foram aplicados com microcapilares, em forma de pontos, equidistantes de 1,5 cm e a 1,5 cm da extremidade inferior e lateral da placa cromatográfica. Para o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram colocadas em uma câmara, cujo fundo estava coberto com o eluente. Os resultados da cromatografia de camada delgada, foram relatados, adotando-se o conhecido valor Rf¹⁰⁰:

$$Rf = \frac{\text{distância percorrida pela mancha desde a origem}^*}{\text{distância percorrida pelo solvente desde a origem}}$$

* Considerando a parte meia da mancha.

2.3.2 - CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Esta técnica é bastante empregada para a separação de compostos orgânicos, sendo precedida por uma CCD.

Para sua realização foram empregadas placas de vidro de 20 x 20 cm, revestidas com sílica gel PF₂₅₄₊₃₆₆, com 1,5

mm de espessura. Os extratos (100-200 mg) foram aplicados sobre uma linha a 2,0 cm da extremidade inferior da placa. As placas foram desenvolvidas no sistema de solvente contendo Clorofórmio-metanol a 10%. Após o solvente percorrer 15 cm além da linha de aplicação das amostras (extrato), os cromatogramas foram secos, logo a seguir examinados sob luz U.V. As regiões correspondentes às manchas mais representativas, foram raspadas da placa e as substâncias recuperadas da sílica com metanol e filtrado em funil com porcelana sinterizada. As soluções metanólicas foram levadas à secura em rotavapor.

2.3.3 - VISUALIZAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

A revelação dos compostos, no cromatograma seco, foi realizada por métodos físicos e químicos.

- MÉTODO FÍSICO

A visualização das substâncias separadas ocorre irradiando-se luz ultra violeta sobre o cromatograma. Para isto, empregam-se placas com indicador fluorescente a um determinado comprimento de onda, 254 e 366, ou ambos combinados.

- MÉTODO QUÍMICO

Esta técnica emprega reativos específicos, que são borificados com auxílio de um pulverizador manual ou spray com ar comprimido. As placas foram pulverizadas com a seguinte mistura reagente: $H_2SO_4:H_2O$: solução de formaldeído saturada (50:40:10), a uma distância de 15 a 20 cm e logo foram aquecidas a 120 °C.

2.3.4.- PONTO DE FUSÃO

A determinação dos pontos de fusão dos compostos isolados foram realizadas em aparelho de ponto de fusão - Micro Química modelo APF-301. Na tabela 27 estão relacionados os compostos isolados e seus respectivos dados utilizados nas suas identificações, como o p.f. e a CCD.

TABELA 27 - Identificação por CCD e p.f. dos compostos isolados da *Hymenaea martiana*

Compostos	CCD				p.f. (°C)
	Fase Móvel	Visualizadores			
		U.V.	For.Sulfur.	Rf	
Composto (HM-17C)	CHCl ₃ -MeOH	amar.	marrom	0,30	183
" (HM-17A)	(80:20) OH	amar.	amarelo	0,50	231-33
" (HM-17B)	"	amar.	marrom	0,53	175-5
Composto HM-01	Dicl.-hexano acetato etila (50:40:10)	amar.	amarelo	0,75	75,7-77
Composto HM-02	idem anterior	não absorve			71,0
Composto HM-04	CHCl ₃ -MeOH (90:10)				305
Composto HM-04 acetilado	Dicl.-Hexano- acetato etila (40:50:10)	Azul	Roxo	0,61	150
Composto HM-13 acetilado	Benzeno-acetona (85:15)	"	Marrom	0,76	82-85
Composto HM-14 acetilado	"	" amar.	"	0,58	117-121
Composto HM-17C acetilado	"	"	"	0,56	121-122
Composto HM-18 acetilado	"	"	"	0,44	116-118
Composto HM-19 acetilado	"	"	"	0,38	131-135

TABELA 28 - Rendimento das frações semipurificadas e dos compostos puros obtidos das cascas de *H. martiana* (3,7 Kg)

A - Frações Semipurificadas	Rendimento	Fração de Origem
Éter de Petróleo	5g = 0,13%	
Clorofórmio	13,2g = 0,36%	Extrato de
Acetato de Etila	52,9g = 1,43%	Acetato de
Metanol	29,0g = 0,78%	Etila
B - Compostos Puros	Rendimento	Fração de Origem
HM-1	10mg=0,00027%	Éter de Petróleo
HM-2	10mg=0,00027%	Éter de Petróleo
HM-4	44mg=0,0012%	Acetato de Etila
HM-17A	122mg=0,003%	Acetato de Etila
HM-17B	40mg=0,0011%	H-3
HM-17C	1850mg=0,05%	Acetato de Etila
HM-13 (acetilado)	5mg=0,00013%	HMAA-5
HM-14 (acetilado)	37mg=0,001%	HMAA-4
HM-17C (acetilado)	250mg=0,0067%	HMAA-5
HM-18 (acetilado)	74mg=0,002%	HMAA-5
HM-19C (acetilado)	88mg=0,0024%	HMAA-5

2.3.5 - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS ATRAVÉS DE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS (IV,UV,RMN¹H,RMN¹³C)

Os espectros de absorção na região de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 787, com as substâncias incorporadas em pastilhas de brometo de potássio anidro. As absorções foram registradas em escala de centímetros (cm^{-1}), sendo os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0,5 mm de espessura.

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro Intralab DMS 80, utilizando-se etanol ou metanol como solvente.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram obtidos em aparelhos Varian XL-100 a uma frequência de 100 MHz em piridina deuterada, usando o tetrametilsilano (TMS=0) como referencial interno, sendo os deslocamentos químicos expressos em valores de δ (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades indicadas como: s (simplete), d (duplete), t (triplete), q (quadruplete), m (multiplete).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³C foram obtidos em aparelhos Varian XL-300, 75,6 MHz em piridina deuterada contendo TMS como referencial interno, sendo os deslocamentos químicos expressos em valores de δ (ppm).

Os espectros dos compostos isolados são discutidos no capítulo III.

CAPÍTULO III

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - COMPOSTO HM-17A

Esta substância foi encontrada, após concentração da fração HMD-2, na forma de um sólido verde, de p.f. 231-33 °C, sendo codificada como HM-17A.

3.1.1 - DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE HM-17A

São apresentados na tabela 29

TABELA 29 - Dados espectrométricos de I.V., U.V., RMN¹H, RMN¹³C de HM-17A

Espectro	Bandas de Absorção
I.V. γ KBr cm ⁻¹ max.	3350, 2920, 1650, 1615, 1510, 1470, 1200, 830. (fig. 19, p. 131).
U.V. λ EtOH nm (log ξ) max.	251(4,41), 259(4,39), 297(4,02), 328 (3,81).
λ EtOH + AcONa max. nm	265, 330
λ EtOH + AlCl ₃ max. nm	265, 314, 375 (Fig. 18, p.130).

Continuação da Tabela 29.

Espectro	Deslocamentos químicos de H e C respec.
RMN^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ :	1,63(d, J=6 Hz), 4,36(1 H), 4,43(m, 1 H), 4,65 (dd, 1 H), 4,92 (dd, 1H) 6,10 (d, J=1,5 Hz, 1H), 6,59 (d, J=2,1 Hz, 1H), 6,67 (d, J=2,1 Hz, 1H) 8,35 (s, 1 H). (Fig. 21 e 21a, p.134 e 135).
RMN^{13}C (75,6 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)ppm:	18,7; 71,4; 71,9; 72,5; 73,7; 95,0; 100,1; 102,5; 106,3; 139,9 ; 147,5; 158,5; 163,3; 166,2; 178,3 (Fig. 20 e 20a, p.132 e 133).

3.1.2 - IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE HM-17A

Pela análise dos espectros de HM-17A pode ser observado que o espectro de RMN^{13}C mostra a estrutura de um açúcar ligado a um núcleo de 10 átomos de carbono. Este espectro permite também identificar o açúcar como ramnose. O espectro U.V. identifica a presença de hidroxilas nas posições 5 e 7. Pelo I.V. fica evidenciado um composto aromático com grupos OH e carbonila (de um sistema flavonóide). Enquanto que o espectro RMN^1H indica H em posição 2,6 e 8 e um grupo metila. Isto orientou a pesquisa para compostos derivados do grupo cromona. A análise mais detalhada dos espectros é realizada a seguir:

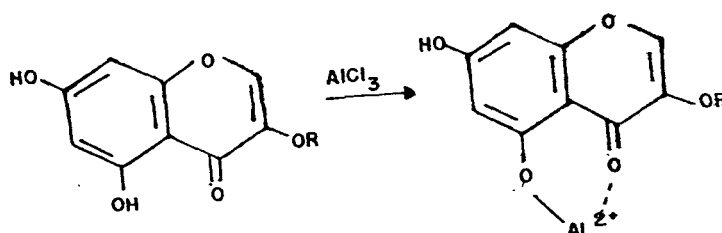
3.1.2.1 - ESPECTRO U.V. DE HM-17A

O espectro U.V. do HM-17A apresenta uma banda em 328 nm, que é característica de um sistema benzo-gama-pirona. As outras bandas são em 251 nm, 297 nm e 259 nm (ver figura 18).

Em presença de acetato de sódio a banda de 251 nm muda para 265 nm, ou seja, 14,0 nm, que corresponde a um composto com -OH em posição 7 (ver tabela 4, p.37)⁴⁶. A banda de 297nm muda até 330 nm, ou seja, 33 nm.

Em presença de AlCl_3 a banda de 328 nm muda para 375 nm, ou seja, 47 nm, que corresponde a compostos com -OH em posição 5 (ver tabela 6, p. 39). Isto ocorre devido a formação de um complexo, como pode ser observada na equação (2):

Equação (2) - Formação de complexo hidroxietônico em flavonóides em presença de AlCl_3 .



Concluimos que estamos na presença de um flavonóide com hidroxila nas posições 5 e 7 do anel A.

3.1.2.2 - ESPECTRO I.V. DE HM-17A

O espectro I.V. apresenta forte absorção na região de 3350 cm^{-1} correspondente a bandas de vibração de estira

ramento de ligação - OH. Uma banda em 1650 cm^{-1} é atribuída à carbonila de um sistema flavonóide¹⁰³. As bandas em 1615, 1510 e 1470 são características de anel aromático conjugadas a grupo carbonila (ver fig. 19).

3.1.2.3. - ESPECTRO RMN¹³C DE HM-17A

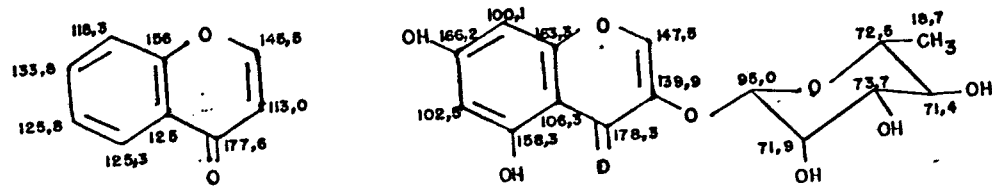
Numa análise preliminar do espectro de RMN¹³C deste composto (HM-17A) pode observar-se a presença de um monossacárido e de um núcleo flavonóide. Considerando também os espectros U.V. e I.V. supõe-se que o HM-17A seja uma estrutura tipo eucryfina.

O espectro RMN¹³C de HM-17A em piridina-d₅, é coerente com o espectro realizado por Tschesche, Sepúlveda, Delhvi e Breitmaier¹⁰¹ de eucryfina, em metanol deuterado (CD₃OD) (ver tabela 30 e figuras 20 e 20a).

TABELA 30 - Dados espectrométricos de RMN¹³C de HM-17A em piridina-d₅ e de Eucryfina em CD₃OD (δ)¹⁰¹.

	(Eucryfina) CD ₃ OD	(HM-17A) piridina-d ₅
C-2	148,0	147,5
C-3	140,5	139,9
C-4	179,0	178,3
C-5	159,4	158,5
C-6	102,7	102,5
C-7	166,1	166,2
C-8	100,1	100,1
C-9	163,6	163,3
C-10	106,5	106,3
C-1"	95,0	95,0
C-2"	71,7	71,9
C-3"	73,6	73,7
C-4"	71,3	71,4
C-5"	72,0	72,5
C-6"	18,0	18,7

Por outro lado, os sinais de 95,0; 71,9; 73,7; 71,4; 72,5 e 18,7 estão coerentes com a interpretação de dados publicados sobre α -L-ramnose¹⁰². Os outros sinais foram deduzidos por Sepúlveda¹⁰¹, considerando a cromona (33) como composto base do eucryfina (34) e os incrementos produzidos pela presença das hidroxilas do mesmo (fig. 16).



Cromona (33)

Eucryfina (34)

FIGURA 16 - Dados espectrométricos de RMN C^{13} de cromona e eucryfina.

3.1.2.4 - ESPECTRO RMN 1H DO HM-17A

O espectro de RMN de próton realizado em piridina- d_5 pode ser interpretado considerando a tabela 31 e figura 21 e 21a.

TABELA 31 - Deslocamentos químicos de tipos de próton de HM-17A em piridina- d_5

Deslocamento Químico (ppm)	Tipo de próton
1,63(d, J=6 Hz, 3 H)	de CH_3 de ramnose
4,36 (1 H)	de C-4" de ramnose
4,43 (m, 1 H)	de C-5" de ramnose
4,65 (dd, 1 H)	de C-3" de ramnose
4,92 (dd, 1 H)	de C-2" de ramnose
6,10 (d, J=1,5 Hz, 1 H)	de C-1" de ramnose
6,59 (d, J=2,1 Hz, 1 H)	de C-6 de ramnose
6,67 (d, J=2,1 Hz, 1 H)	de C-8 de ramnose
8,35 (s, 1 H)	de C-2 de ramnose

Existem diferenças claras com o espectro de RMN¹H realizado em CD₃OD por Sepúlveda¹⁰¹. O sinal de 1,63 ppm de metila de ramnose aparece em 1,25 ppm em CD₃OD, ou seja, existe uma mudança para campos mais baixos em piridina-d₅ e isto também é observado com os sinais de H de C-6, C-8 e C-2. Os hidrogênios de C-6 e C-8, relacionados por posição meta, aparecem, segundo Markan⁴⁶, como dubletes com um J=2,5 Hz, sendo coerente com o nosso caso, que apresentam um J=2,1 Hz (ver p.44'). O sinal de H de C-2 aparece em campos mais baixos (8,35 ppm) que o H de C-3 de flavonas (6,35 ppm). O sinal de H de C-1'' em 6,10 ppm está em campos mais baixos que os correspondentes a flavonol-3-O-ramnosídeo (5,0-5,1 ppm) como TMS-éteres em CCl₄ (ver fig. 17 e p.129)⁴⁵.

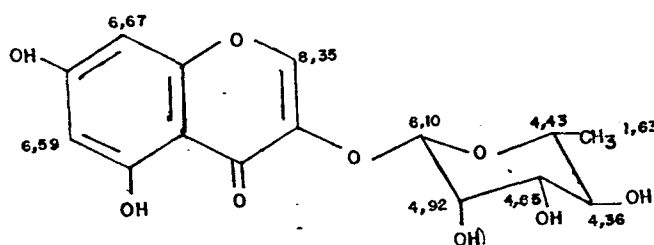


FIGURA 17 - Dados espectrométricos de RMN¹H de HM-17A

3.1.2.5 - COMPARAÇÃO DE HM-17A COM UMA AMOSTRA DE EUCRYFINA

Finalmente a amostra foi cromatografada em CCD junto com outra enviada pelo professor Sepúlveda¹⁰¹, mostrando o mesmo R_f, usando diferentes sistemas de solventes. O ponto de fusão da mistura forneceu o mesmo valor do composto original: 231-233°C.

Por estas razões, este composto está claramente identificado como eucryfina.

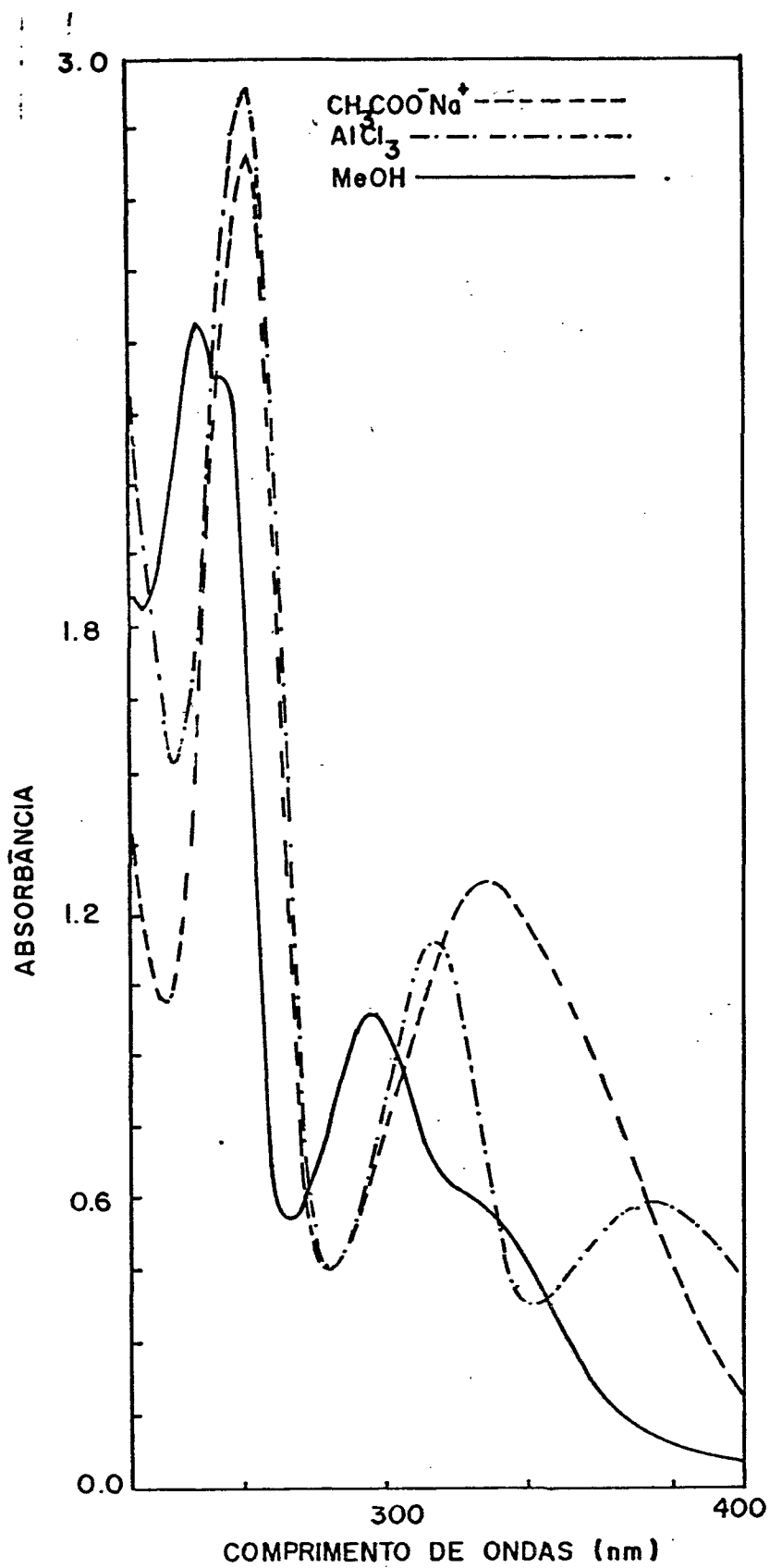


FIGURA 18 - Espectro U.V. (EtOH) de Eucryfina (5,7-dihidroxi-3 (α -O-L-ramnopiranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).

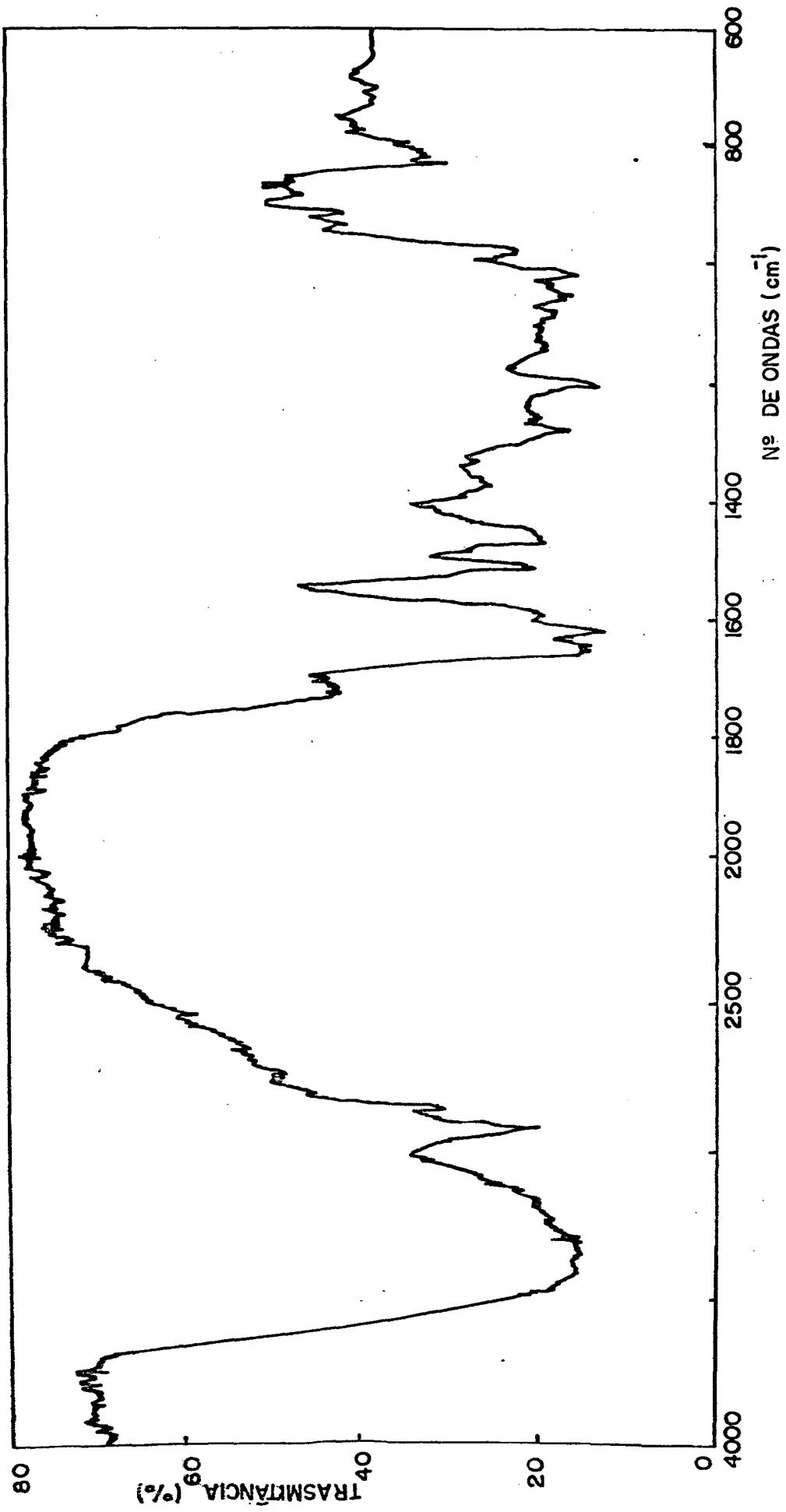


FIGURA 19 - Espectro I.V. (KBr) de eucryfina (5,7-dihidroxi-3(α -O-L-ramnopyranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A)

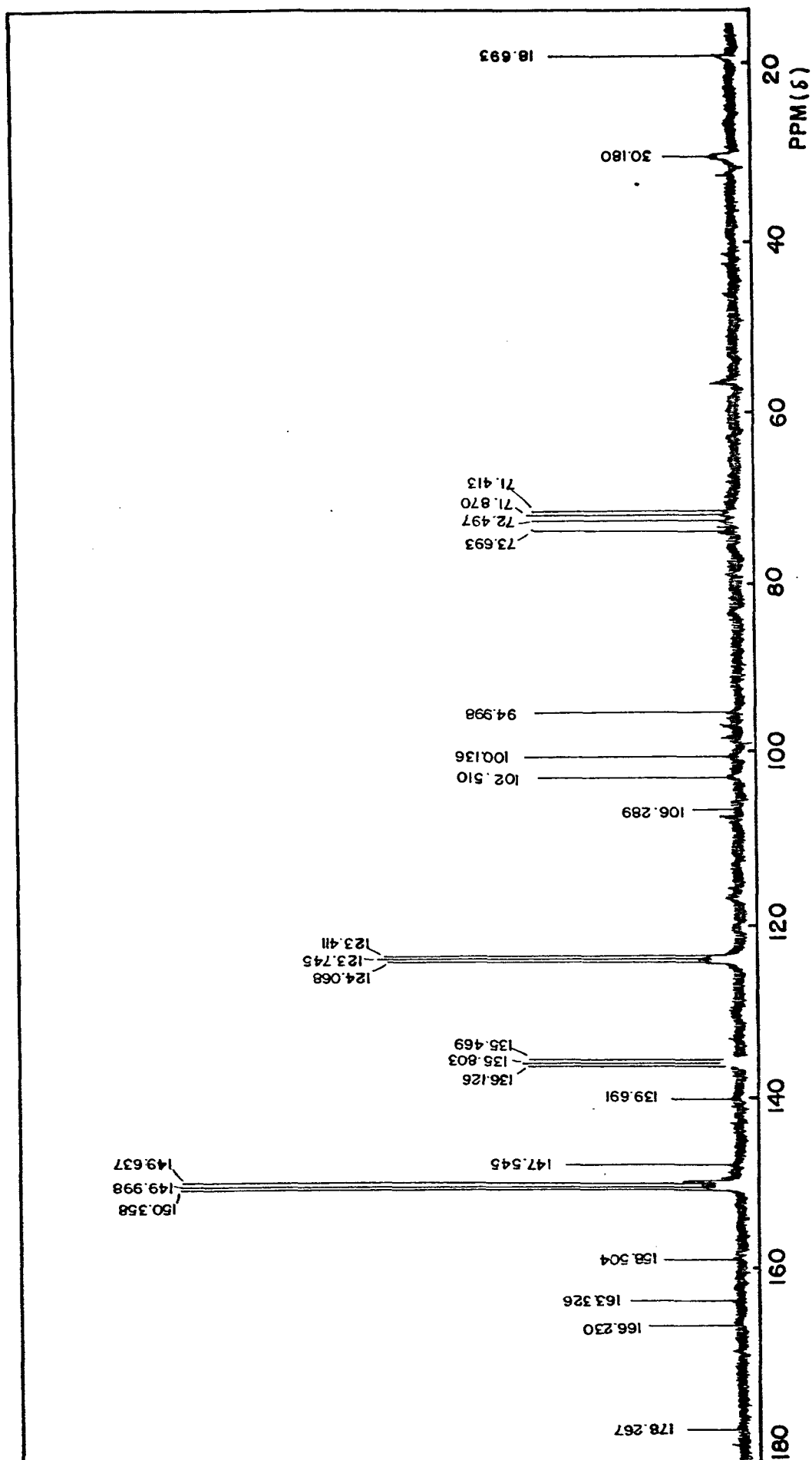


FIGURA 20 - Espectro RMN¹³C (75,6 MHz, C₅D₅N) de eucryfina (5,7-dihidroxi-3--(α -0-L-ramnopiranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).

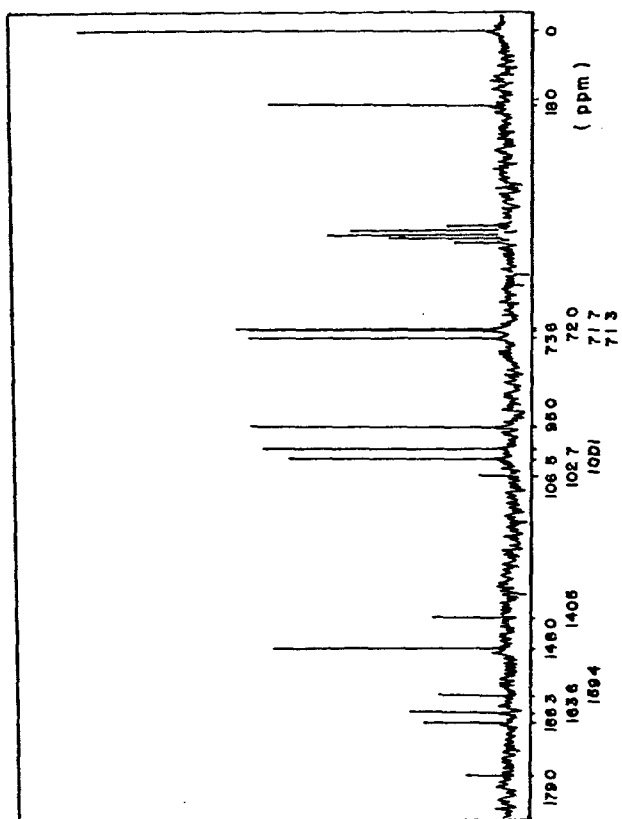


FIGURA 20a - Espectro RMN ^{13}C (22,63 MHz, CD_3OD) de eucryfina (5,7-dihidroxi-3-(α -O-L-rannopiranosil)-4H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A)

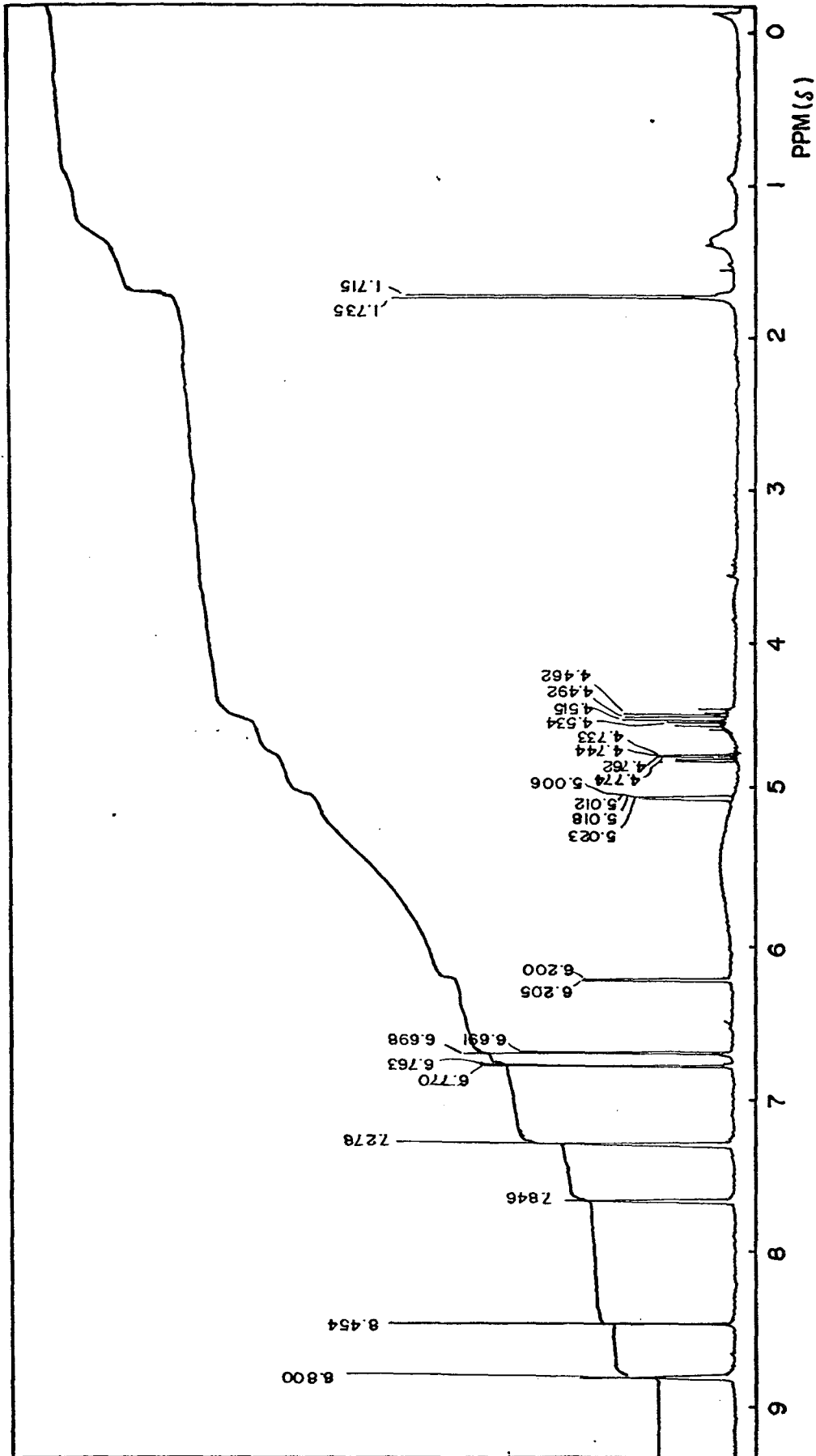


FIGURA 21 - Espectro RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N) de Eucryfina (5,7-dihidroxi-3-(α -O-L-ramnopyranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).

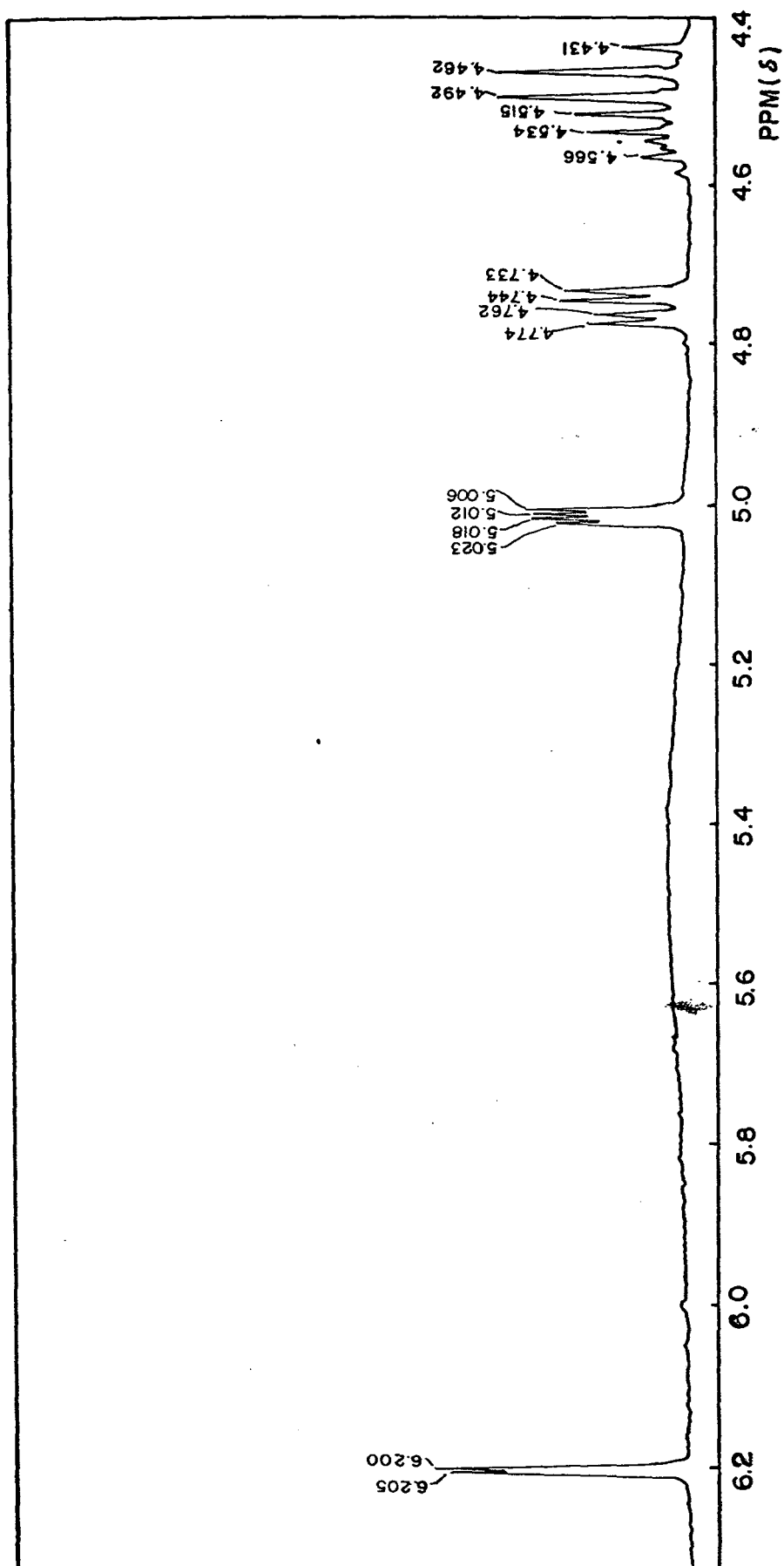


FIGURA 21a - Espectro RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N) de Eucryfina (5,7-dihidroxi-3-(α -O-L-rhamnopyranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1) (HM-17A).

3.2 - COMPOSTO HM-17C

Este composto foi isolado da fração HMD-6, apresentando-se como um sólido amarelo de p.f. 183 °C e sendo codificado como HM-17C.

3.2.1 - DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE HM-17C

São apresentados na tabela 32

TABELA 32 - Dados espectrométricos de I.V., U.V., RMN¹H, RMN¹³C de HM-17C

Espectro	Bandas de Absorção
I.V. ν KBr cm^{-1}	3420, 2940, 1640, 1600, 1520, 1470, 1360
max.	1290, 1260, 1170, 1110, 1080, 1060, 1030 e 815 (Fig. 25 e 25a, p.149 e 150).
U.V. λ EtOH nm (log ϵ)	290 (4,27), 330(3,43).
max	
λ EtOH + AcONa	
max. nm	290, 326, 9
λ EtOH + AcONa + H ₃ BO ₃	
max. nm	292, 330
λ EtOH + AlCl ₃	
max nm	316, 2, 365
λ EtOH + AlCl ₃ + HCl	
max. nm	313, 367

(Fig. 24 e 24a, p.147 e 148).

Continuação da Tabela 32.

Espectro	Delocamentos químicos de H e C respectiv.
RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) δ :	1,70(d,J=6 Hz, 3H), 4,31(1 H), 4,46 (1 H), 4,63 (1 H), 5,0 (1 H), 5,1 (1 H), 5,15 (d,J=10,8 Hz, 1 H),5,45 (d,J=10,8 Hz, 1H), 6,34 (d,J=1,5 Hz, 1 H), 6,46 (d,J=1,5 Hz, 1 H), 7,21 (2 H), 7,64 (2 H).
	(Fig. 27, p. 153)
RMN ¹³ C(75,6MHz,C ₅ D ₅ N)ppm:	18,9; 70,9; 72,0; 72,9; 74,2; 77,4; 83,6; 96,5; 97,7; 102,4; 102,5;116, 7; 116,7, 120,1; 128,6; 147,7; 148, 4; 163,7; 165,4; 169,0; 195,8.
	(Fig. 26 e 26a, p. 151 e 152).

3.2.2 - IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE HM-17C

A análise dos espectros deste composto evidenciam pelo U.V. a presença de um dihidroflavonol ou flavanona com hidroxilas em posição 5 e 7. O espectro de RMN¹³C verifica que se trata de um dihidroflavonol com hidroxilas em posições 5,7,3' e 4' e um açúcar (ramnose) ligado ao mesmo . O I.V. mostra um composto aromático com grupos hidroxila e carbonila (de um sistema flavonóide). O espectro RMN¹H identifica H em posição 2,3,6,8 e 2',5',6' e ainda um grupo metila. Com estes dados se procurou pesquisar dihidroflavonóis com açúcares ligados aos mesmos, ou se -

ja, flavonóides glicosídeos. A seguir os espectros serão discutidos detalhadamente.

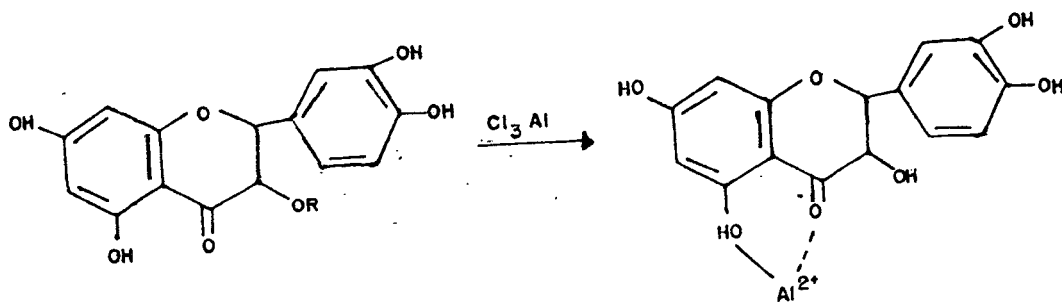
3.2.2.1 - ESPECTROS U.V. de HM-17C

O espectro U.V. do composto, realizado em metanol, apresenta uma banda em 290 nm e um ombro em 330 nm. (Ver figura 24 e 24a).

Quando é adicionado acetato de sódio a banda de 290 nm (Banda II) muda até 326,9 nm, o que significa uma mudança de 36,9 nm, o que corresponderia a um dihidroflavonol ou uma flavona com hidroxilas em posição 5 e 7 do anel A (ver tabela 4, p. 37)⁴⁶.

Adicionando ácido bórico a banda de 290 nm não muda, indicando assim, a inexistência de o-diOH do anel A (ver tabela 5, p. 38).

Adicionando tricloreto de alumínio, a banda 290 nm muda para 316,2 nm, ou seja, 26,1 nm, que corresponde a flavanonas ou dihidroflavonóis com -OH em posição 5 (tabela 6, p.). Quando se adiciona tricloreto de alumínio e ácido clorídico, o espectro não muda com relação com tricloreto de alumínio. A mudança com tricloreto de alumínio pode-se explicar pela formação de um complexo hidroxicetônico: (equação 3):



Equação 3: formação de complexo hidroxicetônico em flavonóides em AlCl_3 .

Esta análise permite concluir que o composto em estudo (HM-17C), é um dihidroflavonol ou uma flavanona com grupos hidroxila em posição 5 e 7 do anel A.

3.2.2.2 - ESPECTRO I.V. DE HM-17C

O espectro I.V. evidencia a presença de uma absorção larga e intensa, que corresponde a uma banda de vibração de estiramento de ligação OH em 3420 cm^{-1} . Uma banda em 1640 cm^{-1} é atribuída a carbonila de um sistema flavonóide¹⁰¹. As bandas em 1600 , 1520 e 1470 cm^{-1} são características de anel aromático conjugado a um grupo carbonila (ver figura 25 e 25a).

3.2.2.3 - ESPECTRO RMN¹³C DE HM-17C

A ressonância magnética nuclear de C^{13} permite caracterizar em grande parte os flavonóides (ver p. 50).

O espectro de RMN de C^{13} do composto (HM-17C) realizado em piridina deuterada (ver figura 26 e 26a), mostra os picos do C-2, C-3 e C-4 em 83,6, 77,4 e 195,8 ppm respectivamente, o que claramente indicam tratar-se de um dihidroflavonol¹⁰⁴.

segundo a análise de Agrawal e colaboradores¹⁰⁴. O pico de C-3 que aparece em 71,7 ppm em dihidroflavonóis, muda para campos mais baixos=77,4 ppm pela presença de ramnose.

Os valores dos picos de C-5, C-7 e C-9 em 165,4, 169 e 163,7 ppm confirmam a presença de hidroxila em posição 5 e 7. Neste caso o valor que corresponde a C-7 sempre está em campos mais baixos que os de C-5 e C-9¹⁰⁵. Os picos de C-6 e C-8 que aparecem entre 90-100 ppm estão presentes em 97,7 e 96,5 ppm, sendo que o correspondente ao C-6 em campos mais baixos.

Os picos do anel B aparecem entre 110-150 ppm e os valores indicam a presença de grupos hidroxila em C-3' e C-4'.

Comparando os valores correspondentes a dihidroflavonóis com hidroxilas em posição 5,7,3' e 4' da literatura (106) com os do composto (HM-17C) observamos um total paralelismo, como se observa na tabela 33.

TABELA 33 - Dados espectrométricos de RMN¹³C de dihidroflavonóis
5,7,3',4'(OH)₄ (Dihidroquercitina) e o composto (HM-17C) (δ)

Carbonos	<u>Dihidroquercitina</u>	<u>HM-17C</u>
2	83,1	83,6
3	71,7	77,4
4	197,1	195,8
5	163,3	165,4
6	96,1	97,7
7	166,8	169,0
8	95,1	96,5
9	162,5	163,7
10	100,6	102,4
1'	128,9	128,6
2'	115,3	116,7
3'	144,9	148,4
4'	145,7	147,7
5'	115,3	116,7
6'	119,2	120,1
1''		102,5
2''		72,0
3''		74,2
4''		70,9
5''		72,9
6''		18,9

Os valores de C-5, C-7 e C-9 são coerentes com a literatura e apresentam o valor de C-7 em 169 ppm em campos mais baixos, depois C-5 em 165,4 ppm e em campos mais altos C-9 em 163,7 ppm. C-6 e C-8 apresentam valores que correlacionam perfeitamente. C-3' e C-4' apresentam valores de 148,4 e 147,7 ppm, que correspondem a C oxigenados com posição orto ou para oxigenada (ver tabela 14, pag. 51). Os picos de 116,7 ppm correspondem a carbonos não oxigenados com carbonos oxigenados em posição orto ou para (90-125 ppm) (ver tabela 14, pag. 51). Os picos restantes correspondem a C-1 e C-6'.

O pico em 18,9 ppm indica a presença de um grupo metila, que deve corresponder ao de uma ramnose. Os outros valores confirmam a presença de uma ramnose em posição 3, que segundo Mar⁴⁶khan, deve apresentar bandas em 101,9; 70,4; 70,6; 71,5; 70,1; 17,3 ppm (tabela 17).

Desta forma a interpretação pode ser feita como na figura 22

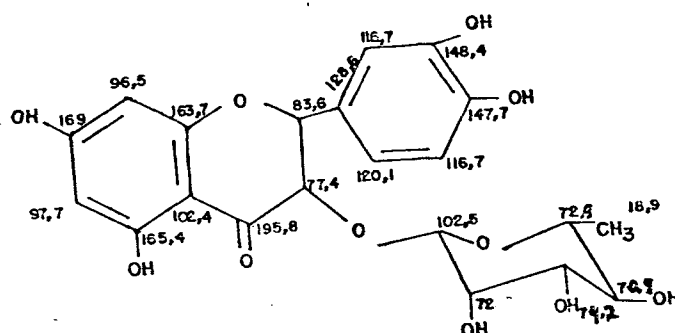


FIGURA 22 - Dados espectrométricos de RMN¹³C de HM-17C.

O espectro de RMN e C¹³ do HM-17C hexaacetilado

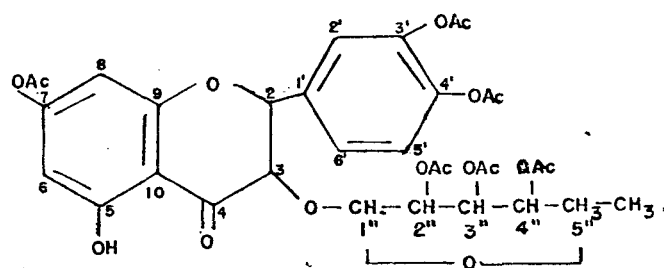
foi realizado em clorofórmio deuterado. A hidroxila em posição 5, que deve estar quelada com o oxigênio carbonílico, não foi acetilada. A interpretação do espectro está indicado na tabela 34 e figura 26a.

TABELA 34 - Dados espectrométricos de RMN¹³C de HM-17C hexacetilado em CDCl₃ (δ)

Carbonos

HM-17C Hexaacetilado

2	81,1
3	79,0
4	186,4
5	151,9
6	106,2
7	162,9
8	101,8
9	163,7
10	106,4
1'	134,7
2'	121,8
3'	142,7
4'	142,3
5'	124,0
6'	125,6
1''	98,5
2''	70,7
3''	69,3
4''	68,6
5''	67,3
6''	17,1(CH ₃ de ramnose)
6C=O de acetato	170,3 x 2; 170,1; 169,9; 168,4; 168,1
6 CH ₃ de acetato	21,1; 20,8; 20,7; 20,6. x 2; 20,5.



3.2.2.4 - ESPECTRO RMN¹H DE HM-17C

Finalmente o espectro de ressonância magnética nuclear de próton, confirma a identificação até agora realizada do HM-17C. O espectro foi realizado em piridina deuterada e os deslocamentos químicos dos prótons relacionados na tabela 35 (ver figura 27).

TABELA 35 - Deslocamentos químicos de tipos de prótons de HM-17C em piridina-d₅.

Deslocamento químico (ppm)	Tipo de próton
1,70 (d, J=6 Hz, 3 H)	de CH ₃ de ramnose
4,31 (1 H)	de C-5" de ramnose
4,46 (1 H)	de C-4" " "
4,63 (1 H)	de C-3" " "
5,0 (1 H)	de C-2" " "
5,1 (1 H)	de C-1" " "
5,15 (d, J=10,8 Hz, 1 H)	de C-3
5,45 (d, J=10,8 Hz, 1 H)	de C-2
6,34 (d, J=1,5 Hz, 1 H)	de C-8
6,46 (d, J=1,5 Hz, 1 H)	de C-6
7,21 (2 H)	de C-5' e C-6' misturado c/ piridina
7,64 (2 H)	de C-2' e C-6'

Segundo a tabela 13, pag. 45, em dihidroflavonóis os prótons do C-2 e C-3 estão relacionados trans-diaxialmen

te, aparecendo como dubletes com um $J=11$ Hz, sendo portanto coerente com o nosso caso, que apresentam um $J=10,8$ Hz. Em dihidroflavonóis 3-O-glicosídeos, o sinal de C-2 aparece em 5,0-5,6 ppm e o de C-3 em 4,3-4,6 ppm. Neste composto em estudo o próton de C-2 (5,45 ppm) é perfeitamente coerente com o valor esperado, enquanto que o sinal de C-3 aparece em campos mais baixos (5,15 ppm) que o correspondente.

Os H do C-6 e C-8 estão meta acoplados e aparecem segundo a tabela 9, pag. 44⁴⁵, como dubletes com um $J=2,5$ Hz e neste composto apresentam um $J=1,5$ Hz. Os sinais de C-2' C-6' em 7,64 ppm, concordam com os valores da pág. , para 3',4'-di-hidroxiflavonóides em 7,2-7,9 ppm (ver fig. 23).

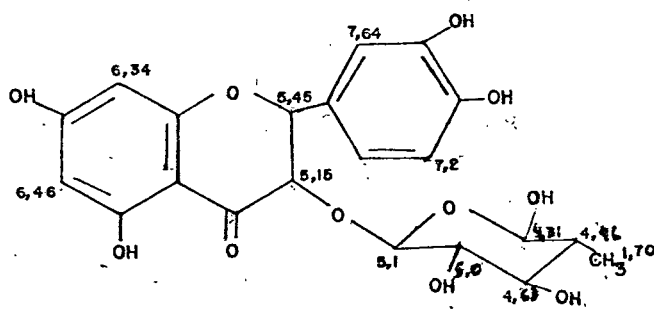


FIGURA 23 - Dados espectrométricos de RMN¹H de HM-17C.

3.2.2.5 - PONTO DE FUSÃO

O ponto de fusão apresentado por HM-17C foi de 183 °C (Astilbina:lit. 181-183 °C)¹⁰¹.

Com todos estes dados, o composto em estudo (HM-17C), fica decididamente identificado como sendo Astilbina.

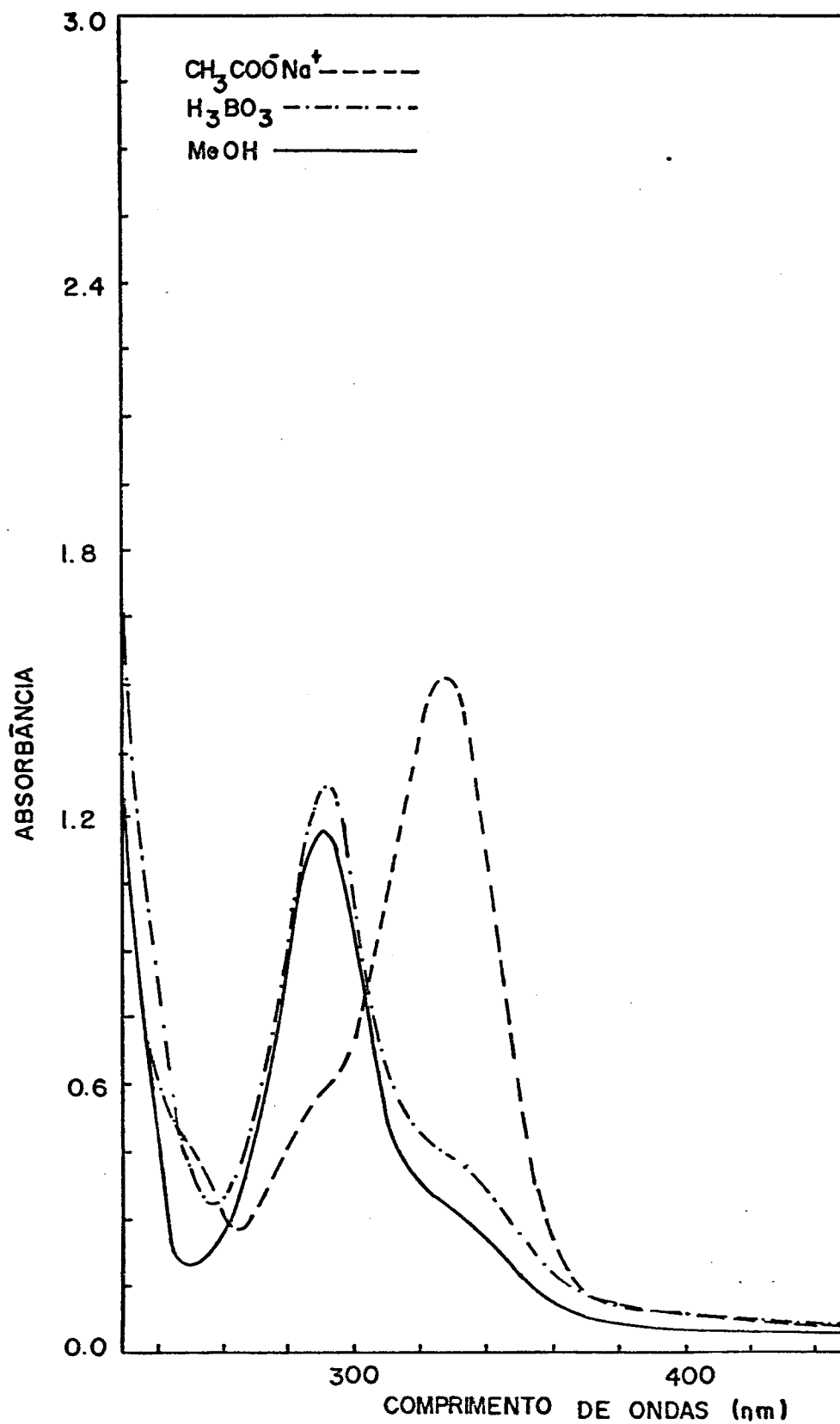


FIGURA 24- Espectro U.V. (EtOH) de Astilbina(3-O- α -L-ramnosídeo de dihidroquercitina) (HM-17C)

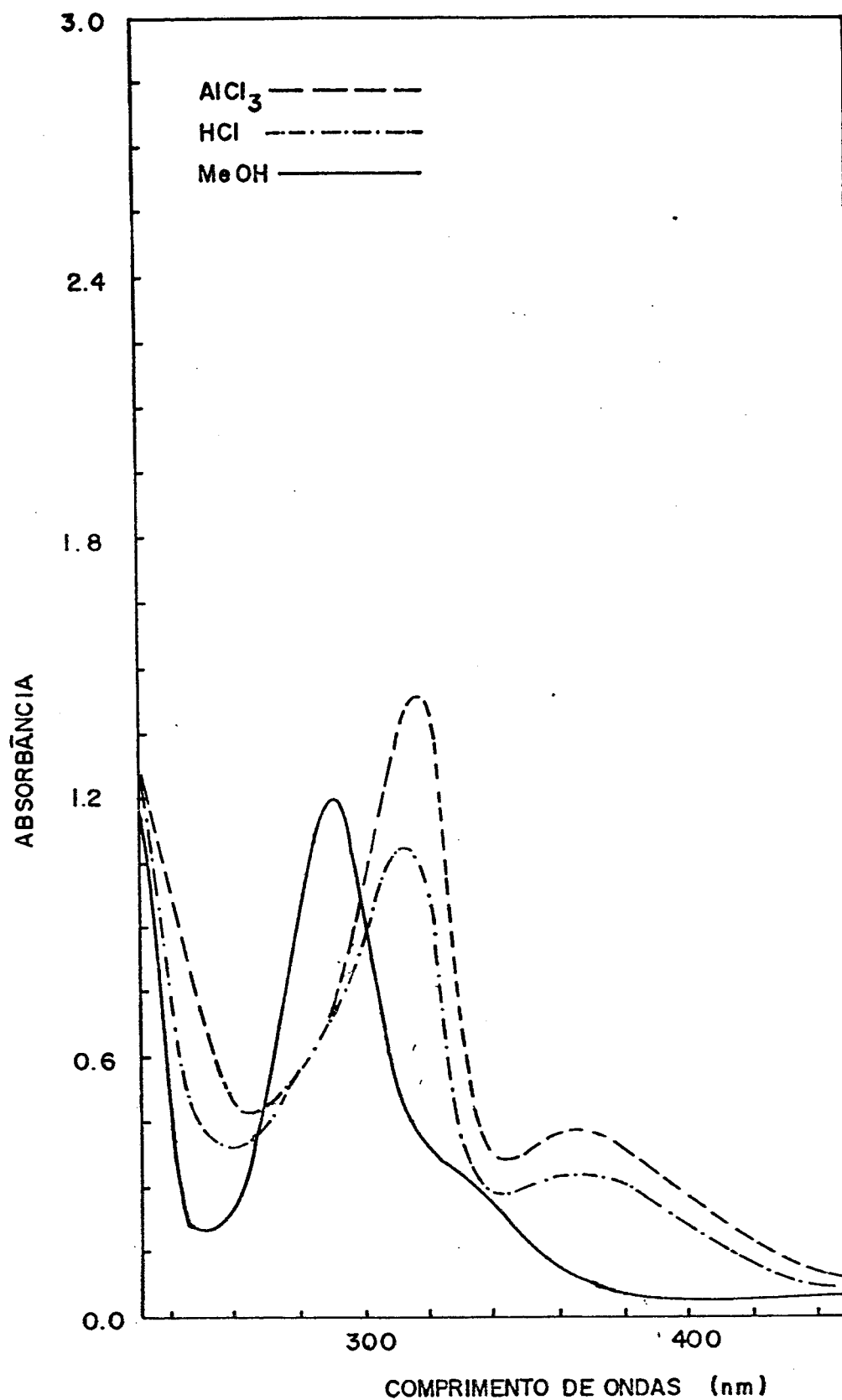


FIGURA 24a - Espectro U.V. (EtOH) de Astilbina (3-O- α -L-ramno-sídeo de dihidroquercitina) (HM-17C).

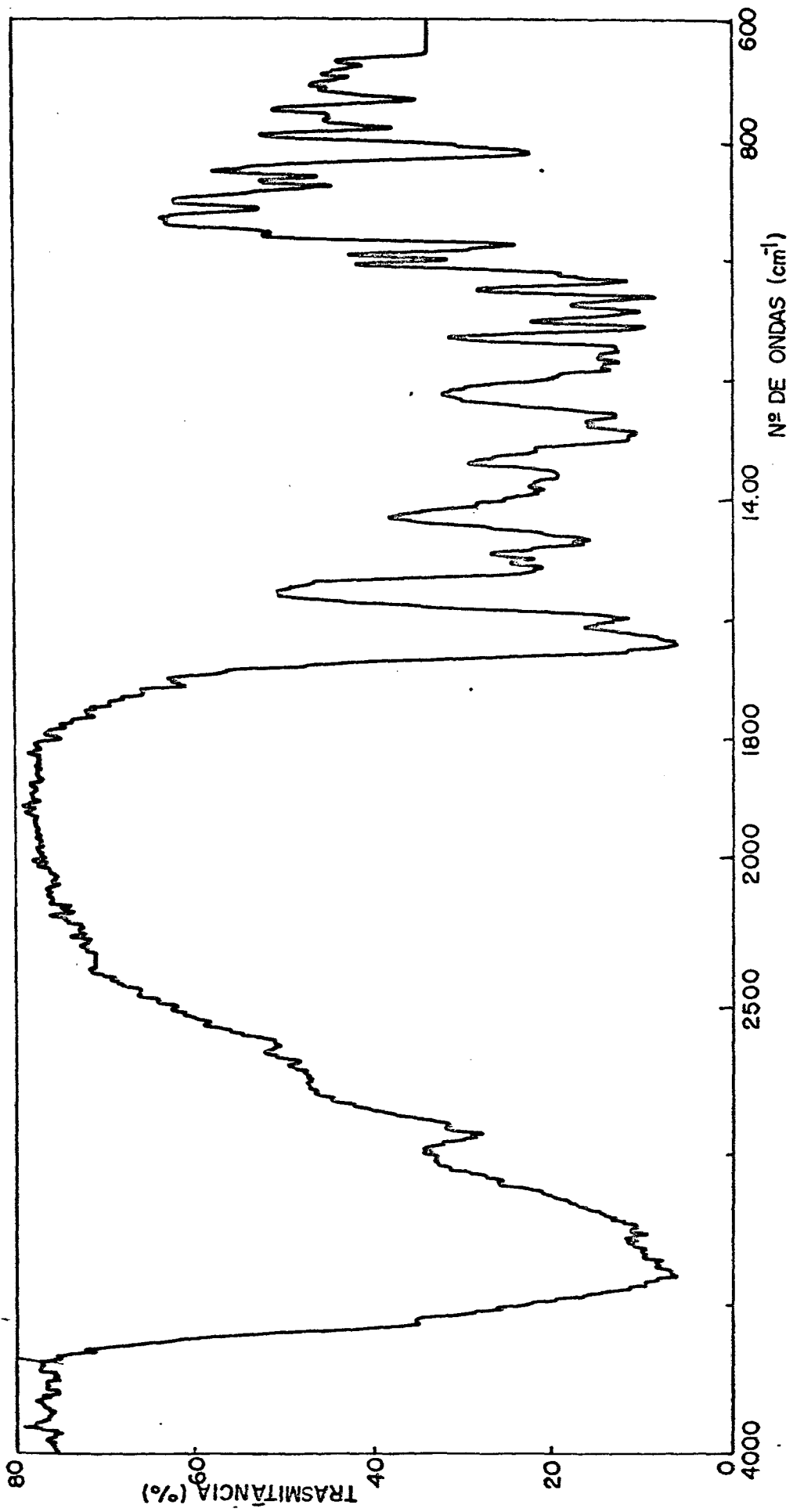


FIGURA 25 - Espectro I.V. (KBr) de Astilbina(3-O- α -L-ramnosideo de dihidroquercitina) (HM-17C). 149

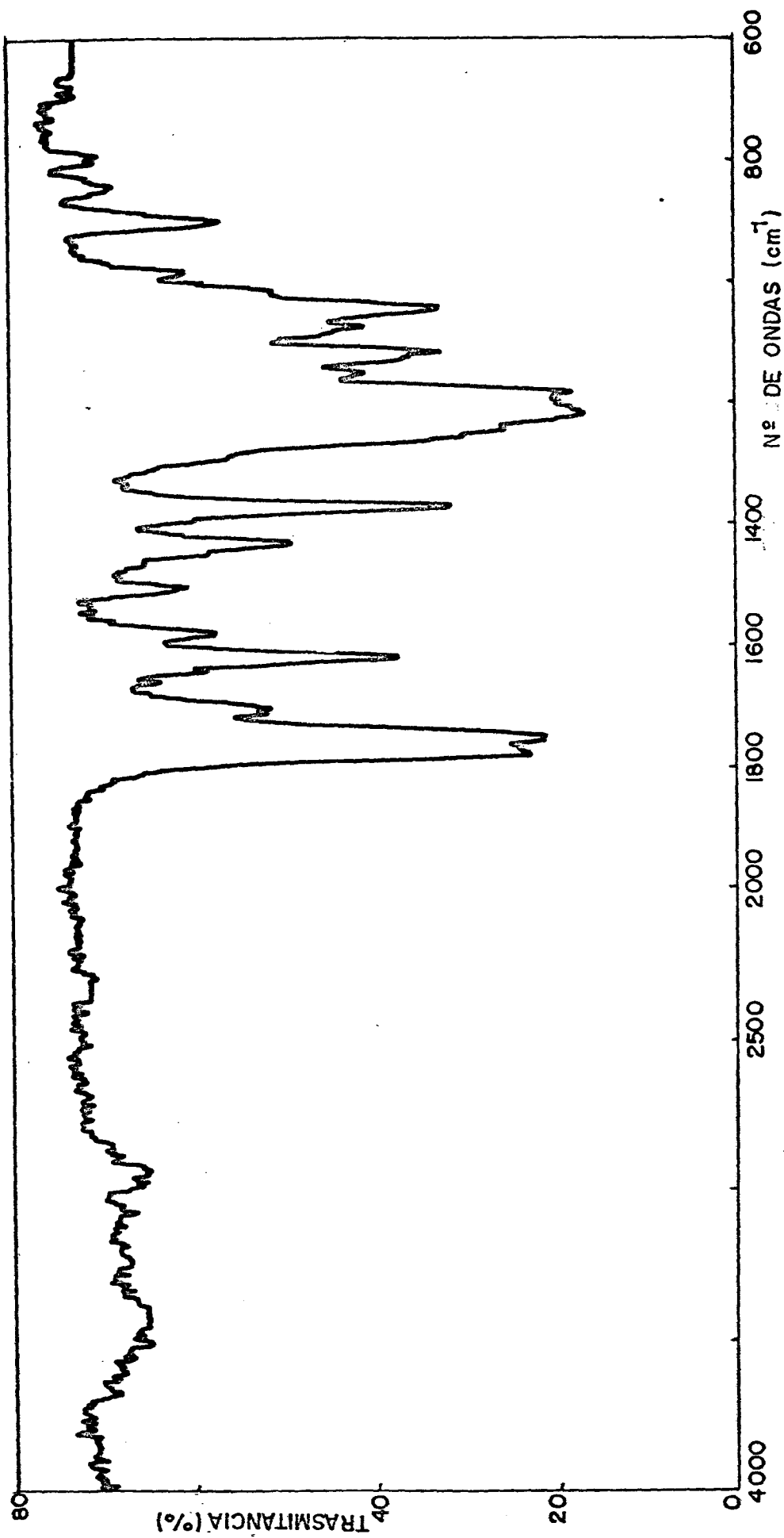


FIGURA 25a - Espectro I.V. (KBr) de Astilbina acetilada (3-O- α -L-ramnosido de dihidroquercetina) acetilada (HM-17C acetilada).

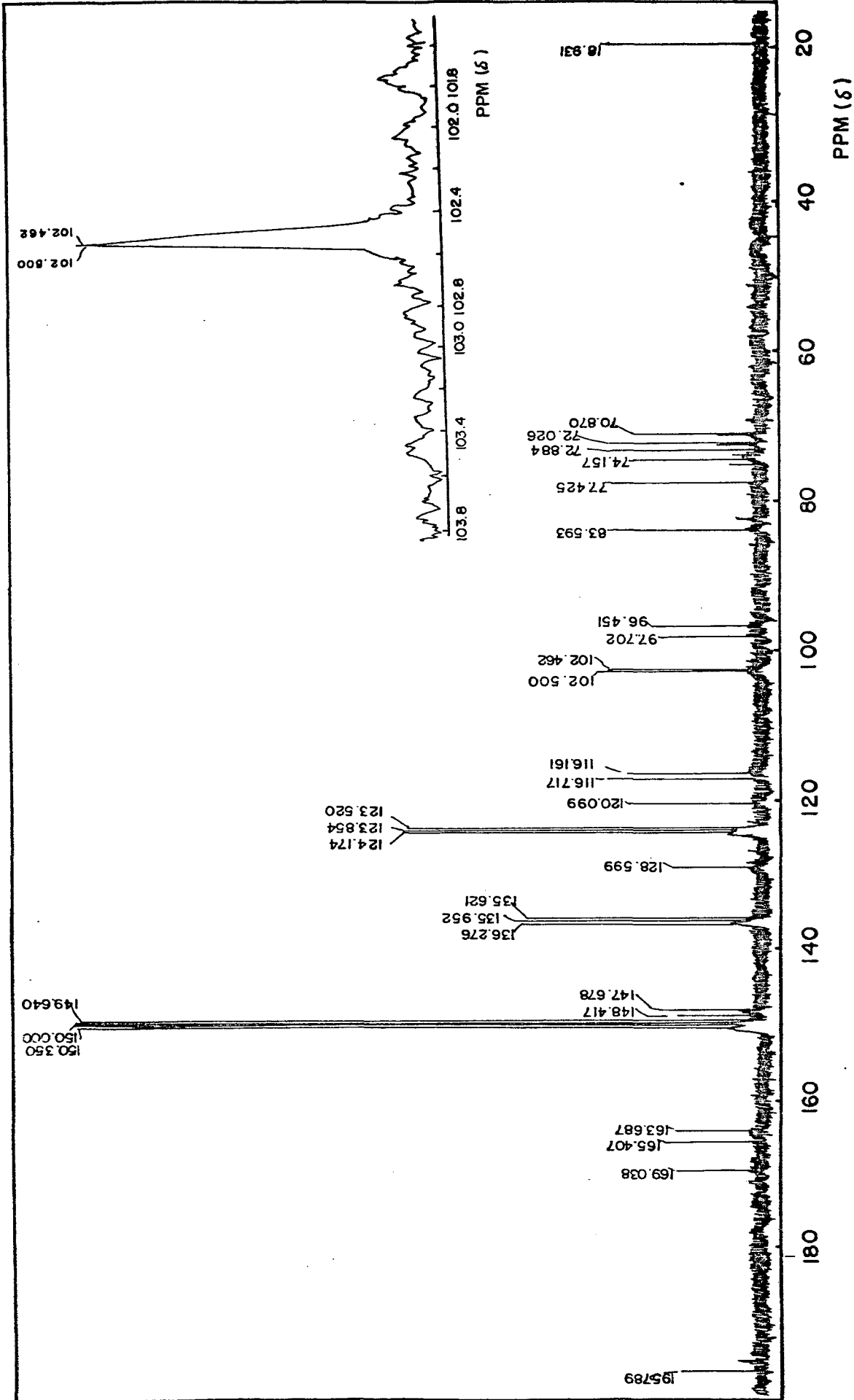


FIGURA 26 - Espectro RMN¹³C (75,6 HMz, C₅D₅N) de Astilbina(3-O- α -L-ramnosídeo de dihidroquercitina) (HM-17C).

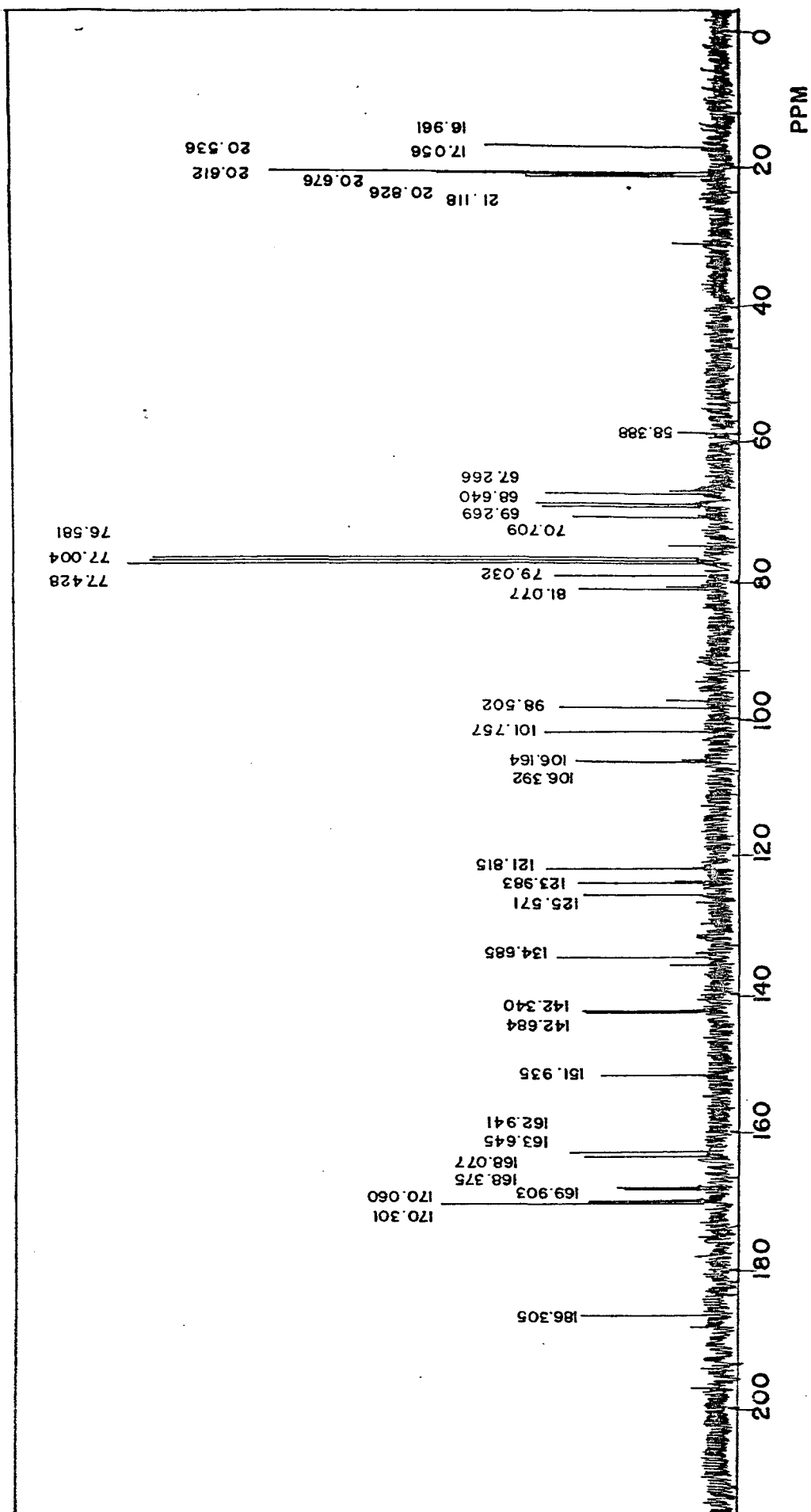


FIGURA 26a - Espectro RMN¹³C (75,6 MHz, CDCl₃) de Astilbina hexacetilada (3-O-α-L-ranosídeo de dihidroquercitina hexacetilado) (HM-17C).

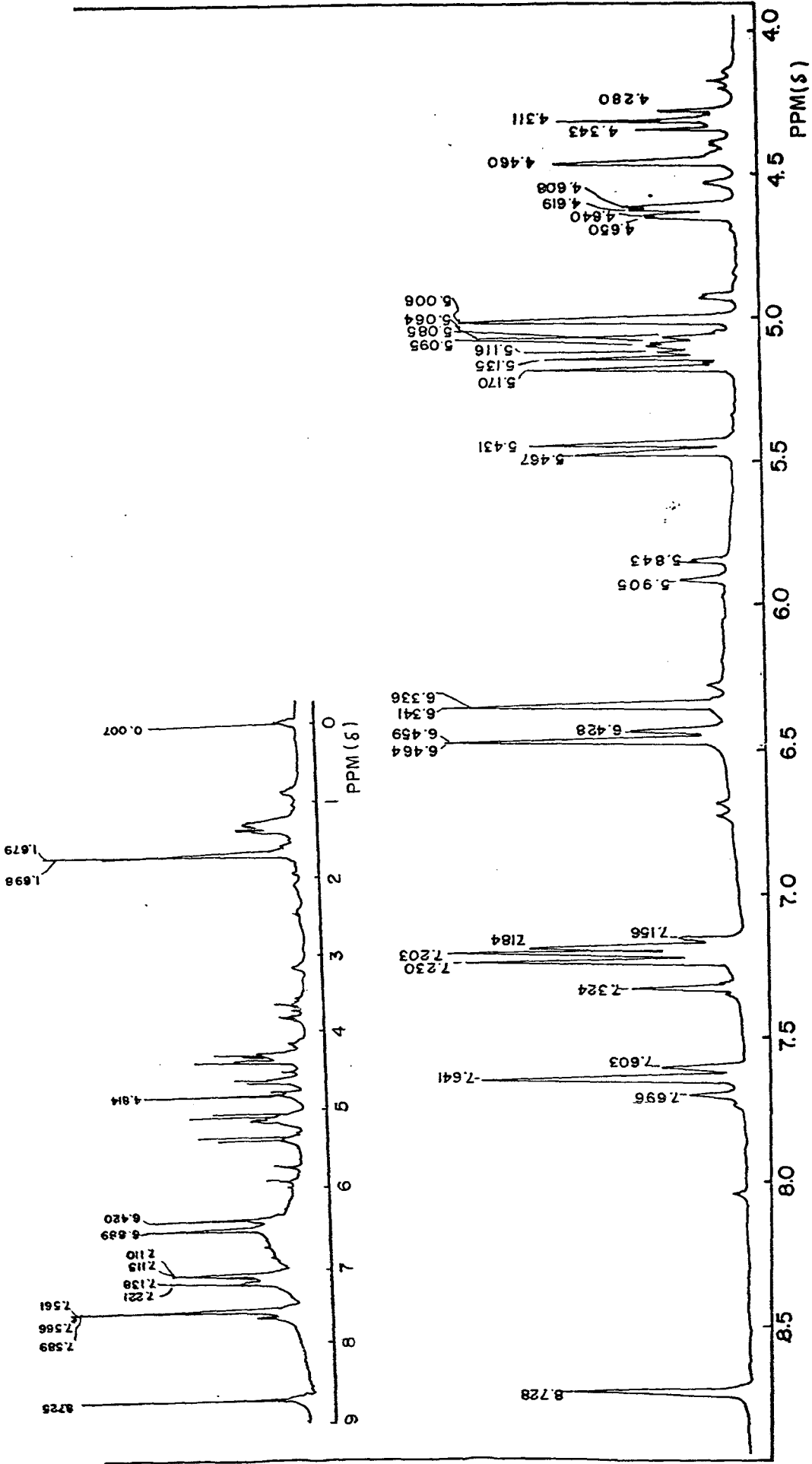


FIGURA 27 - Espectro RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N) de Astilbina(3-O- α -L-ranmosídeo de dihidroquercitina) (HM-17C).

3.3 - COMPOSTO HM-17B

Este composto foi obtido após concentração da fração H-3, sob a forma de um sólido amarelo de p.f. 173-75 °C. A substância foi codificada como HM-17B.

3.3.1 - DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE HM-17B

São apresentados na tabela 36

TABELA 36 - Dados espectrométricos de I.V., U.V., RMN¹H, RMN¹³C de HM-17B

Espectro	Bandas de absorção
I.V. γ KBr cm ⁻¹ max.	3350, 1630, 1510, 1460, 1370, 1260, 1160, 800 .
(Fig. 31, p.165).	
U.V. λ MeOH nm max	292
λ MeOH + NaOMe max. nm	328
λ MeOH + NaOMe + AcONa max. nm	329
λ MeOH + AlCl ₃ max. nm	315
λ MeOH + AlCl ₃ + HCl max. nm	315
(Fig. 30 e 30a, p.163 e 164).	

Continuação da Tabela 36.

Espectro	Deslocamentos químicos de H e C respec.
RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) δ :	1,68(d, J=6 Hz, 3 H), 4,29 (1 H), 4,38 (1 H), 4,63 (1 H), 4,81 (1 H), 5,14 (1 H), 5,06 (d, J=10,8, Hz, 1 H), 5,37 (d, J=10,8 Hz, 1 H), 6,42 (1 H), 6,54 (1 H), 7,12 (dd, J=7,0 Hz, 2 H), 7,57 (dd, J=7,0 Hz, 2H).
	(Fig. 33 e 33a, p.167 e 168).
RMN ¹³ C (75,6 MHz, C ₅ D ₅ N) ppm:	18,83; 70,7; 71,9; 72,7; 74,1; 77,7; 83,2; 97,6; 98,6; 101,6; 102,4; 116,5; 116,5; 128,0; 129,9; 129,9; 159,8; 161,0; 163,6; 165,6; 194,6.
	(Fig. 32, p.166).

3.3.2 - IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE HM-17B

Este composto analisado por espectro de RMN¹³C por comparação com astilbina e naringenina, evidenciou um composto da classe desse último, ou seja, um dihidroflavonol com hidroxilas em posições 5,7 e 4' e um açúcar (ramnose) ligado a este, como ocorre também com a astilbina. Em espectro RMN¹H identifica-se a presença de prótons em posição 2,3,6,8 e 2',3',5',6' e um grupo de metila. Pelo I.V. temos um composto aromático com grupos hidroxila e carbonila (de um flavonóide) como também foi observado

com eucryfina e astilbina. A análise mais detahada dos espectros é apresentada a seguir:

3.3.2.1 - ESPECTRO U.V. DE HM-17B

O espectro U.V. deste composto, realizado em metanol, apresentou uma banda de absorção em 292 nm, corresponde a banda II (ver fig. 30 e 30a).

Quando é adicionado metóxido de sódio, a banda II muda de 292 nm até 328 nm, ou seja, 36 nm, que corresponde a uma flavanona ou dihidroflavonol com hidroxilas em posição 5 e 7 (ver tabela 7. p. 41)⁴⁶.

A adição de acetato de sódio causa uma mudança na banda II de 292 nm até 329 nm, que significa uma mudança de 37 nm, correspondente a uma flavona ou dihidroflavonol com grupo OH em posição 7 (com 5-OH) (ver tabela 4, p.)⁴⁶.

Adicionando tricloreto de alumínio, a banda 292 nm, muda para 315 nm, ou seja, 23 nm, que corresponde a flavanonas ou dihidroxiflavonóis com grupo OH em posição 5 (tabela 6, pag. 39). Quando se adiciona tricloreto de alumínio e ácido clorídico, o espectro não muda em relação ao com tricloreto de alumínio. A mudança com Cl_3Al se pode explicar pela formação de um complexo hidroxicetônico como no caso da astilbina.

Com esta análise pode-se dizer que o composto em estudo (HM-17B) é um dihidroflavonol ou uma flavanona com grupos hidroxila em posição 5 e 7 do anel A.

3.3.2.2 - ESPECTRO I.V. DE HM-17B

O espectro I.V. evidencia: presença de uma absorção larga e intensa correspondente a um estiramento de ligação OH em 3350 cm^{-1} ; um estiramento de C=O em 1630 cm^{-1} , correspondente a uma carbonila de um flavonóide¹⁰¹; bandas do anel aromático conjugado a grupo carbonila em 1510, 1460, 1370 cm^{-1} (ver fig. 31).

3.3.2.3 - ESPECTRO RMN¹³C DE HM-17B

Podemos observar na figura 32, o espectro de ressonância magnética nuclear realizado em piridina deutrada.

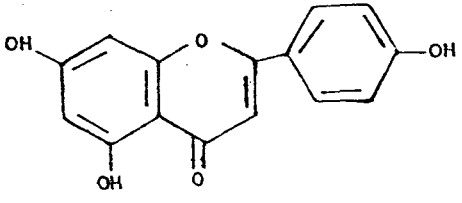
O espectro de RMN¹³C usando a técnica de APT¹⁰⁷ define a multiplicidade de cada átomo de carbono (ver tab. 37).

TABELA 37 - Dados espectrométricos de RMN¹³C de HM-17B em piridina-d₅ (δ).

C	CH
194,7	129,8 x 2
165,6	116,5 x 2
163,6	102,4
161,0	98,5
159,8	97,6
128,0	83,1
101,6	77,6
	74,1
	72,7
	71,9
	70,7

Comparados os valores da tabela 38 com os espectros de narigenina e de astilbina, podemos observar, analisar e interpretar os mesmos.

TABELA 38 - Dados espectrométricos de RMN¹³C de HM-17B, Astilbina e Naringenina (δ).

Carbonos	HM-17B	Astilbina	Naringenina ⁷⁶
2	83,2	83,6	78,2
3	77,7	77,4	42,0
4	194,6	195,8	195,6
5	163,6	165,4	163,3
6	98,5	97,7	95,8
7	165,6	169,0	166,4
8	97,6	96,5	94,9
9	161,0	163,7	162,7
10	101,6	102,4	101,9
1'	128,0	128,6	128,9
2'	129,9	116,7	127,6
3'	116,5	148,4	115,1
4'	159,8	147,7	157,4
5'	116,5	116,7	115,1
6'	129,9	120,1	127,6
1''	102,4	102,5	naringenina
2''	71,9	72,0	
3''	74,1	74,2	
4''	70,7	70,9	
5''	72,7	72,9	
6''	18,83	18,83	

Na tabela 38, observa-se que o anel B (C-1' a C-6') de HM-17B, apresenta picos semelhantes a Naringenina, que tem somente um grupo hidroxila em posição 4'. Todos os outros picos são totalmente semelhantes a Astilbina.

O pico de 159,8 ppm, corresponde a C oxigenado sem oxigenação em posição orto ou para, segundo a tabela 14, pag. 46 aparece em 155-165 ppm (Ver fig. 28).

A análise dos outros picos do anel B pode ser observado no estudo de astilbina.

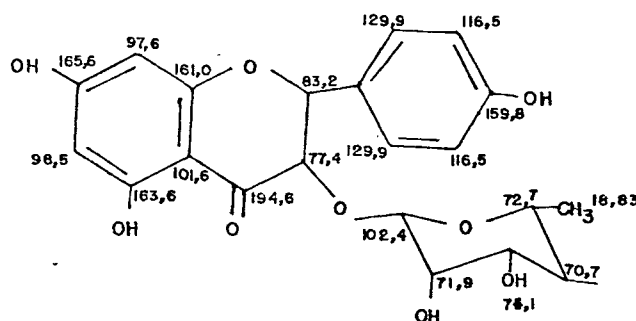


FIGURA 28 - Dados espectrométricos de RMN¹³C de HM-17B.

3.3.2.4 - ESPECTRO RMN¹H DE HM-17B

O espectro de RMN¹H (fig. 33 e 33a) confirma a identificação até agora realizada. O espectro realizado em piridina deuterada apresenta os deslocamentos químicos dos prótons que estão contidos na tabela 39.

TABELA 39 - Deslocamentos químicos de tipos de próton de HM-17B em piridina-d₅.

Deslocamento químico (ppm)	Tipo de próton
1,68 (d, J=6 Hz, 3 H)	de CH ₃ de ramnose
4,29 (1 H)	de C-5" " "
4,38 (1 H)	de C-4" " "
4,63 (1 H)	de C-3" " "
4,81 (1 H)	de C-2" " "
5,14 (1 H)	de C-1" " "
5,06 (d, J=10,8 Hz, 1 H)	de C-3
5,37 (d, J=10,8 Hz, 1 H)	de C-2
6,42 (1 H)	de C-8
6,54 (1 H)	de C-6
7,12 (dd, J=7,0 Hz, 2 H)	de C-3' e C-5'
7,57 (dd, J=7,0 Hz, 2 H)	de C-2' e C-6'

A análise do espectro RMN¹H de HM-17B no que se refere aos prótons do anel A e C, pode ser feita da mesma forma que a de astilbina, pois os espectros são muito semelhantes (ver p. 141). Porém os compostos diferem na oxigenação do anel B, uma análise diferenciada se faz necessário. O HM-17B é um flavonóide 4' oxigenado e o astilbina é 3', 4' oxigenado. No composto HM-17B os prótons do C-2', C-6' aparecem em 7,57 ppm e os de C-3' e 5' em 7,12 ppm, estes valores correspondem exatamente aos esperados para estes flavonóides (6,5-7,9 ppm) (ver tabela 12, figura 29, p. 162).

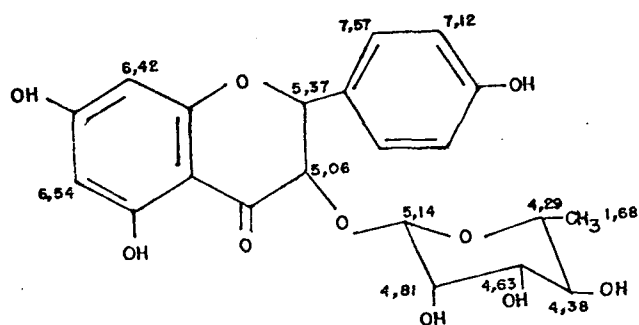


FIGURA 29 - Dados espectrométricos de RMN¹H de HM-17B

3.3.2.5 - PONTO DE FUSÃO

O ponto de fusão de HM-17B foi de 173-5 °C (Engel-tina 173-175 °C)¹⁰¹.

Considerando o p.f., espectros RMN de ¹³C e ¹H, U.V. e I.V., tudo indica que o composto em estudo (HM-17B) é o en gelitina.

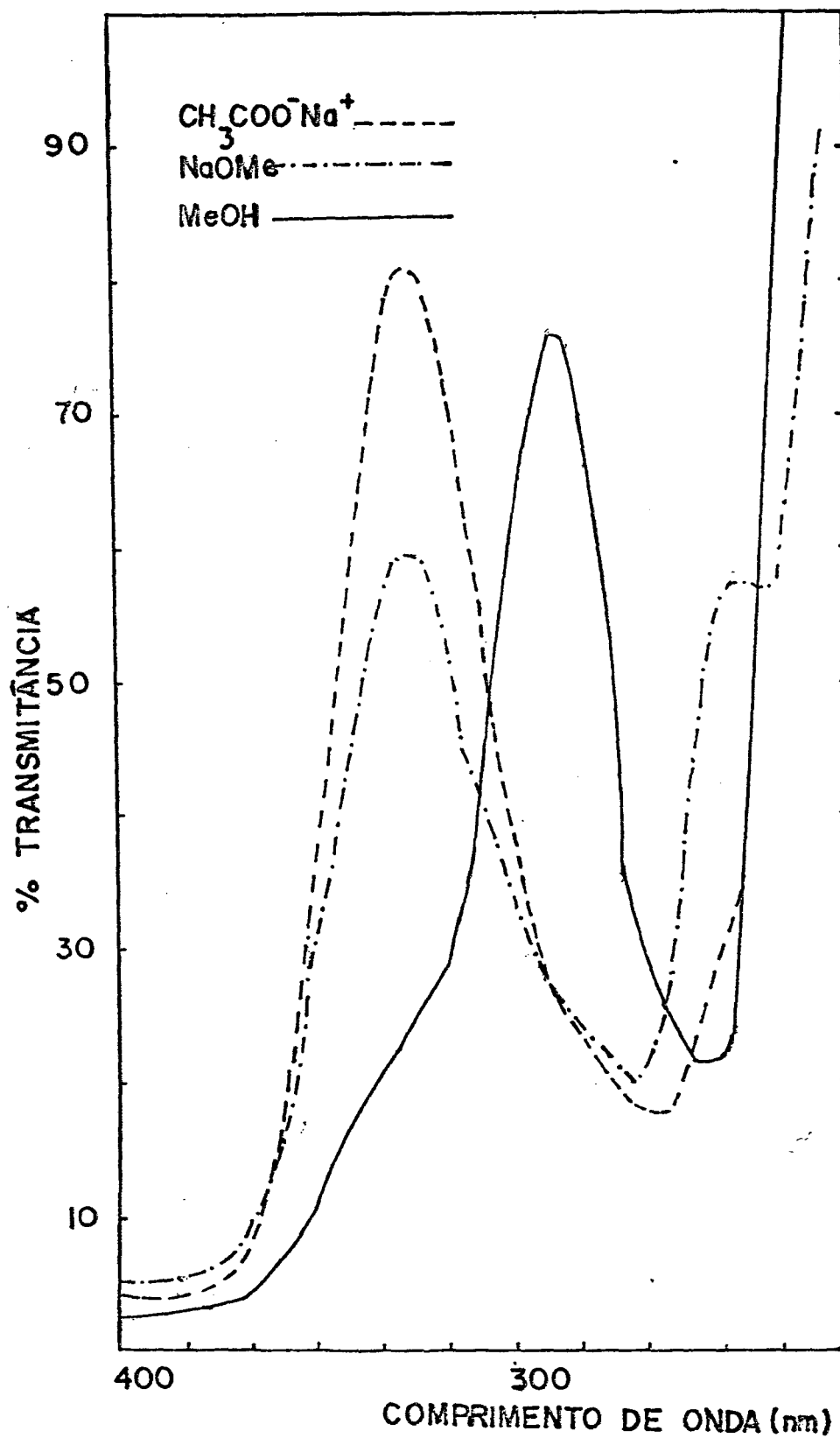


FIGURA 30 - Espectro U.V. (MeOH) de Engelitina (3-O- α -L-ramno-
sido de dihidrokaempferol) (HM-17B).

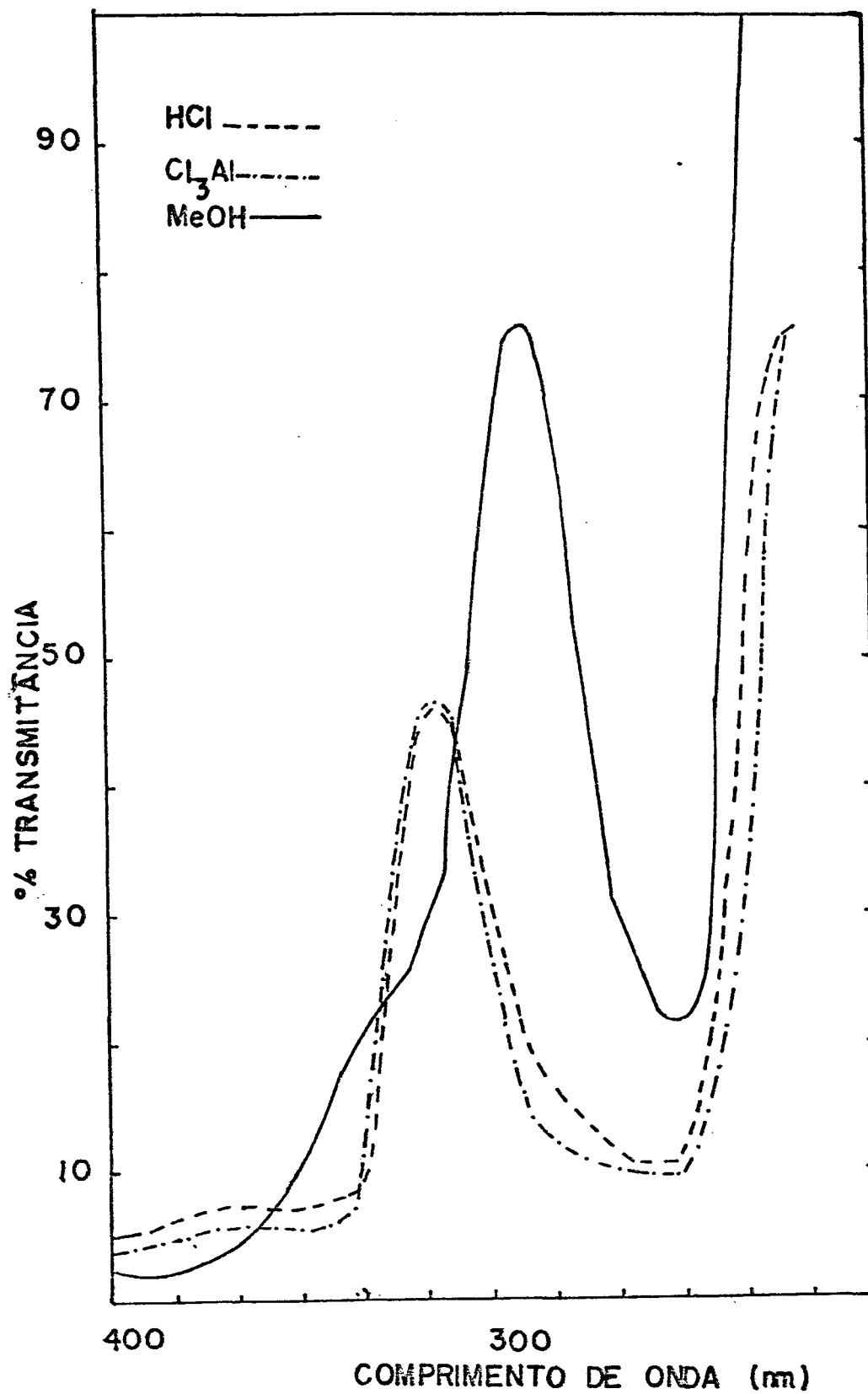


FIGURA 30a - Espectro U.V. (MeOH) de Engelitina (3-O- α -L-ramno-sídeo de dihidrokaempferol) (HM-17B).

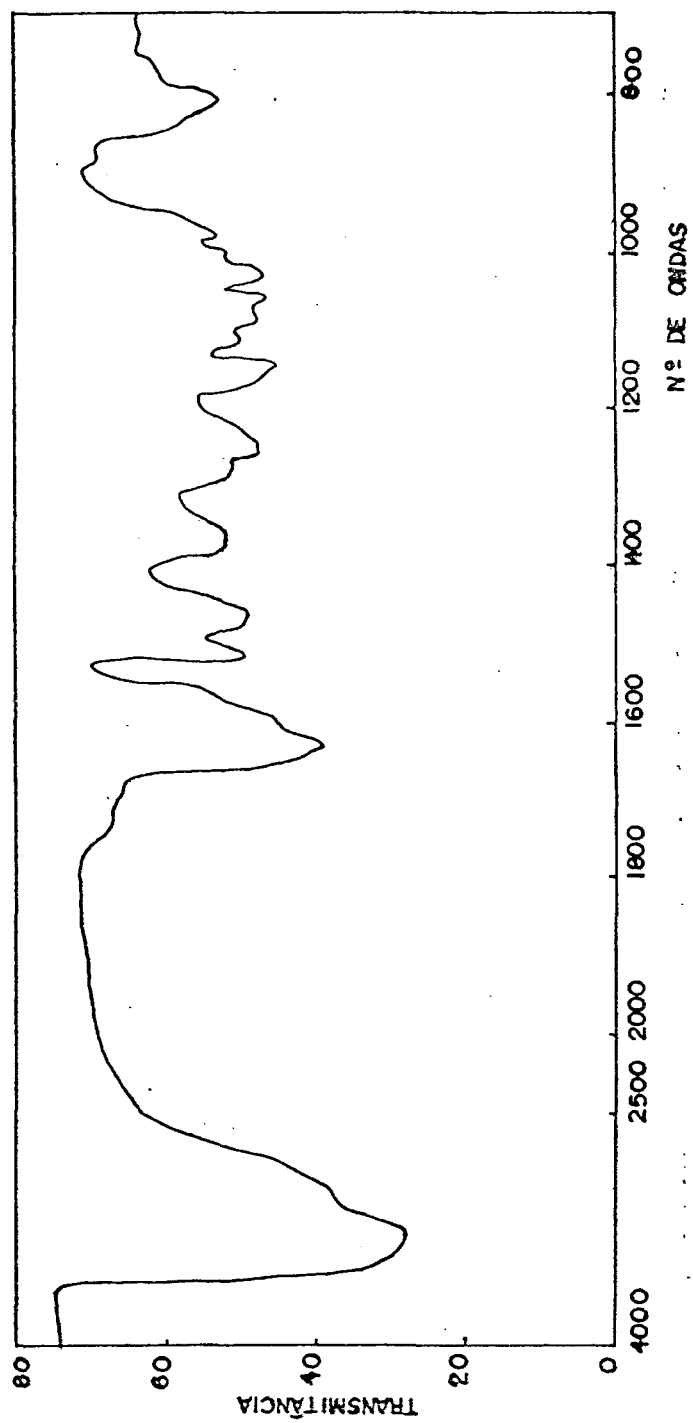


FIGURA 31 - Espectro I.V. (KBr) de Engelitina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidrokaempferol)
(HM-17B)

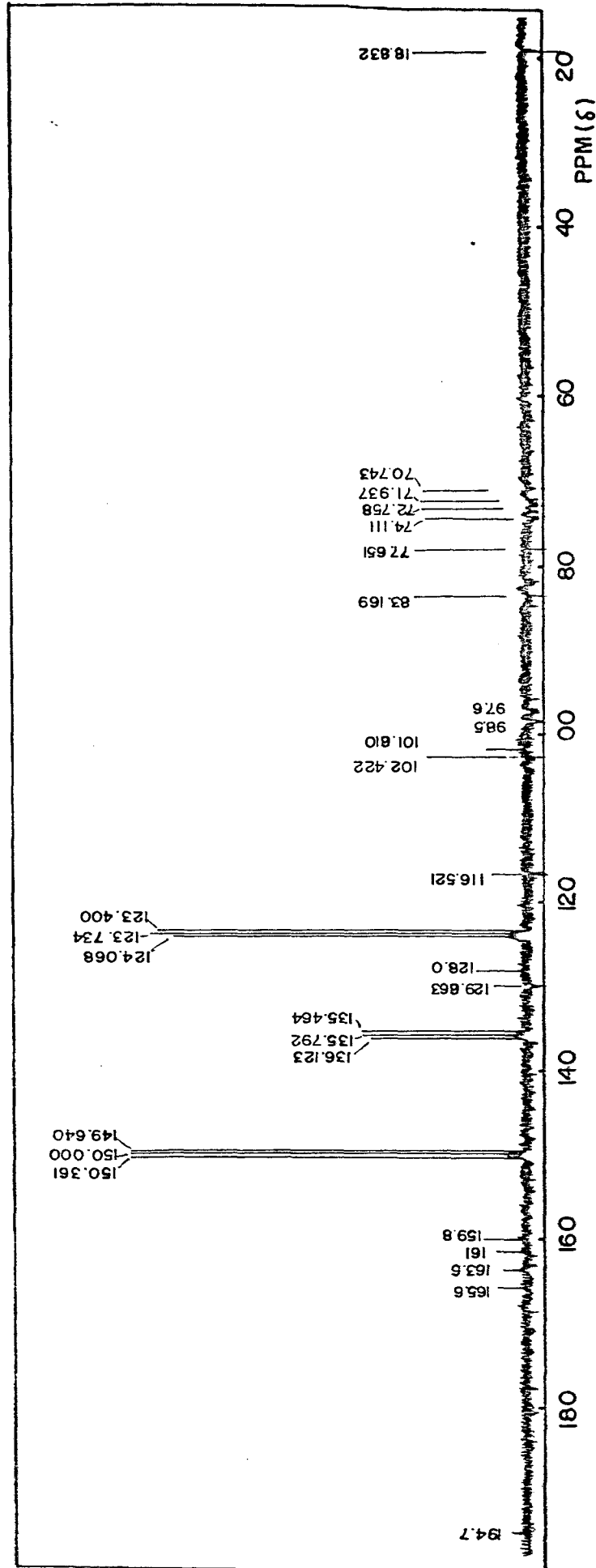


FIGURA 32 - Espectro RMN¹³C (75,6 MHz, C₅D₅N) de Engelitina (3-O- α-L-ranosídeo de dihidrokaempferol) (HM-17B).

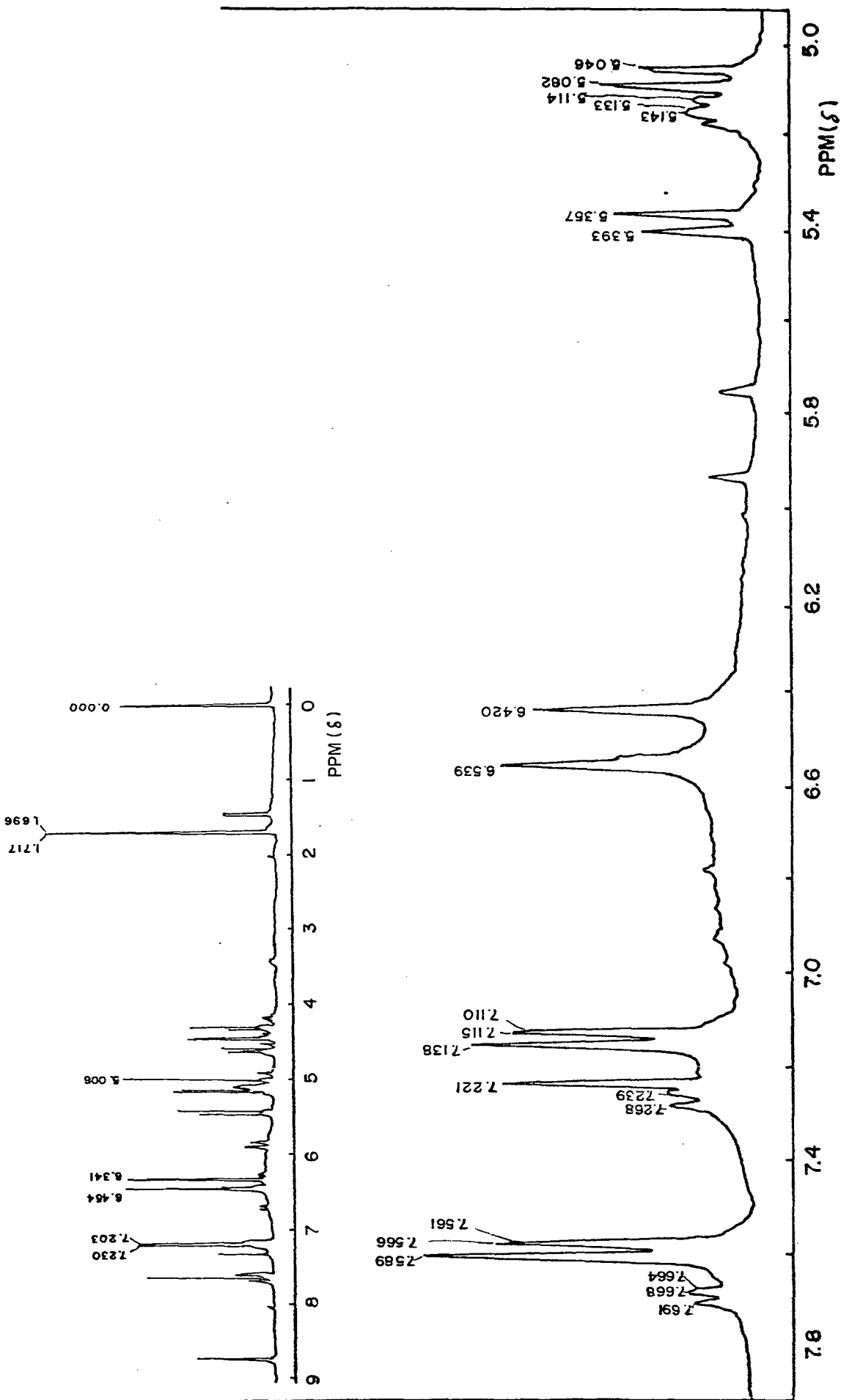


FIGURA 33 - Espectro RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N) de Engelitina (3-O- α -L-ramnosido de dihidrokaempferol) (HM-17B).

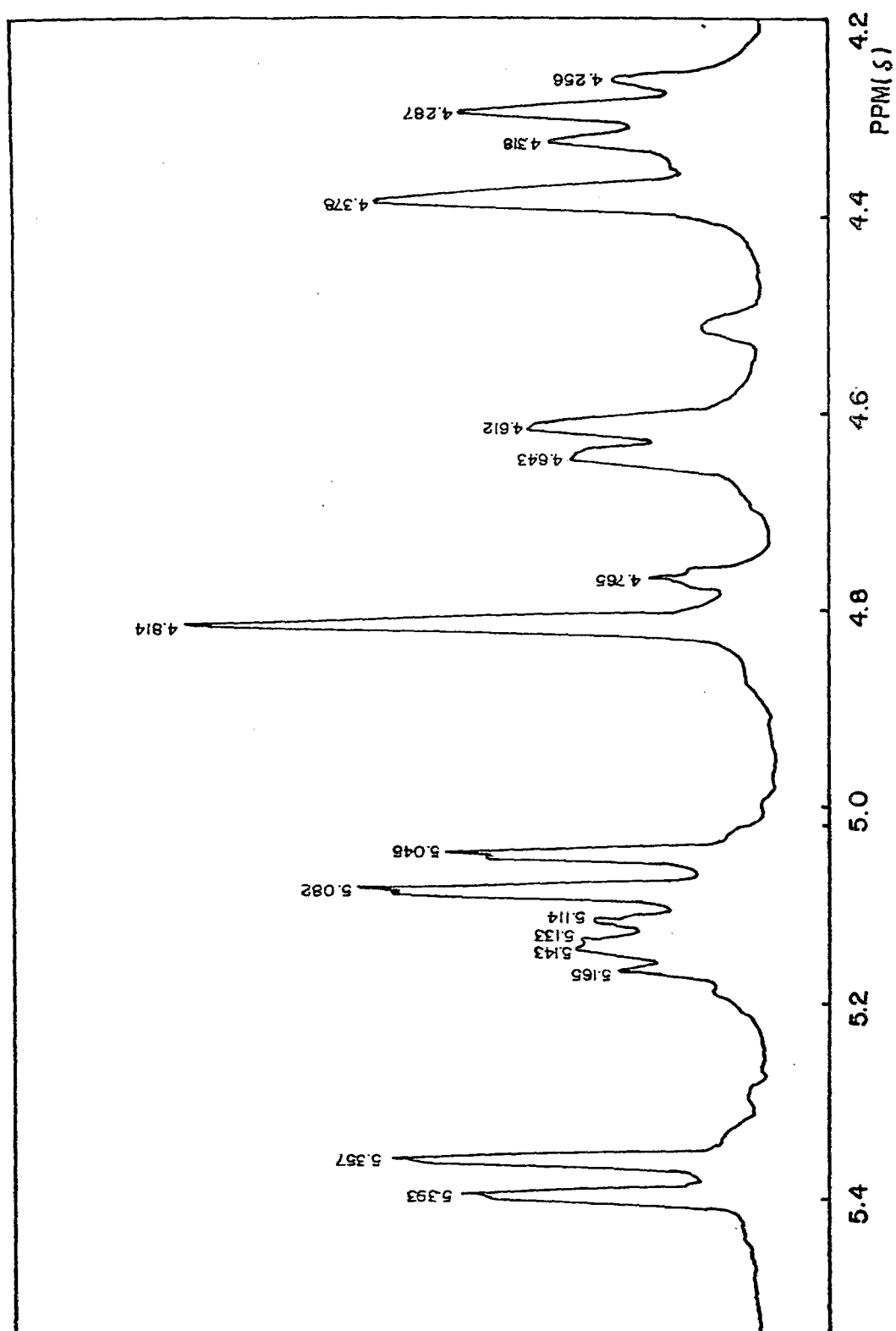


FIGURA 33a - Espectro RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N) de Engelitina (3-O- α -L-ramnosido de dihidrokaempferol) (HM-17B).

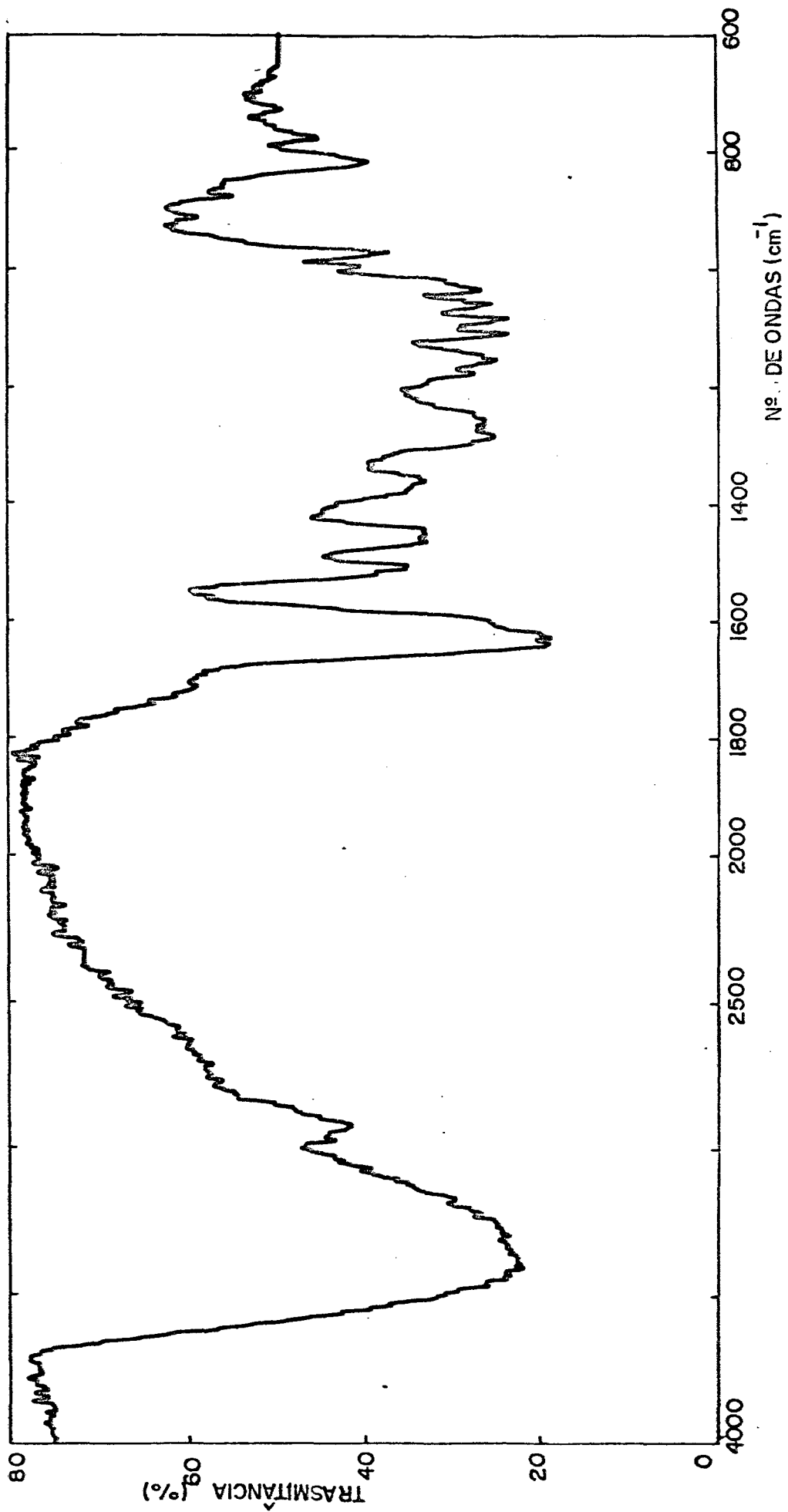


FIGURA 34 - Espectro I.V. (KBr) da Fração Acetato de etila.

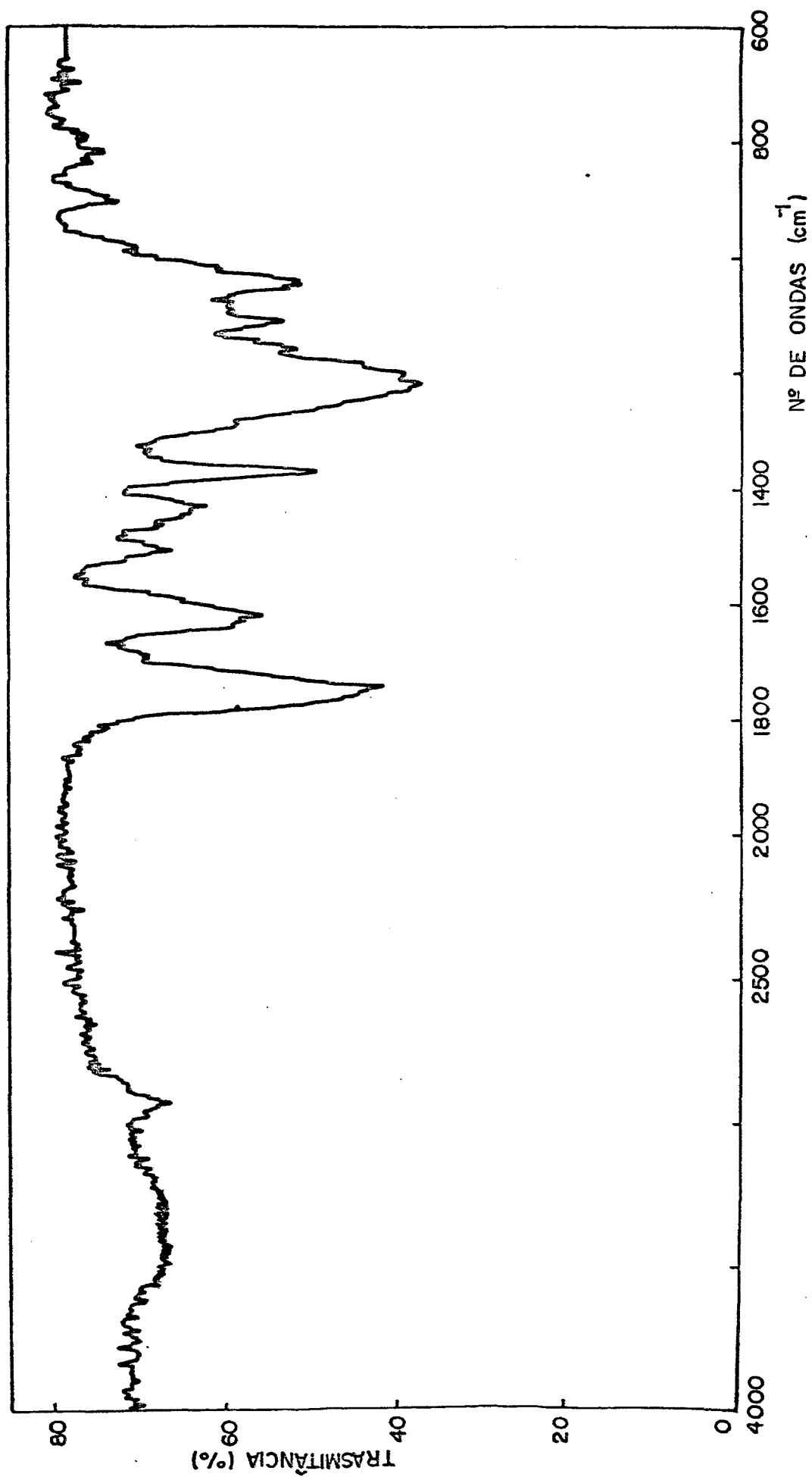


FIGURA 35 - Espectro I.V. (KBr) da Fração Acetato de etila acetilada.

3.4 - ANÁLISE FARMACOLÓGICA DE HYMENAEA MARTIANA HAYNE, ARZEIK

3.4.1 - INTRODUÇÃO

No Brasil e em outros países, o extrato fluído das cascas e resinas da espécie *H. martiana*, popularmente conhecida como jatobá, tem sido amplamente empregado, por apresentar diversas propriedades medicinais no tratamento de afecções gastrointestinais (diarréias, úlceras, dispepsias), urinárias (cistite, uretrite) e das vias respiratórias (asma, bronquite, laringites e tosses)^{10,29,30}.

Apesar do vasto uso medicinal desta planta, são escassos os estudos farmacológicos que comprovem suas aplicações medicinais.

Por outro lado, existem evidências de que algumas ações terapêuticas dessa planta possam estar relacionadas com a presença de substâncias tânicas com suas folhas, embora estas tenham sido quimicamente pouco investigadas³⁴, havendo, sobretudo, relatos sobre a identificação de compostos terpenóides^{17, 35-37} e fenólicos^{19, 34}.

Estudos farmacológicos de *H. martiana* estão sendo desenvolvidos, nos laboratórios do Departamento de farmacologia da UFSC, com a finalidade de contribuir para o esclarecimento das ações medicinais desta planta. Para isso, são realizados testes "in vivo" e "in vitro" com o extrato bruto e composto purificados da mesma. Dentre estes últimos, no presente trabalho, é apresentada a atividade farmacológica dos compostos glicosídicos: as

tilbina, eucryfina e engelitina, inéditos nesta espécie estudada.

3.4.2 - ANÁLISE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO DA HYMENAEA MARTIANA

3.4.2.1 - ESTUDO "IN VITRO"

O extrato bruto hidroalcoólico (EB) da *Hymenaea martiana* foi analisado em relação a vários neurotransmissores no útero de rata e íleo de cobaia¹⁰⁸.

A incubação do EB obtido das cascas da *H. martiana* (50 a 200 µg/ml), durante 20 minutos, causou deslocamento paralelo e concentração dependente a direita sobre a curva dose-resposta à bradicinina no útero isolado de rata (figura 36a). O gráfico de Schild¹¹⁶ (figura 36b) indica existir boa correlação entre o aumento da dose do EB e o deslocamento à direita (0,98), sugerindo a existência de antagonismo competitivo (inclinação 1, 2). Nas mesmas concentrações (50 a 200 µg/ml), o EB da *H. martiana* deslocou também à direita a curva da dose-resposta à lisil-bradicinina, sem causar alterações marcantes da resposta máxima (figura 37a). Porém, o gráfico de Schild (figura 37b), indica que embora exista boa correlação ($r=0,99$), o antagonismo, apesar de competitivo, não é de natureza simples, já que a inclinação da reta de regressão é significativamente maior que 1 (tabela 40). Os resultados desta tabela mostram que o extrato apresenta a mesma potência em antagonizar as respostas à bradicinina e a lisil-bradicinina no útero de rata, com valores de PA_2 (g/ml) de 4,2 e 4,5, respectivamente.

Por outro lado, o antagonismo não foi seletivo para as cininas, já que o EB da *H. martiana* nas mesmas concentrações (50 a 200 $\mu\text{g/ml}$) causou também deslocamento paralelo à direita sobre a curva dose-resposta à acetilcolina no útero isolado da rata (figura 38a). O gráfico de Schild (figura 38b), indica haver boa correlação ($r=0,9$) e inclinação de 0,9, sugerindo uma interação competitiva dos princípios ativos com os receptores colinérgicos presentes na musculatura uterina. Os resultados apresentados na tabela 39, indicam que o EB apresenta a mesma potência em antagonizar as respostas a acetilcolina e as cininas.

Interessante, o EB da *H. martiana* (50 a 200 $\mu\text{g/ml}$) não modificou significativamente a curva concentração-resposta para a serotonina no útero isolado de rato (figura 39a). No entanto, nas mesmas concentrações, o EB causou redução concentração dependente da resposta máxima contrátil para a prostaglandina $F_{2\alpha}$, angiotensina II e ocitocina, associado com deslocamento à direita no útero isolado da rata (figura 39b, c e d). Estes resultados indicam que o EB da *H. martiana* pode apresentar vários princípios ativos capazes de interagir por mecanismos distintos com os diversos neurotransmissores no útero isolado de rata.

Quando analisado no íleo isolado de cobaia, o EB da *H. martiana* (50 a 200 $\mu\text{g/ml}$), antagonizou de maneira não competitiva a resposta contrátil à bradicinina, causando um deslocamento à direita sobre a curva dose-resposta associada com a inibição da resposta máxima (figura 40a). Com relação a resposta contrátil à acetilcolina, o EB, em baixas concentrações (50 a 100 $\mu\text{g/ml}$) causou deslocamento à direita sobre a curva dose-resposta e em concentração mais elevada (200 $\mu\text{g/ml}$), grande redução de resposta máxima (figura 40b). Ao contrário, o EB causou apenas pequenas variações na curva dose-resposta à histamina no íleo isolado de cobaia (figura 40c).

Em todos os tecidos testados, as ações do EB da *H. martiana*, foram totalmente revertidas, seguindo lavagens da preparação em cerca de 60 minutos.

3.4.2.2 - ESTUDO "IN VIVO"

Este estudo envolveu a análise do efeito anti-edematoso e analgésico do extrato bruto hidroalcoólico da *H. matiana*¹⁰⁹.

O extrato bruto hidroalcoólico (EB) da *H. martiana*, quando administrado por via oral (v.o) (500 mg/kg, 1 h. antes) não inibiu o desenvolvimento dos edemas de pata de rata causado por carragenina (300 µg), dextrana (300 µg) e fator de agregação plaquetária PAF-acéter (4 µg). Porém, quando administrado por esta mesma via, o EB (400-800 mg/kg, 1 hora) inibiu a forma concentração-dependente do edema causado pelo ácido araquidônico (AA) na orelha de camundongo (DE 50 > 800 mg/kg, inibição máxima, I. máx=23%) (figura 41a, b e c e tabela 40).

Quando administrado por via intraperitoneal (i.p.) (25-200 mg/kg, 30 minutos antes), o EB determinou inibição dose-dependente do edema induzido pela carragenina (DE 50=38 mg/kg, I. máx. = 100%), dextrana (DE 50=30, 8 mg/kg, I. máx = 98%), mas inibindo parcialmente o edema causado pelo PAF-acéter (DE 50=35 mg/kg, I. máx. = 50%) (figura 42a, b e c). Por esta mesma via, o EB (100/200 mg/kg) foi mais efetivo em inibir o edema causado pelo AA na orelha do camundongo (DE 50=105 mg/kg, I. máx.= 53%) (tabela 41). Da mesma forma como foi observado no edema de pata de rata, o EB foi significativamente mais potente quando administrado por via i.p.

Ao contrário dos resultados observados no edema de pata de rato, o EB da *H. martiana* (100-200 mg/kg) administrado por v.o., produziu inibição dose-dependente das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) e Acetilcolina (Ach) (6 mg/kg) em camudongos (DE 50 < 100 mg/kg) (tabela 42 e 43).

Quando administrado por via i.p., o EB (6,5-50 mg/kg) foi significativamente mais potente em inibir as contorções abdominais causadas tanto pela Ach como pelo ácido acético. (DE 50=5 mg/kg) (Tabela 42).

Pelo exposto, deve-se salientar que o EB não apresentou atividade antiedematogênica por v.o em ratos, mas inibiu o edema causado pelo AA, bem como as contorções abdominais induzidas pela Ach e ácido acético em camudongos por esta via. Esses resultados sugerem a existência de diferenças na absorção dos princípios ativos presentes no extrato, nas duas espécies animais estudadas. Pelo fato do EB apresentar-se mais potente em inibir o edema de pata de rato e as contorções abdominais em camudongos por via i.p., sugere-se que os princípios ativos responsáveis por esses efeitos são pouco absorvidos por via v.o. em ratos.

Como o EB apresentou atividade tanto por v.o. como por via i.p. em inibir o edema causado pelo AA na orelha do camudongo, sugere-se que os princípios ativos presentes nesta planta possam estar atuando através da inibição dos metabólitos do AA via lipoxigenase, principais responsáveis pela ação edematogênica do AA na orelha do camudongo¹¹⁰⁻¹¹⁴. Esse mecanismo de ação, poderia também explicar o efeito analgésico observado por esse extrato em camudongos, pois os metabólitos do AA via lipoxigenase, podem também produzir hiperalgesia¹¹⁵.

3.4.3 - ANÁLISE FARMACOLÓGICA DAS FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS E COMPOSTOS PUROS DA *HYMEANEA MARTIANA*

3.4.3.1 - ESTUDO "IN VITRO"

Os traçados gráficos apresentados na figura 42, mostram que a fração HM4-8 (ver pag.) (10-80 $\mu\text{g/ml}$) obtida da fração acetato de etila acetilada da *H. martiana*, contendo uma mistura de 3 compostos de natureza flavonóidica, deslocou à direita a curva concentração-resposta à bradicinina, no útero isolado de rata, associado com redução significativa da resposta máxima nas concentrações de 40 e 80 $\mu\text{g/ml}$. Ambos os efeitos foram reversíveis após a lavagem das preparações e bastante semelhantes àqueles descritos para o extrato total desta planta (figura 36a),

A purificação da fração HM4-8 permitiu a obtenção de dois glicosídeos: a eucryfina e astilbina. Nas mesmas concentrações (40-80 $\mu\text{g/ml}$) (29,5-236 μM) a eucryfina também causou deslocamento à direita da curva concentração resposta à bradicinina, porém, o deslocamento foi menor quando comparado ao obtido com a fração semipurificada (figura 43a). Ao contrário, o segundo composto isolado desta fração, a astilbina (10-80 $\mu\text{g/ml}$) (22-176 μM) não modificou a curva concentração-resposta para a bradicinina, quer ao nível da resposta máxima, como da DE 50 (Figura 43b).

Com relação a resposta contrátil à acetilcolina no útero isolado da rata, pequena dose de eucryfina (29,5 μM), também deslocou à direita a curva dose-resposta a esse agonista, enquanto que, concentração mais elevada (59 μM) não influenciou a

contração causada pela acetilcolina (Figura 44a). Novamente a astilbina (22 a 176 μM) não causou modificação significativa da resposta contrátil à acetilcolina nesta preparação (Figura 44b).

Interessante que a acetilação das moléculas de astilbina e eucryfina modificaram completamente seus perfís de ação. A astilbina acetilada (13-52 μM) e a eucryfina acetilada (18-72 μM), causaram um deslocamento concentração-dependente à direita sobre a curva dose-resposta à bradicinina no útero isolado de rata, associado com redução da resposta máxima (Figura 45a e 47a). O gráfico de Schild (Figura 45b), indica a existência de boa correlação entre o aumento da concentração de astilbina e o deslocamento à direita sobre a curva dose-resposta à bradicinina ($r=0,93$) e o valor de PA_2 de 5,1. Resultados semelhantes foram obtidos para o EB da H. martiana (Figura 36a, b). Nas mesmas concentrações (13-52 μM) e (18-72 μM), a astilbina acetilada e a eucryfina acetilada, respectivamente, causaram também deslocamento à direita associado com a redução significativa da resposta máxima para a acetilcolina (Figura 46a e 47b). Este efeito também foi mostrado em útero isolado de rata pela astilbina acetilada com relação à ocitocina (Figura 46b), sendo este composto (13-52 μM) mais potente em antagonizar a resposta contrátil à ocitocina neste tecido. Os efeitos causados por estes compostos foram totalmente revertidos após lavagem das preparações.

Outro composto puro testado, foi isolado da fração acetato de etila, obtida da H. martiana, denominado de engelitina. Este composto (23-92 μM) não modificou a curva concentração-resposta à bradicinina (Figura 48a)) mas causou ligeiro deslocamento sobre a resposta à acetilcolina no útero isolado de rata (Figura 48b).

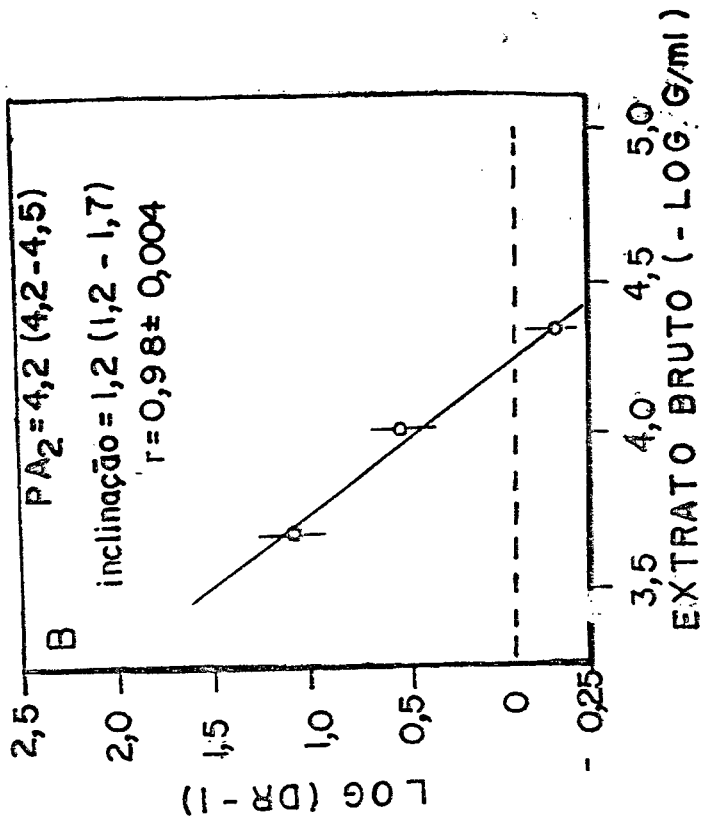
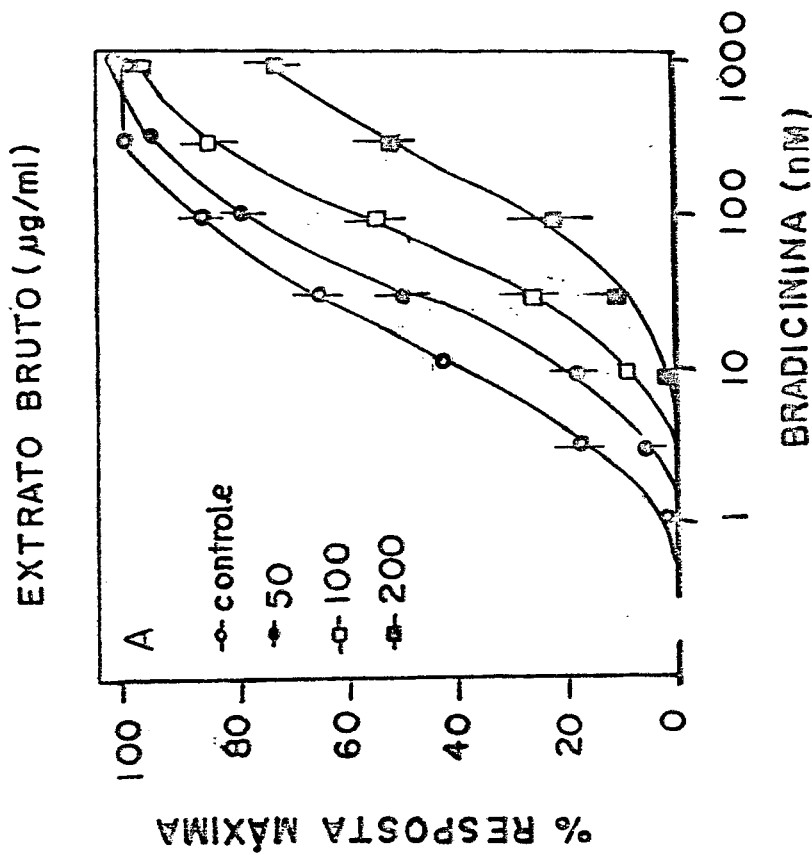


FIGURA 36a-- Curva concentração-resposta: médias para a bradicinina no útero isolado de rata, na ausência ou na presença de concentrações crescentes do extrato bruto hidroalcoólico da *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

FIGURA 36b- Gráfico de Schild evidenciando o antagonismo do extrato bruto da *H. martiana* sobre a resposta contrátil a bradicinina no útero isolado de rata.

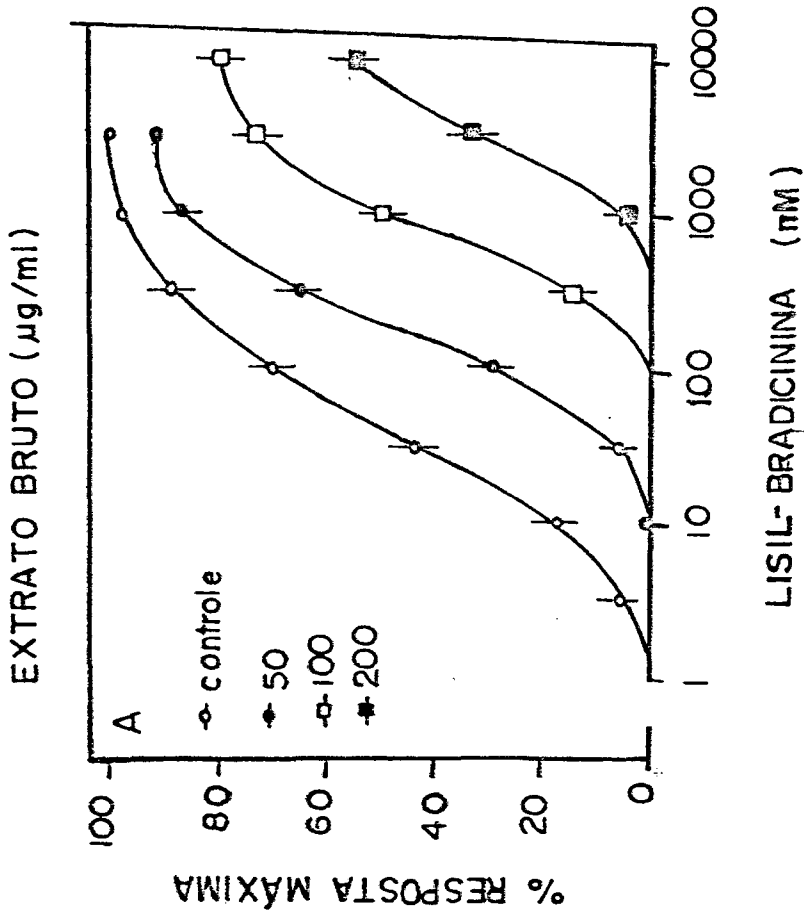


FIGURA 37a - Curva concentração-reposta médias para a lisil-bradicinina no útero isolado de rato, na ausência ou na presença de concentrações crescentes do extrato bruto hidroalcoólico da *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

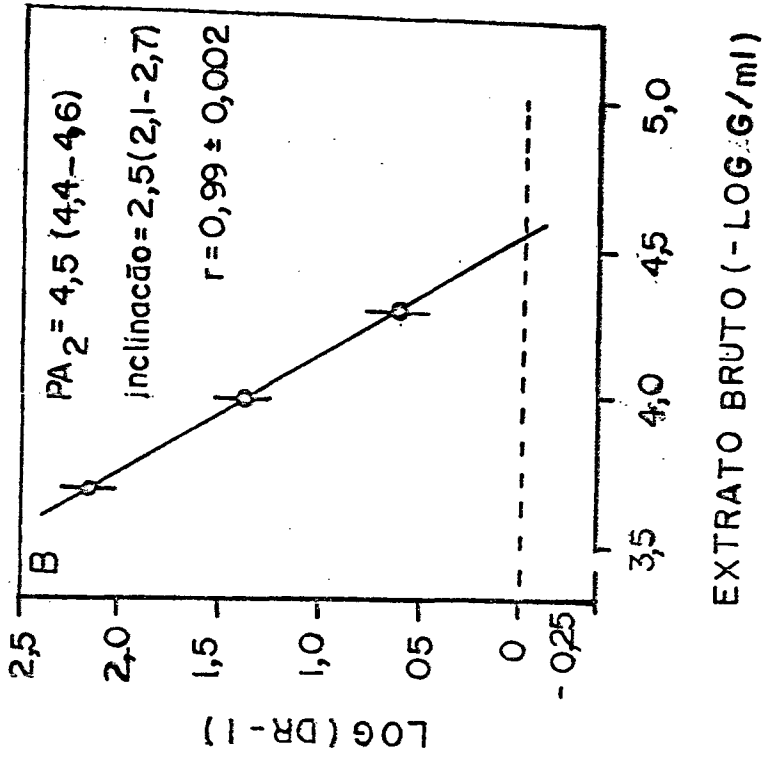


FIGURA 37b - Gráfico de Schild evidenciando o antagonismo do extrato bruto da *H. martiana* sobre a resposta contrátil a lisil-bradicinina no útero isolado de rato.

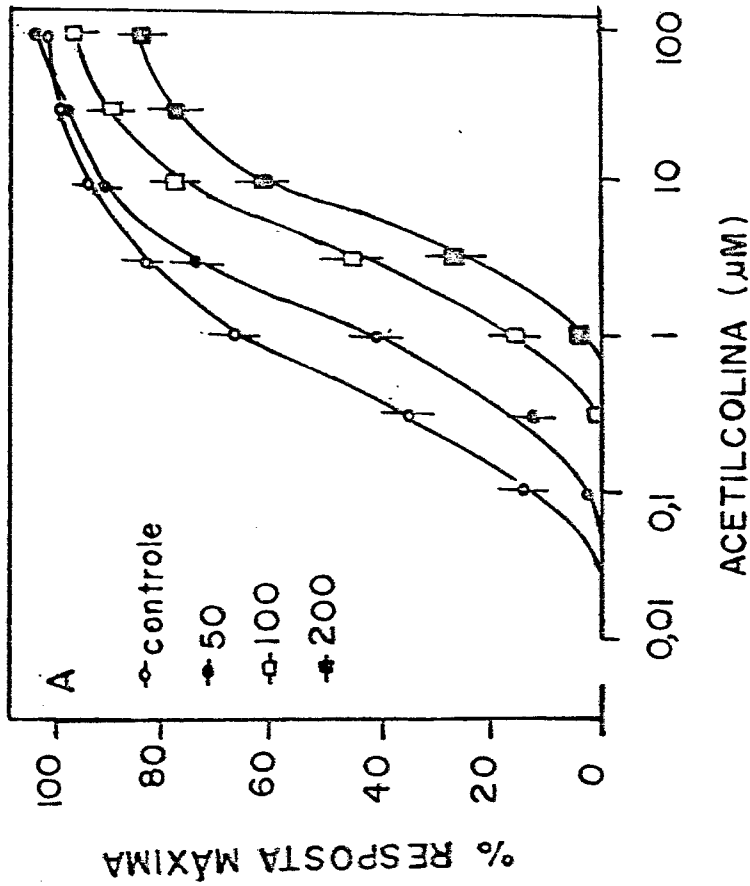
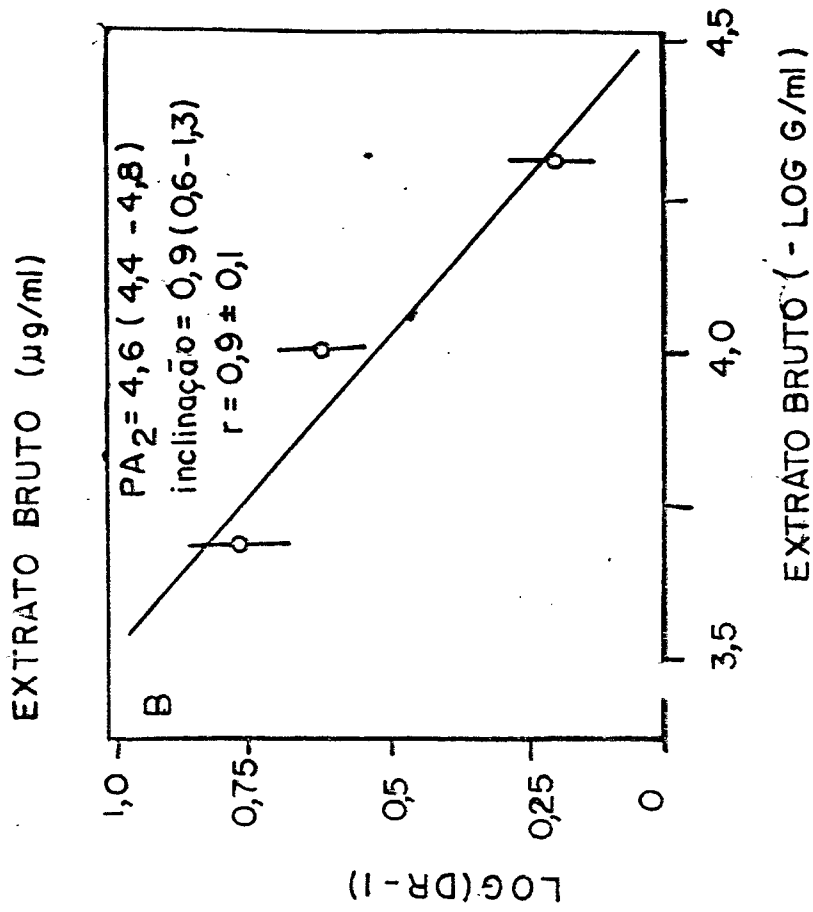


FIGURA 38a - Curva concentração-resposta médias para a acetilcolina no útero isolado de rata, na ausência ou na presença de concentrações crescentes do extrato bruto hidroalcoólico da H. martiana. Cada ponto representa a média de 5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

FIGURA 38b - Gráfico de Schild evidenciando o antagonismo do extrato bruto da H. martiana sobre a resposta contrátil a acetilcolina no útero isolado de rata.

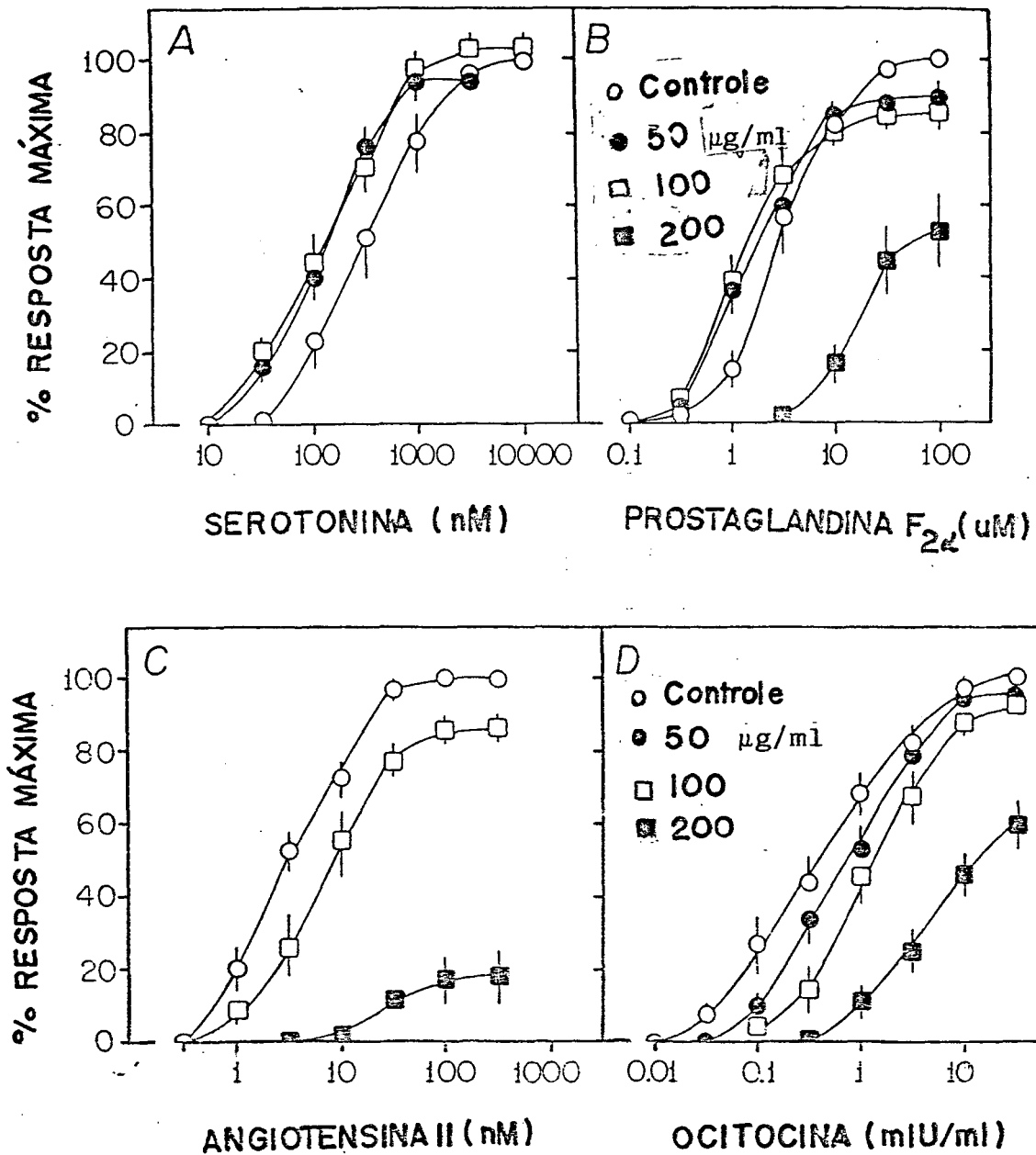


FIGURA 39 - Curvas concentração-resposta médias para serotonina, nas F_{2α}, angiotensina II e ocitocina no útero isolado de rata na ausência ou na presença de diversas concentrações do extrato bruto da *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrões das médias.

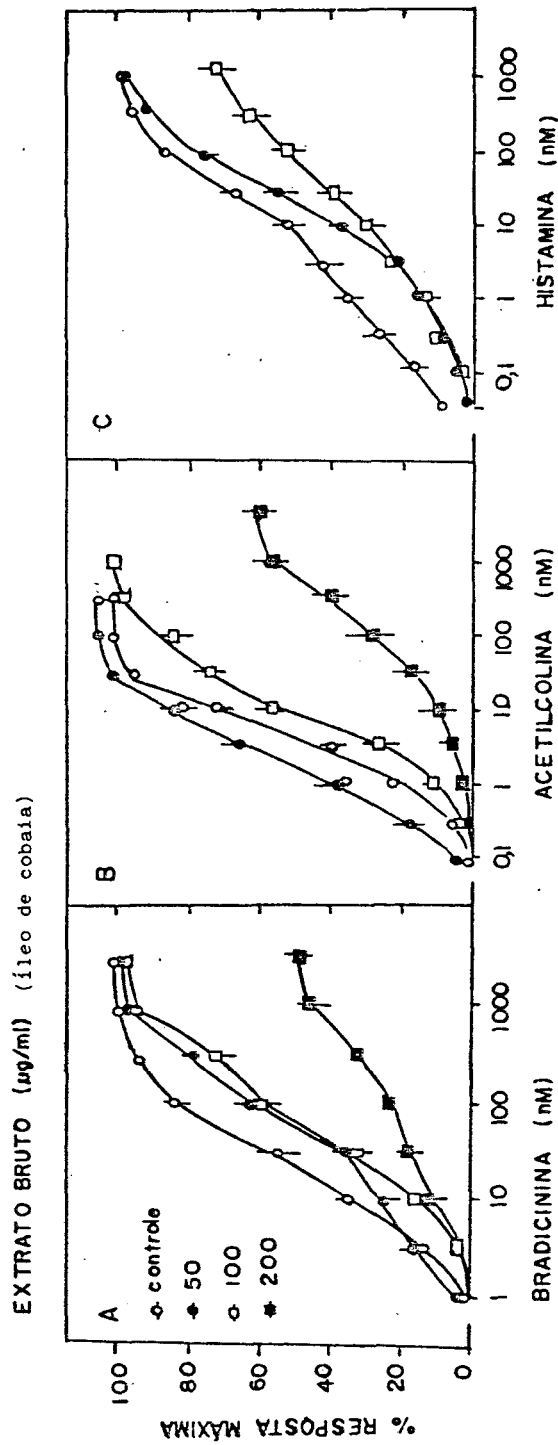


FIGURA 40 - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradycinina, acetilcolina e histamina no íleo isolado de cobaia na ausência e na presença de diversas concentrações do extrato bruto de *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 5 a 7 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

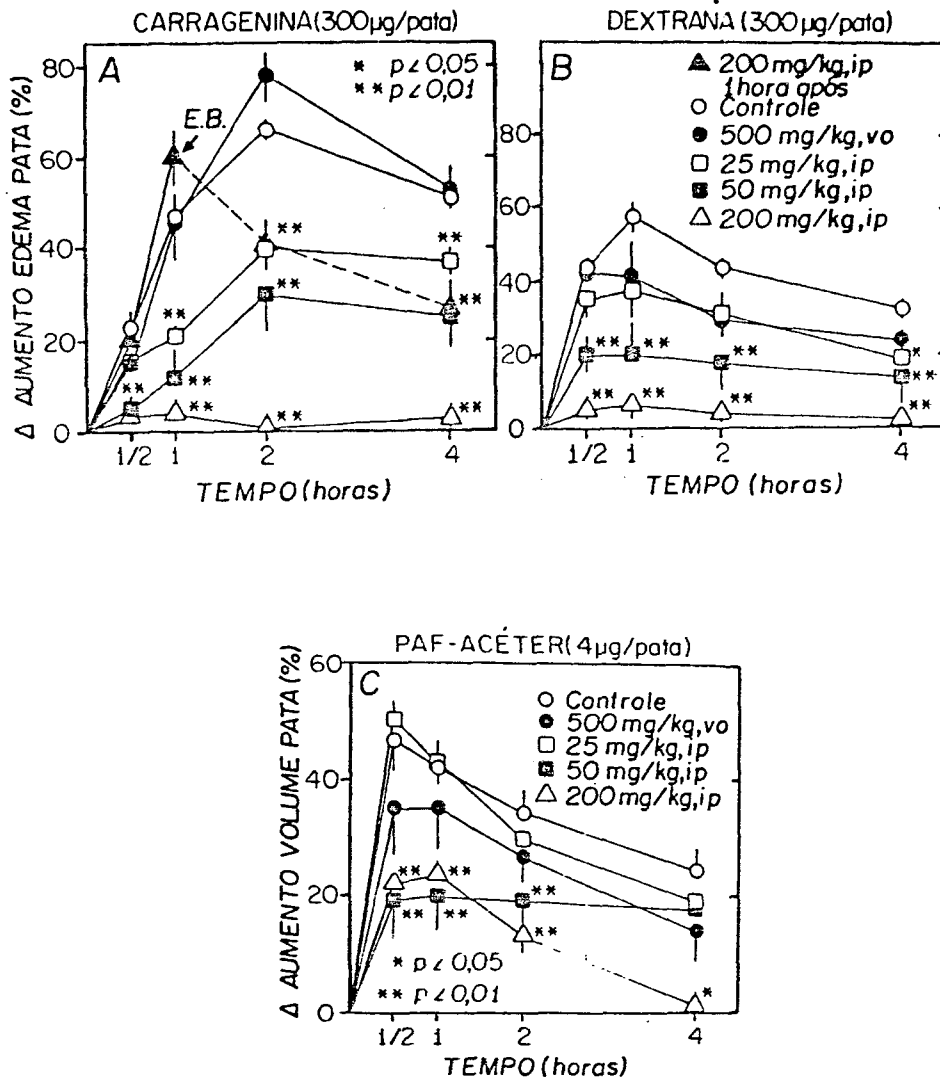


FIGURA 41 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Hymenaea martiana* administrado por via oral ou intraperitoneal sobre o desenvolvimento do edema de pata de rato causado por carragenina (A), dextrana (B) e PAF-acéter (C). Cada ponto representa a média de 5 a 7 experimentos e as linhas verticais representam os erros padrão das médias.

FRAÇÃO HM4-8 ($\mu\text{g/ml}$)

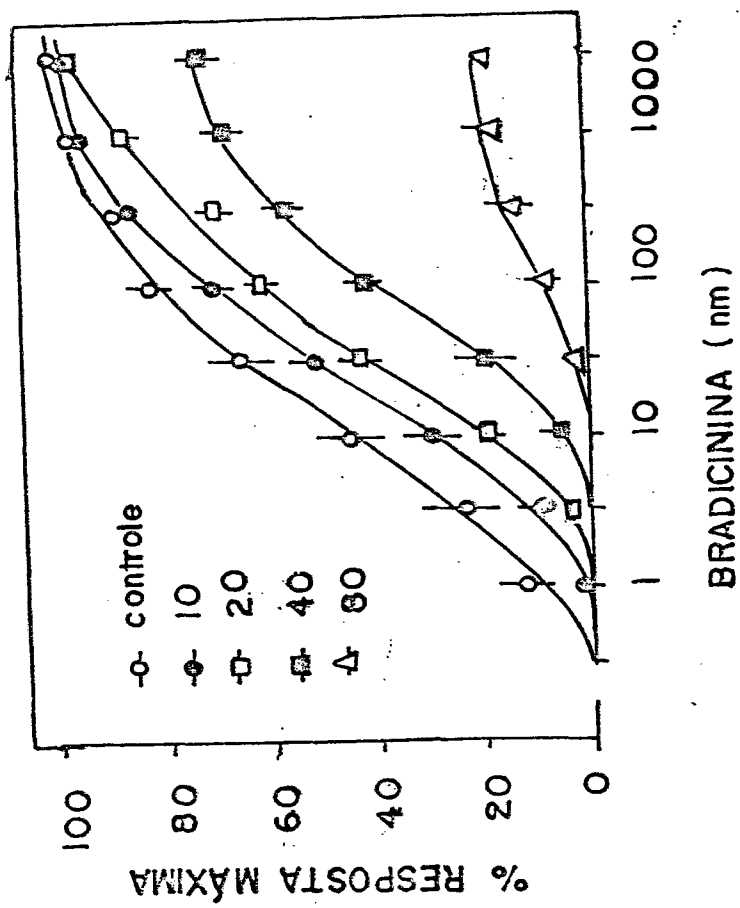


FIGURA 42 - Curvas concentração-resposta para a bradycinina no útero isolado de rata na ausência e na presença da fração semipurificada (HM4-8) obtida da *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

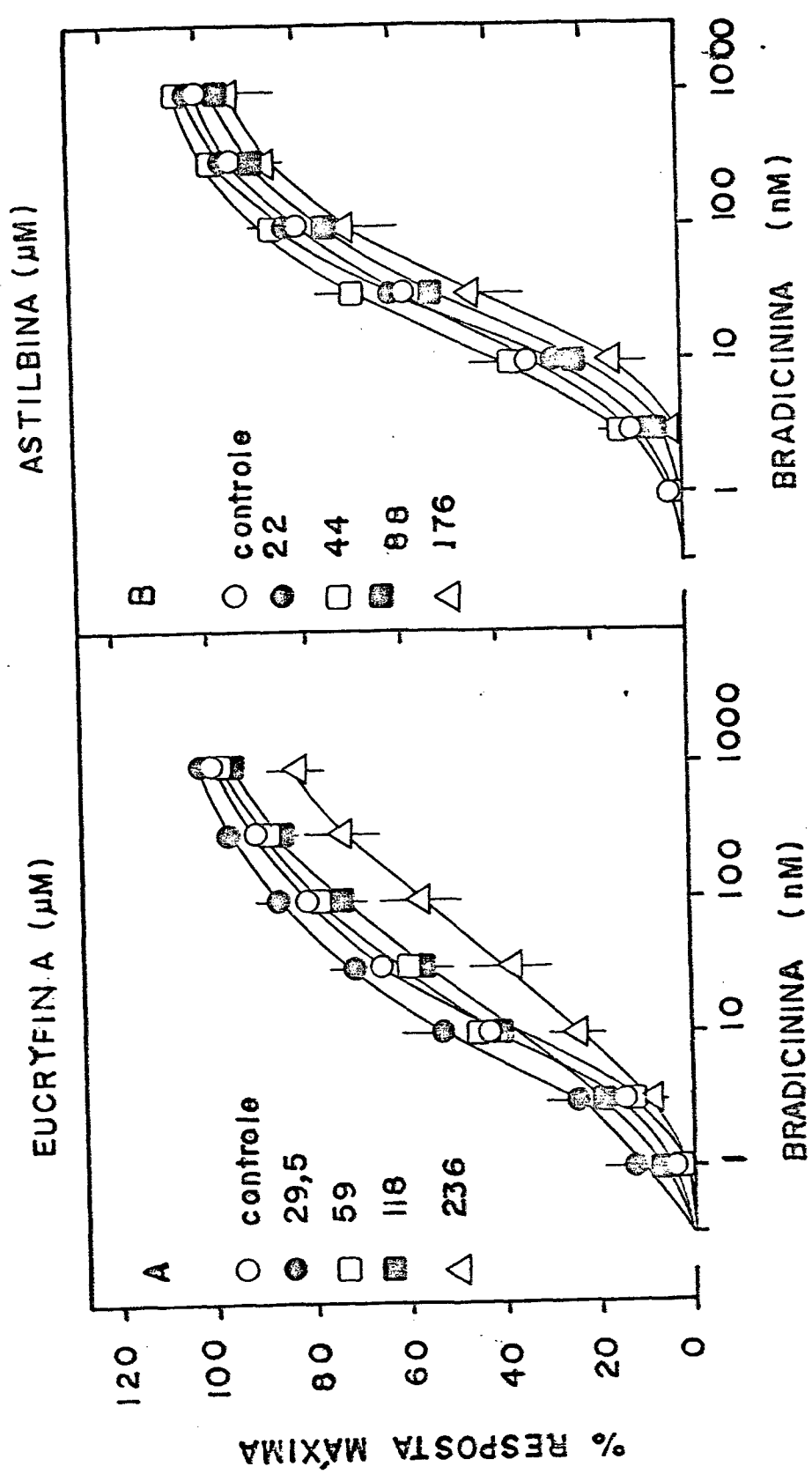


FIGURA 43 - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradicinina no útero isolado de rata na ausência e na presença de eucryfina (A) e astilbina (B) isoladas da *H. maritima*. Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

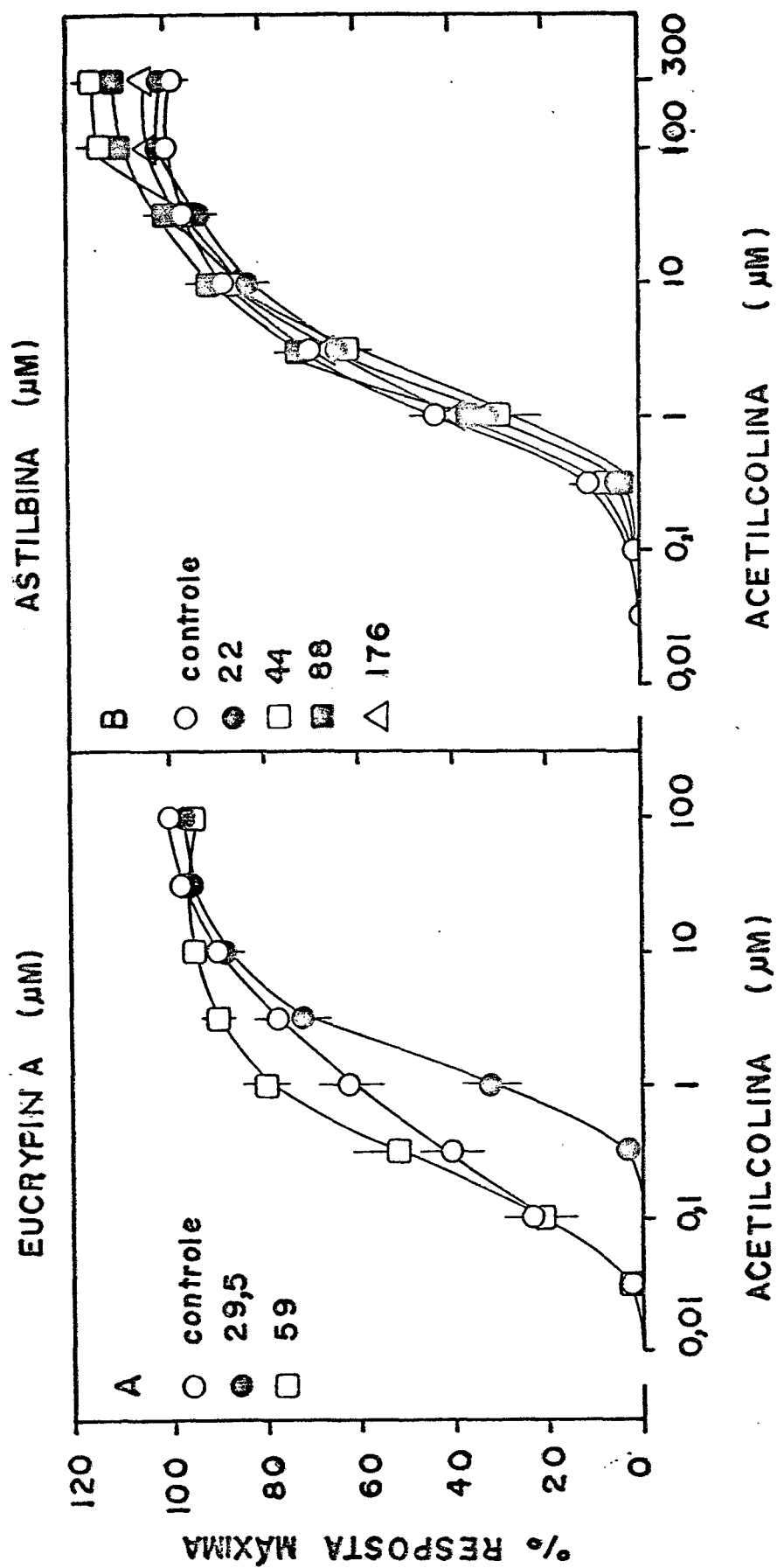


FIGURA 44 - Curva concentração-resposta médias para a acetilcolina no útero isolado de rata na ausência ou na presença de diversas concentrações de eucryfina (A) e astilbina (B) isolados da *H. martiana*. Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

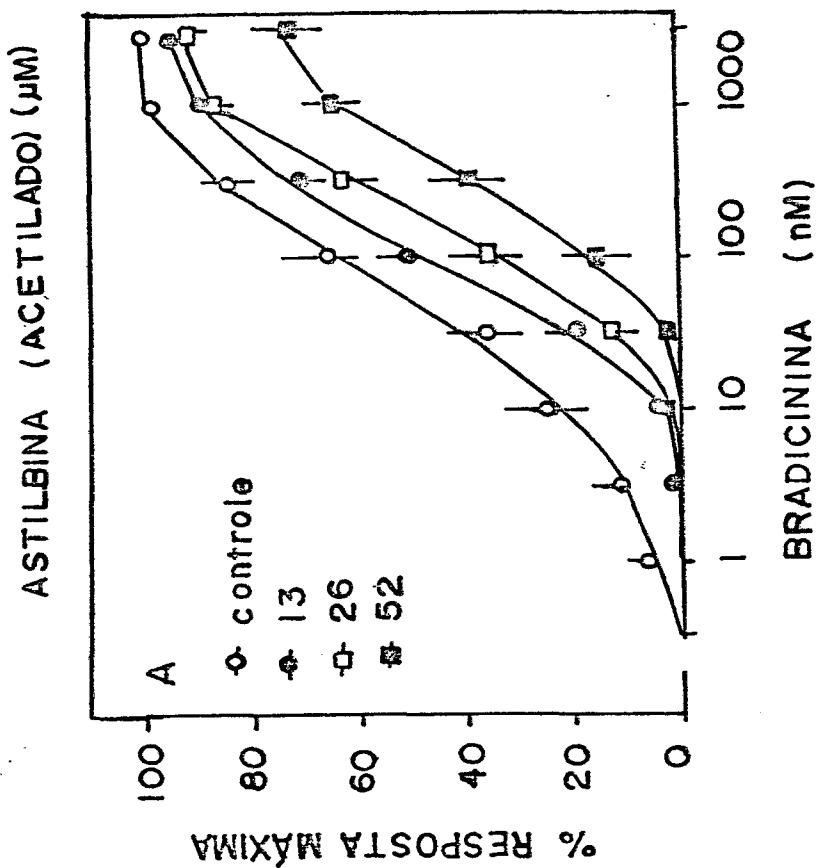


FIGURA 45a - Curvas concentração-resposta médias para a bradicinina no útero isolado de rato na ausência e na presença de astilbina (acetilado). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias

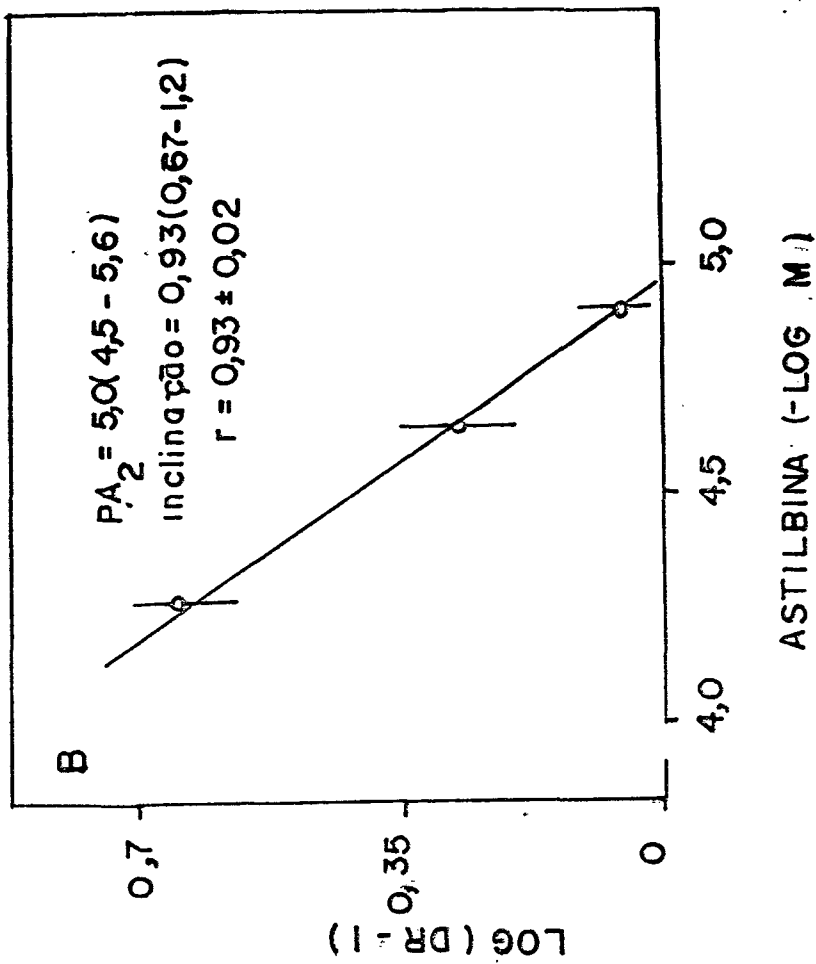


FIGURA 45b - Gráfico de Schild evidenciando o antagonismo de astilbina acetilado contra a resposta para a bradicinina no útero isolado de rato.

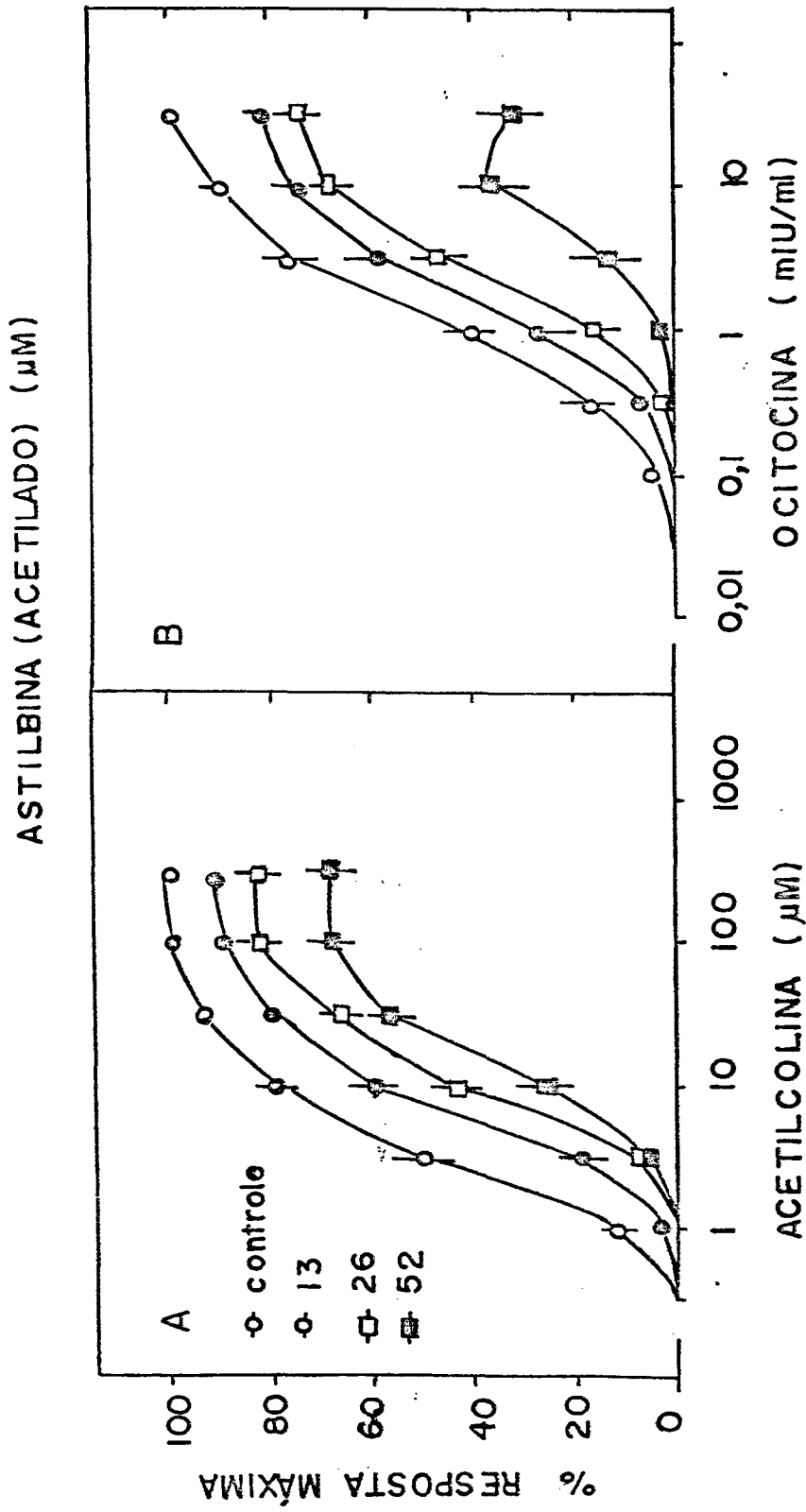


FIGURA 46 - Curvas concentração-resposta para a acetilcolina (A) e ocitocina (B) no útero isola-
do de rato na ausência ou na presença de astilbina acetilado. Cada ponto repre-
senta a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

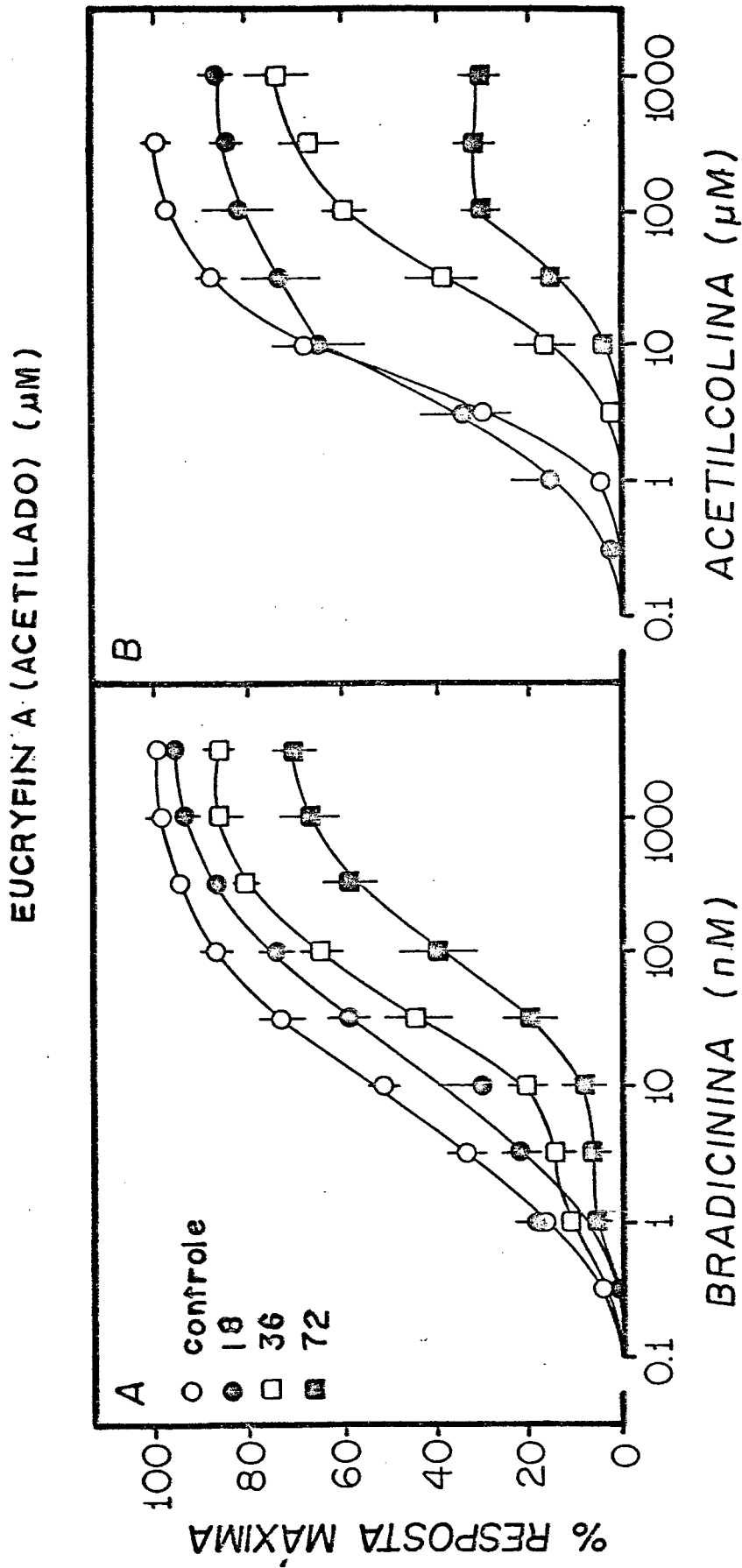


FIGURA 47 - Curvas concentração-resposta para a bradycininina (A) e acetilcolina (B) no útero isolado de rato na ausência ou na presença de eucryfina acetilado. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

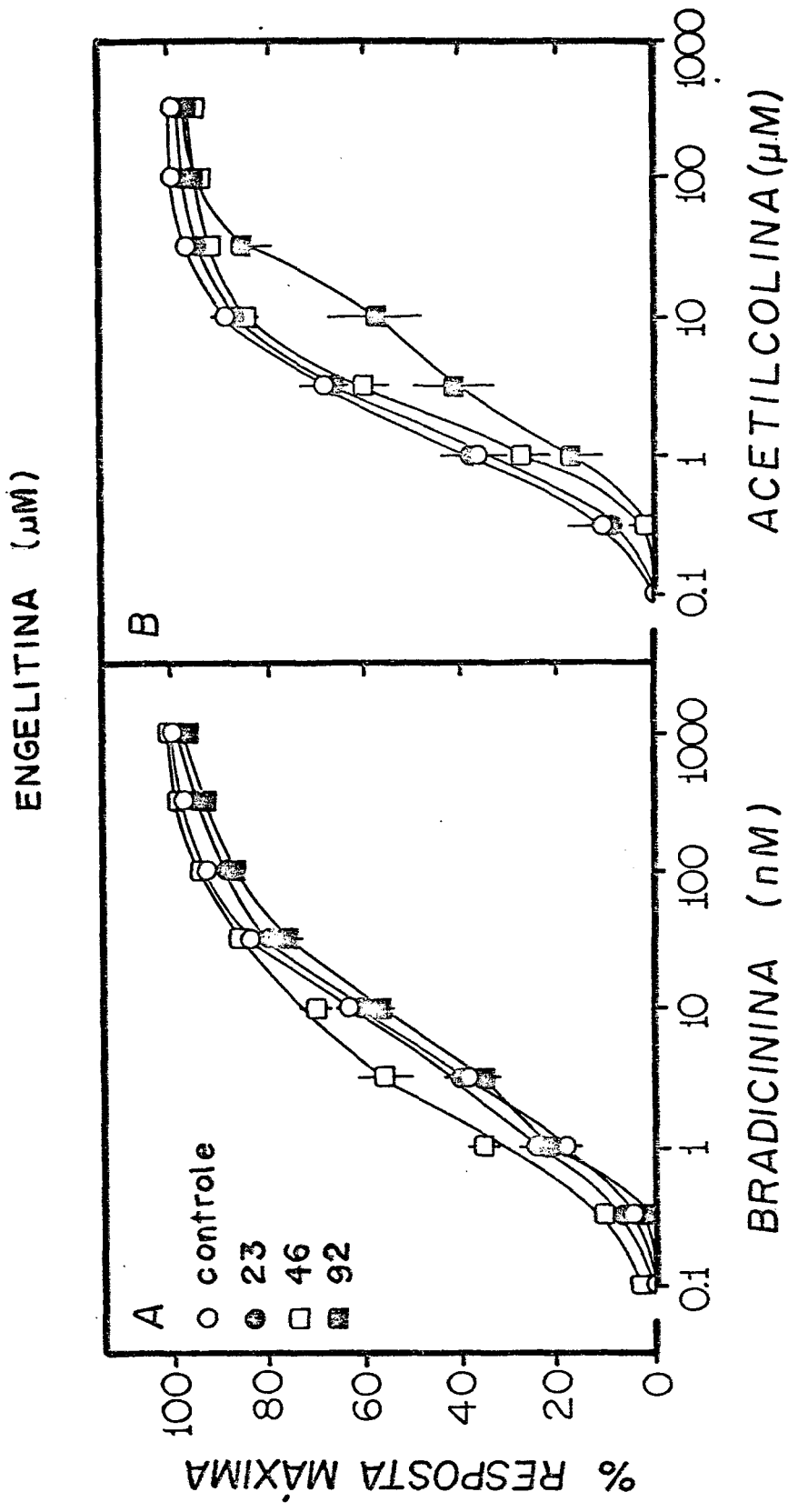


FIGURA 48 - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradycinin (A) e acetilcolina (B) no útero isolado de rato na ausência e na presença de engelitina. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

TABELA 40 - Valores aparentes de PA_2 (g/ml) para o extrato bruto hidroalcoólico obtido da Hymenoclea martiana em relação às respostas contráteis à bradicinina, lisil-bradicinina e acetilcolina no útero isolado de rata.

<u>Agonista</u>	PA_2 (g/ml, L.C.95%)	Inclinação (L.C.95%)	Correlação (média \pm EPM)
Bradicinina (n=6)	4,2 (4,1-4,5)	1,2 (0,9-1,7)	r=0,98 \pm 0,004
Lisil-bradicinina (n=5)	4,5 (4,4-4,6)	2,5 (2,1-2,7)	r=0,99 \pm 0,002
Acetilcolina (n=5)	4,6 (4,4-4,8)	0,9 (0,6-1,3)	r=0,90 \pm 0,09

L.C. = Limite de confiança (P < 0,05)

n = Número de experimentos

EPM = Erro Padrão da Média

PA_2 = Potência do Antagonismo

TABELA 41 - Efeito do extrato Hidroalcoólico da *Hymenaea martiana* sobre o edema causado pelo ácido araquidônico (2 mg) na orelha do camundongo.

Tratamento	Dose (mg/kg) ^a	Via	N	Aumento Peso Das Orelhas (mg)	% de Inibição	DE ₅₀ (mg/kg)
	-	P.O.	6	11,3 ± 1,7	-	
NaCl 0,9%	400	P.O.	6	9,7 ± 0,8	14,1*	> 800
Extrato	800	P.O.	6	8,7 ± 0,6	23,0*	
NaCl 0,9%	-	I.P.	6	12,8 ± 1,0	-	
Extrato	100	I.P.	6	9,0 ± 1,3	29,7*	
	200	I.P.	6	6,0 ± 0,6	53,1**	105
	400	I.P.	6	10,0 ± 0,3	21,9**	

a - Os animais foram tratados 60 minutos antes da administração do ácido araquidônico

Difere significativamente dos respectivos controles (*p < 0.05, **p < 0.01)

TABELA 42 - Efeito do extrato Hidroalcoólico da *Hymenaea martiana* sobre as contorções abdominais produzidas por acetilcolina (6 mg/kg, I.P.) em camundongos

Tratamento	Dose (mg/kg) ^a	Via	N	Número de Contorções	% Inibição	DE ₅₀ (mg/Kg)
NaCl 0,9%	-	P.O.	9	8.9 ± 1.4	-	
Extrato	100	P.O.	9	5.1 ± 1.6	42.7	
	200	P.O.	9	3.7 ± 1.1	58,4*	< 100
	400	P.O.	9	4.8 ± 1.3	46.1	
NaCl 0,9%	-	I.P.	12	4.75 ± 0.6	-	
Extrato	6.25	I.P.	9	1.3 ± 0.4	72.6**	
	12.5	I.P.	9	0.4 ± 0.2	91.6**	< 6,25
	25.0	I.P.	9	0.4 ± 0.2	91.6**	
	50.0	I.P.	9	0 ± 0	100**	

a - Os animais foram tratados V.O. (60') e I.P. (30') antes da administração de acetilcolina. Difere significativamente dos respectivos controles (*P < 0.05; **P < 0.01).

TABELA 43 - Efeito do extrato Hidroalcoólico da *Hymenaea martiana* sobre as contorções abdominais produzidas por ácido acético (0.6%, i.p.) em camundongos.

Tratamento	Dose (mg/kg) ^a	Via	N	Número de Contorções	% de Inibição	DE ₅₀ (mg/kg)
NaCl, 0.9%	-	P.O.	9	21.0 ± 3.3	-	
Extrato	100	P.O.	9	9.9 ± 2.4	52.8*	
	200	P.O.	9	8.1 ± 1.6	61.4*	< 100
	400	P.O.	9	14.4 ± 2.5	31.4	
NaCl 0.9%	-	I.P.	12	34.1 ± 1.7	-	
Extrato	6.25	I.P.	9	18.7 ± 1.4	45.2*	
	12.25	I.P.	9	5.8 ± 0.8	83.0**	4.6
	25.0	I.P.	9	7.5 ± 0.9	78.0**	
	50.0	I.P.	9	1.7 ± 0.4	95.0**	

a - Os animais foram tratados V.O. (60') e I.P. (30') antes da administração de ácido acético. Difere significativamente dos respectivos valores controles (*P < 0.05; **P < 0.01).

CAPÍTULO IV

IV - CONCLUSÃO

Considerando os resultados experimentais do presente trabalho, podemos concluir:

1 - As cascas de *Hymenaea martiana* Hayne, Arzeick (Leguminosae), planta empregada popularmente para o tratamento de diversas doenças, foram extraídas com acetato de etila e este filtrado sobre sílica gel com éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Destas frações, somente a de clorofórmio e de acetato de etila apresentaram atividade farmacológica ("in vitro").

2 - A fração de acetato de etila bruta ou previamente acetilada, foi fracionada em coluna de sílica gel, separando-se vários compostos, dos quais foram identificados três glicosídeos: astilbina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidroquercitina), engelitina (3-O- α -L-ramnosídeo de dihidrokaempferol) e eucryfina (5,7-dihidroxi-3-(α -O-L-ramnopiranosil)-4 H-1-benzopirano-4-1).

3 - A identificação destes compostos foi realizada por análise dos espectros U.V., I.V., RMN H¹ e RMN H¹³. No caso de eucryfina, a identificação foi realizada também por determinação de p. f. em mistura com o composto padrão e por análise em camada delgada junto a este.

4 - A análise do conjunto de testes farmacológicos realizados "in vivo" e "in vitro" revela que parte das ações medicinais atribuídas popularmente à *Hymenaea martiana* foi confirmada, apresentando em seu extrato, forte atividade antiedematogênica a a -

nalgésica, além de vários efeitos "in vitro". Entre eles, destaca-se a ação inibitória sobre a resposta à bradicinina, acetilcolina e prostaglandina. Os compostos isolados e acetilados mostraram também efeitos semelhantes ao extrato total, podendo ser os responsáveis, em parte, pelas ações farmacológicas observadas. Essas evidências são também reforçadas pela vasta bibliografia a respeito das atividades biológicas destes e de outros flavonóides, incluindo a ação antiinflamatória, antihistamínica, inibição da agregação plaquetária, entre outras. Contudo, não pode ser totalmente excluída a participação de outros compostos existente nesta espécie, como, por exemplo, os taninos, nas ações farmacológicas estudadas. Este ponto permanece para ser esclarecido em futuros estudos.

5 - Considerando que a acetilação dos compostos isolados foi bastante significativa para a atividade farmacológica destes, sugere-se que sejam tentadas novas modificações estruturais visando este objetivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) JOLY, A. B. Introdução à taxonomia vegetal. 7 ed., São Paulo, Nacional, 1985. p. 371-2.
- (2) DE MATOS, H. B. & WERNER, J. C. Comparison among five tropical legumes. Bol. Ind. Anim., 32(2):293-305, 1975.
- (3) KATOCH, D. C. et alii. Forage yield and chemical composition of some tropical pasture legumes in mid-hills of Himachal Pradesh. Forage Res. 4(2):173-5, 1978.
- (4) ANELLI, G. & NUTI, M. P. Seed chemical characteristics in some fodder plants cultivated in Somaliland. Riv. Agric. Subtrop. Trop., 72(1-2):101-7, 1978.
- (5) OBUKHOVA, Z. D. et alii. Organic and mineral composition of legume crop seeds in southern Kirgizian. Mikroelem. Zhivotnovod. Rastenievod., 8:38-47, 1969.
- (6) SOTELO, A. et alii. Chemical composition and toxic factors content in fifteen leguminous seeds. Q. J. Crude Drug Res., 16(3):143-9, 1978.
- (7) _____ . et alii. Chemical composition and toxic factors content of sixteen leguminous seeds. Q. J. Crude Drug Res., 18(1):9-16, 1980.
- (8) BALOGUN, A. M. & FETUGA, B. L. Chemical composition of so

me underexploited leguminous crop seeds in Nigeria. J. Agric. Food Chem., 34(2):189-92, 1986.

- (9) RIZZINI, C. T. & MORS, W. B. Botânica econômica brasileira. São Paulo, Pedagógica, Universitária, Ed. da USP, 1976. p. 78, 121, 167 e 172.
- (10) BRAGA, R. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. 4 ed., Natal, Ed. Universitária, Ed. da UFRN, 1960. p.301.
- (11) RANGEL, J. L. & SCHWARTZ, H. S. Brazilian Copals: Jutahyca resin. Rev. Chem. Ind., 5:293-5, 1936.
- (12) LEE, Y. T. & LANGENHEIM, J. H. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). Univ. Calif. Publ. Bot., 69:1-109, 1975.
- (13) LEE, Y. T. et alii. An evolutionary and ecological perspective of Amazonian *Hylaea* species of *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae). Acta Amaz., 3(1):5-38, 1973.
- (14) LEE, Y. T. & LANGENHEIN, J. H. Additional new taxa and new combinations in *Hymenaea* (Leguminosae, Caesalpinioideae). J. Arnold Arb. Harv. Univ., 55(3):441-52, 1974.
- (15) LANGENHEIN, J. H. & STUBBLEBINE, W. Comparative studies of the variability of leaf resin composition between parent and progeny trees of selected species of *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, tribo Detarieae). II. Comparison of additional Amazonia populations with one population in southeast Brazil. Acta Amaz., 10(2):293-309, 1980.

- (16) LANGENHEIN, J. H. et alii. Resin acids from two amazonian species of *Hymenaea*. Phytochemistry, 12:633-5. 1973.
- (17) NAKANO, T. & DJERASSI, C. Terpenoids. XLVI. Copalic acid. J. Org. Chem., 26:167-73, 1961.
- (18) SILVA, Nogueira et alii. Ceramic Moldings. Braz. Pedido PI 7701, 668. 19 sep., 1978. 10 p.
- (19) LANGENHEIN, J. H. & CRANSKSHAW, D. R. Variation in terpenes and phenolics through leaf development in *Hymenaea* and possible significance to herbivory. Biochem. Syst. Ecol., 9(2-3):115-24, 1981.
- (20) _____ & STUBBLEBINE, W. H. Variation in leaf resin composition between parent tree and progeny in *Hymenaea*: implications for herbivory in the humid tropics. Biochem. Syst. Ecol., 11(2)97-106, 1983.
- (21) _____. & HALL, G. D. Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocaneella*, on *Hymenaea stigonocarpa* in central Brazil. Biochem. Syst. Ecol., 11(1):29-36, 1983.
- (22) _____. & STUBBLEBINE, W. H. Effects of *Hymenaea courbaril* leaf resin on the generalist herbivore *Spodoptera exigua*. J. Chem. Ecol., 3(6):633-47, 1977.
- (23) ARRHENIUS, S. P. Inhibitory effects of terpenes and phenolics from *Hymenaea* and *Copaifera* (Leguminosae; Caesalpi

- nioideae) on the leaf fungus pestalotia (Deuteromycoetes, Melanconiales) in the neotropics. Diss. Abst. Int., 44 (6), 1983.
- (24) AMOS, G. L. Some siliceous timbers of British Guiana. Caribbean Forester, 12,133-7, 1951.
- (25) MARQUES DE MELO, C. F., et alii. Tropical woods reforestation, cellulose and paper. Inst. Pesq. Exp. Agropecuar . Norte. Ser: Tecnol.,2(1) 75 pp., 1971.
- (26) WISE, L. E. et alii. Chemical composition of eight tropical woods as indicated by proximate analysis. Trappi , 34:195-8, 1951.
- (27) WISNIEWSKI, A. Creaming agents in the concentration of Hevea latex. Inst. Agron. Norte (Brasil), (Circ. No. 4) : 3-18, 1954.
- (28) LEITE, E. C. T. Modification of the characteristics of synthetic or natural fibers. Braz. Pedido PI BR 8303. 718 , 10 Apr., 1984. 8 p.
- (29) KLEIN, LABORATÓRIOS LTDA. Guia de medicina vegetal. Porto Alegre, 1985.
- (30) CRUZ, G. L. Dicionário de plantas úteis no Brasil. Rio de Janeiro, Civilização Brasileira, 1979. p. 102.
- (31) MORTON, J. F. Atlas of medicinal plants of midle américa .

Illinois Springfield, Charles C. Thomas Puclisher,1981.
p. 322-3.

- (32) SAMPAIO, M. R. et alii. Modificação do método diPaolo e Moore para testes de extratos e com substância anti-câncer. Arq. Inst. Biol. São Paulo, 51, (1-4), 35-9,1984.
- (33) STATHER, F. Some little - Known tropical tanning materials. Collegium, 256-62, 1931.
- (34) Mc CLOSKEY, L. P. Leaf phenolic compounds in the tropical tree genera *Hymenaea* and *copaifera*. Diss. Abstr. Int., 46(1):DA8504948, 1985.
- (35) LANGENHEIN, J. H. et alii. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk of amazonian *Hymenaea courbaril*. Phytochemistry, 13(1):294-5, 1974.
- (36) KHOO, S. F. & OEHLISCHLAGER, A. C. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin. Tetraedron, 29(21), 3379-88, 1973.
- (37) MARSAIOLI, A. J. et alii. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. Phytochemistry, 14(8):1882-3, 1975.
- (38) FRIESE, F. W. Plantas medicinais brasileiras. São Paulo , Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo, 1934. 494 pp.

- (39) BRAY, G. T. & ISLIP, H. T. South american oil seeds. Ana-lyst,46:325-7, 1921.
- (40) OEHLSCHALAGER, A. C. et alii. Struture and Stereochemis-try of diterpenes from trachylobium verrucosum. Tetrae-dron suppl.8, Pt 1:203-16, 1966.
- (41) LANGENHEIN, J. H. et alii. ¹³C NMR and IR analyses of struc-ture, aging and botanical origin of dominican and mexi-can ambers. Phytochemistry,22(4):965-68, 1983.
- (42) LANGENHEIN, J.H. et alii. Quantitative variation in leaf pocket resin composition in Hymenaea. Biochem. Syst. E-col.,4(3):181-91, 1976.
- (43) DEVON, T. K. & SCOTT, A. L. Handbook of naturally occurring compounds. New York, Academic Press, 1972. v. 2.
- (44) HARBONE, J. B. Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis. 2. ed. New York, Chap-man and Hall, 1984. p. 37-76.
- (45) HARBONE, J. B. et alii. The flavonoids. New York, Acade-mic Press, 1975. pt.1 cap. 2 e 8.
- (46) MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. New York, Academic Press, 1982. p. 1-14.
- (47) ROBERTS, J. D. & CASERIO, M. C. Basic principles of orga-nic chemistry. 2 ed. California, W. A. Benjamin, 1977. p. 621, 925-6.

- (48) ALLINGER, N. L. et alii. Química orgânica. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1976. p. 626-7.
- (49) GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. p. 584.
- (50) VIEIRA, E. C. et alii. Bioquímica celular. Rio de Janeiro, Atheneu, 1979. p. 11-4.
- (51) DOMINGUEZ, X. A. Métodos de investigation fitoquímica. México, Centro Regional de Ayuda Técnica, 1973. p. 81.
- (52) MABRY, T. J. et alii. The systematic identification of flavonoids. Berlin, Springer-Verlag, 1970.
- (53) JURD, L. The chemistry of flavonoids compounds. New York, Pergamon Press, 1962.
- (54) JAY, M. et alii. Phytochemistry, 14, 1605, 1975.
- (55) MABRY, T. J. et alii. Baptsia flavonoids - Nuclear magnetic resonance analysis. Phytochemistry, 4:487-93, 1965.
- (56) THOMAS, M. B. & MABRY, T. J. Phytochemistry, 7:787, 1968.
- (57) ROSLER, H. et alii. The nuclear magnetic resonance analysis of the disaccharide in flavonoid rannoglucosides. J. Org. Chem., 30:4346, 1965.

- (58) HOROWITZ, R. M. & GENTILI, B. Long range proton shielding in C-glycosyl compounds. Structure of some new C-glycosyl flavones. Chem. Ind.:625-7, 1966.
- (59) MASSICOT, J. & MARTHE, J. P. Resonance magnétique nucléaire de produits naturels. III - Étude de quelques dérivés flavoniques et substance apparentées. Bull. Soc. Chim. France: 1962, 1962.
- (60) MASSICOT, J. et alii. Bull. Soc. Chim. France: 2712, 1963
- (61) HILLIS, W. E. & HORN, D. H. S. Nuclear magnetic resonance spectra and structures of some C-glycosyl flavonoids. Aust. J. Chem., 18(4):531-42, 1965.
- (62) LEVY, G. C. & NELSON, G. L. Carbon-13 nuclear magnetic resonance for organic chemists. New York, J. Wiley, 1972. cap. 5.
- (63) STOTHERS, J. B. Carbon-13 NMR spectroscopy. (Organic Chemistry, a Serie of monograph, 24). New York, Academic Press, 1972.
- (64) WAGNER, H. et alii. Neue flavon-C-O-glykoside aus melandrium album. Phytochemistry,18(5):907, 1979.
- (65) PELTER, A. et alii. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. J. Chem. Soc. Perkin I:2475, 1976.

- (66) MARKHAM, K. R. et alii. Phytochemistry, 17:1601, 1978.
- (67) MABRY, T. J. et alii. Advances in flavonoid research 1975-80. London, Chapman and Hall, 1982.
- (68) MARKHAM, K. R. & CHARI, V. M. Advances in flavonoid research 1975-80. London, Chapman and Hall, 1982.
- (69) CHARI, V. M. et alii. Proceedings of the 5 th Hungarian Bi flavonoid Symposium. Matrafures, Hungary, 1977. pp. 49.
- (70) MIDDLETON Jr., E. Some effects of flavanoids on mammalian cell systems. In: Hungarian bioflavonoid symposium, 7. Szeged, Hungary, may 16-18, 1985. Amsterdam, Elsevier, 1986. (Studies in Organic Chemistry, 23). p. 381-7.
- (71) HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem. Pharm., 32(7) , 1141-8, 1983.
- (72) VECKENSTED, A. et alii. Antiviral, Immunologic and toxicologic studies with quercetin in mice. In: Hungarian bioflavonoid Symposium, 7. Szeged, Hungary, may 16-18, 1985. Amsterdam, Elsevier, 1986. (Studies in Organic Chemistry, 23). p. 339-49.
- (73) MUCSI, I. Combined antiviral effect of quercetin and interferon on the multiplication of herpes simplex virus in cell culture. In: Hungarian bioflavonoid symposium,

7. Szeged, Hungary, may 16-18, 1985. Amsterdam, Elsevier, 1986. (Studies in Organic Chemistry, 23). p. 333-8.
- (74) BELADI, Y. et alii. The effect of flavonoids on the natural killer activity of human lymphocytes. In: Hungarian bioflavonoid symposium,7. Szeged, Hungary, may 16-18, 1985. Amsterdam, Elsevier, 1986. (Studies in Organic Chemistry, 23). p. 325-31.
- (75) GRUFFITHS, L. A. Altered patterns of drug metabolism in liver disease and their normalization by cyanidanol-3. In: Hungarian bioflavonoid symposium,7. Szeged, Hungary, may 16-18, 1985. Amsterdam, Elsevier, 1986. (Studies in Organic Chemistry, 23). p. 437-43.
- (76) MABRY, T. J. & ULUBELEN. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans. Agficul. & Food chem.,28:188, mar/Apr. 1980.
- (77) ARENS, H. et alii. Novel antiinflammatory flavonoids from Podophyllum versipelle cell culture. Planta Médica,6 : 468, 1986.
- (78) VILLAR, A. et alii. Hypolaetin 8-O-glucoside, an antiinflammatory flavonoid from Sideritis mugronensis. Planta Méd.,70:70, 1985.
- (79) PEARCE, P. L. et alii. Effect of quercitin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. J. Allergy Clin. Immunol.,73 (6):819, 1984.

- (80) MIDDLETON Jr., E. et alii. Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. J. Immunol., 127(2), 546-50, 1981.
- (81) MIDDLETON Jr., E. & DRZEWIECKI, G. Effects of flavonoids and transitional metal cations on antigen-induced histamine release from human basophils. Biochemi. Pharmacol., 31(7):1449-53, 1982.
- (82) MIDDLETON Jr., E. et alii. The effects of citrus flavonoids on human basophil and neutrophil function. Planta Méd., 53:325, 1987.
- (83) HOPE, W. C. et alii. Vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin. Biochem. Pharmacol. 32(2), 367-71, 1983.
- (84) KUBO, M. et alii. Scutellariae Radix X. Inhibitory effects on histamine release from rat peritoneal mast cells in vitro. Chem. Pharm. Bull., 32:5051-54, 1984.
- (85) CAZENAVE, J. P. et alii. The effects of flavonoids on human platelet function. In: Hungarian bioflavonoid symposium., 7. Szeged, Hungary, may 16-18, 1985. Amsterdam, Elsevier, 1986. (Studies in Organic Chemistry, 23). p. 373-80.
- (86) SWIES, J. et alii. Antiaggregatory effects of flavonoids in vivo and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase

- nase in vitro. Pol. J. Pharmacol. Pharm.,36. 455-65 , 1984.
- (87) BOURDILLAT, D. et alii. Hispidulin, a natural flavone, inhibits human platelet aggregation by increasing cAMP levels. Eur. J. Pharmacol.,147:1-6, 1988.
- (88) OKUDA, T. et alii. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. J. Nat. Prod.,50(4):680-3, 1987.
- (89) KUMAMOTO, H. et alii. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in lemon peelings. Nipp. Nôgeikagaku Kaishi,58(2):137-43, 1984.
- (90) KUMAMOTO, H. et alii. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in lemon peelings (Part II). Nipp. Nôgeikagaku Kaishi,59, 677-82, 1985.
- (91) KUMAMOTO, H. et alii. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in kinkan Fortunell Japonic. peelings. Agric. Biol. Chem.,49(9):2613-18, 1985.
- (92) CHAU, T. T. & HALEY, T. J. Flavonoid antagonism of the spasmogenic effect of angiotensin, bradykinin, and eleo-doisin on guinea pig ileum. J. Pharm. Sci.,58(5):621-3, 1969.
- (93) LAEKEMAN, G. M. et alii. Cardiovascular effects of 3-methylquercitin. Planta Méd.,6:433-6, Dez. 1986.

- (94) GOODWIN, R. S. et alii. Flavonoids from *Brickellia gutinosa*. J. Nat. Prod., 47(4):711-4, 1984.
- (95) JAYARAJ, A. P. et alii. The protective effect of meciadanol (O-methyl-3(+)-catechin) on experimental ulceration. Eur. Pharmac., 147:265-71, 1988.
- (96) HATAYAMA, K. et alii. Anti-ulcer effect of isoprenyl flavonoids, III. Synthesis and anti-ulcer activity of metabolites of 2'-carboximethoxy-4,4'-bis(3-methyl-2-butenyloxy)chalcone. Chem. Pharm. Bull., 33:1327-33, 1985.
- (97) KONTUREK, S. J. et alii. Antiulcer and gastroprotective effects of solon, a synthetic flavonoid derivative of spheradin, role of endogenous prostaglandins. Eur. J. Pharmac., 125:185-92, 1986.
- (98) MULKENS, A. & KAPETANIDIS, I. Flavonoides des feuilles de *Melissa officinalis* L. Lamiaceae. Pharm. Acta Helv., 62:19-21, 1987.
- (99) WAAGE, S. K. & HEDDIN, P. A. Quercetin 3-O-galactosyl-(1→6)-glucoside, a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity. Phytochemistry, 24(2):243-45, 1985.
- (100) SHRINER, R. L. et alii. Identificação sistemática dos compostos orgânicos. 6ª ed., Rio de Janeiro, ed. Guanabara - ra Dois, 1983. p. 27-31.
- (101) TSCHESCHE, R. et alii. Eucryphin, a new chromone rhamnoside

- de from the bark of *Eucyphia Cordifolia*. Phytochemistry, 18:867-869, 1979.
- (102) LE ROY, J. & JANKOWSKI, W. C. Carbon-13-NMR-Spectra. New York, J. Wiley, 1972.
- (103) MURRAY, R. D. H. & McCABE, P. H. Infrared studies of chromones-I carbonyl and hydroxyl regions. Tetrahedron, 25: 5819, 1969.
- (104) AGARWAL, P. K. & RASTOGI, R. P. Heterocycles, 16:2181, 1981.
- (105) NOMURA, T. & FUKAI, T. On the structures of mulberrin, mulbenochromene, cyclomulberrin, and cyclomulberrochromene. Heterocycles, 12(10):1289-95, 1979.
- (106) MARKHAM, K. R. & TERNAI, B. ^{13}C NMR of flavonoids-II Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. Tetrahedron, 32:2607, 1976.
- (107) COCQ, L. C. & LALLEMAND, J. Y. J. Chem. Soc. Comm., 4:150, 1977.
- (108) CALIXTO, J. B. et alii. Análise do extrato hidroalcoólico da *Hymenaea martiana* sobre a ação de vários neurotransmissores no útero de rata e íleo isolados de cobaia. X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, São Paulo, SP, 1988.
- (109) NEVES, P. C. A. et alii. Efeito anti-edematogênico e analgésico do extrato bruto hidroalcoólico da *Hymenaea martiana*. X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, São Paulo, SP, 1988.

- (110) OPAS, E. E. et alii. Pharmacological modulation of eicosanoid levels and hyperalgesia in yeast-induced inflammation. Biochem. Pharmacol.,36:547-51, 1987.
- (111) YOUNG, J. et alii. The mouse ear inflammatory response to tropical arachidonic acid. J. Inv. Dermatol.,82:367-1, 1984.
- (112) CHANG, J. et alii. Correlation between mouse skin inflammation induced by arachidonic acid and eicosanoid synthesis. Inflammation,10:205-14, 1986.
- (113) BERKENKOP, J. et alii. Drug activities in arachidonic acid and croton oil induced inflammations. Agents & Actions,16:601, 1985.
- (114) ARMER, E. C. et alii. Arachidonic acid-induced edema: correlation of swelling with production of lipoxygenase (LO) products. Agents & Actions,16:600, 1985.
- (115) LEVINI, J. D. et alii. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. Science,225:743-5, 1984.
- (116) ARUNLAKSHAMA, O. & SCHILD, M. O. Some quantitative uses of drug and antagonists. Br. J. Pharmacol.,14:48, 1959.