

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

FÁBIO HENRIQUE TENÓRIO DE SOUZA

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOBOTÂNICO DE
Richardia brasiliensis GOMES (RUBIACEAE)

SAPIENTIA EDIFICAT

João Pessoa – PB

2009

FÁBIO HENRIQUE TENÓRIO DE SOUZA

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOBOTÂNICO DE
***Richardia brasiliensis* GOMES (RUBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria de Fátima Agra

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

João Pessoa – PB

2009

S729e Souza, Fábio Henrique Tenório de.
Estudo fitoquímico e farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) / Fábio Henrique Tenório de Souza - João Pessoa, 2009.
194f. : il.
Orientadora: Celidarque da Silva Dias
Co-orientadores: Maria de Fátima Agra, Emídio Vasconcelos Leitão Cunha
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS/LTF
1. Produtos Naturais. 2. *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) – ervaço. 3. Plantas Medicinais. 4. Fitoquímica. 5. Farmacobotânica.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

FÁBIO HENRIQUE TENÓRIO DE SOUZA

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOBOTÂNICO DE
***Richardia brasiliensis* GOMES (RUBIACEAE)**

Dissertação aprovada em 13 de Novembro de 2009

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias

PhD em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Orientadora)

Profa. Dra. Micheline de Azevedo Lima

PhD em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Departamento de Engenharia e Meio Ambiente – Centro de Ciências Aplicadas e Educação
Universidade Federal da Paraíba – Campus IV
(Examinadora Externa)

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

PhD em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Interno)

A Natureza das Coisas

Composição: Accioly Neto

Se avexe não...
Amanhã pode acontecer tudo
Inclusive nada.

Se avexe não...
A lagarta rasteja
Até o dia em que cria asas.

Se avexe não...
Que a burrinha da felicidade
Nunca se atrasa.

Se avexe não...
Amanhã ela pára
Na porta da tua casa.

Se avexe não...
Toda caminhada começa
No primeiro passo.
A natureza não tem pressa
Segue seu compasso,
Inexoravelmente chega lá...

Se avexe não...
Observe quem vai
Subindo a ladeira,
Seja princesa, seja lavadeira...
Pra ir mais alto
Vai ter que suar.

*Dedico este trabalho a família Tenório-Souza, em especial aos meus pais, **Cícero Mariano de Souza e Maria Aparecida Tenório de Souza** por todo o afeto, apoio, motivação e, principalmente, pelo amor e carinho incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de aqui demonstrar o meu sincero agradecimento a todos que fizeram parte desta caminhada tão importante em minha vida. Este foi apenas o começo de muitos outros projetos ainda em construção, e é preciso saber reconhecer que sozinhos não conseguiríamos nada...

Quero agradecer primeiramente aos meus pais, **Cícero Mariano de Souza** e **Maria Aparecida Tenório de Souza**, por todo o amor, o carinho, a preocupação e a dedicação que sempre demonstraram ter a mim. Pelos esforços (e sei que foram muitos) e noites mal dormidas em favor de minha educação e que me permitiram chegar até aqui. Saibam que esta vitória é NOSSA. Que estas palavras sejam a expressão da minha gratidão por tudo que lhes devo. Amo vocês.

As minhas irmãs, **Flávia Danielly Tenório de Souza** pelo carinho e dedicação que me permitiram concluir o curso de graduação em Farmácia e **Flaviane Michelly Tenório de Souza** pelo carinho e convivência quase sempre harmoniosa (risos) e por me apoiar na análise dos espectros mesmo sem entender nada de “tripletos”, “quartetos” e tantos outros “etos” (risos). E também por juntas, suportarem esse irmão chatíssimo, mas que gosta muito de vocês.

A minha orientadora, a professora **Celidarque da Silva Dias**, pela amizade, carinho, cumplicidade, preocupação e ensinamentos durante esses quase três anos de convívio. Por ter confiado e acreditado sempre em mim, aceitando ser minha orientadora desde a época da iniciação científica e por permitir e apoiar, sem reclamar (risos), a realização de tantos outros projetos desta minha vida tão hiperativa. Muito obrigado *Teacher*.

A minha co-orientadora, a professora **Maria de Fátima Agra**, pela confiança, carinho, conselhos e acolhimento de imediato em seu Laboratório de Farmacobotânica, permitindo a realização de um dos vários sonhos, que é trabalhar com o mundo microscópico.

A minha futura co-orientadora, a professora **Sandra Rodrigues Mascarenhas** (ou simplesmente Sandra), também pela amizade, confiança, dedicação, incentivo e diversas oportunidades proporcionadas, em particular, o convívio com os surdos, nos vários Cursos de Extensão organizados, que me tornou uma pessoa mais humana e atenta aos problemas sociais. Muito obrigado *“minha cara”*.

Ao professor **Josean Fechine Tavares** (ou simplesmente Josean) pela dedicação e contribuição direta a este trabalho, seja participando das elucidações das substâncias, seja contribuindo para o aprendizado de todos em espectroscopia. Ao professor **Marcelo Sobral da Silva** por permitir assistir como ouvinte a disciplina “Técnicas Avançadas de RMN”, e também pela confiança, disposição em ajudar e auxílio na identificação dos compostos, *“tá entendendo”*.

A aluna de iniciação científica (minha “co-co-orientanda”, risos), **Tainá Souza Silva**, pela realização conjunta deste trabalho, pela dedicação e companhia. Saiba que este trabalho é NOSSO.

A amiga e “ex-co-co-orientadora”, **Danielle Serafim Pinto**, pela amizade, carinho, cumplicidade e ensinamentos desde a época de iniciação científica, sem nunca descer do salto (literalmente falando).

Ao amigo e técnico do Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL), **Vicente Carlos de Oliveira Costa** (Op. Vicente), pela amizade e pelo apoio seja na obtenção dos espectros de RMN, seja nas caronas para casa. Mas também pela paciência e generosidade em me ensinar tudo que sabe sobre os aparelhos de espectroscopia, permitindo operá-los sem receio e me concedendo status de “Op. Fábio” (risos).

As amigas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica: a “co-comendadora” e “guia espiritual”, **Gabriela Lemos de Azevedo Maia**, pela amizade, ensinamentos, conversas sempre acompanhadas de muito bom humor, pela tradução simultânea durante nossa passagem por Paris (risos), e também pelo computador, scanner e impressora (risos e mais risos); a **Analúcia “sem espaçamento” Guedes Silveira**

Cabral, pela convivência, carinho, amizade e também pelas etiquetas, solventes, pinças, vidrinhos e algodões de bolinha, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho (risos); a “*promoter*” **Daysianne Pereira de Lira**, pelos eventos sociais proporcionados sob sua orientação, por compartilhar as emoções do nosso primeiro concurso público para professor, por ser esta pessoa simples, sincera e batalhadora e pela grande amizade construída durante este mestrado; a “senhora” **Thaís Leite Rolim**, pela amizade e preocupação demonstradas nos inúmeros telefonemas, sempre com a mesma pergunta “*e aí Fábio, tá precisando de alguma coisa?*”. MUITÍSSIMO obrigado, principalmente pela generosidade e preocupação de TODAS elas, principalmente nesta última fase de elaboração do projeto de doutorado e da dissertação de mestrado.

A galerinha de Farmacocinética: **Karine Formiga Queiroga** (carinhosamente chamada de “*Ridxxxícica*” ou “*Maníaca Depressiva*”, risos) por compartilhar os inúmeros sábados e madrugadas durante esses quase dois anos de mestrado, e também pela torcida e por ser esta pessoa super batalhadora, “o que faz sugerir” um futuro muito promissor; e a **Socrates Gólzio dos Santos** pelas idéias, pela disponibilidade em ajudar a todos e pelos surtos psicóticos que tornavam os finais de semana sempre muito divertidos, mas... “*Cadê meu diploma?*” (risos).

A **Ana Sílvia Suassuna Carneiro Lúcio**, **Camila Silva de Figueiredo** e **Vivianne Marcelino de Medeiros**, pela amizade, carinho e excelente convivência no laboratório. A **Adriana Maria Fernandes de Oliveira** e **Anna Cláudia de Andrade Tomaz**, também pela amizade, torcida e jantares sempre muito saborosos.

A **Narlize Silva Lira** e a **Ricardo Carneiro Montes**, a galerinha das esponjas marinhas, pela convivência e amizade. Aos demais pós-graduandos da Farmacoquímica, **Isis Fernandes Gomes**, **Steno Lacerda de Oliveira**, **Fabiana Lima Silva**, **Marianne Guedes Fernandes**, **Rafael Rodrigo de Azevedo Ramirez**, **Roosevelt Albuquerque Gomes** e aos maleiros, **Stanley Juan Chavez Gutierrez**, **Roberto Jefferson Bezerra do Nascimento** e **Antônio Cláudio da Silva Lins**.

Aos alunos de Iniciação Científica, em especial, **Sandro de Sousa Leal**, **Cynthia Silveira Queiroga**, **Kamylla Lopes Marques**, **Flavia Talita de Sousa**

Wanderley, Heloisa Mara Batista Fernandes e Hellane Fabrícia Sousa de Lucena pela amizade, companheirismo e excelente convivência.

Aos amigos do Laboratório de Farmacobotânica, a tagarela **Kiriaki Nurit Silva**, a **lonaldo Diniz Basílio**, a **Niara Moura Porto**, a **Rafael Costa e Silva** e a **Gessica Anastácia Gomes da Costa**, pela amizade e acolhimento durante minha passagem pela Botânica, em especial, a **Nathalia Diniz Araújo**, pelos conselhos, incentivos e amizade, e por ensinar os famosos cortes botânicos extremamente finos e manuais.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, a carioca (ops!!! desculpa, mineira) **Juliana da Silva Brandi Oliveira**, ao extrovertido **Fagner Carvalho Leite**, a sensível **Jacqueline Alves Leite**, a organizada **Danielle Vasconcelos**, a super sincera **Gabrielle Demmany Gualberto Alexandre** e também, a **Jaime Ribeiro Filho**, a **Josenilson Feitosa de Lima**, a **Hermann Ferreira Costa** e a **Claudio Roberto Bezerra dos Santos**, pelo acolhimento e amizade.

Aos amigos da Monitoria de Biologia Celular e Imunologia, em especial, as monitoras **Rayana Pereira Feitosa**, **Liza Kikuti**, **Larissa Cunha Rodrigues** pela amizade, carinho e cumplicidade; e aos professores **Krystina Gorlach Lira**, **Luis Fernando Marques dos Santos**, **Maria Cecília Campos**, **José Antonio Novaes da Silva**, **Kellyane dos Anjos Carvalhos** e **Cristine Hirsch Monteiro** pelos conselhos sempre muito bem vindos e por despertarem em mim o desejo de ser professor.

A minha querida amiga bióloga, **Christiane Bezerra de Araújo** (FCa), pela amizade sólida e verdadeira, por ser uma amiga para todas as horas e por todos momentos divertidos que passamos juntos. A sensível e sempre apaixonada **Charlane Kelly Souto Pereira** por ser uma pessoa sincera e divertida, pelo compartilhamento de nossos dramas profissionais, pela companhia durante a apresentação dos inúmeros seminários sobre diabetes e pelo carinho e torcida. E a minha futura nutricionista **Mariana Menezes** pelo apoio e torcida.

“As_4_meninas” – **Ana Elisabeth Torres Souto**, **Raquel Calado da Rocha**, **Rute Calado da Costa**, e em especial **Manuela Torres Souto** (Manuelinha) – pela

amizade, o carinho, os conselhos, as confidências e o apóio, principalmente no início da minha trajetória acadêmica. Desculpa aí as festas não idas, os telefonemas não atendidos, as visitas bastante irregulares e as preocupações causadas quando eu passava dias sem dar notícias (risos). Saibam que vocês são minhas eternas amigas e que serão necessárias muitas vidas para eu agradecer tudo que fizeram por mim.

À titio **Tenorinho**, que mesmo ausente sei que onde estiver estará torcendo pelo meu sucesso. Obrigado por me levar aos locais de provas quando eu ainda era vestibulando; por esperar eu terminar as provas mesmo contra a minha vontade; pela preocupação e dedicação. Eu nunca vou esquecer dos seus gestos tão simples e ao mesmo tempo tão generosos. Até um dia!!!!!!

Aos professores da Pós-Graduação, em especial, a **Bagnólia Araújo Costa** (Mecanismos e Transdução Celular), **Demetrius Antonio Machado de Araújo** (Bioquímica Avançada), **Eduardo de Jesus Oliveira** (Técnicas Hinfenadas), **Maria de Fátima Vanderlei de Souza** (Métodos Físicos em Fitoquímica I), **Josean Fechine Tavares** (Métodos Físicos em Fitoquímica II), **Liana Clébia Soares Lima de Moraes** (Bioestatística) e **Marcia Regina Piuvezam** (Imunologia I).

A todos os meus amigos da turma de Mestrado 2008 pela boa convivência durante e após o término das disciplinas: **Ana Carolina de Carvalho Correia**, **Antonia Rosangela Soares Penha**, **Bruna Priscilla Vasconcelos Dantas**, **Camila Silva de Figueiredo**, **Fillipe de Oliveira Pereira**, **Geraldo Goncalves de Almeida Filho**, **João Carlos Lima Rodrigues Pita**, **Jonh Paul Albuquerque Caldas**, **Karine Formiga Queiroga**, **Marcelo Cavalcante Duarte**, **Maria do Carmo de Alustau**, **Renata Kelly de Paulo Moura**, **Thaísa Leite Rolim**, **Tiago Bezerra de Sá de Sousa Nogueira**, **Vitor Prates Lorenzo**, **Vivyanne dos Santos Falcão Silva**, **Wemerson Neves Matias**, a dupla sertaneja “Alcalóide e Saponina” representada por **Charlane Kelly Souto Pereira** e **Daysianne Pereira de Lira**, e a banda Gq/11 representada por **Carlos Alberto Fernandes Ramos** e **Rubens Batista Benedito**. Foi muito bom conhecer todos vocês.

Aos professores **Marcia Regina Piuvezam** e **Eduardo de Jesus Oliveira**, pela competência e excelente trabalho que vêm desenvolvendo na coordenação do

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Ao professor **José Maria Barbosa Filho** pela generosidade, simplicidade, boa vontade, por nunca dizer um não a um aluno, e também por sua garra e determinação que fizeram deste programa de pós-graduação, nível 6 junto a CAPES.

À direção do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica na pessoa da professora **Silvana Jales**. Ao professor **Fábio dos Santos Souza** pela disponibilidade em realizar os experimentos de rotação óptica. A professora **Bárbara Viviana de Oliveira Santos** pelas caronas, por torcer pelo meu sucesso e também pelos valiosos ensinamentos a cerca de outras metodologias.

A todos os técnicos de laboratório, em especial, **Severino Francisco Alves** (Seu Biu), e também a **Raimundo Nonato da Silva Filho** e **Wellington Lima Navarro** pela enorme ajuda nos experimentos, bem como, pela amizade, excelente convivência e por serem um exemplo de funcionários públicos. A **Tânia Maria Alves de Araújo**, secretária do curso de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e a todos os seguranças e funcionários da limpeza e da manutenção por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

A Universidade Federal da Paraíba pelo suporte técnico e estrutural; ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido e a todos os brasileiros que por meio do pagamento dos impostos, torna possível o desenvolvimento de pesquisas em nosso país.

A **Aquele** que eu nem sei ao certo quem é, mas que com certeza foi e é responsável para que tudo isto fosse real no dia de hoje, a quem eu devo a vida e o privilégio de conhecer todas estas pessoas.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

Fábio Henrique Tenório de Souza

RESUMO

TENÓRIO-SOUZA, F. H. **Estudo Fitoquímico e Farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2009. 194 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae), planta herbácea conhecida por “ervanço”, “poaia” e “ipeca”, é utilizada popularmente como emética, antidiabética, vermífuga e no tratamento de eczema, queimadura, bronquite, gripe, hemorróida e malária avícola. Estudos farmacológicos revelaram atividade antimicrobiana e antioxidante e investigações fitoquímicas anteriores resultaram no isolamento de terpenóides, flavonóide e cumarina. Este trabalho objetivou contribuir para o conhecimento do gênero *Richardia* e da família Rubiaceae por meio do estudo farmacobotânico e fitoquímico de *Richardia brasiliensis* Gomes. Para isto, o material vegetal foi coletado em João Pessoa – Paraíba e depositado no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) com o código Tenório-Souza 01. No estudo farmacobotânico, a morfologia externa do vegetal foi analisada à vista desarmada e com auxílio de estereomicroscópio. Para as morfodiagnoses microscópicas, foram realizadas secções paradérmicas e transversais das folhas (lâmina e pecíolo), bem como, secções transversais do caule e das raízes, que foram clarificadas, coradas, montadas entre lâmina e lamínula e analisadas ao microscópio óptico comum. A caracterização macroscópica de todos os órgãos evidenciou aspectos que são comuns às espécies pertencentes à família Rubiaceae, tais como, folhas simples opostas, estípulas interpeciolares, inflorescência cimosas, flores bissexuadas e actinomorfas, prefloração valvar e ovário ínfero. Microscopicamente, a folha é anfiestomática apresentando nas epidermes superior e inferior, estômatos paracíticos e tricomas tectores simples. A nervura principal apresenta feixe vascular colateral. O pecíolo possui feixe vascular em forma de arco e quatro pequenos feixes vasculares laterais. Em secção transversal, o caule em crescimento secundário é cilíndrico e o sistema vascular apresenta organização sifonostélica contínua ectoflóica, já a raiz principal apresenta parênquima cortical com idioblastos contendo ráfides e sistema vascular anficrival com organização protostélica nas raízes laterais e protostélica radiada na raiz principal. Para o estudo fitoquímico, o vegetal, após secagem e pulverização, foi submetido a processos de extração, partição e cromatografia para isolamento dos constituintes químicos. A estrutura química dos mesmos foi determinada por métodos espectroscópicos, tais como: Infravermelho, Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparações com modelos da literatura. Da fase hexânica obteve-se uma mistura de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol) e 15^1 -hidroxi-(15^1 -S)-porfirinolactona α ; da fase CHCl_3 foi isolado e identificado quatro cumarinas: cedrelopsina, norbraylina, braylina e 5,6-dimetoxi-7,8-[2'-(prop-1-en-2-il)-(2'-S)-2',3'-diidrofurano]cumarina (cumarineletefina), sendo esta última relatada pela primeira vez na literatura; e da fase AcOEt obteve-se o flavonóide canferol, contribuindo, portanto para a quimiotaxonomia do gênero *Richardia* e da família Rubiaceae.

Palavras-chave: Rubiaceae, *Richardia brasiliensis* Gomes, Fitoquímica. Farmacobotânica.

ABSTRACT

TENÓRIO-SOUZA, F. H. **Phytochemistry and Pharmacobotanical Study of *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2009. 194 p. Dissertation (Master in Pharmacology of Bioactive Natural Products and Synthetic) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae), a herbaceous plant known as "ervanço", "poaia" and "ipeca", is popularly used as emetic, anti-diabetic, worms and the treatment of eczema, burns, bronchitis, influenza, hemorrhoids and avian malaria. Pharmacological studies have shown antimicrobial and antioxidant activity and phytochemical previous investigations resulted in the isolation of terpenoids, flavonoids and coumarin. This study aimed to contribute to the knowledge of the *Richardia* genus and Rubiaceae family through the phytochemical and pharmacobotanical study of *Richardia brasiliensis* Gomes. For this, the plant material was collected in João Pessoa - Paraíba and deposited in the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) with the code Tenorio-Souza 01. In the pharmacobotanical study, the external morphology of the plant was to the naked eye and with a stereomicroscope. The microscopical morphodiagnosis were performed paradermic and transverse sections of leaves (blade and petiole), as well as transverse sections of stems and roots, which were cleared, stained, mounted between slide and coverslip and examined under the light microscope. The macroscopic anatomy of all organs revealed aspects that are common to species belonging to the family Rubiaceae, such as simple opposite leaves, interpetiolar stipules, flowering tops, flowers bisexual and actinomorphic, aestivation valve and inferior ovary. Microscopically, the leaf presents presenting the upper and lower epidermis, stomata and simple trichomes. The main vein has collateral vascular bundle. The petiole has vascular bundle arc-shaped and four small lateral bundles. In cross section, the stem secondary growth is cylindrical and the vascular system provides continuous siphonostele ectophloic organization, already has a tap root cortical parenchyma with idioblasts containing raphides and system with vascular bundle organization protostele in lateral roots and protostele radiated in the main root. For phytochemical study, vegetable, dried and pulverized, was subjected to extraction processes, and partition chromatography to isolate the chemical constituents. The chemical structure has been assessed by spectroscopic methods such as IR, Mass and uni-dimensional ^1H and ^{13}C NMR and comparisons with literature data. The hexane phase was obtained a mixture of steroids (β -sitosterol and stigmasterol) and 15¹-hydroxy-(15¹-S)- porfirinolactone a; CHCl_3 phase was isolated and identified four coumarins: cedrelopsin, norbraylin, braylin and 5,6 -dimethoxy-7,8-[2'-(prop-1-en-2-yl)-(2'-S)-2',3'-dihydrofuran]coumarin (cumarineletefin), the latter being first reported the literature, and the AcOEt phase was obtained the flavonoid kaempferol, contributing therefore to the chemotaxonomy of the *Richardia* genus and Rubiaceae family.

Keywords: Rubiaceae, *Richardia brasiliensis* Gomes, Phytochemistry, Pharmacobotanical.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de Etila
ALA	5-Aminolevulinato
APT	<i>Attached Proton Test</i>
Bra	Brácteas
cb	Câmbio
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CHCl₃	Clorofórmio
CH₃OH	Metanol
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
compr.	Comprimento
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
cs	Câmara subestomática
d	Dupleto
DAHPh	Ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato
dd	Duplo dupleto
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
eab	Epiderme da face abaxial
ead	Epiderme da face adaxial
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EM	Espectrometria de massas
end	Endoderme
ep	Epiderme
EPSF	Ácido 5-enolpiruvil-chiquímico-3-fosfato
es	Estrutura secretora
est	Estômato
EtOH	Etanol

ev	Elemento de vaso
FAA	Formaldeído – Ácido acético – Álcool etílico
fd	Feloderma
fg	Felogênio
fl	Floema
FMDV	<i>Foot and Mouth Disease Virus</i>
frt	Frutículo
fv	Feixe vascular
g	Gramma
H₂O	Água
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HR-TOF-MS	<i>High Resolution Time of Flight Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
id	Idioblastos
IES-EM	Espectro de massas por ionização de electrospray
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
kg	quilograma
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
LUDEM	Laboratório Unificado de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos
<i>m</i>	Multiplete
me	Medula
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol

MEP	Via do metileritritol-fosfato
mg	Miligrama
Mg²⁺	Magnésio
MHz	Megahertz
min	minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
MVA	Via do ácido mevalônico
NF-κB	Fator nuclear kappa B
n-BuOH	n-butanol
nm	Namômetro
NO	Óxido nítrico
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NUCAL	Núcleo de Caracterização e Análise
OMS	Organização Mundial de Saúde
ov	Ovário
pág.	Página
PAL	Fenilalanina amônia liase
pc	Parênquima cortical
pe	Parênquima esponjoso
pec	Pecíolo
PEP	Fosfoenolpiruvato
pet	Pétalas
pf	Parênquima fundamental
pm	Parênquima medular
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
pp	Parênquima paliçádico
ppm	Partes por milhão
psc	Parênquima do sistema de condução
q	quarteto
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

R_f	Fator de Retenção
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
sc	Sistema cortical
sep	Sépalas
sl	Simpleto largo
sr	Sistema de revestimento
su	Súber
SUS	Sistema Único de Saúde
sv	Sistema vascular
t	Tripleto
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
tq	Tripleto de quintetos
tri	Tricomas
tRNA	Ácido ribonucléico transportador
tts	Tricoma tector simples
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultravioleta
xi	Xilema
δ	Deslocamento químico em ppm
μg	micrograma
μm	Micromêtro

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Etapas envolvidas no processo de obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	69
Esquema 2.	Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase hexânica de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	72
Esquema 3.	Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	74
Esquema 4.	Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Comparação do número de espécies apresentadas por algumas famílias do Reino Vegetal: (a) Asteraceae, (b) Orchidaceae, (c) Leguminosae, (d) Rubiaceae e (e) Graminae	38
Figura 2.	Distribuição geográfica da família Rubiaceae no mundo, representada nas áreas em verde	39
Figura 3.	Principais representantes da família Rubiaceae: (a) <i>Coffea arabica</i> L. e (b) <i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes	40
Figura 4.	Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes a família Rubiaceae	42
Figura 5.	Distribuição geográfica do gênero <i>Richardia</i> no mundo, representada nas áreas em verde	44
Figura 6.	Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero <i>Richardia</i> L.: <i>Richardia grandiflora</i> (Cham. & Schtdl.) Steud. e <i>Richardia scabra</i> L.	47
Figura 7.	Distribuição geográfica da espécie <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes no mundo, representada nas áreas em verde	49
Figura 8.	Prancha ilustrativa mostrando <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes e seus detalhes anatômicos	50
Figura 9.	Substâncias isoladas de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes em estudos anteriores	52
Figura 10.	Representação esquemática da biossíntese dos derivados porfirínicos segundo Chikaraishi e colaboradores (2005) e Rüdiger (1997)	56
Figura 11.	Representação esquemática da biossíntese de cumarinas segundo Simões e colaboradores (2007) e Bourgaud e colaboradores (2006)	59
Figura 12.	Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides segundo Dewick (1997) (primeira etapa – rota do ácido chiquímico)	63
Figura 13.	Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides segundo Dewick (1997) (segunda etapa – rota do acetato polimalonato)	64
Figura 14.	Ilustrações demonstrando os cortes transversais feitos em caule e/ou raiz (esquerda) e folhas (direita)	67

Figura 15.	<i>Richardia brasiliensis</i> Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Visão geral da espécie em seu hábitat mostrando a inflorescência; (B) Infrutescência sorose; (C) Frutículo inteiro e em secção transversal; ovário tricarpelar-trilocular, evidenciando os óvulos; (D) Caule com tricomas; (E) Flor evidenciando cálice, corola, estames e gineceu; (F) Raízes principal e lateral; (G) Semente inteira e em secção trasnversal e longitudinal; (H) Folhas em vista abaxial e adaxial, respectivamente	81
Figura 16.	Epiderme em vista frontal de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Face adaxial com tricoma tector simples; (B) Detalhe da face adaxial, células epidérmicas com parede anticlinal reta e estômatos anisocítico e anomocítico; (C) Face abaxial com tricoma tector simples; (D) Detalhe da face abaxial, células epidérmicas com parede anticlinal ondulada e estômatos anisocítico e anomocítico	83
Figura 17.	Lâmina foliar em secção transversal de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Mesofilo heterogêneo bifacial; (B) Detalhe do parênquima paliádico e da epiderme da face adaxial; (C) Detalhe do parênquima lacunoso e da epiderme da face abaxial evidenciando estômato, câmara subestomática e feixe vascular; (D) Bordo foliar	84
Figura 18.	Nervura principal da lâmina foliar em secção transversal de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Visão geral da nervura principal, região mediana; (B) Detalhe da face abaxial evidenciando a epiderme e o parênquima fundamental adjacente; (C) Detalhe da face adaxial evidenciando a epiderme e o parênquima fundamental adjacente; (D) Detalhe do feixe vascular colateral aberto	85
Figura 19.	Pecíolo, em secção transversal, de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Visão geral, na região proximal, mostrando os cinco feixes vasculares; (B) Detalhe da epiderme da face abaxial e do parênquima fundamental; (C) Detalhe do feixe vascular central, em arco; (D) Detalhe de um feixe vascular circular	86
Figura 20.	Caule, em secção transversal, de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes (Tenório-Souza 01). (A-B) Visão geral de caule em estrutura secundária; (C) Detalhe do sistema de revestimento e cortical evidenciando estômato, estrutura secretora e parênquima cortical; (D-E) Detalhe do sistema vascular e do endoderma; (D) Detalhe da região medular mostrando idioblastos com drusas e areia cristalina	88
Figura 21.	Secção transversal de raízes, em crescimento secundário, de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Visão geral de raiz lateral; (B) Detalhe do sistema de revestimento, cortical e	

	vascular de raiz lateral, mostrando súber, felogênio e feloderma; (C-D) Visão geral de raiz principal; (E) Detalhe do sistema de revestimento, cortical e vascular, evidenciando súber, parênquima cortical com idioblastos e cordões floemáticos	90
Figura 22.	Substâncias isoladas de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes no presente trabalho	91
Figura 23.	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>Rb-1</i>	92
Figura 24.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>Rb-1</i>	93
Figura 25.	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>Rb-1</i> na região de 3,4 – 5,5 ppm	94
Figura 26.	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>Rb-1</i> na região de 0,6 – 2,4 ppm	94
Figura 27.	Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>Rb-1</i>	95
Figura 28.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>Rb-1</i> na região de 35,0 – 58,0 ppm	96
Figura 29.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de <i>Rb-1</i> na região de 11,0 – 34,0 ppm	96
Figura 30.	Estruturas químicas de <i>Rb-1</i> : β -sitosterol (à esquerda) e estigmasterol (à direita)	97
Figura 31.	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>Rb-2</i>	99
Figura 32.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Rb-2</i>	101
Figura 33.	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de 5,8 – 9,9 ppm	102
Figura 34.	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de 3,2 – 5,2 ppm	102
Figura 35.	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de 1,8 – 2,6 ppm	103
Figura 36.	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de 0,7 – 1,7 ppm	103
Figura 37.	Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Rb-2</i>	105
Figura 38.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de 134,0 – 174,0 ppm	106

Figura 39.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de 93,0 – 133,0 ppm	106
Figura 40.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de 31,0 – 62,0 ppm	107
Figura 41.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de 10,0 – 30,0 ppm	107
Figura 42.	Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-2</i>	108
Figura 43.	Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de (4,5 – 10,5 ppm) x (90,0 – 125,0 ppm)	109
Figura 44.	Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de (3,2 – 5,0 ppm) x (48,0 – 63,0 ppm)	109
Figura 45.	Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de (0,5 – 4,5 ppm) x (10,0 – 42,0 ppm)	110
Figura 46.	Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de (0,6 – 2,0 ppm) x (13,0 – 27,0 ppm)	110
Figura 47.	Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-2</i> na região de (0,8 – 2,6 ppm) x (27,0 – 42,0 ppm)	111
Figura 48.	Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i>	112
Figura 49.	Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i> na região de (0,5 – 6,0 ppm) x (0,5 – 6,0 ppm)	112
Figura 50.	Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i> na região de (0,6 – 3,0 ppm) x (0,6 – 3,0 ppm)	113
Figura 51.	Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i>	114
Figura 52.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i> na região de (1,0 – 10,0 ppm) x (110,0 – 173,0 ppm)	114
Figura 53.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i> na região de (1,5 – 5,0 ppm) x (130,0 – 156,0 ppm)	115
Figura 54.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i> na região de (0,1 – 4,5 ppm) x (15,0 – 60,0 ppm)	115
Figura 55.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i> na região de (1,0 – 4,5 ppm) x (106,0 – 176,0 ppm)	116
Figura 56.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Rb-2</i> na região de (0,1 – 4,5 ppm) x (10,0 – 60,0 ppm)	116

Figura 57.	Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-2</i>	118
Figura 58.	Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-2</i> na região de (3,0 – 10,0 ppm) x (3,0 – 10,0 ppm)	118
Figura 59.	Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-2</i> na região de (0,1 – 5,5 ppm) x (0,1 – 5,5 ppm)	119
Figura 60.	Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY para <i>Rb-2</i>	120
Figura 61.	Espectro de massas IES-EM (pos) de <i>Rb-2</i>	120
Figura 62.	Estrutura química de <i>Rb-2</i> : 15 ¹ -hidroxi-(15 ¹ -S)-porfirinolactona a .	123
Figura 63.	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>Rb-3</i>	124
Figura 64.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-3</i>	126
Figura 65.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-3</i> na região de 5,2 – 7,7 ppm	126
Figura 66.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-3</i> na região de 5,2 – 5,3 ppm	127
Figura 67.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-3</i> na região de 1,6 – 4,0 ppm	127
Figura 68.	Espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Rb-3</i>	128
Figura 69.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Rb-3</i> na região de 104,0 – 164,0 ppm	129
Figura 70.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Rb-3</i> na região de 16,0 – 59,0 ppm	129
Figura 71.	Espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-3</i>	130
Figura 72.	Expansão do espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-3</i> na região de (5,0 – 7,8 ppm) x (70,0 – 150,0 ppm)	131
Figura 73.	Expansão do espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-3</i> na região de (0,0 – 4,3 ppm) x (0,0 – 70,0 ppm)	131
Figura 74.	Espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-3</i>	132
Figura 75.	Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-3</i> na região de (1,0 – 5,5 ppm) x (1,0 – 5,5 ppm)	132
Figura 76.	Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-3</i>	134

Figura 77.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-3</i> na região de (1,5 – 4,5 ppm) x (105,0 – 160,0 ppm)	135
Figura 78.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-3</i> na região de (1,4 – 2,1 ppm) x (10,0 – 37,0 ppm)	135
Figura 79.	Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-3</i>	136
Figura 80.	Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-3</i> na região de (1,0 – 6,5 ppm) x (1,0 – 6,5 ppm)	136
Figura 81.	Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY para <i>Rb-3</i>	137
Figura 82.	Estrutura química de <i>Rb-3</i> : 7-hidroxi-6-metoxi-8-prenilcumarina (cedrelopsina)	138
Figura 83.	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>Rb-4</i>	139
Figura 84.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-4</i>	141
Figura 85.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-4</i> na região de 5,6 – 7,6 ppm	141
Figura 86.	Espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Rb-4</i>	142
Figura 87.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Rb-4</i> na região de 104,0 – 164,0 ppm	143
Figura 88.	Espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-4</i>	143
Figura 89.	Expansão do espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-4</i> na região de (5,4 – 8,0 ppm) x (107,0 – 145,0 ppm)	144
Figura 90.	Espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-4</i>	144
Figura 91.	Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-4</i>	147
Figura 92.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-4</i> na região de (5,4 – 8,3 ppm) x (105,0 – 160,0 ppm)	147
Figura 93.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-4</i> na região de (6,7 – 7,0 ppm) x (140,5 – 146,0 ppm)	148
Figura 94.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-4</i> na região de (1,0 – 7,5 ppm) x (25,0 – 85,0 ppm)	148
Figura 95.	Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-4</i>	149

Figura 96.	Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY para <i>Rb-4</i>	149
Figura 97.	Estrutura química de <i>Rb-4</i> : 6-hidroxi-7,8-[2',2'-dimetilpirano] cumarina (norbraylina)	151
Figura 98.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de <i>Rb-5</i>	152
Figura 99.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de <i>Rb-5</i> na região de 5,6 – 7,7 ppm	153
Figura 100.	Espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 50 MHz) de <i>Rb-5</i>	153
Figura 101.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 50 MHz) de <i>Rb-5</i> na região de 106,0 – 164,0 ppm	154
Figura 102.	Estrutura química de <i>Rb-5</i> : 6-metoxi-7,8-[2',2'-dimetilpirano] cumarina (braylina)	154
Figura 103.	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>Rb-6</i>	155
Figura 104.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-6</i>	157
Figura 105.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-6</i> na região de 5,0 – 8,0 ppm	157
Figura 106.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Rb-6</i> na região de 1,5 – 4,3 ppm	158
Figura 107.	Espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Rb-6</i>	159
Figura 108.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Rb-6</i> na região de 84,0 – 166,0 ppm	159
Figura 109.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Rb-6</i> na região de 10,0 – 70,0 ppm	160
Figura 110.	Espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-6</i>	161
Figura 111.	Expansão do espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de <i>Rb-6</i> na região de (3,4 – 6,0 ppm) x (58,0 – 116,0 ppm)	161
Figura 112.	Espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-6</i>	162
Figura 113.	Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-6</i> na região de (1,6 – 5,6 ppm) x (1,6 – 5,5 ppm)	162
Figura 114.	Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-6</i>	164

Figura 115.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-6</i> na região de (2,4 – 8,8 ppm) x (104,0 – 165,0 ppm)	164
Figura 116.	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-6</i> na região de (0,8 – 6,5 ppm) x (10,0 – 92,0 ppm)	165
Figura 117.	Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-6</i>	165
Figura 118.	Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Rb-6</i> na região de (1,1 – 5,9 ppm) x (1,4 – 5,7 ppm)	166
Figura 119.	Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY para <i>Rb-6</i>	166
Figura 120.	Proposta biossintética para <i>Rb-6</i> partindo do ácido 2',4'-diidroxicinâmico	167
Figura 121.	Espectro de massas HR-TOF-MS (pos) de <i>Rb-6</i>	169
Figura 122.	Estrutura química de <i>Rb-6</i> : 5,6-dimetoxi-7,8-[2'-(prop-1-en-2-il)-2',3'-diidrofurano] cumarina (cumarieletefina)	169
Figura 123.	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>Rb-7</i>	170
Figura 124.	Espectro de RMN ¹³ C - APT (CD ₃ OD, 50 MHz) de <i>Rb-7</i>	172
Figura 125.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CD ₃ OD, 50 MHz) de <i>Rb-7</i> na região de 90,0 – 180,0 ppm	172
Figura 126.	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 200 MHz) de <i>Rb-7</i>	173
Figura 127.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 200 MHz) de <i>Rb-7</i> na região de 6,0 – 8,3 ppm	174
Figura 128.	Estrutura química de <i>Rb-7</i> : 5,7,4'-triidroxiflavonol ou 3,5,7,4'-tetraidroxiflavona (canferol)	175

LISTA QUADROS

Quadro 1.	Enquadramento taxonômico de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes segundo Stevens (2007)	48
Quadro 2.	Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase hexânica de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes, frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações obtidos após análise em CCDA	71
Quadro 3.	Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes, frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações obtidos após análise em CCDA	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Deslocamentos químicos e tipos de sinais para os átomos de carbono e hidrogênio de <i>Rb-1</i> , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) citados por Tomaz (2008) para as mesmas substâncias	98
Tabela 2.	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para <i>Rb-2</i> , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	121
Tabela 3.	Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Rb-2</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de Porfirinolactona em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente)	122
Tabela 4.	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono e hidrogênio da substância <i>Rb-3</i> , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	137
Tabela 5.	Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Rb-3</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente), de cedrelopsina em $\text{DMSO-}d_6$ (potência não informada) e de isocedrelopsina em CD_3OD (300 e 75 MHz, respectivamente)	138
Tabela 6.	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono e hidrogênio da substância <i>Rb-4</i> , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	150
Tabela 7.	Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Rb-4</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de cedrecumarina A em CD_3OD (300 e 100 MHz, respectivamente)	150
Tabela 8.	Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Rb-5</i> em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente), <i>Rb-4</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de braylina em CD_3OD (300 e 100 MHz, respectivamente)	152
Tabela 9.	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono e hidrogênio da substância <i>Rb-6</i> , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	167
Tabela 10.	Dados comparativos de RMN de ^1H e ^{13}C de <i>Rb-6</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de hedyotiscona A em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente)	168

Tabela 11. Deslocamentos químicos e tipos de sinais para os átomos de carbono e hidrogênio de *Rb-7*, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CD_3OD , bem como, os deslocamentos químicos dos hidrogênios (δ_{H}^*) e carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Pizzolatti (2003) para a mesma substância (600 e 150 MHz, respectivamente) em $\text{DMSO}-d_6$ 175

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE FIGURAS

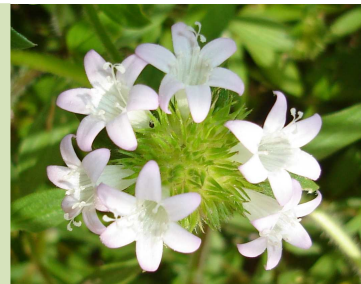
LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	32
1.1. Produtos Naturais: importância científica validação	32
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo geral	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	38
3.1. Considerações sobre a família Rubiaceae Jussieu	38
3.2. Considerações sobre o gênero <i>Richardia</i> Linnaeus	44
3.3. Considerações sobre <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	48
3.4. Considerações químicas, biológicas e farmacológicas sobre as classes de constituintes químicos isolados de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes e seus aspectos biossintéticos	53
3.4.1. <i>Derivados porfirínicos</i>	53
a) <i>Propriedades farmacológicas dos derivados porfirínicos</i>	54
b) <i>Aspectos biossintéticos dos derivados porfirínicos</i>	55
3.4.2. <i>Cumarinas</i>	56
a) <i>Propriedades farmacológicas das cumarinas</i>	57
b) <i>Aspectos biossintéticos das cumarinas</i>	58
3.4.3. <i>Flavonóides</i>	59
a) <i>Papel biológico e propriedades farmacológicas dos flavonóides</i>	61
b) <i>Aspectos biossintéticos dos flavonóides</i>	62
4. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA	66
4.1. Estudo farmacobotânico de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	66
4.1.1. <i>Coleta e identificação do material botânico</i>	66

4.1.2. Estudo morfológico das folhas, caule, raízes, inflorescência, infrutescência e sementes de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	66
4.1.3. Estudo anatômico das folhas, caules e raízes de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	67
4.2. Estudo fitoquímico de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	68
4.2.1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto (EEB)	68
4.2.2. Isolamento e purificação dos constituintes químicos	70
a) Processamento cromatográfico da fase hexânica	71
b) Processamento cromatográfico da fase clorofórmica	72
c) Processamento cromatográfico da fase acetato de etila	75
4.2.3. Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados	75
a) Espectroscopia de Infravermelho (IV)	75
b) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	76
c) Espectrometria de Massas (EM)	77
d) Rotação óptica e ponto de fusão	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1. Farmacobotânica de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	79
5.1.1. Nome aceito e sinônimos de acordo com Lewis e Oliver (1974)	79
5.1.2. Morfodiagnose macroscópica	79
5.1.3. Morfodiagnose microscópica	81
5.2. Fitoquímica de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	91
5.2.1. Determinação estrutural de Rb-1	92
5.2.2. Determinação estrutural de Rb-2	98
5.2.3. Determinação estrutural de Rb-3	123
5.2.4. Determinação estrutural de Rb-4	139
5.2.5. Determinação estrutural de Rb-5	151
5.2.6. Determinação estrutural de Rb-6	155
5.2.7. Determinação estrutural de Rb-7	170
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	178
REFERÊNCIAS	180

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Medicinais: importância e validação científica

Amenizar o sofrimento e tentar curar doenças pela ingestão de ervas e folhas, possivelmente foi uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS-JUNIOR; BOLZANI, 2006). As plantas medicinais tem sido utilizadas sob os critérios dos conhecimentos popular e científico em diferentes contextos terapêuticos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). Porém, a humanidade se aproveita de uma fração muito pequena das plantas e o reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita. Sendo possuidor da maior e mais rica biodiversidade do planeta, o Brasil não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (PINTO et al., 2002).

Em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu os medicamentos de origem vegetal como recurso terapêutico (WHO, 2008) e recomendou aos países que executassem levantamentos regionais e identificação botânica de espécies vegetais usadas na medicina popular tradicional, estimulassem e indicassem o uso das plantas medicinais com eficácia e segurança comprovadas, bem como, contra-indicassem o emprego das práticas medicinais consideradas inúteis ou prejudiciais. Também preconiza, em seu documento intitulado “Estratégia da OMS sobre Medicina Tradicional 2002 – 2005”, o desenvolvimento de políticas públicas para o uso de plantas medicinais, observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, acesso e uso racional (LORENZI; MATOS, 2008).

O sistema público de saúde no Brasil ainda não possui uma política de assistência farmacêutica capaz de suprir as necessidades medicamentosas da sociedade, sobretudo no Nordeste brasileiro, onde a população carente enfrenta mais dificuldades para obter os medicamentos essenciais (COSENDY et al., 2000). No entanto, a política para uso de plantas medicinais no serviço público foi estabelecida através da portaria nº. 971 de 03 de Maio de 2006, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006). Recentemente, o Ministério da Saúde (MS) divulgou a “Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde” (RENISUS), constituída por 71 espécies vegetais que foram selecionadas por serem amplamente utilizadas pela população brasileira e por contarem com

evidências para indicação de uso na atenção básica à saúde (BRASIL, 2009). Então, a normatização do mercado de produtos derivados de plantas medicinais, a cargo do MS, a instauração de Fóruns de debates e a elaboração de leis que assegurem o acesso aos conhecimentos tradicionais, são demonstrações de que há uma preocupação governamental na prospecção ética da biodiversidade do país (FUNARI; FERRO, 2005).

O interesse pelas plantas medicinais e pelos produtos naturais aumenta ao considerarmos a problemática para os tratamentos atuais de várias patologias. As drogas ansiolíticas, por exemplo, podem apresentar risco de dependência e síndrome de abstinência, retardo para início do efeito ou ainda efetividade duvidosa (ANDREATINI et al., 2001). Os analgésicos e anti-inflamatórios, por sua vez, podem produzir ulceração gástrica, intolerância gastrintestinal, bloqueio da agregação plaquetária e reações de hipersensibilidade, além de outras complicações quando do uso prolongado com glicocorticóides ou analgésicos opióides (GYLMAN, 1996). Considerando isso, há a necessidade de investigação e pesquisa de novas drogas que possam diminuir tais efeitos colaterais e tratar de modo efetivo e seguro estas desordens, seja com o extrato bruto ou com os compostos isolados da imensa flora brasileira.

As recentes investigações etnobotânicas da flora nordestina têm demonstrado o constante uso de plantas medicinais, inclusive por usuários de serviços públicos de áreas urbanas (AMORIM et al., 2003; SILVA; ANDRADE, 2005). A maior facilidade na coleta e comercialização de plantas cultiváveis em áreas urbanas, entretanto, tem contribuído para o uso de plantas medicinais sem respaldo científico, resultando em automedicação e elevação tanto do risco à saúde quanto dos custos operacionais dos serviços de saúde pública (OLIVEIRA, 2006).

Para uma planta ser considerada medicinal no Brasil, faz-se necessário uma resposta positiva a ensaios que comprovem a propriedade terapêutica que lhe é atribuída, bem como, o seu grau de toxicidade nas doses compatíveis com seu emprego medicinal, observados em estudos farmacológicos pré-clínicos com avaliação da toxicidade, seguido de ensaio clínico (LORENZI; MATOS, 2008).

No processo de embasamento científico de uma medicina alternativa, a química de produtos naturais se destaca ao permitir o conhecimento estrutural dos metabólitos secundários responsáveis pelos efeitos farmacológicos das plantas medicinais (SOUZA; SILVA, 2006). Em suas inúmeras atribuições, engloba o

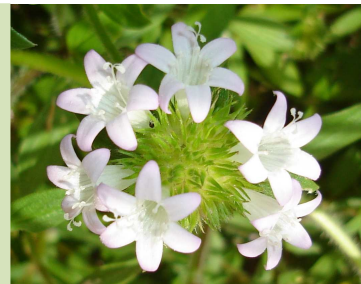
isolamento e a identificação dos constituintes químicos bioativos, atuando como fonte de novos fármacos, e realiza pesquisas para validação de medicamentos de origem vegetal, sendo assim, a base essencial para o direcionamento de estudos farmacológicos.

Numa análise preliminar de uma droga vegetal não se pode esquecer a importância dos estudos botânicos. As espécies vegetais são muitas vezes identificadas pelo nome vernacular que omite a verdadeira identidade da planta, pois existe grande variação destes nomes associados a diferentes espécies e que mudam conforme a região, a cultura ou o uso (MARTINS-DA-SILVA, 2002). Kanashiro (2002), em seu estudo com madeiras, afirma que por serem semelhantes a olhos não-treinados, as espécies são confundidas e exploradas de forma desordenada. Por isto é importante fornecer dados para que os profissionais possam identificar corretamente as espécies em estudo.

Desta forma, o conhecimento cada vez mais aprofundado das espécies vegetais, desenvolvido por estudos integrados nas áreas de botânica, química, farmacologia e outras ciências afins, é fundamental para dar suporte e maior longevidade ao uso do potencial natural ainda existente no planeta (VIEGAS-JUNIOR; BOLZANI, 2006).

Vislumbrando o potencial farmacológico das substâncias isoladas de espécies da família Rubiaceae, a ocorrência de muitas espécies ainda não devidamente exploradas do ponto de vista químico, farmacológico e botânico, e reconhecendo a importância do gênero *Richardia*, no qual suas espécies são amplamente utilizadas na medicina popular para diversas enfermidades, optamos por enveredar pela trilha do estudo da espécie *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae), cujos estudos farmacobotânicos, químicos e farmacológicos ainda são pouco conhecidos, o que poderá conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento do gênero *Richardia* e da família Rubiaceae enfatizando os aspectos farmacobotânico e fitoquímico de *Richardia brasiliensis* Gomes.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar um estudo farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes pela análise macroscópica e microscópica das folhas, caules, raízes, inflorescências, infrutescências e sementes para obtenção de dados que possibilitem a identificação do vegetal frente a outras espécies do gênero *Richardia* e da família Rubiaceae;
- Estudar fitoquimicamente a espécie *Richardia brasiliensis* Gomes, por meio do isolamento e determinação estrutural dos constituintes químicos, a fim de obter modelos moleculares bioativos, bem como, traçar um perfil químico da planta contribuindo com os estudos quimiotaxonômicos do gênero *Richardia* e da família Rubiaceae;

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Considerações sobre a família Rubiaceae Jussieu

A família Rubiaceae Juss., descrita primeiramente por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, tem seu nome derivado do gênero *Rubia* L., do latim *rubium*, relativo à tinta vermelha produzida pelas raízes de plantas deste gênero, utilizadas para tingir tecidos (CRONQUIST, 1981).

É considerada a quarta maior família entre as angiospermas, e a maior da ordem Gentianales (Figura 1, pág. 38). Nas filogenias apresentadas por Backlund e Bremer (2000), a família Rubiaceae é o grupo mais antigo dessa Ordem, apresentando material fóssil com datação de cerca de 70 milhões de anos, sugerindo hipóteses sobre o centro de origem da ordem Gentianales.

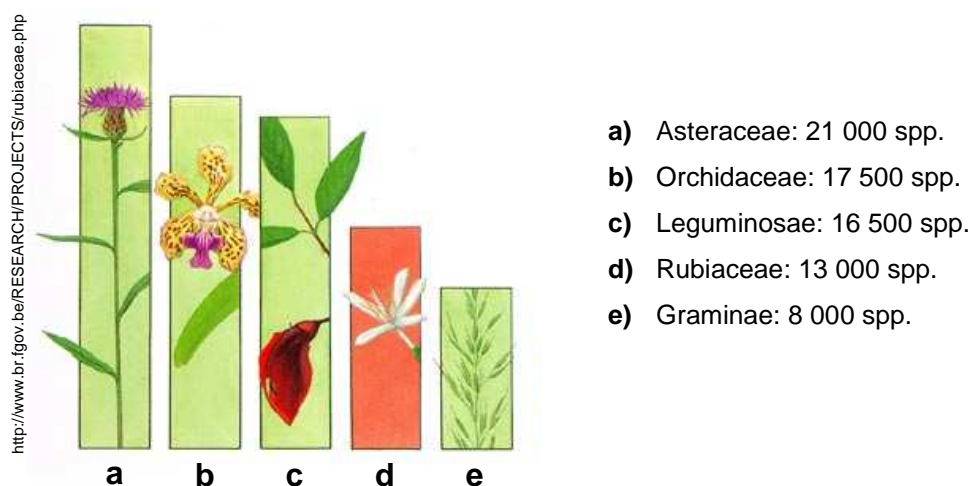


Figura 1. Comparação do número de espécies apresentadas por algumas famílias do Reino Vegetal: (a) Asteraceae, (b) Orchidaceae, (c) Leguminosae, (d) Rubiaceae e (e) Graminae.

Compreende cerca de 650 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies (ROGERS, 2005), classificadas em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirrhoideae e Rubioideae) e 39 tribos. Ocorre essencialmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 2, pág. 39) (VIEIRA et al., 2006; MONGRAND et al., 2005). No Brasil, é representada por 18 tribos, 101 gêneros e 1010 espécies, distribuídas por diversas formações vegetais e apresentando grande ocorrência na Mata Atlântica (PEREIRA et al., 2006b). Para a região Nordeste, foram compilados 66 gêneros e 277 espécies (PEREIRA; BARBOSA, 2004).



Figura 2. Distribuição geográfica da família Rubiaceae no mundo, representada nas áreas em verde.

Representantes da família Rubiaceae são importantes componentes de sub-bosques de florestas neotropicais, onde existe alta diversidade de sistemas reprodutivos e de polinização (VIEIRA et al., 2006). Várias de suas espécies são fontes de recursos para animais que se alimentam de pólen, néctar e frutos, sendo essenciais para o equilíbrio dos ecossistemas (LOPES; BUZATO, 2005).

Espécies dessa família apresentam grande importância econômica, sendo exploradas como alimentícias (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Ixora* spp., *Mussaenda* spp., *Gardenia* spp., dentre outras) e medicinais (*Cinchona pubescens* Vahl empregada no tratamento da malária) (COELHO et al., 2006). Certas Rubiáceas também provocam danos ao setor agropecuário brasileiro, incluindo espécies daninhas de *Borreria*, *Richardia* e *Diodia*, conhecidas popularmente como poaias e espécies causadoras de intoxicação ao gado, principalmente pertencentes aos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*, popularmente conhecidas como mata-ratos ou erva-de-rato (SOUZA; LORENZI, 2008).

Rubiaceae reúne representantes de hábitos bastante variados. Segundo Souza e Lorenzi (2008), esta família possui espécies que se apresentam botanicamente como (Figura 3, pág. 40):

Ervas, subarbustos, arbustos ou árvores, menos frequentemente lianas; folhas opostas, menos frequentemente verticiladas, simples, quase sempre com estípulas interpeciolares, ocasionalmente transformadas em espinhos (em *Randia* e *Chomelia*, por exemplo) ou semelhante às folhas (*Galium*), margem direita. Inflorescência geralmente cimosa, às vezes formando glomérulo ou reduzida a uma única flor; flores vistosas, bissexuadas ou menos frequentemente unissexuadas (*Alibertia*), actinomorfas, geralmente diclamídeas; cálice 4-5-mero, geralmente dialissépalo, às vezes com uma das sépalas muito desenvolvidas (em *Mussaenda* e *Capirona*, por

exemplo), prefloração valvar ou aberta; corola (3-)4-5(-8)-mera, gamopétala, prefloração valvar ou imbricada; estames em número igual ao das pétalas, epipétalos, anteras rimosas; disco nectarífero presente ou não; ovário ínfero (súpero em *Pagamea*), 2(-5)-carpelar, (1-)2(-5)-locular, placentação axial, ereta ou pêndula, raramente parietal, geralmente uni a pauciovulada. Fruto cápsula, esquizocarpo, drupa ou baya (SOUZA; LORENZI, 2008).

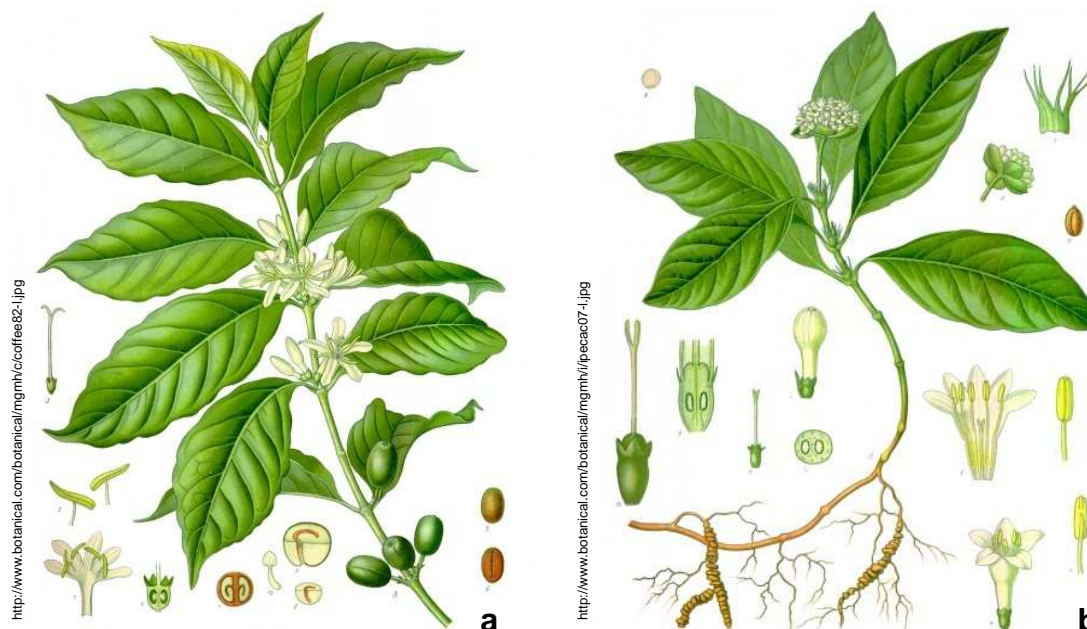
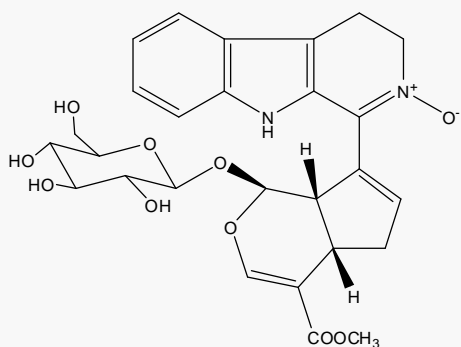


Figura 3. Principais representantes da família Rubiaceae: (a) *Coffea arabica* L. e (b) *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.

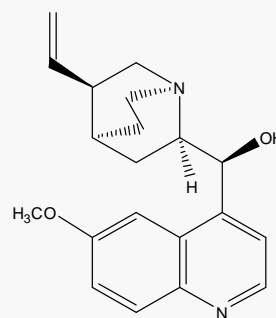
Do ponto de vista etnomedicinal e farmacológico, diversas propriedades tem sido evidenciadas para algumas espécies de Rubiaceae: *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes, cuja presença de dois alcalóides em suas raízes, a emetina e a cefaelina, conferem-lhe propriedades emética, amebicida e expectorante (ASSIS; GIULIETTI, 1999; ROSSI et al., 2005); *Galianthe brasiliensis* (Spreng) E.L., utilizada na medicina popular como emética, além da efetiva atividade antiproliferativa do extrato metanólico bruto de suas partes aéreas, podendo estar relacionada, em parte, ao ácido ursólico e ao asperulosídeo presentes na espécie (MOURA et al., 2006); *Uncaria sinensis* utilizada secularmente na medicina tradicional chinesa para tratamento de distúrbios nervosos e febre; *Uncaria callophylla* indicada na Tailândia para o tratamento da hipertensão arterial e diversas enfermidades; *Uncaria glabata* empregada em Sumatra na medicina tradicional contra intoxicação alimentar; *Uncaria gambir* utilizada na Malásia, na forma de pasta e loções, para alívio de queimaduras e afecções epidérmicas; *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel e *Uncaria*

tomentosa (Willd.) D.C. empregadas na medicina popular peruana como fitoterápico no tratamento do câncer, gastrite, artrite e certas enfermidades epidérmicas (CARBONEZI et al., 2004); e a *Gonzalagunia rosea* Standl cujo extrato metanólico apresenta bioatividade contra *Candida albicans* e *Fusarium solani* (NIÑO et al., 2006).

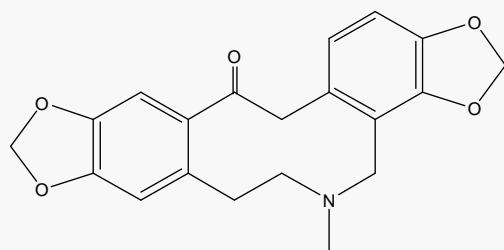
Segundo Cordell e colaboradores (2001), quimicamente foram estudadas 181 espécies pertencentes a 57 gêneros. Estas investigações fitoquímicas revelaram os alcalóides indólicos como sendo os principais marcadores químicos desta família (CARBONEZI et al., 2004). No entanto, a família produz alcalóides pertencentes a mais de dez classes diferentes, onde se destacam os alcalóides isoquinolínicos e os quinolínicos (CORDELL et al., 2001). A presença de iridóides também é de grande relevância devido ao fato de também serem marcadores taxonômicos da família Rubiaceae (BRUNETON, 1991). Além desses compostos, também foram evidenciados flavonóides (HAMERSKI et al., 2005; PINTO et al., 2008b), derivados benzenóides (TOMAZ et al., 2008; PINTO et al., 2008b), antraquinonas (AHMAD et al., 2005; KAMIYA et al., 2005), cumarinas (BENEVIDES et al., 2004; PINTO et al., 2008b), saponinas triterpênicas (HAMERSKI et al., 2005), lignóides (SILVA et al., 2006; KAMIYA et al., 2004), terpenóides (PINTO, 2008; SU et al., 2003; CARVALHO et al., 2006), cucurbitacinas (OLMEDO et al., 2007; GUERRERO-ANALCO et al., 2005), amidas (BANDYOPADHYAY et al., 2007) e feofitinas (TOMAZ et al., 2008) (Figura 4, pág. 42 e 43).



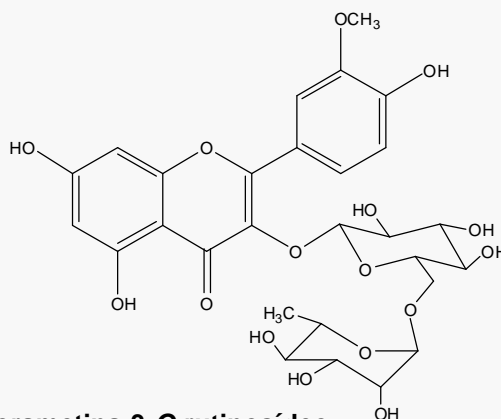
Croceina A
(Alcalóide indólico)
(NARINE; MAXWELL, 2008)



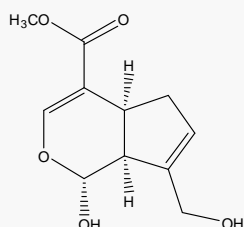
Quinidina
(Alcalóide quinolínico)
(POLLITO; TOMAZELLO-FILHO, 2008)



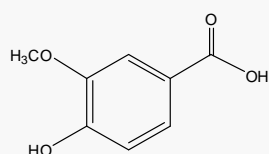
Protopina
(Alcalóide isoquinolínico)
(SENER; ERGUN, 2008)



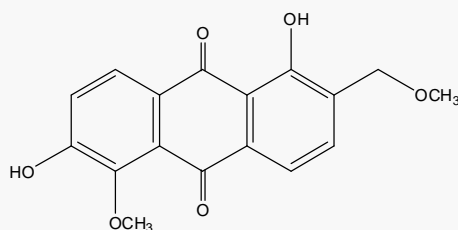
Isorametina-3-O-rutinosídeo
(Flavonóide)
(PINTO et al., 2008b)



(+)-Genipina
(Iridóide)
(JUMA; MAJINDA, 2008)



Ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzóico
(Derivado benzenóide)
(TOMAZ et al., 2008; PINTO et al., 2008b)



5,15-O-dimetilmorindol
(Antraquinona)
(KAMIYA et al., 2005)

Figura 4. Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes a família Rubiaceae.

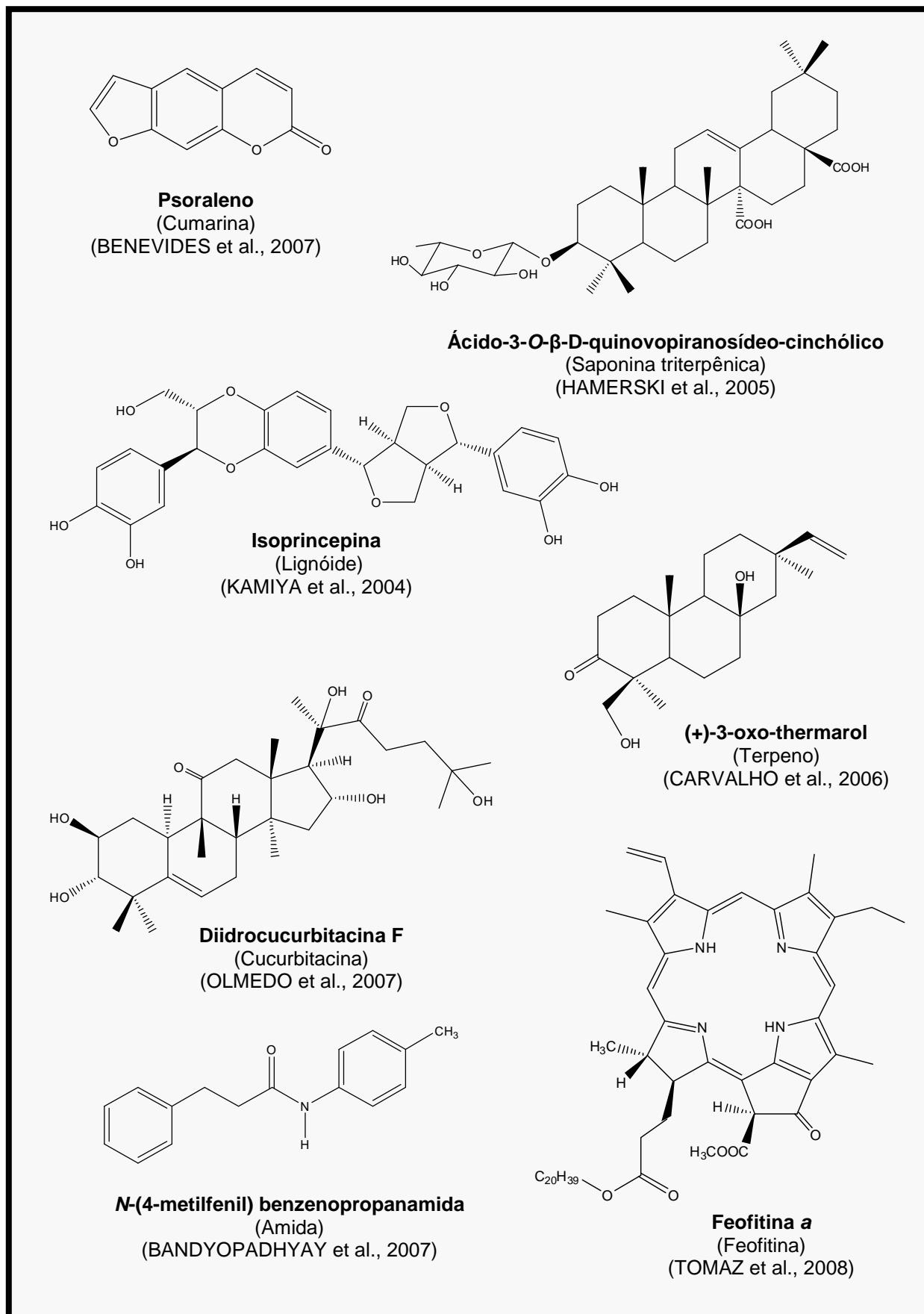


Figura 4 (cont.). Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes a família Rubiaceae.

Devido à diversidade molecular observada, a família Rubiaceae possibilitou a obtenção de compostos de interesse comercial e uma variedade de usos farmacêuticos, decorrentes de suas atividades farmacológicas. Muitas destas substâncias foram e ainda são empregadas na terapêutica para diferentes sintomas e enfermidades. Como exemplos destas substâncias potencialmente ativas podem-se citar: cafeína (*Coffea arabica*), utilizada em diversos medicamentos; emetina, isolada de *Cephaelis ipecacuanha*, com atividade emética e antiamebicida; quinidina (*Cinchona ledgeriana*), utilizada por suas propriedades antimalárica e tônica; e ioimbina, isolada de *Pausinystalia yoimba*, com efeito afrodisíaco (CORDELL et al., 2001).

Tendo em vista a variedade de constituintes químicos apresentados pelas espécies de Rubiaceae e a importância destes na pesquisa de potencialidades terapêuticas, o conhecimento aprofundado desta família abre perspectivas para a química, farmacologia e quimiotaxonomia.

3.2. Considerações sobre o gênero *Richardia* Linnaeus

O gênero *Richardia* Linnaeus pertence à subfamília Rubioideae da tribo Spermaceae. É constituído por 16 espécies (GROENINCKX et al., 2009) distribuídas desde os Estados Unidos até a América do Sul (Figura 5, pág. 44) (LEWIS; OLIVER, 1974). No Brasil, está representado por oito espécies distribuídas de forma descontínua por todo o território brasileiro (ANDERSSON, 1992).



Figura 5. Distribuição geográfica do gênero *Richardia* no mundo, representada nas áreas em verde.

Apresenta os limites taxonômicos bem definidos, quando comparados com os demais gêneros da tribo Spermaceae. Pode ser reconhecido pelas inflorescências providas de brácteas foliáceas ovais, ovário com três ou quatro carpelos e fruto esquizocárpico com tantos mericarpos indeiscentes quanto o número de carpelos (PEREIRA, 2007a).

Compreende ervas anuais ou perenes, eretas ou prostradas. Ramos cilíndricos ou tetragonais, pubescentes; folhas opostas, sésseis ou subsésseis, frequentemente escabrosas, estípulas persistentes, cerdas. Apresentam inflorescências sésseis, em cimeiras glomeriformes, paucifloras ou multifloras, terminais com algumas ou numerosas flores suportadas por duas a quatro brácteas foliáceas, ovais, dispostas em cruz; flores sésseis, frequentemente tetrâmeras, raro trímeras ou hexâmeras, actinomorfas, homostílicas; cálice rotáceo, persistente ou decíduo, lobos lanceolados, glabros ou pilosos; corola infundibuliforme, glabras ou pubescentes, prefloração valvar; estames na fauce ou no tubo da corola, frequentemente exsertos; anteras lanceoladas ou elipsóides, dorsifixas, introsas; ovário 3-4-carpelar, 3-4-locular, um óvulo por lóculo, placentação axial; disco nectarífero inteiro; estilete cilíndrico, exserto, estigma 3-4-lobado. Fruto geralmente pubescente, esquizocarpo, separando-se em 3-4 mericarpos indeiscentes; sementes plano-convexas, superfície dorsal lisa, superfície ventral sulcada (PEREIRA, 2007a; LEWIS; OLIVER, 1974).

Conhecidas popularmente como poaias (SOUZA; LORENZI, 2008), espécies deste gênero são citadas na literatura como ervas daninhas e atuam competindo pelo espaço e por recursos de crescimento com diversas culturas (HAUSEAR; PARHAM, 1969; MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; RONCHI et al., 2003; PEDRINHO JÚNIOR et al., 2004; SAN MARTIN MATHEIS, 2004; MONQUERO et al., 2005). Reconhecê-las, portanto, é importante no sentido de utilizá-las de forma a beneficiar o planejamento agrícola.

Sob o ponto de vista químico, apenas três espécies foram estudadas: *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (TOMAZ et al., 2008), *Richardia scabra* L. (MONGRAND et al., 2005) e *Richardia brasiliensis* Gomes (PINTO et al., 2008b; PINTO, 2008). De *Richardia grandiflora* (Figura 6, pág. 47) foram isolados e caracterizados dois compostos fenólicos (ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzóico e ácido *o*-hidroxi-benzóico), dois esteróides em mistura (β -sitosterol e estigmasterol) e um derivado de clorofila (feofitina *a*) (TOMAZ et al., 2008). A avaliação da composição

lipídica das folhas de *Richardia scabra* feita em CG-EM permitiu identificar a presença de vários ácidos graxos (Figura 6, pág. 47): ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido linoléico, ácido 9,12,15-octadecatrienóico, entre outros (MONGRAND et al., 2005); além disso, possui como constituinte majoritário a emetina (AYYANAR; IGNACIMUTHU; 2005). Já os estudos fitoquímicos realizados com *Richardia brasiliensis* revelaram-na como bioprodutora de diferentes classes de metabólitos: cumarinas, flavonóides, triterpenos, esteróides e ácidos fenólicos (PINTO et al., 2008b; PINTO, 2008).

Estudos etnofarmacológicos revelaram que a espécie *Richardia grandiflora*, conhecida popularmente como ervanço, poaia ou ipeca-mirim, é indicada popularmente para uso contra hemorróidas e como vermífugo na forma de decocto (AGRA et al., 2007a; AGRA et al., 2007b). Na Índia, as folhas de *Richardia scabra*, cujo nome popular local é “Pachai-amman paccharisi”, é usada na preparação de uma pasta que é aplicada externamente para tratar doenças de pele (AYYANAR; IGNACIMUTHU; 2005).

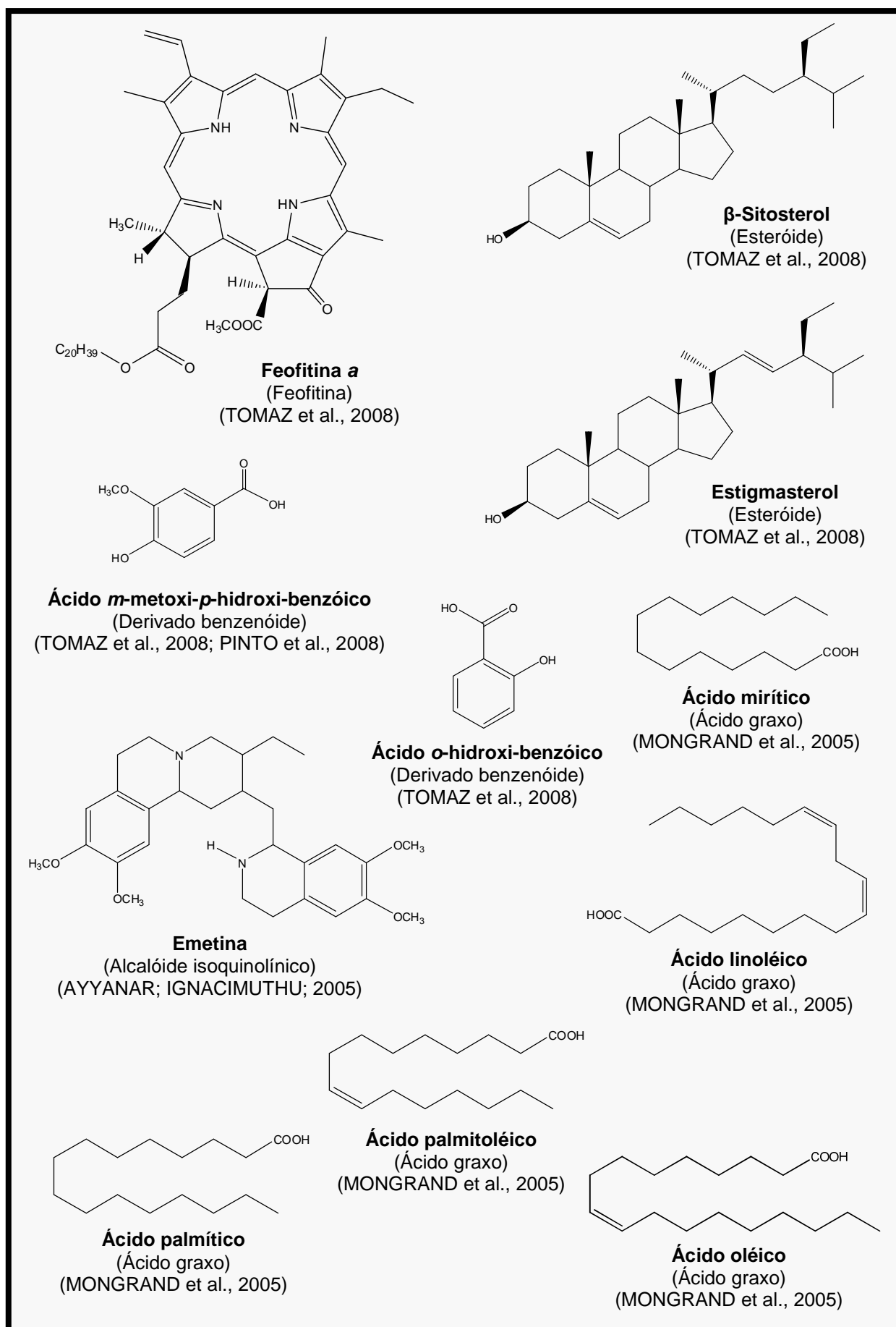


Figura 6. Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Richardia* L.: *Richardia grandiflora* (Cham. & Schtdl.) Steud. e *Richardia scabra* L.

3.3. Considerações sobre *Richardia brasiliensis* Gomes

Richardia brasiliensis Gomes, cujo enquadramento taxonômico encontra-se no Quadro 1 (pág. 48), é popularmente conhecida por ervanço, poaia branca, ipeca (AGRA et al., 2007b; PEDRINHO JÚNIOR et al., 2004), falsa-ipecuanha (GROTH, 1980), erva-de-botão e erva pedreira (SOARES et al., 2004), sendo geralmente encontrada à beira de rodovias, córregos e estradas de ferro, e de presença marcante nas regiões agrícolas do Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil (PEDRINHO JÚNIOR et al., 2004).

Quadro 1. Enquadramento taxonômico de *Richardia brasiliensis* Gomes segundo Stevens (2009).

Categoria Taxonômica	Táxon segundo Stevens (2009)
Reino	Plantae
Filo	Angiospermae
Classe	Magnoliophyta
Ordem	Gentianales
Família	Rubiaceae
Subfamília	Rubioideae
Tribo	Spermacoceae
Gênero	<i>Richardia</i>
Espécie	<i>Richardia brasiliensis</i> Gomes

Esta espécie é comumente encontrada no centro da América do Sul, desde os Andes até o Oceano Atlântico, tendo sido também introduzida em países como os Estados Unidos, México, Jamaica, sudeste e leste da África e Havaí (LEWIS; OLIVER, 1974) (Figura 7, pág. 49). Além disso, Bartoli e colaboradores (2007) destacaram a aparição recente deste vegetal ao sul da Espanha e sugere que a introdução da mesma esteja relacionada com o comércio internacional de madeiras ou com o cultivo ornamental nesta zona geográfica que podem propiciar a disseminação das sementes para várias regiões do globo.



Figura 7. Distribuição geográfica da espécie *Richardia brasiliensis* Gomes no mundo, representada nas áreas em verde.

Pereira (2007) descreve botanicamente os indivíduos da espécie como sendo (Figura 8, pág. 50):

Ervas anuais ou perenes, prostadas ou eretas, até 30 cm comp. Ramos cilíndricos a tetragonos, hirtos. Folhas obovadas ou oblongas; lâmina foliar 1,2-7x0,5-2,2 cm, ápice agudo ou obtuso, base aguda a atenuada, decurrente, subsésseis, pubescente em ambas as faces. Bainha estipular 1,5-3 cm comp., 3-5 fímbrias, 0,2-0,4 cm comp., hirta. Flores em glomérulos terminais achatados, 0,5-1,3 cm diâm., 2-4 brácteas foliáceas. Cálice 6-mero; sépalas 1-2,5 mm comp., triangulares a ovado-triangulares, ciliadas. Corola 4-8 mm comp., pubérula externamente, 6-mera, 0,2-0,7 cm comp., anel de pêlos na metade inferior do tubo, branca a rosada na porção apical. Estames 6, exsertos; filetes 0,4-0,8 cm comp., fixos na fauce da corola. Estilete exserto; 5-8 mm comp.; estigma trifido, ramos estigmáticos ca. 0,1 mm comp, papilosos. Ovário 3-locular. Fruto esquizocárpico, 0,2-0,4x0,1-2,5 cm, separando-se na maturação em 3 mericarpos achatados, face ventral carenada, face dorsal convexa, hirta. Semente 0,1-0,3x0,1-0,2 cm, face ventral angulosa (PEREIRA; 2007b).

O vegetal é perene ou anual com ciclo estival, floresce e frutifica desde meados do verão até princípio do outono, sendo que no inverno está em repouso vegetativo, se propaga por sementes. Prefere vegetar sobre solos pobres, soltos, secos ou pouco úmidos, argilosos e arenosos, ocorrendo na beira das estradas, em terrenos baldios e em canais de irrigação (GROTH, 1980).

É utilizada na medicina popular como emética (DEL VITTO et al., 1997; ADOLPHO et al., 2006; GRANDI et al., 1989), antidiabética (SOARES et al., 2004; ADOLPHO et al., 2006), vermífuga e contra hemorróida (AGRA et al., 2007b). O infuso e o decocto das raízes de *Richardia brasiliensis* também são utilizados pela população por apresentar propriedade expectorante (GRANDI et al., 1989). Além disso, é empregada na cura de eczema, tratamento de queimaduras, contra a

malária avícola (EDEOGA et al., 2005) e também no tratamento de bronquite e gripe (MERÉTIKA, 2008).

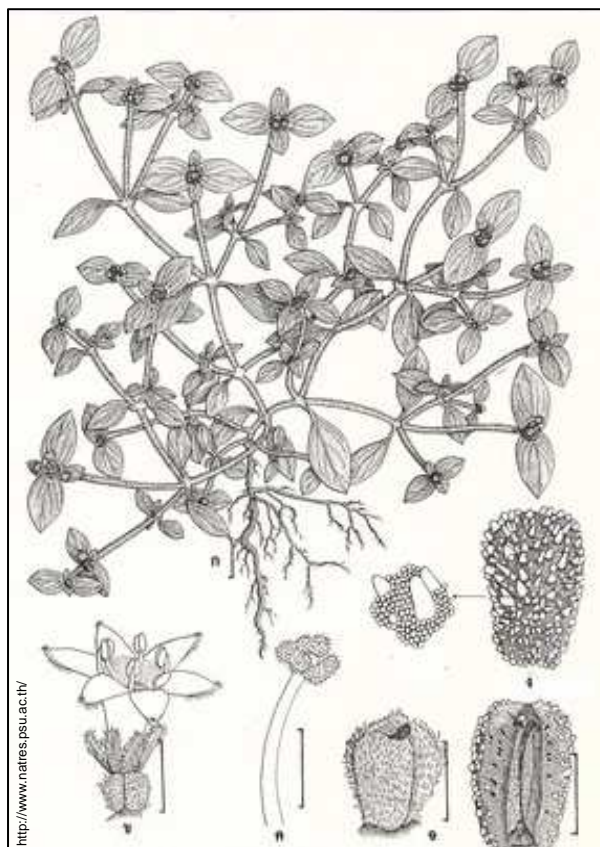


Figura 8. Prancha ilustrativa mostrando *Richardia brasiliensis* Gomes e seus detalhes anatômicos.

Apesar dos estudos etnomedicinais revelarem interessantes propriedades farmacológicas para *Richardia brasiliensis*, muitas dessas atividades não foram comprovadas cientificamente. Estudo realizado por Adolpho e colaboradores (2006) mostrou que as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica possuíam atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella setubal*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoneae*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*). No mesmo estudo, os pesquisadores verificaram que *Richardia brasiliensis* não apresentava propriedade antifúngica para os fungos *Candida albicans*, *Candida dublinienses*, *Candida neoformns* e *Sacchoromyces cereviase*, no entanto, Adekunle (2000) constatou que os extratos aquoso e etanólico desta espécie (2,0 mg/mL) inibiram o crescimento de *Candida albicans* e também dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Epidermophyton floccosium*, *Fusarium solani*, *Mucor mucedo*, *Microsporium audonii* e *Trichophyton*

verrucosum, e que esta atividade foi mais pronunciada para o extrato etanólico que para o extrato aquoso. Pinto e colaboradores (2008a) também verificaram significativa atividade antioxidante para o extrato e as fases deste vegetal, sendo mais pronunciada para a fase acetato de etila; e os estudos *in vitro* realizados por Chungsamarnyart e colaboradores (2007) mostraram que o extrato etanólico bruto não possuía atividade antiviral para FMDV (do inglês, *Foot and Mouth Disease Virus*).

Sob o ponto de vista fitoquímico, *Richardia brasiliensis* apresentou em estudos anteriores constituintes pertencentes a diferentes classes de metabólitos (Figura 9, pág. 52): ácidos fenólicos (ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzóico e ácido *p*-hidroxi-benzóico), cumarinas (escopoletina), triterpenos (ácido oleanólico, ácido ursólico e 3 β -hidroxiurs-11-en-28,13 β -olide), esteróides (β -sitosterol e β -sitosterol glicosilado) e flavonóides (isorametina 3-O-rutinosídeo) (PINTO et al., 2008b; PINTO, 2008; ADOLPHO et al., 2008). Porém, triagens fitoquímicas preliminares demonstraram que, além dessas classes de metabólitos, *Richardia brasiliensis* também continha taninos, alcalóides, saponinas, glicosídeos cardiotônicos (EDEOGA et al., 2005; ADEKUNLE, 2000) e antraquinonas (ADEKUNLE, 2000). Interessante foi a triagem fitoquímica feita por Adekule (2000) e Pinto (2008) onde eles verificaram a ausência de alcalóides, contrapondo os experimentos de Edeoga e colaboradores (2005), o que leva a acreditar na possibilidade de variação sazonal.

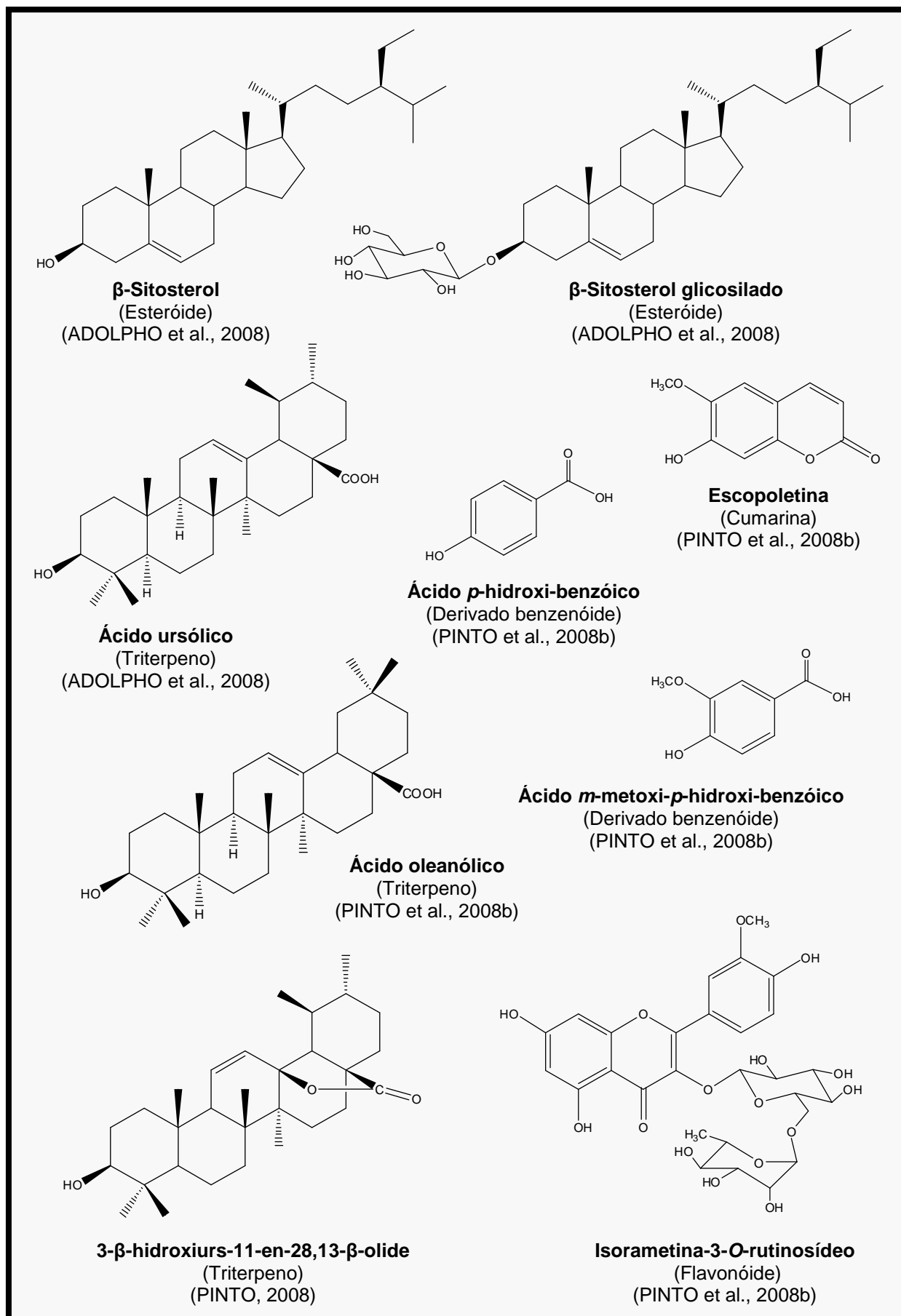
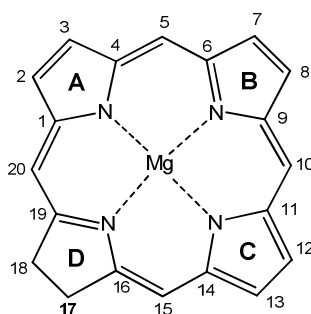


Figura 9. Substâncias isoladas de *Richardia brasiliensis* Gomes em estudos anteriores.

3.4. Considerações químicas, biológicas, farmacológicas e biossintéticas sobre as classes de constituintes químicos isolados de *Richardia brasiliensis* Gomes

3.4.1. Derivados porfirínicos

As porfirinas e seus derivados compreendem um grupo de entidades químicas constituídas essencialmente de quatro anéis pirrólicos ligados entre si por pontes metínicas formando um grande macrociclo (STREIT et al., 2005). Estes anéis numeram-se de 1 a 4 ou de “A” a “D”, de acordo com o sistema de numeração de Fisher (SHOEFS, 2002). Nos vegetais são representados pela clorofila que são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio (Mg^{2+}). Além disso, contém uma cadeia fitílica, por alusão ao álcool fitol, longa e apolar, anexa ao anel porfirínico, que confere uma alta hidrofobicidade à molécula (SOARES, 2006).



Esqueleto porfirínico

Existem vários tipos de clorofila. A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. Os principais pigmentos acessórios também incluem: a clorofila *b*, presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; a clorofila *c*, em feófitas e diatomáceas, e a clorofila *d*, em algas vermelhas (TAIZ; ZIEGER, 2004).

As diferenças estruturais na série de clorofilas decorrem do grau de insaturação dos anéis e na composição das cadeias laterais anexadas aos anéis pirrólicos (SOARES, 2006).

Na clorofila *a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) no carbono C-7 e a clorofila *b* um grupo aldeído (-CHO) (VON ELBE, 2000). A clorofila *c* apresenta em C-8 um grupo metil ou vinil no lugar do radical etila em clorofilas *a* e *b*, além disso, apresenta dupla ligação em C-17 e C-18 e não possui cadeia fitílica (STRAIN; MANNING, 1942). Já a clorofila *d* difere da *a* por apresentar um grupo aldeído em C-3 substituindo o grupo vinila terminal presente na clorofila *a* (LARKUM; KÜHL, 2005).

a) Propriedades farmacológicas dos derivados porfirínicos

Várias atividades farmacológicas já foram reportadas na literatura para os derivados porfirínicos. Feofitinas isoladas de *Plagiochila ovalifolia* tem mostrado atividade citostática e também antibacteriana para *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (MATSUO et al., 1996). Exibem moderada inibição do fator necrose tumoral α (TNF- α) induzido por ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (HUANG et al.; 2007). Também já foi demonstrado atividade antiviral de feofitinas contra o vírus causador do herpes em concentrações subtóxicas. Essa atividade inibitória afetou o vírus antes da entrada na célula hospedeira o que fizeram os autores sugerir que as feofitinas ou tem uma ação viricida ou inteferem na adsorção ou penetração do vírus (SAKDARAT et al., 2009).

Das folhas de *Saussurea medusa*, foram isolados feoforbídeos que apresentaram propriedades imunossupressoras, pois foram capazes de inibir a produção das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-1 β e IL-4 (DUAN et al., 2002). Alguns feoforbídeos apresentaram atividade citotóxica contra carcinomas de pulmão, rins, ovários, ileocecal, entre outras linhagens celulares malignas, atividades estas que, curiosamente, não foram evidenciadas para a 13²-hidroxi-feofitina *a* (CHENG et al., 2001). No entanto, porfirinolactonas apresentam algumas atividades farmacológicas *in vitro* que podem possibilitar seu uso na terapia do câncer: induz necrose ou apoptose em linhagem de células leucêmicas humanas (NATIONAL, 2004) e adenocarcinoma de colon humano, por ativação de caspases e clivagem de DNA (KIM et al., 2003), bem como, inibe a atividade da enzima topoisomerase II- α humana (MOURA et al., 2009).

Além disso, por serem compostos fotossensibilizadores, os derivados porfirínicos têm sido empregados em uma nova terapêutica, a terapia fotodinâmica, na geração de espécies citotóxicas (tais como o oxigênio singlete) para o tratamento

de diversas patologias como infecções cutâneas, infestações bacterianas e, até mesmo, o câncer (SOARES, 2006).

b) Aspectos biossintéticos dos derivados porfirínicos

A formação das clorofilas envolve duas vias biossintéticas (Figura 10, pág. 56): a via do ácido mevalônico (MVA) ou a via do metileritritol-fosfato (MEP) para a biossíntese da cadeia fitílica e a via C5 ou a via Shemin para síntese do clorofilídeo (CHIKARAISHI et al., 2005).

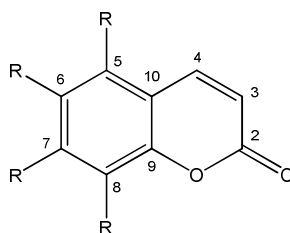
O principal precursor das porfirinas é 5-aminolevulinato (ALA). Este se origina a partir da glicina e succinil-CoA em uma única etapa, catalisada pelo ALA-sintetase (via Shemin) ou a partir do glutamato em um processo que envolve três etapas (via C5): a ativação do glutamato através da ligação ao tRNA^{Glu}; a redução de glutamiltRNA^{Glu} para glutamato-1-semialdeído com a liberação de tRNA^{Glu}; e, por fim, a transaminação do glutamato-1-semialdeído em ALA. Os passos subsequentes na síntese do tetrapirrol incluem (1) a formação do porfobilinogênio monopirrólico a partir de duas moléculas de ALA; (2) formação de hidroximetilbilano, um tetrapirrol linear, a partir de quatro moléculas de porfobilinogênio; (3) fechamento do anel; e (4) reações de modificação das cadeias laterais que vão converter o uroporfirinogênio III em protoporfirina IX. A partir daí segue-se as etapas de inserção de magnésio (catalisada pela Mg-quelase) e outras reações que culminam com a formação do clorofilídeo *a* (WOLFHART, 1997).

O último passo da biossíntese de clorofila consiste em uma reação de esterificação que exige substratos de duas vias, o clorofilídeo *a*, da via das porfirinas, e o fitildifosfato, da via dos isoprenóides e é catalisada pela clorofila sintase (WOLFHART, 1997).

A clorofila *b* é sintetizada a partir da clorofila *a* por meio de uma oxidação do grupo metila para um grupo aldeído (TANAKA et al., 1998), reação catalisada pela enzima clorofila *a* oxigenase (XU et al., 2001).

As clorofilas podem ser modificadas para a sua versão desmetalizada chamada feofitina, onde o íon metálico Mg²⁺ da clorofila é substituído por dois átomos de hidrogênio. Este fenômeno é conhecido como feofitinação e se dá por uma reação de hidrólise ácida (GONZÁLEZ et al., 2006; SOARES, 2006). Posteriormente, a feofitina é hidrolisada na porção éster (remoção da cadeia fitil) por

exceção de alguns casos raros, a maioria das cumarinas encontra-se substituída em C-7 por uma hidroxila. Esses grupos podem ser metilados ou glicosilados. Além disso, é também comum a prenilação em várias posições do esqueleto cumarínico, o que em alguns casos, como na prenilação em C-6 ou C-8, origina as pirano- ou furanocumarinas lineares e angulares, respectivamente (SIMÕES et al., 2007; BRUNETON, 1991).



Esqueleto cumarínico

São amplamente distribuídas entre os vegetais, ocorrendo predominantemente em angiospermas, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. As famílias mais citadas na literatura pelo conteúdo em cumarinas são: Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Olanaceae, Moraceae e Thymeleaceae (SIMÕES et al., 2007).

a) Propriedades farmacológicas das cumarinas

Suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas dependem de seus padrões de substituição. Na área de medicamentos destacam-se os derivados da 4-hidroxi-cumarina, que levou à descoberta da ação anticoagulante do dicumarol, primeiro fármaco com essa ação por via oral e que constituiu o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com o núcleo básico da 4-hidroxi-cumarina, do qual derivam importantes fármacos como a varfarina, entre outros (SIMÕES et al., 2007).

Como as cumarinas aumentam o número de melanócitos e a produção de melanina, são utilizadas como fotodinamizantes em produtos solares para proteção contra as radiações ultravioleta. Também apresentam atividade diurética e são prescritas para o tratamento de psoríase (BRUNETON, 1991).

Segundo Simões e colaboradores (2007) a procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico em cumarinas,

pelo fato de mostrarem atividades farmacológicas relevantes, tais como imunossupressora, hipolipidêmica, hipotensora, relaxante vascular da musculatura lisa e cardíaca, antiagregante plaquetária, antiespasmódica, antioxidante e anti-HIV.

b) Aspectos biossintéticos das cumarinas

As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina (via do ácido chiquímico) (Figura 11, pág. 59), sendo um dos seus primeiros precursores o ácido *p*-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumarínico), que é hidroxilado na posição C-2' (*orto*-hidroxilação). O derivado *orto*-hidroxilado sofre isomerização fotocatalizada da ligação dupla (*E*→*Z*). O isômero *Z* lactoniza-se espontaneamente, produzindo umbeliferona. A prenilação do anel benzênico nas posições 6 ou 8 do derivado 7-hidróxi-cumarina é o passo inicial na biogênese das furano- e piranocumarinas. A ciclização dos derivados 6- ou 8-isoprenilcumarina ocorre por ataque nucleofílico do grupo hidroxila em C-7 ao epóxido formado pela oxidação da ligação dupla do resíduo isopentenila. Dependendo da orientação do ataque nucleofílico, o produto será o hidroxí-isopropil-diidrofuranocumarina ou será o hidroxí-dimetil-diidropiranocumarina (SIMÕES et al., 2007).

A perda de três átomos de carbono nas furanocumarinas para formar, por exemplo, o psoraleno e a angelicina, ocorre por retro-aldolização (BRUNETON, 1991). Posteriormente, reações de hidroxilação e metilação poderão ocorrer nas diversas posições do anel catalisadas por várias monooxigenases e *O*-metiltransferases, respectivamente, o que explica a enorme variedade estrutural existente para essa classe de metabólitos secundários (BOURGAUD et al., 2006).

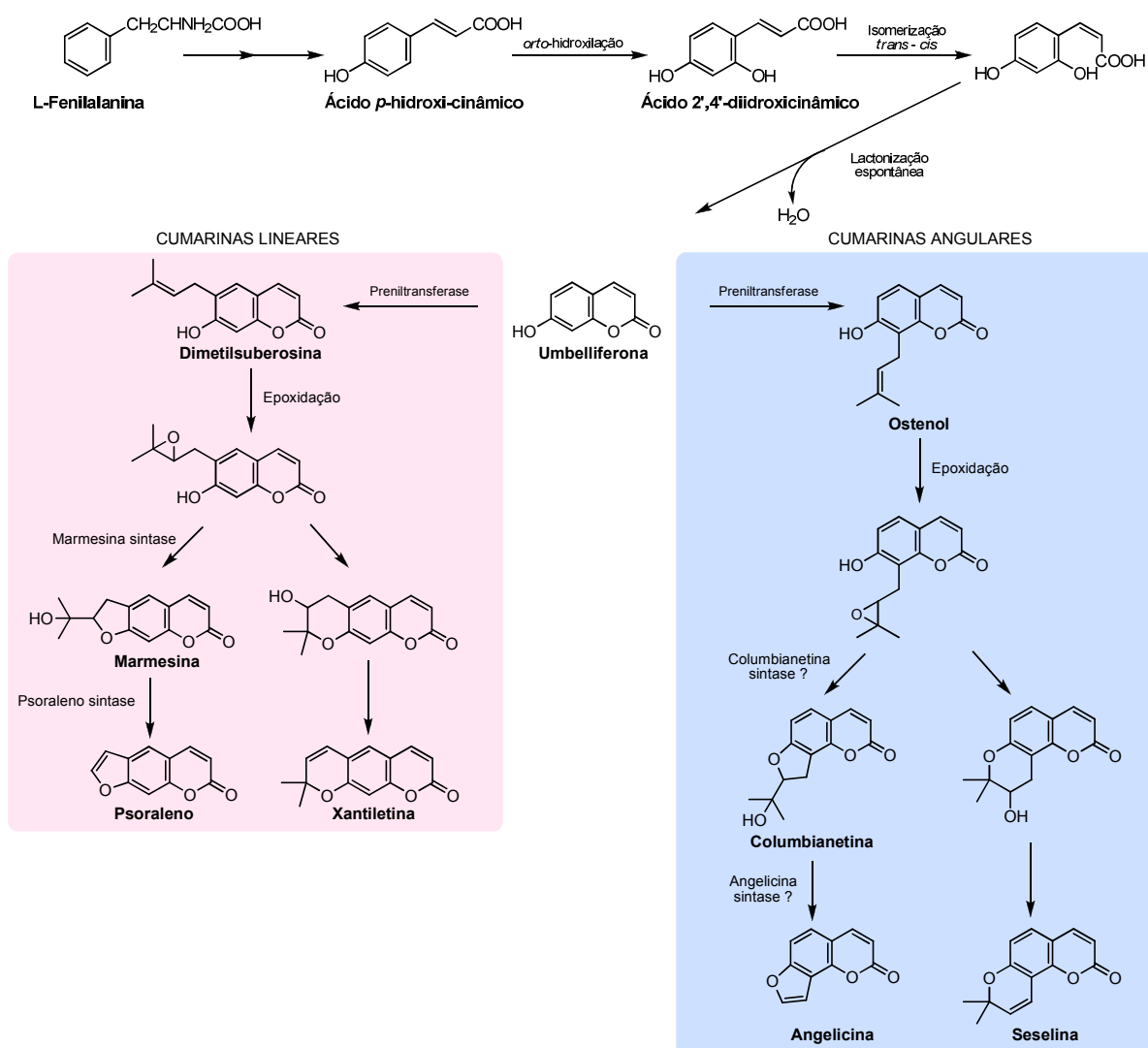
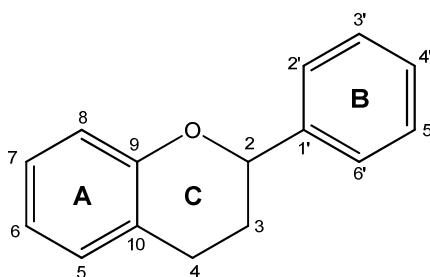


Figura 11. Representação esquemática da biossíntese de cumarinas segundo Simões e colaboradores (2007) e Bourgaud e colaboradores (2006).

3.4.3. Flavonóides

Existindo somente um relato de ocorrência em fungos, quase ausentes em algas e com alguns representantes identificados em briófitas, esta classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal. Em pteridófitas, também foram encontradas, mas a sua variabilidade estrutural é pequena. Todavia, estão presentes em abundância em angiospermas, apresentando neste grupo uma enorme variedade estrutural (SIMÕES et al., 2007).

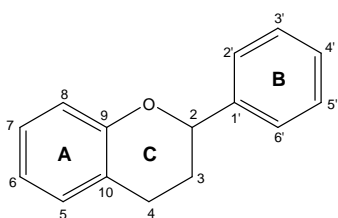
Os flavonóides ocorrem em uma grande variedade de formas estruturais. Todos contêm 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), que são denominados A, B e C, como consequência da ligação de dois grupos fenila a uma cadeia de três carbonos, ou seja, são derivados difenilpropânicos (PIETTA, 2000).



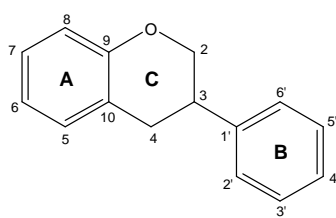
Esqueleto básico dos flavonóides

As várias classes de flavonóides diferem no grau de oxidação e de substituição do anel C, enquanto que compostos individuais em uma classe diferem quanto à substituição dos anéis A e B. Nos compostos tricíclicos, as unidades carbônicas são denominadas núcleos A, B e C e os carbonos recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números, seguidos de uma linha (') para o núcleo B. Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonóides por 8a e 4a, respectivamente (PIETTA, 2000).

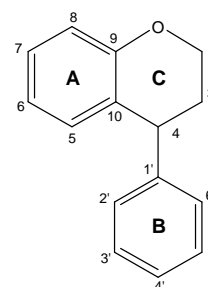
É comum designar os flavonóides derivados do esqueleto 1,3-, 1,2- e 1,1-diarilpropânico em três grandes classes: flavonóides propriamente dito **(1)**, isoflavonóides **(2)** e neoflavonóides **(3)**, respectivamente (AGRAWAL, 1989).



(1)



(2)



(3)

Estas substâncias são usualmente oxigenadas e possuem substituintes hidroxila, metoxila, metilenodioxila e prenila. São isoladas de um grande número de plantas vasculares, com aproximadamente 8.000 compostos individuais conhecidos (PIETTA, 2000). Um grande número de flavonóides ocorre como O-glicosídios, no qual um ou mais grupos hidroxilas do flavonóide estão ligados a uma ou várias unidades de açúcar. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídio. Nos flavonóides C-glicosídios o açúcar está ligado a um átomo de carbono. Quando o metabólito ocorre sem conjugação com esses carboidratos ou

então quando é submetido à hidrólise ácida, é denominado aglicona ou genina (SIMÕES et al., 2007).

a) *Papel biológico e propriedades farmacológicas dos flavonóides*

A grande prevalência de flavonóides no reino vegetal não é acidental. Diversas funções nas plantas são atribuídas aos compostos pertencentes a esta classe: protege os vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível por agir como antioxidantes; protege contra insetos, fungos, vírus e bactérias por inibir enzimas e precursores de substâncias tóxicas ou atuar como quelantes de metais nocivos; atrai animais com finalidade de polinização por atuar como pigmentos coloridos de flores; está envolvida na transferência de energia, na morfogênese, na determinação do sexo, nos níveis de respiração e fotossíntese, na ação de hormônios vegetais de crescimento, na expressão de genes e no comportamento (SMITH; BANK, 1986; HARBORNE, 1989).

Em decorrência da cadeia alimentar, animais e humanos ingerem flavonóides, e há muitos dados que apontam para um grande número de atividades destes compostos em humanos. Por exemplo, eles podem ser utilizados como proteção para a integridade vascular (BERETZ; CAZENAVE, 1988), como agentes antiosteoporóticos (EVANS, 1994) e por suas propriedades antihepatotóxicas (SOIKE; PESCHLOW, 1987). Alguns flavonóides foram examinados para a verificação da sua atividade em modelos experimentais de tumores *in vitro* (BRACKE et al., 1988) e *in vivo* (DESCHNER et al., 1991). Certos flavonóides inibiram a atividade de enzimas tais como a aldose redutase (IWU et al., 1990) e xantina oxidase (PATHAK et al., 1991). Foram reportados por atuar no trato gastrintestinal como agentes antiúlcera (DI CARLO et al., 1999), antiespasmódico (CAPASSO et al., 1991), anti-secretório e antidiarréico (DI CARLO et al., 1993); e também são conhecidos pelos seus efeitos antialérgicos, em parte atribuídos à influência dos mesmos sobre a produção de histamina (BERG; DANIEL, 1988).

Os flavonóides também podem prevenir catarata diabética por inibir a aldose redutase óptica (CHAUDRY et al., 1983). As ações de alguns flavonóides podem estar relacionadas com a sua capacidade de interagir com o óxido nítrico (NO), que é um mediador de vários sistemas biológicos (MONCADA et al., 1991). Outras

atividades importantes como agentes antioxidantes e anti-radicais livres também são relatadas (BURDA; OLESZEK, 2001).

b) Aspectos biossintéticos dos flavonóides

Os flavonóides são biossintetizados via uma combinação das rotas do ácido chiquímico e acetato polimalonato (DI CARLO et al., 1999). Na primeira etapa da biossíntese – rota do ácido chiquímico (Figura 12, pág. 63) – o fosfoenolpiruvato (PEP) reage com a D-eritrose-4-fosfato, produzindo um açúcar ceto fosforilado com sete carbonos, o ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato (DAHP). Este composto, pela perda do grupo fosfato, sofre ciclização e converte-se em ácido 3-desidroquínico, que pela perda de uma molécula de água é então convertido a seus derivados, como por exemplo, o ácido chiquímico. Após fosforilação na posição 3 do ácido chiquímico, origina-se o ácido chiquímico-3-fosfato, que reage com o (PEP) formando o ácido 5-enolpiruvil-chiquímico-3-fosfato (EPSF). Este, por sua vez, origina o ácido corísmico por eliminação de um grupo fosfato e um próton. O ácido corísmico sofre uma reordenação pericíclica do tipo Claisen levando ao ácido prefênico, que por descarboxilação, origina o ácido fenilpirúvico, precursor da fenilalanina e tirosina. A fenilalanina, pela ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), perde uma molécula de amônia, originando o ácido cinâmico, o precursor da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (DEWICK, 1997).

Por intervenção de uma enzima oxigenase, o ácido cinâmico é hidroxilado formando o ácido *p*-cumárico (BRUNETON, 1991). Na segunda etapa da biossíntese – rota do acetato polimalonato (Figura 13, pág. 64) – ocorre condensação de três moléculas de acetato com um derivado do ácido cinâmico (*p*-cumaroil-CoA). Provavelmente, cada molécula de acetil-CoA é primeiramente convertida em malonil-CoA, enquanto que a do ácido cinâmico é convertida em *p*-cumaroil-CoA, ambas intermediárias ativas transformadas por uma coenzima-A. Após condensação, forma-se um intermediário de 15 átomos de carbono, que catalisado pela enzima chalcona sintase, sofre ciclização originando a chalcona, o intermediário comum de todos os flavonóides (DEWICK, 1997). A adição de substituintes ocorrem posteriormente à ciclização da chalcona (BRUNETON, 1991).

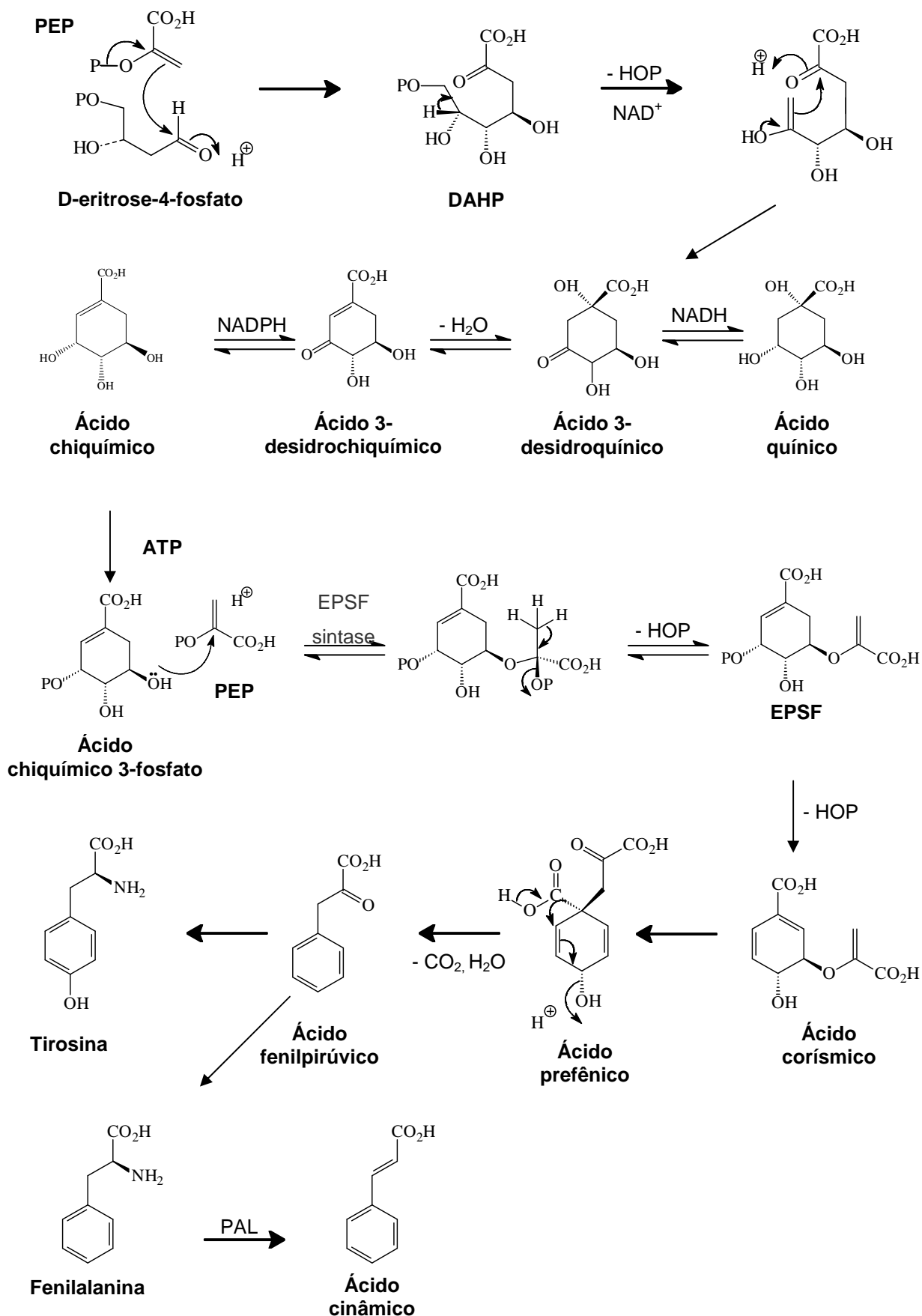


Figura 12. Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides segundo Dewick (1997) (primeira etapa – rota do ácido chiquímico).

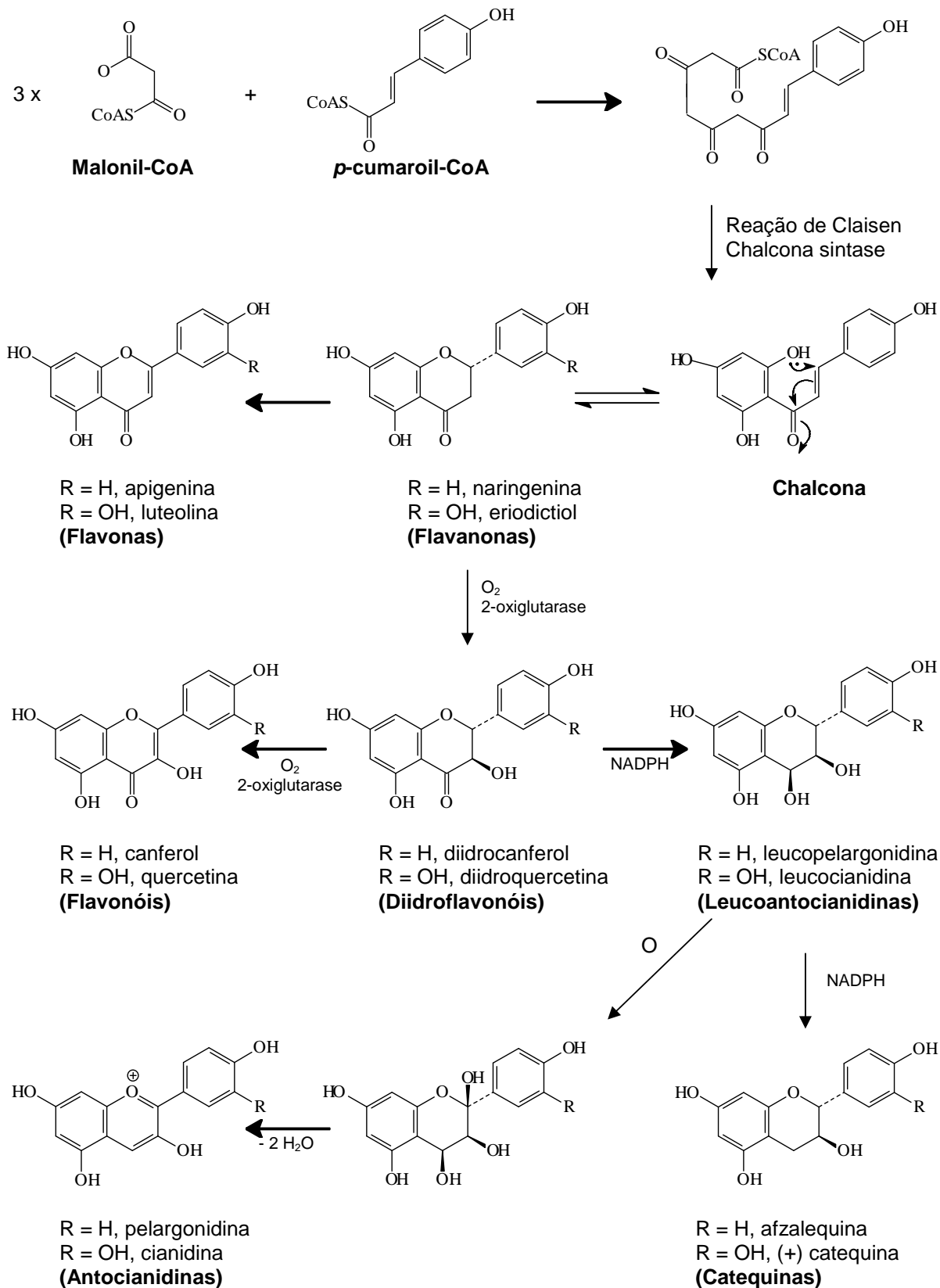
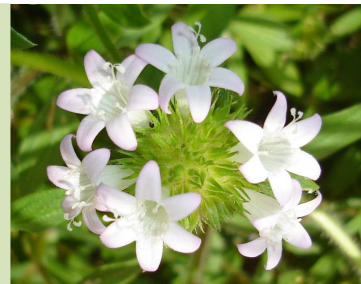


Figura 13. Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides segundo Dewick (1997) (segunda etapa – rota do acetato polimalonato).

DESCRIÇÃO METODOLÓGICA



4. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

4.1. Estudo farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes

4.1.1. Coleta e identificação do material botânico

Richardia brasiliensis Gomes foi coletada em setembro de 2008 nas dependências do *Campus I* da Universidade Federal da Paraíba em João Pessoa – Paraíba. Parte do material fresco foi utilizada para a identificação botânica e a outra parte foi fixada em formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico 50 % (FAA 50 %), por 48 horas, e conservado em álcool etílico 70 °G.L. (JOHANSEN, 1940) para a realização dos estudos morfológicos e anatômicos.

A identificação botânica foi efetuada com auxílio de chaves analíticas e descrições, encontradas em bibliografia especializada (LEWIS; OLIVER, 1974; GROTH, 1980). Amostras do material coletado foram herborizadas seguindo o método descrito por Forman e Bridson (1989) e as exsicatas foram depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, com duplicatas na coleção de referência do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF), ambos da mesma universidade, com o número de coleta Tenório-Souza 01.

4.1.2. Estudo morfológico das folhas, caule, raízes, inflorescência, infrutescência e sementes de *Richardia brasiliensis* Gomes

Com auxílio de um estereomicroscópio binocular, realizou-se um estudo morfológico das partes vegetativas de cinco indivíduos diferentes para a morfodiagnose macroscópica. Foram analisadas folhas provenientes do quarto ou quinto nó, caules obtidos a partir de cinco centímetros do ápice dos ramos e raízes principal e laterais de pequeno calibre.

4.1.3. Estudo anatômico das folhas, caule e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomes

Secções transversais (Figura 14, pág. 67) foram realizadas na lâmina foliar (região da nervura principal, mesofilo e bordo) e no pecíolo de folhas adultas provenientes do quarto ou quinto nó, nos caules obtidos a partir de cinco centímetros do ápice dos ramos, e em raízes principal e lateral de pequeno calibre. As secções foram feitas com lâmina cortante, à mão livre, tendo como suporte a medula do pecíolo de *Cecropia* sp. (imbaúba), seguindo-se metodologia usual.

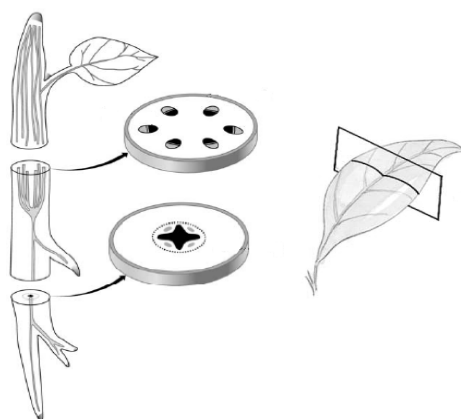


Figura 14. Ilustrações demonstrando os cortes transversais feitos em caule e/ou raiz (esquerda) e folhas (direita).

Posteriormente, os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio a 20 %, neutralizados com solução aquosa de ácido acético 0,2 %, lavados em água destilada, corados com safrablue (mistura de safranina e azul de astra) e montados entre lâmina e lamínula com glicerina a 50 %.

Também foram realizadas secções paradérmicas na face adaxial e abaxial da lâmina foliar, à mão livre, com auxílio de lâmina cortante. Os cortes obtidos foram clarificados e neutralizados, seguindo o processo descrito anteriormente para as secções transversais, corados com safranina e montados entre lâmina e lamínula com glicerina a 50 %.

Para análise da morfologia dos tricomas, foram efetuadas raspagens em ambas as faces da lâmina foliar, pecíolo e ramos. Os tricomas foram montados entre lâmina e lamínula com glicerina a 50 %.

As lâminas foram analisadas e fotografadas ao microscópio óptico Olympus CH-30, com câmara fotográfica Olympus PM-BP35. A caracterização do mesofilo,

das paredes celulares da epiderme, do caule e das raízes baseou-se em Fahn (1974) e a classificação dos estômatos seguiu Metcalfe e Chalk (1979).

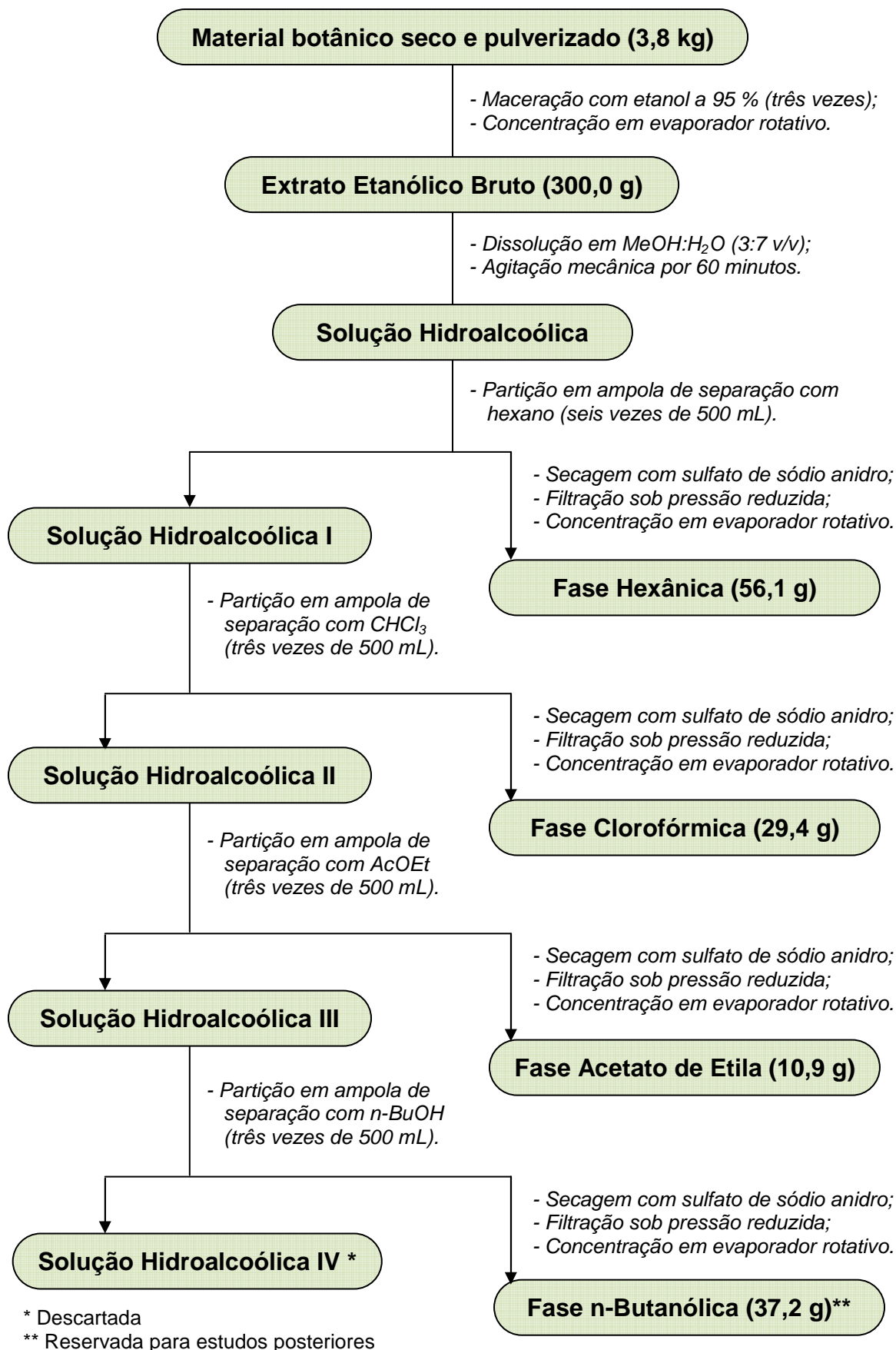
4.2. Estudo fitoquímico de *Richardia brasiliensis* Gomes

4.2.1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto (EEB)

O material botânico coletado (30,0 kg), contendo todas as partes da planta, foi desidratado em estufa com ar circulante à temperatura média de 45,0 °C durante 72 horas e reduzido a pó com auxílio de moinho mecânico, obtendo-se 3,8 kg, o que corresponde a 12,7 % do material coletado. Posteriormente, os constituintes químicos do pó da planta foram extraídos com etanol (EtOH) a 95 % em recipiente de aço inoxidável sob maceração por 72 horas, sendo este processo repetido por quatro vezes, obtendo-se o extrato etanólico (Esquema 1, pág. 69).

A solução extrativa resultante foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50,0 °C, sendo obtido 353,0 g de extrato etanólico bruto (EEB), com rendimento de 9,3 % em relação ao peso seco da planta. Parte deste extrato (300,0 g) foi dissolvido em uma solução de MeOH:H₂O (3:7 v/v) e homogeneizado sob agitação mecânica por 60 minutos, obtendo-se uma solução hidroalcoólica que foi particionada separadamente e consecutivamente com 3000 mL de hexano, 1500 mL de clorofórmio (CHCl₃), 1500 mL de acetato de etila (AcOEt) e 1500 mL de n-butanol (n-BuOH), em ampola de separação (Esquema 1, pág. 69).

As soluções obtidas no processo de partição foram tratadas com sulfato de sódio anidro para secagem, submetidos à filtração sob pressão reduzida e concentradas em evaporador rotativo à temperatura média de 50,0 °C obtendo-se quatro fases: 56,1 g de fase hexânica, 29,4 g de fase CHCl₃, 10,9 g de fase AcOEt e 37,2 g de fase n-BuOH (Esquema 1, pág. 69).

Esquema 1. Etapas envolvidas no processo de obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de *Richardia brasiliensis* Gomes.

4.2.2. Isolamento e purificação dos constituintes químicos

O isolamento, a purificação e a análise dos constituintes químicos de *Richardia brasiliensis* Gomes foram realizados utilizando métodos cromatográficos: cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e preparativa (CCDP).

Para as CC utilizou-se sílica gel (ART 7734 da MERCK de partículas com dimensões entre 0,063 – 0,200 mm e 70 – 230 mesh) ou Sephadex LH-20 (AMERSHAM BIOSCIENCES), tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujos comprimentos e diâmetros variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. As amostras foram acondicionadas sobre o topo da coluna, procedendo-se então a eluição com os solventes comerciais hexano, CHCl₃, AcOEt e MeOH destilados no LTF/UFPB, puros ou em misturas binárias.

A CCDA e a CCDP foram empregadas para análise e purificação das frações obtidas por CC, respectivamente. Para isto, foram usadas placas de vidro (10,0 x 20,0 cm e 20,0 x 20,0 cm) preparadas com uma suspensão de sílica gel PF₂₅₄ (ART 7749 da MERCK) em água destilada (1:2 m/v) distribuída sobre a placa de vidro com ajuda de um espalhador mecânico tipo *quick fit*, seguindo técnica descrita por Matos (1997). As cromatoplasas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 100,0 °C durante duas horas.

A revelação das substâncias em CCDA foi executada pela exposição das cromatoplasas à lâmpada de radiação ultravioleta (UV) sob dois comprimentos de ondas, 254 e 366 nm, em aparelho MINERALIGHT (modelo UVGL-58), bem como, pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas com vapores de iodo.

Por CCDA, as frações semelhantes eram reunidas de acordo com os fatores de retenção (R_f). O grau de pureza foi determinado quando observada uma única mancha após revelação da cromatoplasa, além da observação dos espectros dos referidos compostos.

A recuperação das amostras separadas por CCDP foi feita por extração com CHCl₃ e/ou CHCl₃:MeOH (9:1 v/v), seguida de filtração sob pressão reduzida e concentração em evaporador rotativo.

a) Processamento cromatográfico da fase hexânica

Uma alíquota de 10,0 g da fase hexânica foi submetida à CC utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 eluindo inicialmente com hexano e finalizando com uma mistura de AcOEt e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. Nesta CC foram coletadas 226 frações de 250,0 a 500,0 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo (Quadro 2, pág. 71; Esquema 2, pág. 72).

As frações foram analisadas comparativamente através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes, em 23 grupos de acordo com os R_f , após análise à luz UV e impregnação com vapores de iodo (Quadro 2, pág. 71).

Quadro 2. Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase hexânica de *Richardia brasiliensis* Gomes, frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações obtidos após análise em CCDA.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Grupos após CCDA
Hex (100 %)	1 a 11	1-2; 3; 4-7; 8-12
Hex:AcOEt (99:1 v/v)	12 a 15	13; 14-16
Hex:AcOEt (95:5 v/v)	16 a 107	17-18; 19-20; 21-28; 29-34 ; 35-40; 41-71; 72-107
Hex:AcOEt (9:1 v/v)	108 a 111	108-121; 122-133; 134-145; 146;
Hex:AcOEt (85:15 v/v)	112 a 166	149-155; 156-166
Hex:AcOEt (75:25 v/v)	167 a 173	167-173
Hex:AcOEt (65:35 v/v)	174 a 180	174-193
Hex:AcOEt (1:1 v/v)	181 a 187	
Hex:AcOEt (25:75 v/v)	188 a 193	
Hex:AcOEt (2:8 v/v)	194 a 197	194-217
AcOEt (100 %)	198 a 201	
AcOEt:MeOH (99:1 v/v)	202 a 205	
AcOEt:MeOH (95:5 v/v)	206 a 217	
AcOEt:MeOH (9:1 v/v)	218 a 224	218-226
AcOEt:MeOH (8:2 v/v)	225 a 226	

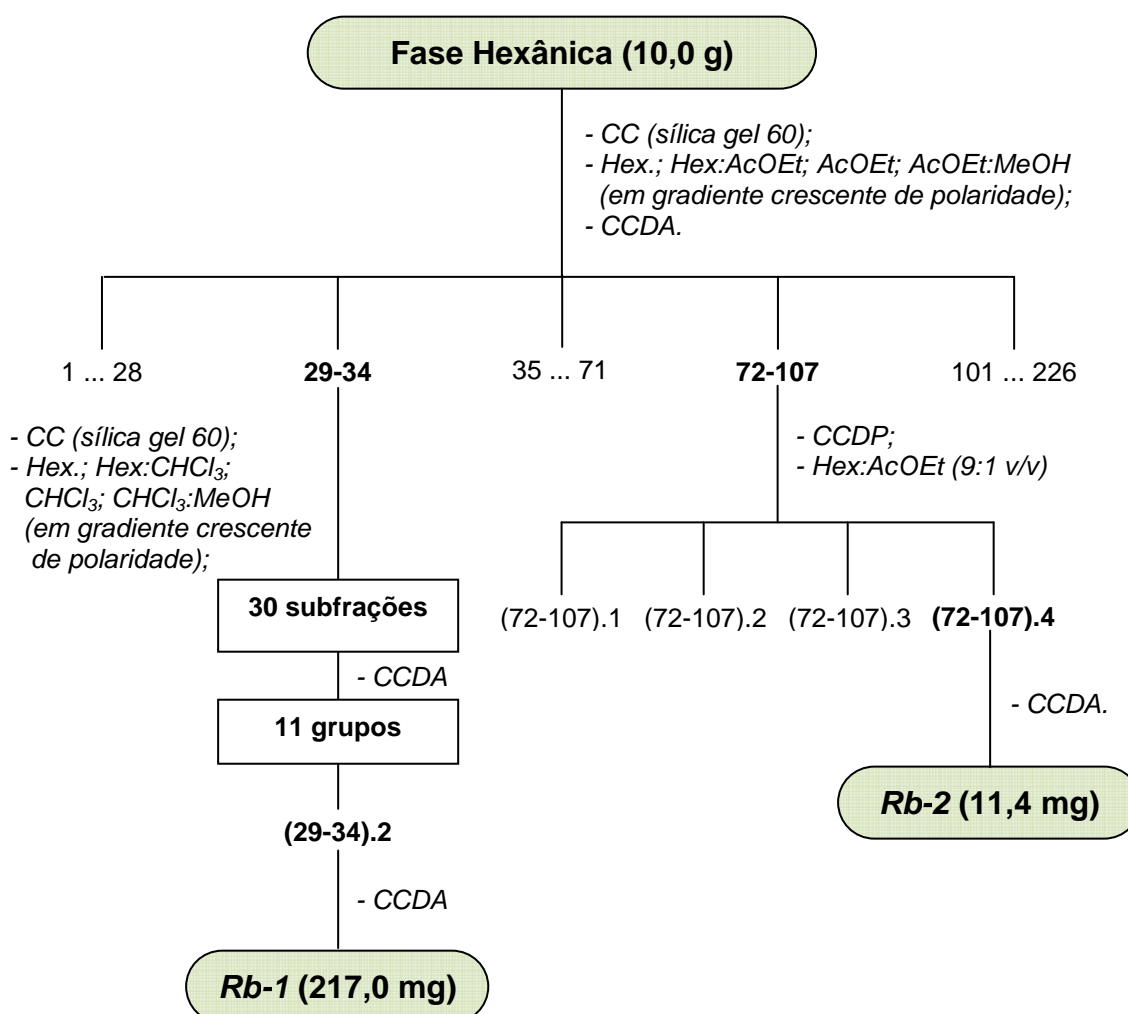
Obs.: Os grupos em negrito resultaram no isolamento de substâncias.

A fração 29-34 foi recromatografada em coluna preenchida com sílica gel 60 e eluída com hexano, CHCl_3 e MeOH, puros ou em misturas binárias seguindo gradiente de concentração, obtendo-se 30 subfrações que foram reunidas em 11

grupos após monitoramento por CCDA. A subfração (29-34).2 formou cristais brancos após evaporação dos solventes, e análise em CCDA revelou uma única mancha sendo então codificada como *Rb-1* (Esquema 2, pág. 72).

A fração 72-107 foi submetida a uma CCDP utilizando Hex:AcOEt (9:1 v/v) para eluição, obtendo-se quatro subfrações. A subfração (72-107).4, após análise por CCDA, recebeu o código *Rb-2* (Esquema 2, pág. 72).

Esquema 2 Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase hexânica de *Richardia brasiliensis* Gomes.



b) Processamento cromatográfico da fase clorofórmica

Uma alíquota da fase CHCl₃ (10,0 g) foi submetida à CC utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 eluindo inicialmente com hexano e finalizando com uma mistura CHCl₃ e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. Nesta CC foram

coletadas 550 frações de 100,0 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo (Quadro 3, pág. 73; Esquema 3, pág. 74).

As frações foram analisadas comparativamente através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição e, posteriormente, reunidas, quando semelhantes, em 25 grupos de acordo com os R_f , após análise à luz UV e impregnação com vapores de iodo (Quadro 3, pág. 73).

Quadro 3. Sistemas de eluições utilizados no processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Richardia brasiliensis* Gomes, frações coletadas para cada sistema de eluição e grupos de frações obtidos após análise em CCDA.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Grupos após CCDA
Hex (100 %)	1 a 7	1-23
Hex:CHCl ₃ (95:5 v/v)	8 a 11	
Hex:CHCl ₃ (92:8 v/v)	12 a 16	
Hex:CHCl ₃ (9:1 v/v)	17 a 20	
Hex:CHCl ₃ (8:2 v/v)	21 a 23	
Hex:CHCl ₃ (3:7 v/v)	24 a 164	24-27; 28-32; 33-56; 57-64; 65-74 ; 75-86 ; 87-100 ; 101-123; 124-134; 135-188;
CHCl ₃ (100 %)	165 a 358	189-195; 196-210; 211-252; 253-283; 284-322; 323-358
CHCl ₃ :MeOH (98:2 v/v)	359 a 415	359-373; 374-400; 401-423
CHCl ₃ :MeOH (96:4 v/v)	416 a 423	
CHCl ₃ :MeOH (9:1 v/v)	424 a 495	424-430; 431-434; 435-446; 447-550
CHCl ₃ :MeOH (85:15 v/v)	496 a 535	
CHCl ₃ :MeOH (8:2 v/v)	536 a 550	

Obs.: Os grupos em negrito resultaram no isolamento de substâncias.

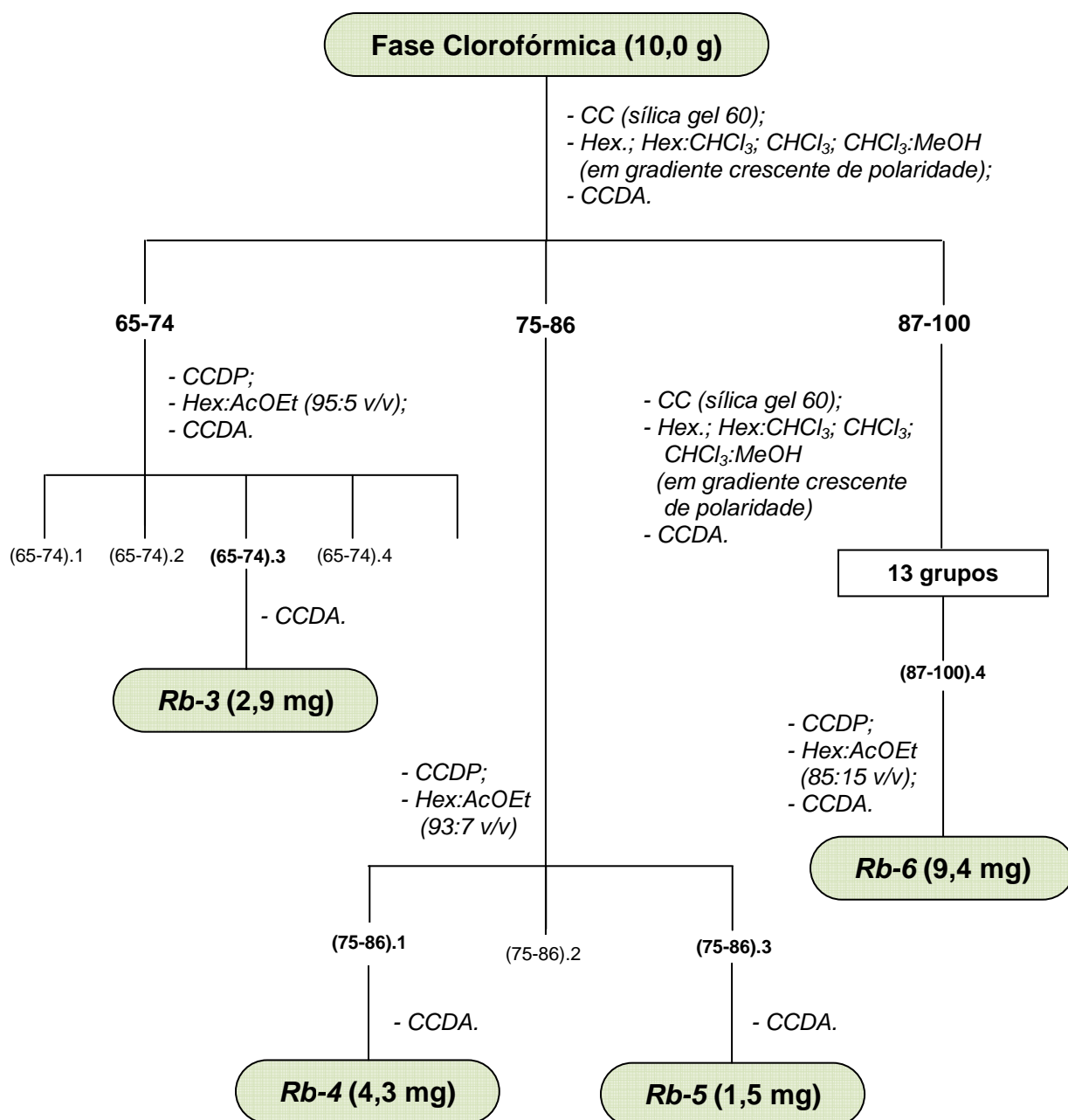
A fração 65-74 foi submetida a uma CCDP utilizando Hex:AcOEt (95:5 v/v) como eluente, obtendo-se cinco subfrações. A subfração (65-74).3 revelou-se como uma única mancha fluorescente após CCDA e foi codificada como *Rb-3* (Esquema 3, pág. 74).

Uma CCDP da fração 75-86 usando Hex:AcOEt (93:7 v/v) como sistema de eluição resultou em três subfrações. As subfrações (75-86).1 e (75-86).3 apresentaram significativo grau de pureza quando analisadas por CCDA e receberam os códigos *Rb-4* e *Rb-5*, respectivamente (Esquema 3, pág. 74).

A fração 87-100 foi recromatografada em coluna utilizando as mesmas condições anteriormente descritas para a fase CHCl₃, obtendo-se 77 subfrações de

10,0 mL cada. Após análise das cromatoplasas impregnadas com vapores de iodo, essas foram reunidas em 13 grupos de acordo com os R_f . A subfração (87-100).4 foi purificada em CCDP utilizando Hex:AcOEt (85:15 v/v) como eluente e codificada como *Rb-6*. Todas as quantidades obtidas das substâncias encontram-se expressas no Esquema 3 (pág. 74)

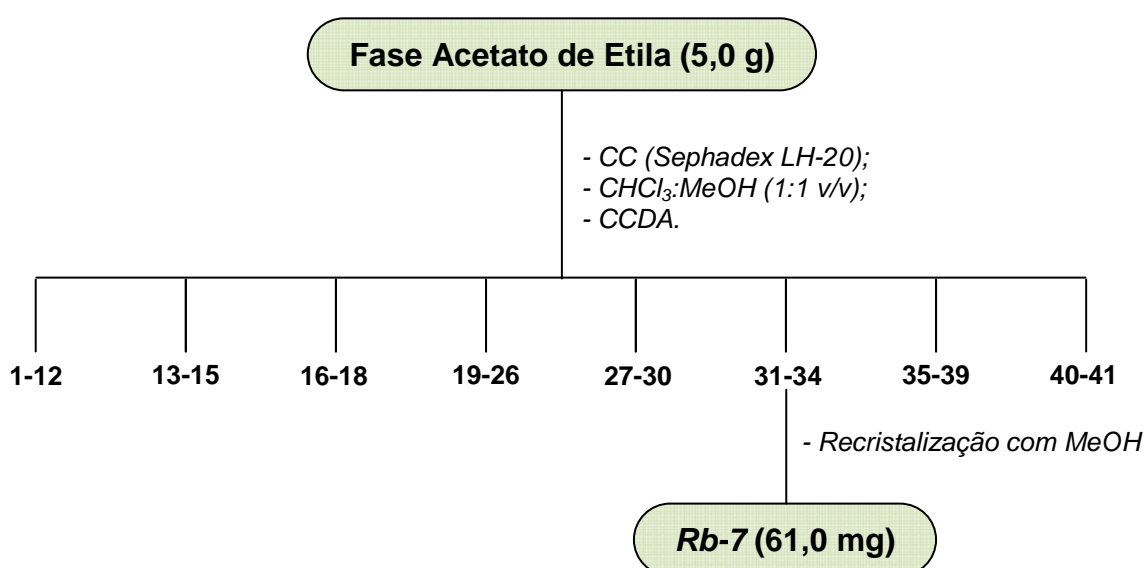
Esquema 3. Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Richardia brasiliensis* Gomes.



c) Processamento cromatográfico da fase acetato de etila

A fase AcOEt (5,0 g) foi cromatografada em coluna utilizando Sephadex LH-20 e CHCl_3 :MeOH (1:1 v/v), processo este que resultou em 41 frações de 10,0 mL cada. Ao ser analisadas por CCDA essas foram reunidas em oito grupos de acordo com seus R_f . A fração 31-34 foi recristalizada com MeOH resultando no composto *Rb-7* (Esquema 4, pág. 75).

Esquema 4. Etapas envolvidas no processamento cromatográfico da fase acetato de etila de *Richardia brasiliensis* Gomes.



4.2.3. Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

A estrutura química das substâncias isoladas foi caracterizada mediante o uso de métodos espectroscópicos, experimentos de rotação óptica e determinação dos pontos de fusão.

a) Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros na região do IV (4000 a 400 cm^{-1}), que dão informações sobre os prováveis grupos funcionais presentes na molécula (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001), foram obtidos em aparelho de BOMEM FT-IR (modelo MB 100) do LTF/UFPB, utilizando uma pequena quantidade de amostra em pastilha de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm^{-1} .

b) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , que informa sobre os diferentes hidrogênios e carbonos da molécula, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001), foram obtidos em espectrômetros VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz e VARIAN-NMR-SYSTEM 200 MHz, ambos do Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL) da UFPB. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em solventes deuterados da marca *Cambridge Isotope Laboratories*: clorofórmio (CDCl_3) e metanol (CD_3OD) deuterados.

Os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz foram referenciados para RMN de ^1H pelos sinais característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: CHCl_3 (7,24 ppm) e CH_3OH (3,30 ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais dos carbonos dos solventes deuterados: CDCl_3 (77,0 ppm) e CD_3OD (49,0 ppm).

As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *tq* (tripletos de quintetos), *q* (quarteto) e *m* (multiplete).

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos pela técnica APT com a seguinte conveção: os sinais de carbonos não-hidrogenados (C) e metilênicos (CH_2) acima da linha base e sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) abaixo da linha base.

Os espectros de RMN também foram otimizados para as técnicas bidimensionais: HMQC, espectro de correlação heteronuclear, que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e seus respectivos carbonos; HMBC que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e carbonos a duas (2J) e três (3J) ligações; COSY, estabelece as correlações entre hidrogênios que são responsáveis, entre si, pelo desdobramento do sinal, e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN ^1H ; e NOESY, técnica homonuclear que mostra correlações espaciais dos hidrogênios da molécula (KAISER, 2000).

Os dados espectrais foram comparados com modelos da literatura, quando possível, permitindo fazer a maioria das atribuições, e os demais foram feitos com base na análise dos espectros bidimensionais.

c) Espectrometria de Massas

O espectro de massas IES-EM da substância *Rb-2* foi obtido em modo de íons positivos pela técnica de Ionização por Eletrospray (+) utilizando um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Quattro LC, Waters).

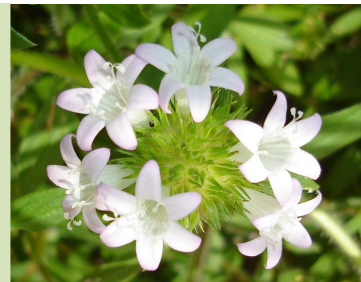
O espectro de massas de alta resolução (HR-TOF-MS) da substância *Rb-6* também foi obtido em modo de íons positivos pela técnica de Ionização por Eletrospray (+) em equipamento com Híbrido Quadrupolo - Tempo de Vôo (Q-TOF-Micromass) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. A amostra foi dissolvida e diluída em uma solução de MeOH:H₂O (1:1 v/v) com ácido fórmico 0,01 % até a concentração de 1,0 µg mL⁻¹. O fluxo de injeção foi de 1,0 mL min⁻¹.

d) Rotação Óptica e ponto de fusão

Os experimentos de rotação óptica foram feitos em um polarímetro digital JASCO DIP-370 do Laboratório Unificado de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LUDEM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB, com a amostra diluída em 20,0 mL de EtOH absoluto. O desvio da luz plano-polarizada foi determinado por comparação com um controle negativo que consistia no mesmo solvente utilizado para diluição da amostra.

O ponto de fusão de cada substância foi determinado em aparelho digital para ponto de fusão (MQAPF – 302) da Microquímica Equipamentos LTDA, com temperatura variando de 0 – 350 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Farmacobotânica de *Richardia brasiliensis* Gomes

5.1.1. Nome aceito e sinônimos de acordo com Lewis e Oliver (1974)

Segundo Lewis e Oliver (1974), sete sinonímias são atribuídas a *Richardia brasiliensis* Gomes:

***Richardia brasiliensis* Gomes**, Mem. Ipec. Bras. 31, t. 2. 1801.

- *Richardsonia brasiliensis* (Gomes) Hayne, Arzengew. **8**: 21, t. 21. 1855.
- *Richardsonia emetica* Martius, Sp. Mat. Med. Bras. 11, 1824.
- *Richardsonia adscendens* Pavón ex DC. Prodr. **4**: 569, 1830.
- *Richardsonia rosea* St.-Hil. Pl. Us. Bras. 7, t. 7. 1824.
- *Richardia rosea* f. *albiflora* O. Ktze, Rev. Gen. Pl. **3**: 112, 1808.
- *Richardia rosea* f. *lilacina* O. Ktze, Rev. Gen. Pl. **3**: 112, 1808.
- *Richardsonia brasiliensis* var. *dubia* Beauverd & Felippone, Bull. Soc. Bot. Genève, ser. 2, **13**: 7, 1921.

5.1.2. Morfodiagnose macroscópica

Erva, (10-) 20-35 (-50) cm de altura (Figura 15A, pág. 81). Caule e ramos eretos, algumas vezes rastejantes, cilíndricos, ramificações do tipo monopodial, verdes com estrias longitudinais rubiginosas, tomentosos, tricomas simples, longos (3,0 mm compr.), hialinos, pilosos por toda extensão do órgão, estípulas interpeciolares (Figura 15D, pág. 81).

Folhas com disposição oposta cruzada no caule, simples, subsésseis, lâmina concolor (verde-claro), limbo íntegro, margem inteira, contorno elíptico a oval, base simétrica e atenuada, ápice agudo, nervação penínervia, consistência membranácea na face adaxial e tomentosa na face abaxial, pubescente; pecíolo lateral, reto, curto (0,6 – 1,0 cm compr.), canaletado em secção transversal, superfície tomentosa e coloração verde a rubiginoso (Figura 15H, pág. 81).

Inflorescência terminal do tipo racimosa em capítulo multifloros, 11 – 36 botões florais, prefloração valvar, pedúnculo 5,5 – 9,2 cm compr., inerme, indumento e tricomas semelhante aos do caule; brácteas-4 foliares e involucrais, opostas cruzadas na base do receptáculo floral. Flores cíclicas, diperiantadas, heteroclamídeas, hermafroditas, isostêmones; cálice actinomorfo, gamossépalo, urceolado, sépalas-6, soldadas na base, lobos verdes, base rubiginosa, linear-lanceolados (cerca de 1,0-1,5 x 5,0-6,0 mm), externamente pubescente, internamente glabrescentes, tricomas no bordo, persistentes; corola actinomorfa, pétalas-6, soldadas na base, infundibuliforme, 1,3-1,7 cm de diâmetro, tubo 1,4 cm compr., branca com extremidade lilás, externa e internamente glabrescentes, caducas; androceu com seis estames homodínamos, dialistêmone, exsertos que surgem das das pétalas, filete cilíndrico, levemente inclinado, não-ramificado, 1,0-2,0 mm de comprimento, anteras ditecas, 1,5-2,0 mm compr., elíptica-ovóide, dorsifixa, deiscência longitudinal e introrsa; grãos de pólen brancos, simples, arredondados e espinhosos; gineceu com ovário subgloboso (1,0-1,5 mm de diâmetro), ínfero, tricarpelar, gamocarpelar, trilocular, branco com estruturas papilares na superfície externa, estilete cilíndrico (1,3-1,5 cm compr.), reto, terminal; estigma claviforme e indiviso, óvulo globoso, placentação axial (Figura 15A, 15C e 15E, pág. 81).

Infrutescência sorose (Figura 15B, pág. 81); frutículos tricoco, epicarpo verde a rubiginoso, cálice frutífero, simples, sincárpico, trispérmico, subgloboso (1,5 – 2,5 mm de diâmetro), cápsula septicida caracterizada por pericarpo de consistência seca, três deiscências longitudinais, fendas ao longo dos septos isolando cada lóculo (Figura 15C, pág. 81); sementes marrom-escuras; subreniformes, albuminadas, ategumentadas envolvidas pelo pericarpo seco do fruto (Figura 15G, pág. 81).

Raiz pivotante e fibrosa, hábitat subterrâneo nos indivíduos eretos e adventícia nos caules com natureza rastejante., axial, não tuberosa, esbranquiçada, 3,5 – 4,0 mm de diâmetro e 30,0 – 50,0 cm compr. na raiz principal, 0,5 – 1,0 mm de diâmetro e 5,0 – 10,0 cm compr. nas raízes laterais (Figura 15F, pág. 81).

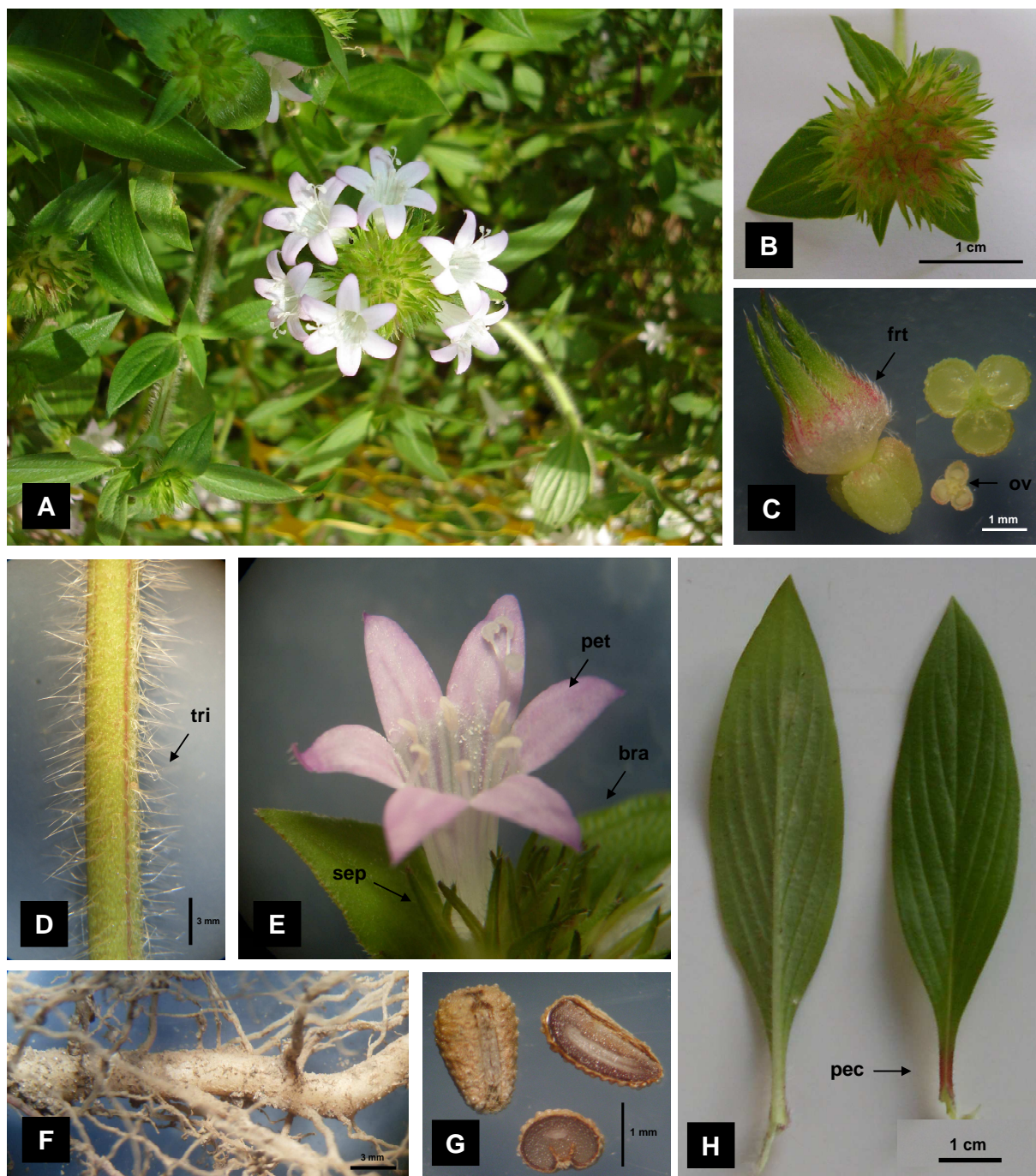


Figura 15. *Richardia brasiliensis* Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Visão geral da espécie em seu hábitat mostrando a inflorescência; (B) Infrutescência sorose; (C) Frutículo inteiro e em secção transversal; ovário tricarpelar-trilocular, evidenciando os óvulos; (D) Caule com tricomas; (E) Flor evidenciando cálice, corola, estames e gineceu; (F) Raízes principal e lateral; (G) Semente inteira e em secção trasnversal e longitudinal; (H) Folhas em vista abaxial e adaxial, respectivamente. **Legenda:** brácteas (bra); frutículo (frt); ovário (ov); pecíolo (pec); pétalas (pet); sépalas (sep); tricomas (tri).

5.1.3. Morfodiagnose microscópica

A epiderme da lâmina foliar, em vista frontal (Figura 16, pág. 83), é constituída por células epidérmicas que variam de alongadas a globosas, possuindo paredes

anticlinais delgadas com contorno poligonal reto na face adaxial e ondulado na face abaxial, semelhantemente ao de *Palicourea longepedunculata* (PEREIRA et al., 2003).

Os estômatos são do tipo paracítico com distribuição anfiestomática. A presença de folhas anfiestomática em espécies invasoras é muito comum, como observado por Procópio e colaboradores (2003). Essa característica pode representar um aumento na taxa fotossintética, já que as trocas gasosas podem ser realizadas pelas duas faces da folha, desta forma, quanto maior a área estomática útil, maior a possibilidade de adaptação da espécie ao ambiente (MOOT et al., 1982). Estômatos paracíticos também foram descritos por Alves e colaboradores (2004) em seu estudo com *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae), confirmando ser este o tipo mais comum de estômatos observado para espécies da família Rubiaceae já registrado por Metcalfe e Chalke (1950).

Apresenta tricomas tectores simples com paredes finamente espessadas e superfície externa lisa. Este tipo de tricoma também foi observado por Salatino e colaboradores (1986) para *Tocoyena formosa* e por Nascimento e colaboradores (1996) para *Bathysa stipulata* e são similares aos “hairs sclereids” de Metcalfe e Chalk (1950). A função dos tricomas tectores depende do órgão onde estes se encontram, de sua morfologia, de sua densidade e até mesmo de sua orientação, isto é, do ângulo de inclinação. Eles podem servir como uma barreira mecânica contra temperaturas extremas, alta intensidade luminosa, perda excessiva de água, entre outros fatores (WERKER, 2000). Assim, a presença de tricomas em *Richardia brasiliensis* Gomes é uma característica que evidencia a adaptabilidade desta espécie a ambientes hostis pois reduzem a perda de água na transpiração e mantêm a assimilação de gás carbônico por manter a atmosfera saturada em vapor de água em torno da folha (FAHN; CUTTER, 1992).

Em secção transversal (Figura 17, pág. 84), a epiderme é unisseriada, formada por células tabulares com formato e tamanho irregulares, no entanto, a maioria apresenta contorno retangular alongado no sentido periclinal com paredes periclinais e anticlinais convexas e delgadas. A cutícula que recobre as células epidérmicas assume um aspecto liso que acompanha o contorno das células, sendo levemente mais espessa na face adaxial. As células estomáticas encontram-se no mesmo nível das células epidérmicas e apresentam câmara subestomática conspícua.

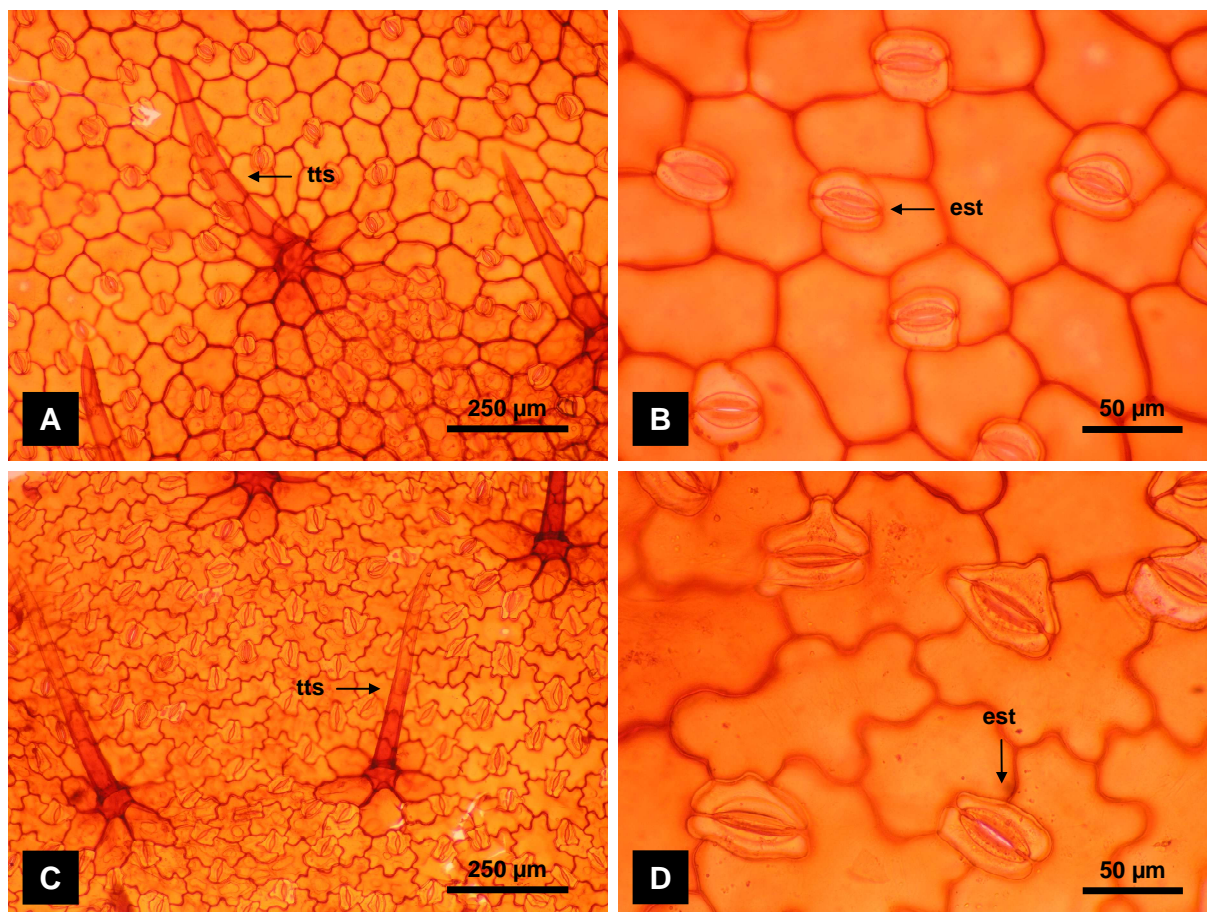


Figura 16. Epiderme em vista frontal de *Richardia brasiliensis* Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Face adaxial com tricoma tector simples; (B) Detalhe da face adaxial, células epidérmicas com parede anticlinal reta e estômatos anisocítico e anomocítico; (C) Face abaxial com tricoma tector simples; (D) Detalhe da face abaxial, células epidérmicas com parede anticlinal ondulada e estômatos anisocítico e anomocítico. **Legendas:** estômato (est); tricoma tector simples (tts).

O mesofilo, em secção transversal (Figura 17A, pág. 84), é bifacial (heterogêneo e assimétrico). O parênquima paliçádico (Figura 17B, pág. 84) é pluriestratificado apresentando 2-3 estratos de células com tamanhos variáveis, densamente compactadas, formadas por paredes anticlinais irregulares ligeiramente espessadas. O parênquima esponjoso (Figura 17C, pág. 84) também é pluriestratificado com 4-5 estratos de células ovais ou alongadas, de tamanhos variáveis com espaços intercelulares irregulares e idioblastos com drusas. Por se tratar de um caráter muito variável, capaz de responder às condições ambientais (DICKISON, 2000; FAHN, 1974), não devem ser considerado para diagnóstico entre espécies.

O bordo foliar (Figura 17D, pág. 84), em secção transversal, apresenta-se agudo, ligeiramente reflexo, revestido por epiderme unisseriada, cujas células encontram-se mais arredondadas quando comparadas com as do mesofilo. A cutícula é mais espessa e o parênquima paliçádico é formado por células menores,

arredondadas no limite do bordo, onde se observa um feixe vascular de pequeno porte e, associado a este, um elemento de vaso cuja parede secundária possui espessamente helicoidal.

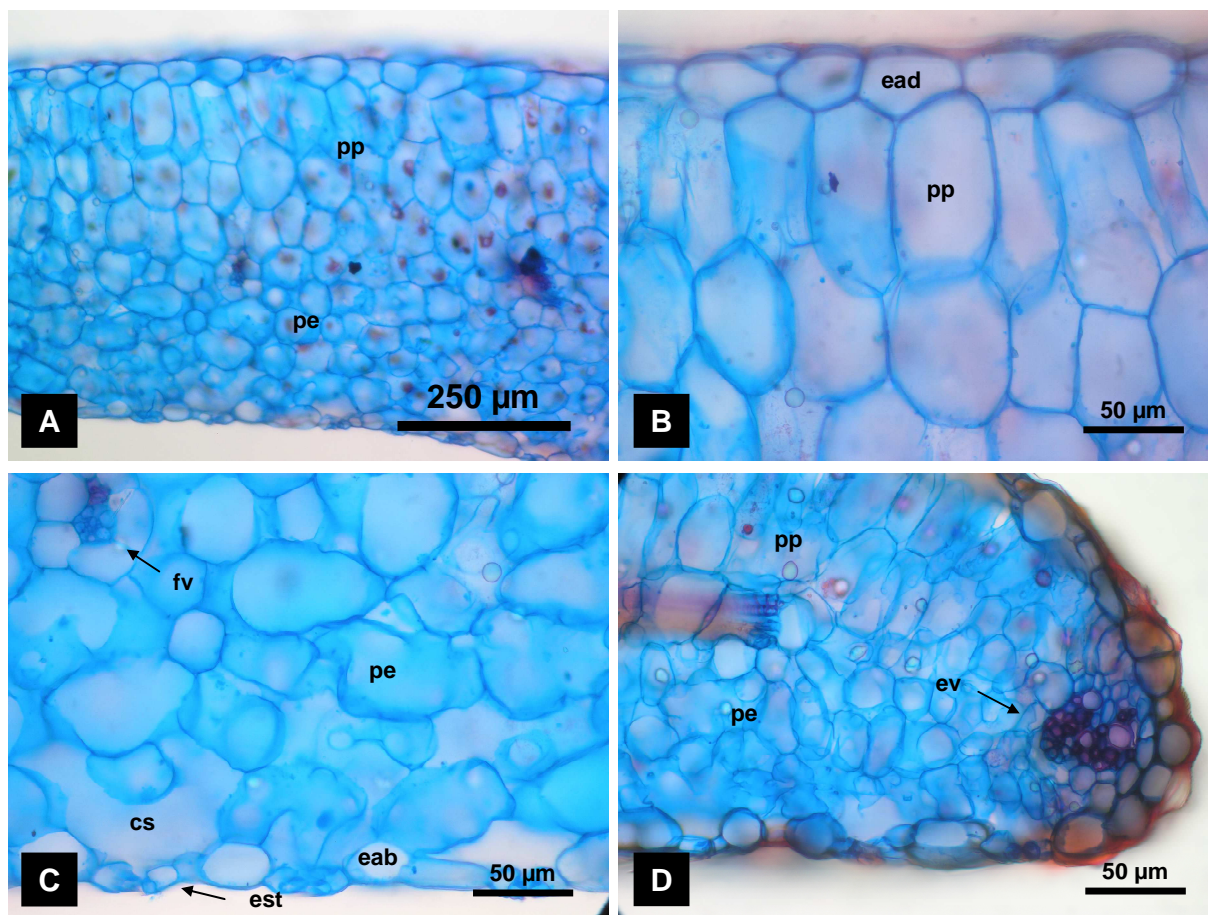


Figura 17. Lâmina foliar em secção transversal de *Richardia brasiliensis* Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Mesofilo heterogêneo bifacial; (B) Detalhe do parênquima paliçádico e da epiderme da face adaxial; (C) Detalhe do parênquima lacunoso e da epiderme da face abaxial evidenciando estômato, câmara subestomática e feixe vascular; (D) Bordo foliar. **Legendas:** câmara subestomática (cs); epiderme da face abaxial (eab); epiderme da face adaxial (ead); estômato (est); elemento de vaso (ev); feixe vascular (fv); parênquima esponjoso (pe); parênquima paliçádico (pp).

A nervura principal (Figura 18A, pág. 85), em secção transversal, apresenta-se côncavo-convexa, sendo mais amplo e proeminente na face abaxial. A epiderme é unisseriada constituída por células globosas de tamanho variável (Figura 18B e C, pág. 85). As paredes periclinais externas são revestidas por uma camada de cutícula lisa e delgada que acompanha o contorno das células. Os tricomas, semelhantemente a lâmina foliar, são tectores simples. Adjacente à epiderme, evidencia-se o parênquima fundamental, mais desenvolvido na face abaxial (4-8 estratos celulares) do que na face adaxial (2-4 estratos celulares). Este tecido é

composto por células globosas de tamanhos variáveis, menores nos estratos mais internos e na face adaxial, e idioblastos contendo área cristalina.

O sistema vascular (Figura 18D, pág. 85) é formado por um único feixe em forma de arco do tipo colateral aberto. O floema está organizado em cordões bem evidentes separados entre si por uma fileira de células parenquimáticas. O xilema é formado por elementos de vaso, dispostos em fileiras radiais, separadas por uma ou duas fileiras de células parenquimáticas.

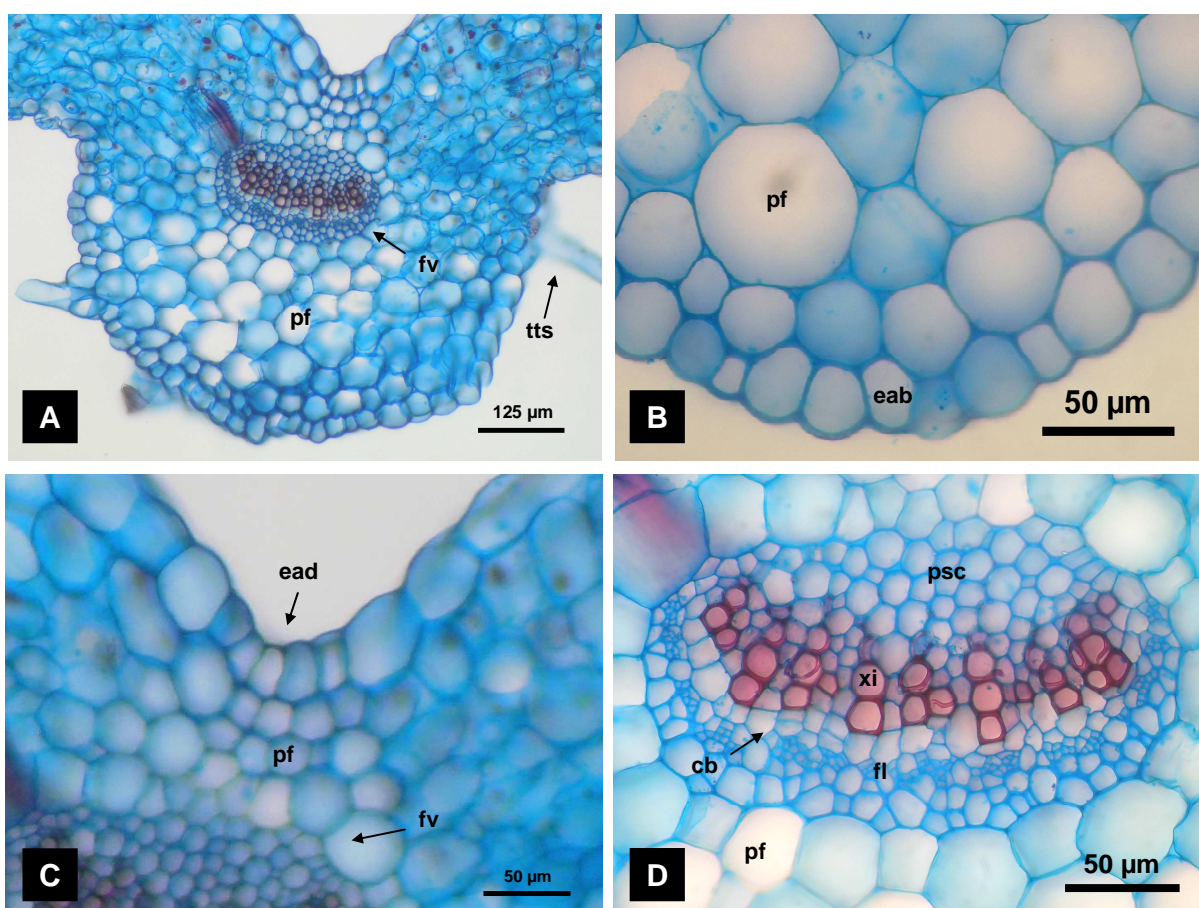


Figura 18. Nervura principal da lâmina foliar em secção transversal de *Richardia brasiliensis* Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Visão geral da nervura principal, região mediana; (B) Detalhe da face abaxial evidenciando a epiderme e o parênquima fundamental adjacente; (C) Detalhe da face adaxial evidenciando a epiderme e o parênquima fundamental adjacente; (D) Detalhe do feixe vascular colateral aberto. **Legedas:** câmbio (cb); epiderme da face abaxial (eab); epiderme da face adaxial (ead); floema (fl); feixe vascular (fv); parênquima fundamental (pf); parênquima do sistema de condução (psc); tricoma tector simples (tts); xilema (xi).

O pecíolo, em secção transversal (Figura 19A, pág. 86), exhibe contorno côncavo-convexo com extremidades voltadas para a face adaxial, arredondadas nas regiões distal e mediana do pecíolo, acuminadas na região proximal. A epiderme (Figura 19B, pág. 87) é unisseriada, constituída por células globosas com paredes periclinais externas revestidas por cutícula lisa e delgada. Adjacente à epiderme,

evidencia-se o parênquima fundamental formado por 7-8 estratos de células globosas de tamanhos variáveis, sendo maiores nos estratos mais internos e observa-se, ainda, a presença de idioblastos com areia cristalina similares aos da nervura principal. Além disso, apresenta tricomas tectores simples e colênquima e esclerênquima.

O sistema vascular (Figura 19C e D, pág. 86) é constituído por cinco feixes vasculares do tipo colateral aberto, sendo um feixe central em forma de arco e quatro menores, circulares, voltados para a face adaxial semelhante ao tipo descrito por Metcalfe e Chalke (1950) para Rubiaceae. O floema está organizado em cordões evidentes separados por 1-2 células parenquimáticas, o câmbio vascular é formado por 1-2 estratos celulares e o xilema constituído por várias séries de 4-5 elementos de vaso, aproximadamente isodiamétricos, dispostos em fileiras radiais separados por 1-2 raios parenquimáticos.

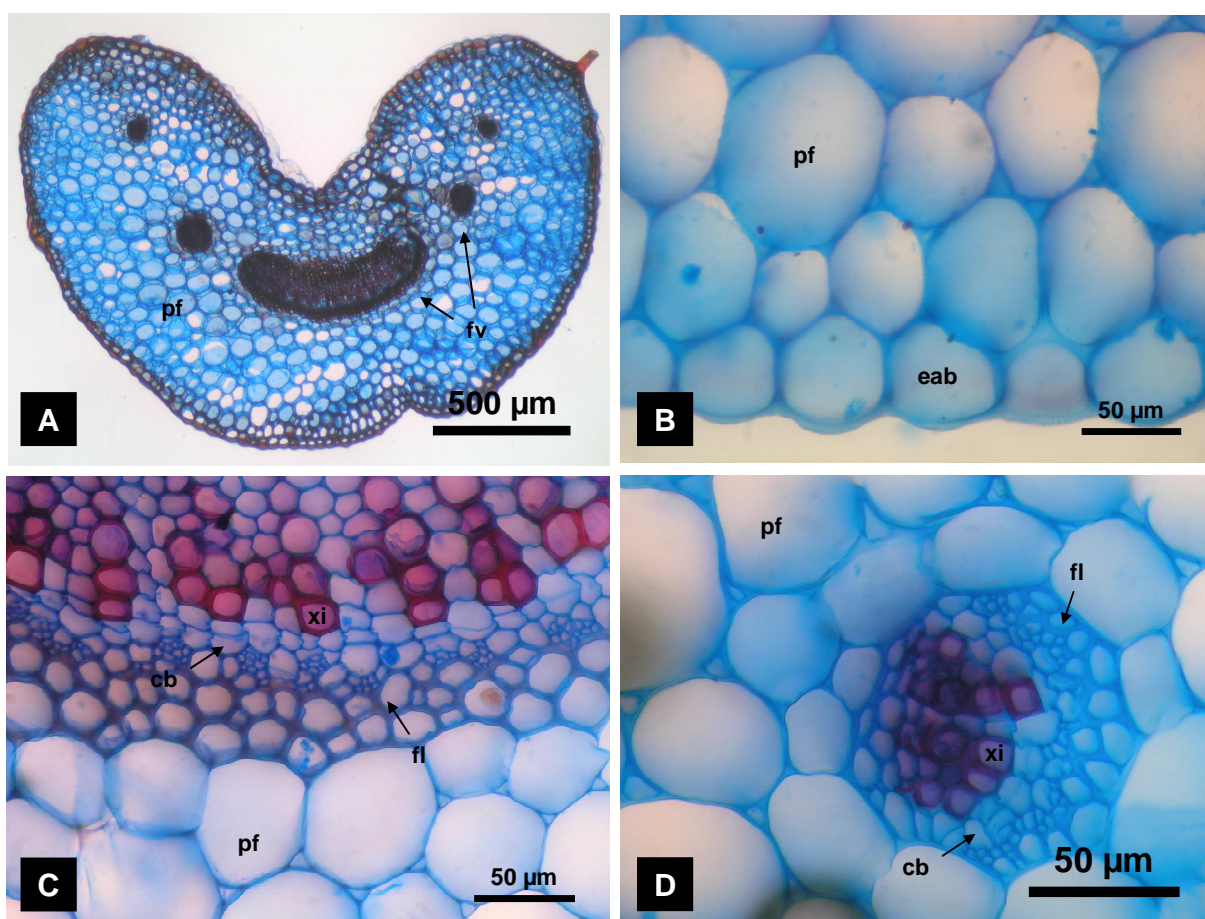


Figura 19. Pecíolo, em secção transversal, de *Richardia brasiliensis* Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Visão geral, na região proximal, mostrando os cinco feixes vasculares; (B) Detalhe da epiderme da face abaxial e do parênquima fundamental; (C) Detalhe do feixe vascular central, em arco; (D) Detalhe de um feixe vascular circular. **Legendas:** câmbio (cb); epiderme da face abaxial (eab); floema (fl); feixe vascular (fv); parênquima fundamental (pf); xilema (xi).

O caule, em estrutura secundária (Figura 20A e B, pág. 88), apresenta contorno cilíndrico e é constituído pelas regiões epidérmica, cortical, vascular e medular.

A epiderme, em secção transversal (Figura 20C, pág. 88), é unisseriada formada por células de tamanho regular com paredes periclinais e anticlinais convexas, revestidas por cutícula lisa e espessa, apresenta tricomas simples tectores e grande quantidade de estômatos com câmara subestomática conspícua.

A região cortical (Figura 20B e C, pág. 88) é constituída por 6-8 estratos de células parenquimáticas com forma e tamanho variáveis, não apresentando nenhum tecido de sustentação (colênquima e esclerênquima). Contem estruturas secretoras esparsas pelo parênquima cortical delimitado internamente pelo endoderma formado por uma camada contínua de células poligonais retangulares.

O sistema vascular (Figura 20D e E, pág. 88) apresenta organização sifonostélica contínua ectoflóica. O floema apresenta-se como cordões floemáticos separados por 2-3 células parenquimáticas. O câmbio é constituído por dois estratos celulares. O xilema forma um cilindro oco com 6-7 elementos de vaso dispostos em fileiras radiais intercaladas com fibras lignificadas.

A medula (Figura 20F, pág. 88) é bastante desenvolvida e é constituída por células parenquimáticas com contorno circular e tamanho variável sendo, em geral, relativamente grandes; e alguns idioplastos na forma de areia cristalina e drusas.

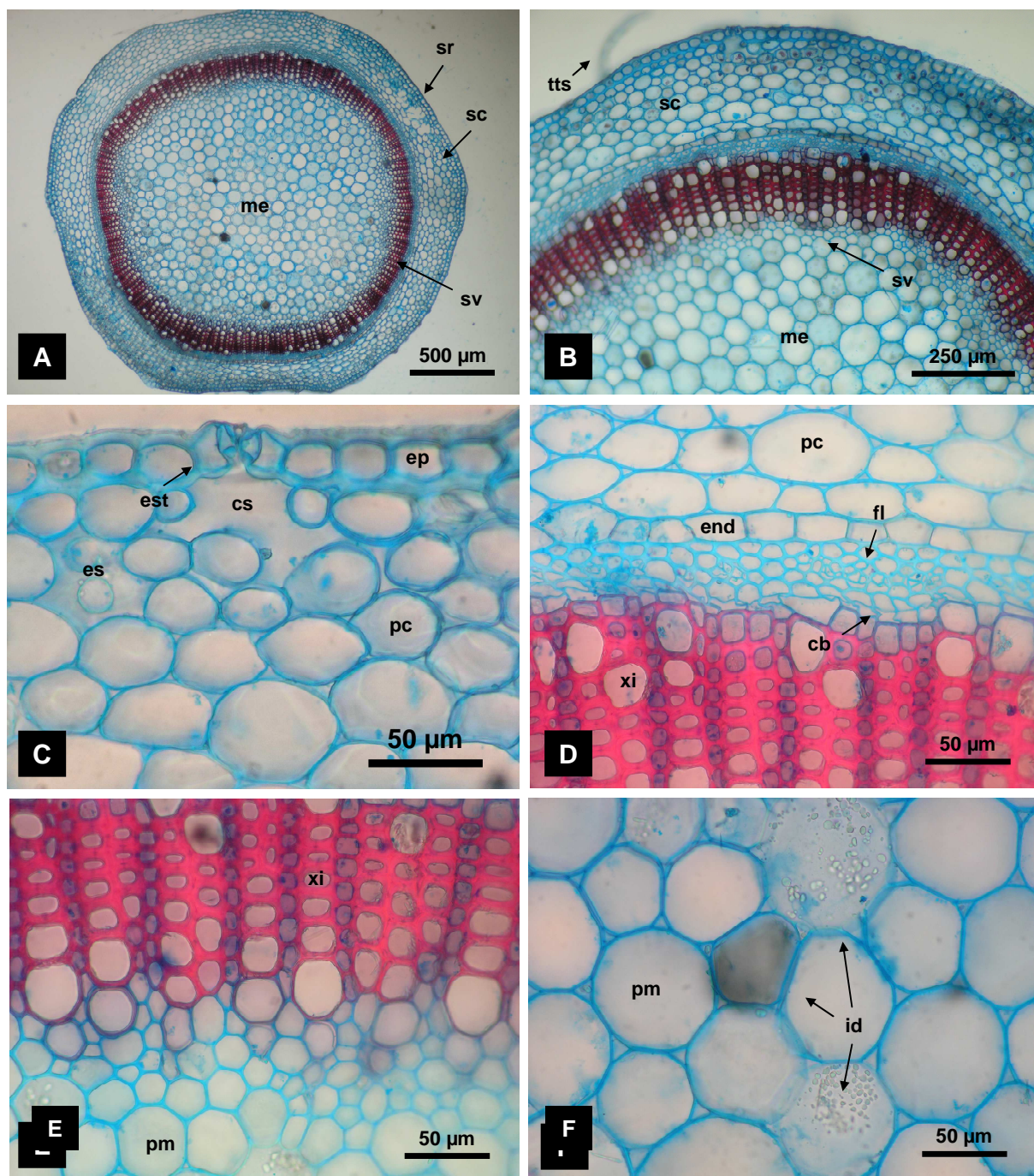


Figura 20. Caule, em secção transversal, de *Richardia brasiliensis* Gomes (Tenório-Souza 01). (A-B) Visão geral de caule em estrutura secundária; (C) Detalhe do sistema de revestimento e cortical evidenciando estômato, estrutura secretora e parênquima cortical; (D-E) Detalhe do sistema vascular e do endoderma; (D) Detalhe da região medular mostrando idioblastos com drusas e areia cristalina. **Legendas:** câmbio (cb); câmara subestomática (cs); endoderme (end); epiderme (ep); estrutura secretora (es); estômato (est); floema (fl); idioblastos (id); medula (me); parênquima cortical (pc); parênquima medular (pm); sistema cortical (sc); sistema de revestimento (sr); sistema vascular (sv); tricoma tector simples (tts); xilema (xi).

As raízes principal e laterais (Figura 21A e C, pág. 90), em estrutura secundária, possuem contorno circular, constituída pelos sistemas de revestimento, cortical e vascular.

Em secção transversal, apresenta uma periderme (Figura 21B e D, pág. 90), formada por 6-8 estratos de súber com células achatadas e sobrepostas e paredes anticlinais coincidentes; um estrato de felógeno e 2 estratos de feloderma.

Na região cortical (Figura 21D e E, pág. 90), adjacente à periderme, encontra-se o tecido parenquimático formado por 4-5 estratos de células irregulares e idioblastos do tipo ráfides.

O sistema vascular é do tipo anficrival, com organização protostélica nas raízes laterais (Figura 21A e B, pág. 90) e protostélica radiada na raiz principal (Figura 21D e F, pág. 90). O floema está organizado em cordões que formam um cilindro, separados radialmente por uma fileira de células parenquimáticas. Nas raízes laterais, o xilema apresenta estrutura monarca, formando um cilindro maciço, com elementos de vaso dispostos em fileiras radiais, intercalados com fibras lignificadas. Na raiz principal, o xilema apresenta estrutura bastante irregular, com elementos de vaso dispostos em fileiras radiais separadas por raios parenquimáticos.

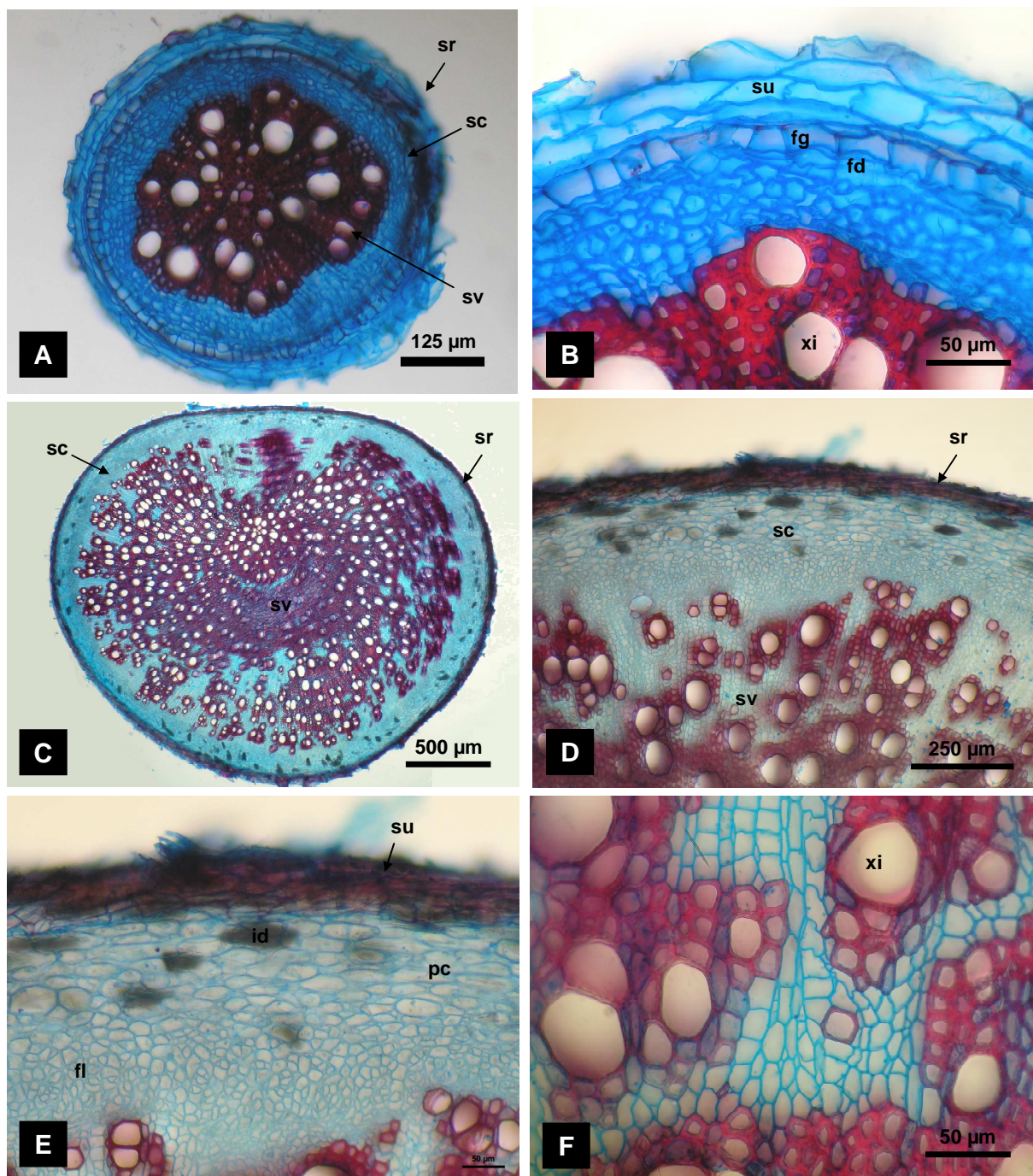


Figura 21. Secção transversal de raízes, em crescimento secundário, de *Richardia brasiliensis* Gomes (Tenório-Souza 01). (A) Visão geral de raiz lateral; (B) Detalhe do sistema de revestimento, cortical e vascular de raiz lateral, mostrando súber, felogênio e feloderma; (C-D) Visão geral de raiz principal; (E) Detalhe do sistema de revestimento, cortical e vascular, evidenciando súber, parênquima cortical com idioblastos e cordões floemáticos. **Legendas:** feloderma (fd); felogênio (fg); floema (fl); idioblastos (id); parênquima cortical (pc); sistema cortical (sc); sistema de revestimento (sr); súber (su); sistema vascular (sv); xilema (xi).

5.2. Fitoquímica de *Richardia brasiliensis* Gomes

O estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto de *Richardia brasiliensis* Gomes resultou no isolamento de sete substâncias. Da fase hexânica obteve-se uma mistura de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol) e 15¹-hidroxi-(15¹-S)-porfirinolactona *a*. Da fase CHCl₃ foi obtida quatro cumarinas: cedrelopsina, norbraylina, braylina e cumarieletefina, sendo esta última relatada pela primeira vez na literatura, e da fase AcOEt obteve-se o flavonóide canferol (Figura 22, pág. 91).

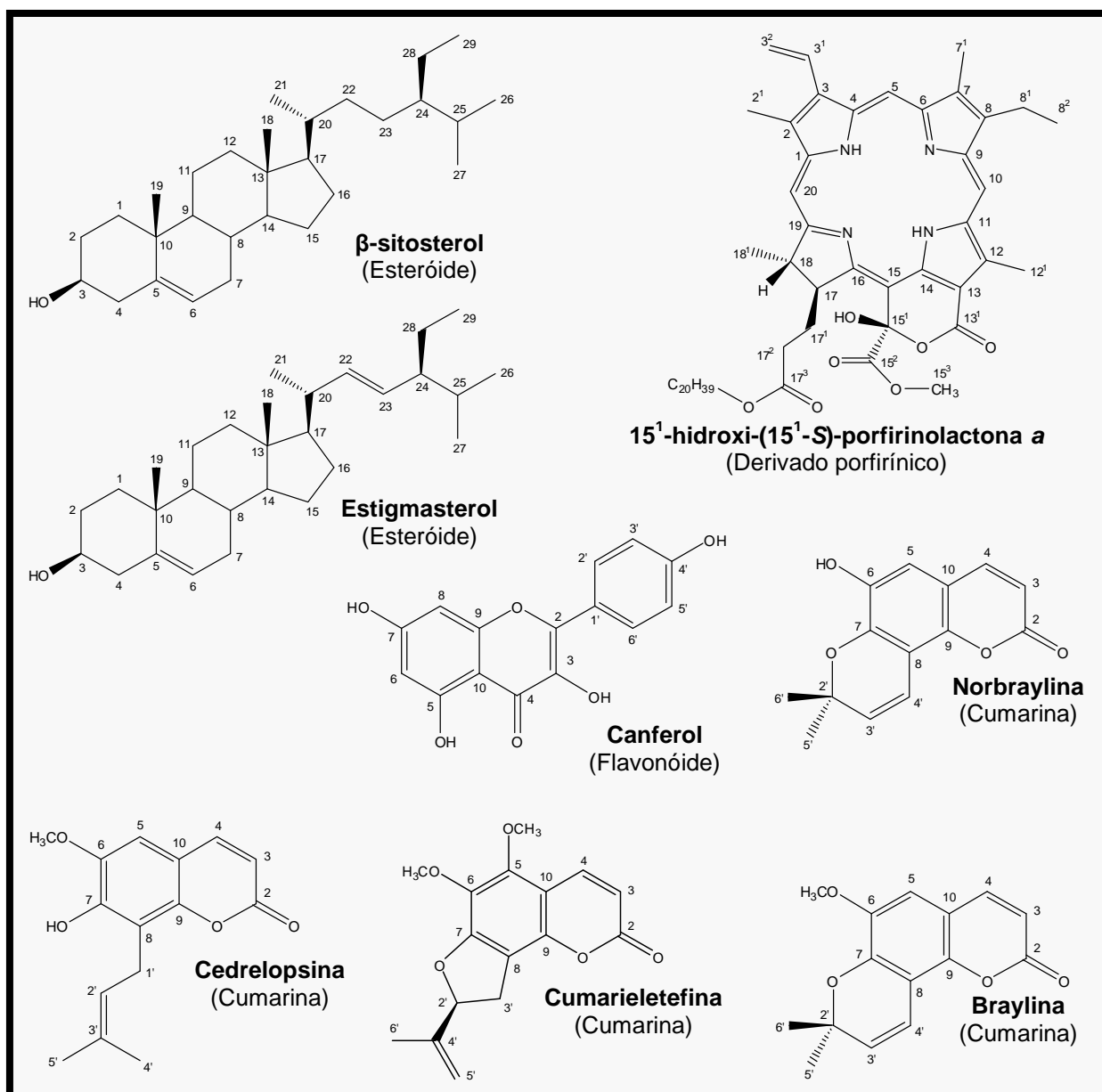


Figura 22. Substâncias isoladas de *Richardia brasiliensis* Gomes no presente trabalho.

5.2.1. Determinação estrutural de Rb-1

A substância codificada como *Rb-1* foi obtida na forma de cristais brancos com massa de 217,0 mg (correspondendo a 2,170 % em relação à massa da fase hexânica), não apresentando fluorescência à luz ultravioleta.

O espectro de IV (Figura 23, pág. 92) deste composto mostrou absorção em 3433 cm^{-1} referente a estiramento O-H em ligação intermolecular sugerindo a presença de hidroxila não impedida estericamente. A ausência de bandas para carbonila fez sugerir que a molécula tratava-se de um álcool; isto foi corroborado pela absorção em 1377 cm^{-1} referente à deformação no plano de O-H. Esta absorção acoplada à vibração fora do plano de C-H sp^3 em 1462 cm^{-1} , bem como, o estiramento de C-O em 1056 cm^{-1} permitiram afirmar que o álcool era ou primário saturado, ou secundário α -insaturado, ou secundário em anel alicíclico de cinco ou seis membros. No mesmo espectro, foram observadas vibrações em 1654 e 1635 cm^{-1} de estiramento de C=C; além disto, absorções fortes em 2935 e 2866 cm^{-1} correspondente a estiramento de C-H sp^3 permitiram sugerir a presença de várias unidades de CH_2 e CH_3 para *Rb-1* (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).

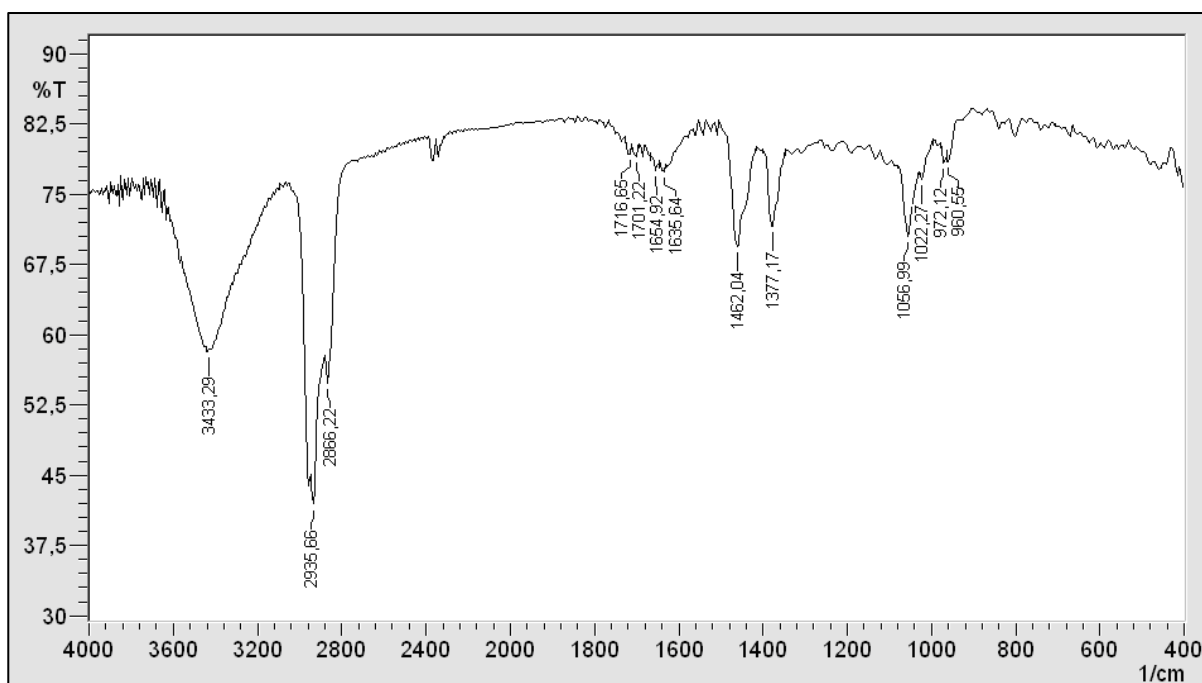


Figura 23. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *Rb-1*.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) e as expansões (Figura 24, 25 e 26, pág. 93 e 94) apresentaram um conjunto de deslocamentos químicos simples e de

alta multiplicidade, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos, em δ_H 0,6 - 2,5 que são compatíveis com substâncias que possuem esqueleto terpênico (KOJIMA et al., 1990). Um multipletto em δ_H 3,49 (Figura 24 e 25, pág. 93 e 94) característico de hidrogênio oximetínico reforçou a proposta do espectro de IV para a presença de função álcool em *Rb-1*. Dupletto largo em δ_H 5,32 ($J = 5,0$ Hz) e dois duplos-dupletos, acoplando *trans* entre si, em δ_H 4,98 ($J = 8,2$ e 15,2 Hz) e 5,13 ($J = 8,2$ e 15,2 Hz) permitiram sugerir duas unidades olefínicas para *Rb-1*, tri e dissustituída, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).

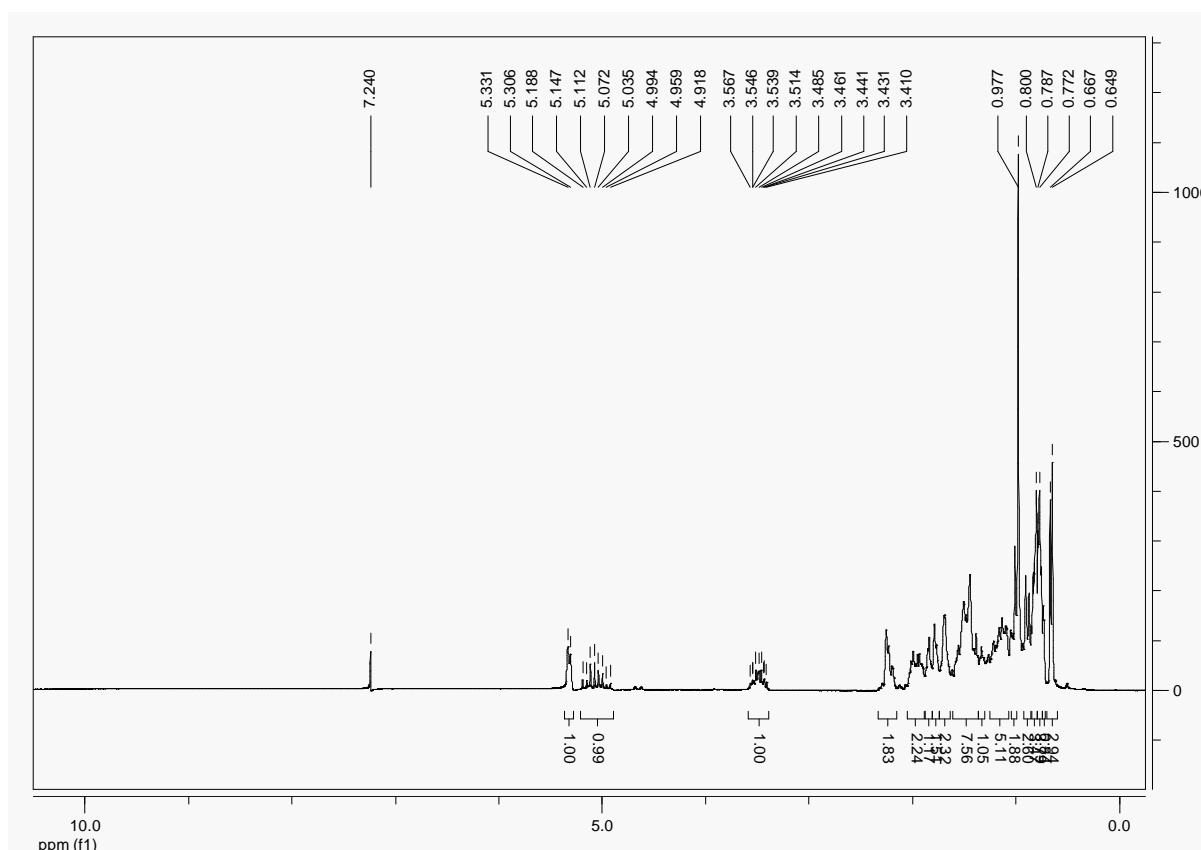


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *Rb-1*.

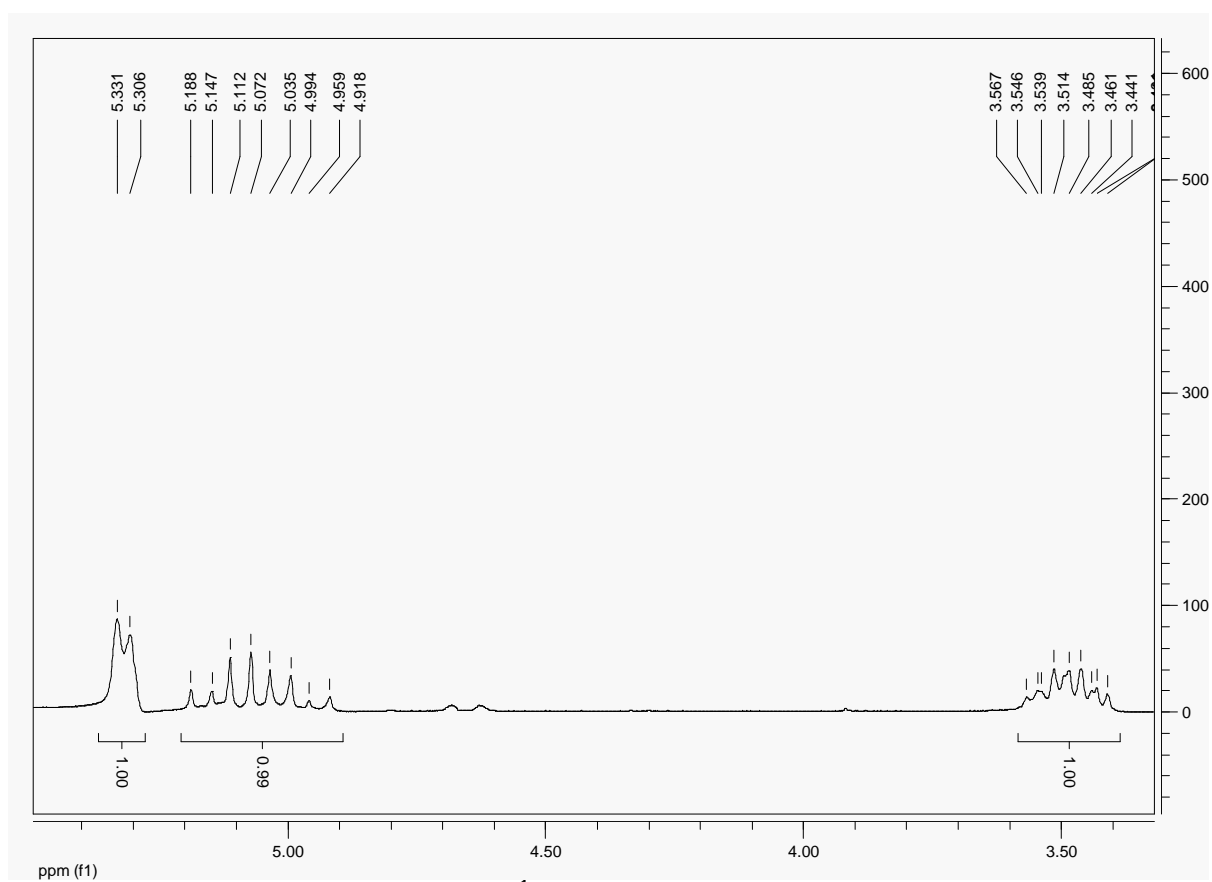


Figura 25. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *Rb-1* na região de 3,4 – 5,5 ppm.

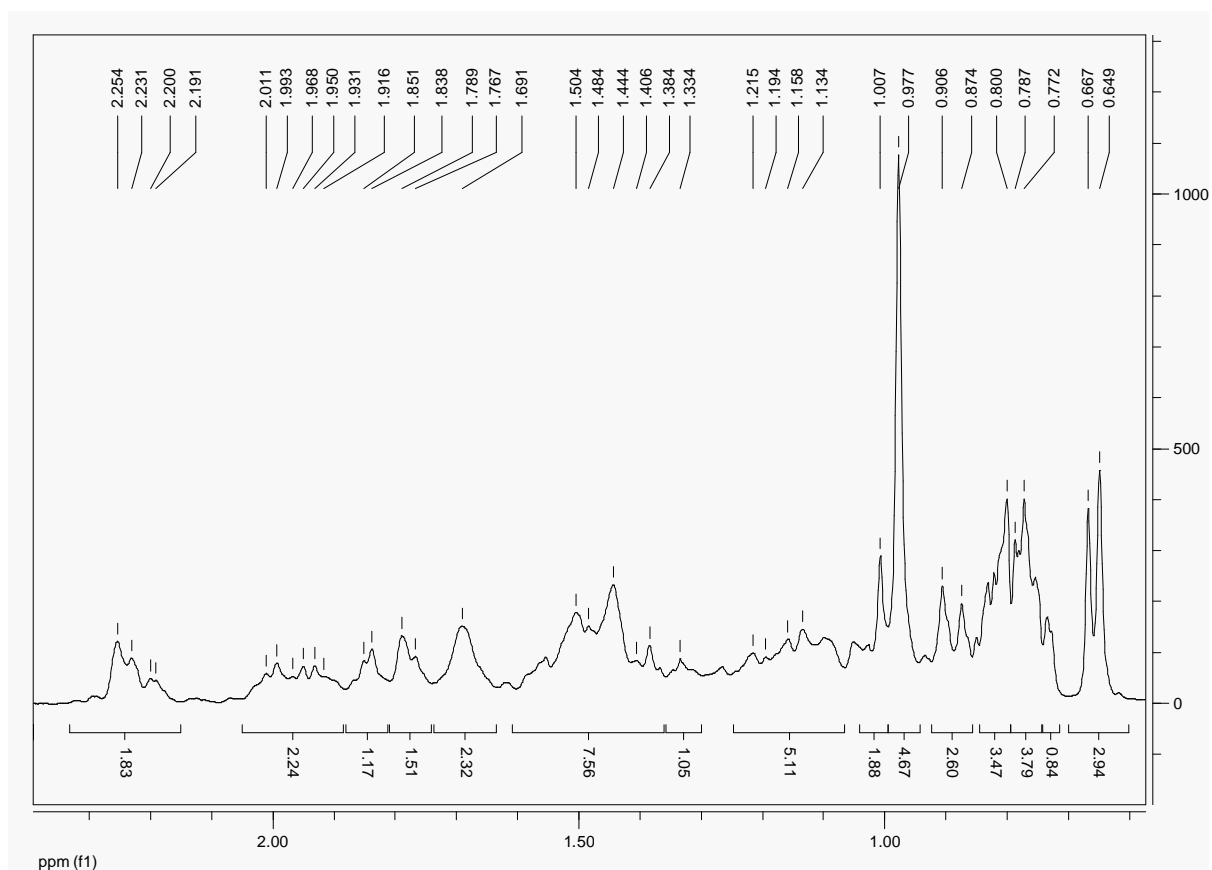
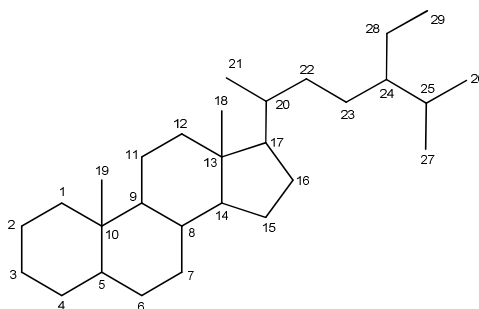


Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *Rb-1* na região de 0,6 – 2,4 ppm.

No espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) e nas expansões (Figura 27, 28 e 29, pág. 95 e 96), sinais intensos e outros duplicados permitiram afirmar que *Rb-1* tratava-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o mesmo esqueleto carbônico: núcleo esteroidal do tipo estigmasteno (C_{29}) (KOJIMA et al., 1990).



Núcleo esteroidal do tipo estigmasteno

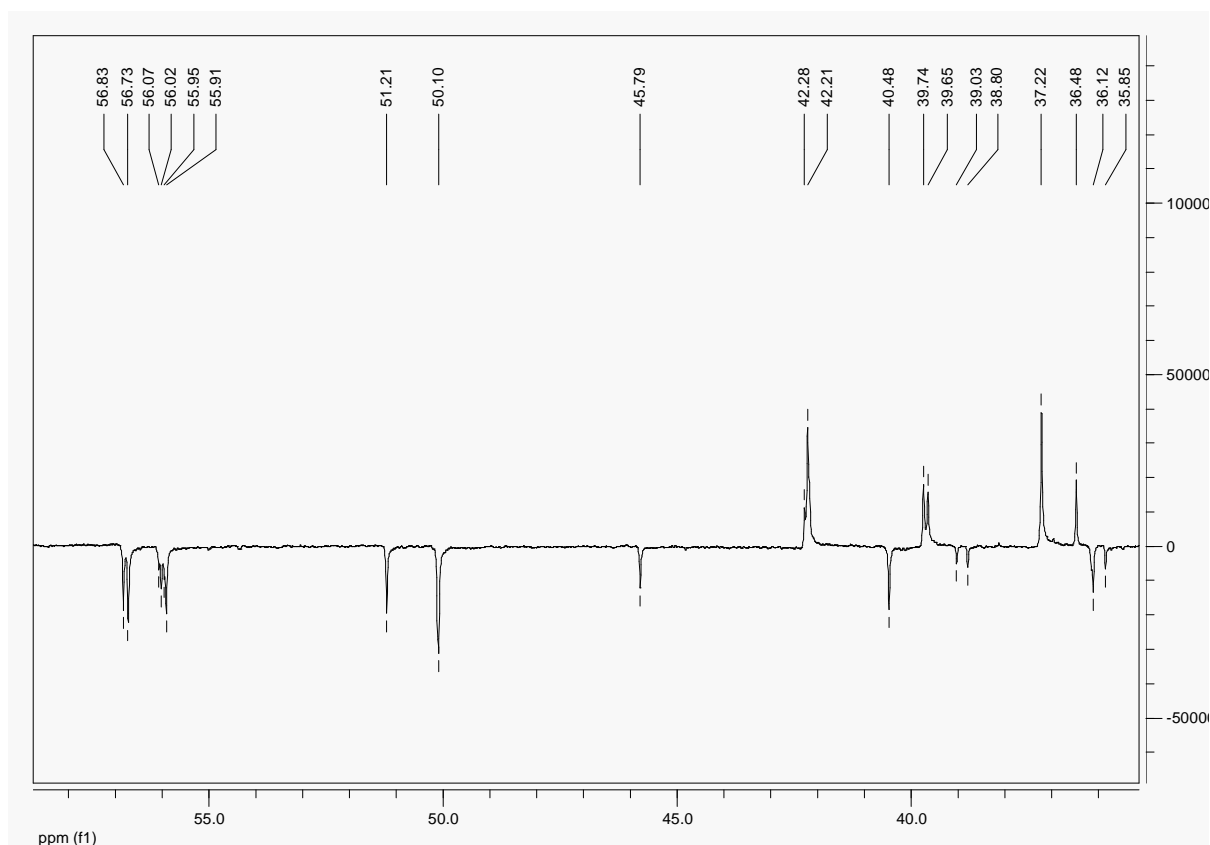


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de *Rb-1*.

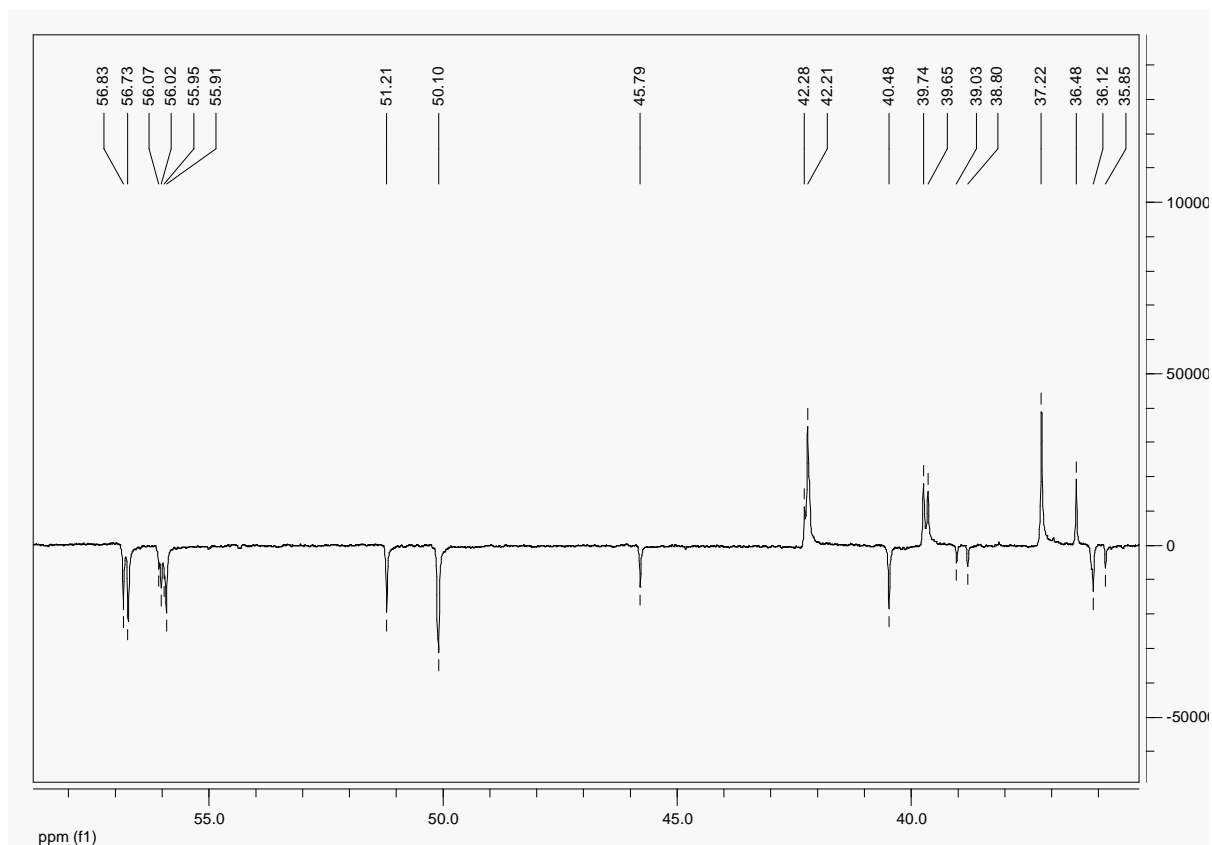


Figura 28. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 50 MHz) de *Rb-1* na região de 35,0 – 58,0 ppm.

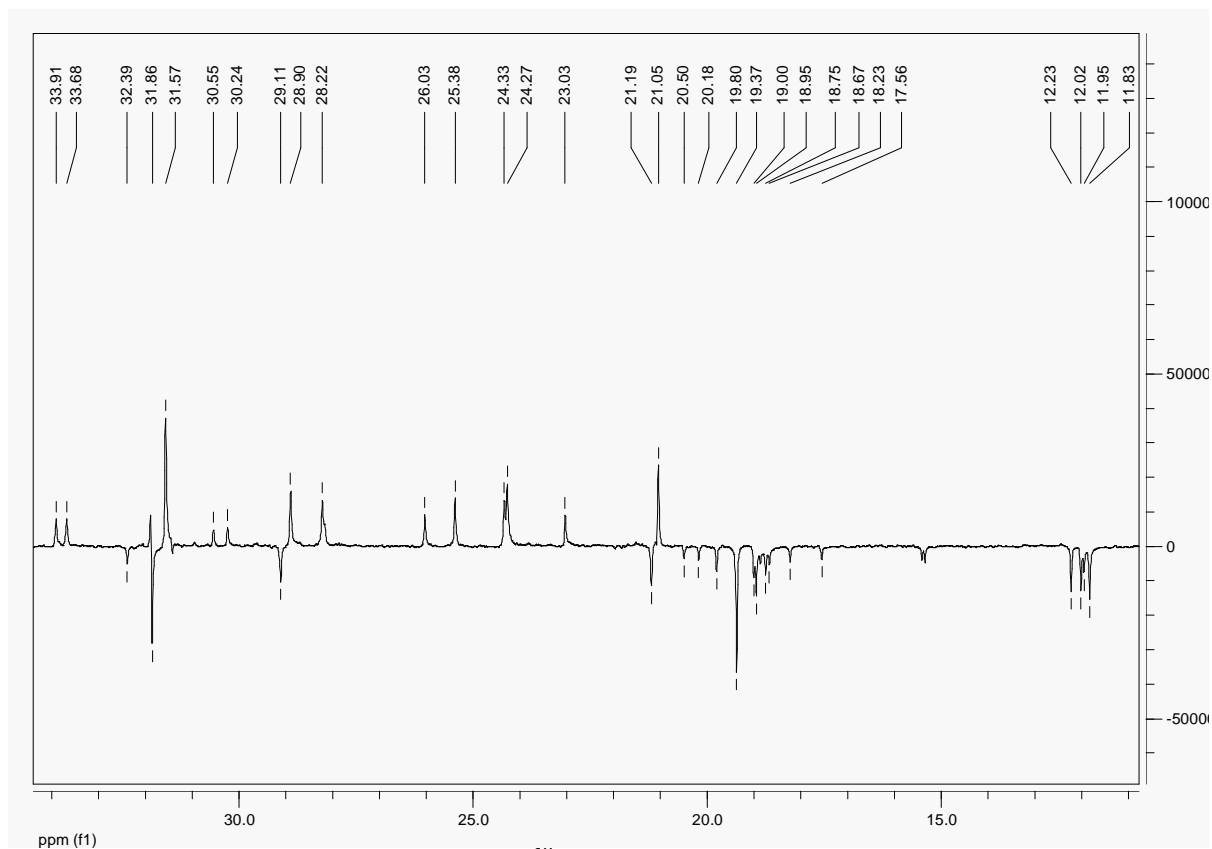


Figura 29. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 50 MHz) de *Rb-1* na região de 11,0 – 34,0 ppm.

Sinal em δ_C 71,7 (Figura 27, pág. 95) referente a dois carbonos (2C) oximetínico em C-3; sinais para carbonos sp^2 metínico em δ_C 121,7 (2C) e não hidrogenado em δ_C 140,7 (2C) compatíveis com dupla ligação localizada em C-5 e C-6; outros em δ_C 138,3 (1C) e 129,2 (1C) para carbonos sp^2 metínico condizente com dupla ligação em C-22 e C-23; bem como, os demais dados espectrais (Tabela 1, pág. 98) permitiram identificar *Rb-1* como sendo uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol (Figura 30, pág. 97). Esta afirmação está fundamentada em comparações dos dados espectrais de *Rb-1* observados em RMN de 1H e ^{13}C com os dados apresentados por Tomaz (2008) para as mesmas substâncias (Tabela 1, pág. 98).

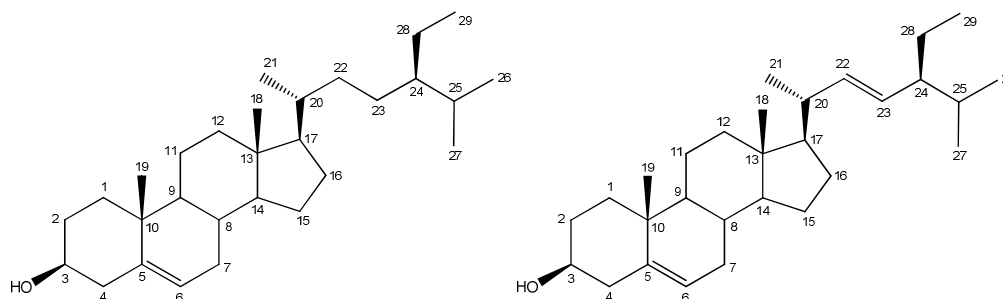
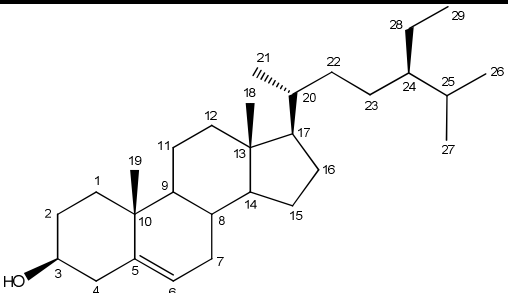


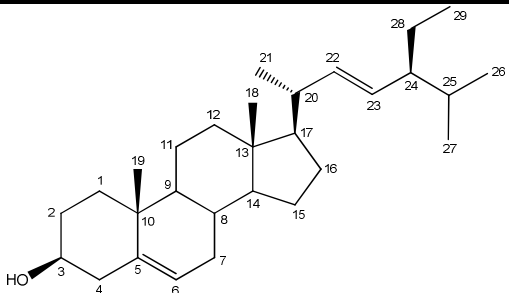
Figura 30. Estruturas químicas de *Rb-1*: β -sitosterol (à esquerda) e estigmasterol (à direita).

β -Sitosterol e estigmasterol são relatados em todo o Reino Vegetal. No gênero *Richardia*, estas substâncias foram isoladas apenas em *Richardia grandiflora* (Cham. & Schldl.) Steud. (TOMAZ et al., 2008). O β -sitosterol é conhecido por apresentar atividades antiúlcera (LING; JONES, 1995), gastroprotetora (NAVARRETE et al., 2002), anticancerígena (AWAD et al., 2005), antiofídica (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005) e hipoglicemiante (LINDO, 1999 citado por MCANUFF et al., 2005). Já o estigmasterol, de acordo com a literatura, revelou atividades anti-inflamatória (PEREIRA et al., 2006a), anticancerígena (AWAD et al., 2005), bem como, antihepatotóxica, hipocolesterolêmica e sedativa (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICES, 2009). Atividade hipoglicemiante confirmada para o β -Sitosterol pode justificar, em parte, o uso popular de *Richardia brasiliensis* Gomes no tratamento de diabetes.

Tabela 1. Deslocamentos químicos e tipos de sinais para os átomos de carbono e hidrogênio de *Rb-1*, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) citados por Tomaz (2008) para as mesmas substâncias.



β -sitosterol



Estigmasterol

	δ_{C}	δ_{C}^*	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}^*	δ_{H}
1	37,2	37,2	-	37,2	37,2	-
2	31,6	31,4	-	31,6	31,4	-
3	71,7	71,7	3,49 (m, 1H)	71,7	71,7	3,49 (m, 1H)
4	42,2	42,1	-	42,2	42,1	-
5	140,7	140,7	-	140,7	140,7	-
6	121,7	121,6	5,32 (d, J = 5,0 Hz, 1H)	121,7	121,6	5,32 (d, J = 5,0 Hz, 1H)
7	31,9	31,9	-	31,9	31,9	-
8	31,9	31,8	-	31,9	31,8	-
9	50,1	50,1	-	50,1	50,1	-
10	36,5	36,4	-	36,5	36,4	-
11	21,1	21,0	-	21,1	21,0	-
12	39,7	39,7	-	39,6	39,6	-
13	42,2	42,2	-	42,2	42,2	-
14	56,7	56,7	-	56,8	56,8	-
15	24,2	24,3	-	24,3	24,3	-
16	28,2	28,2	-	28,9	28,9	-
17	56,0	56,0	-	55,9	55,9	-
18	11,8	11,8	0,65 (s, 3H)	11,9	11,9	0,67 (s, 3H)
19	19,4	19,3	0,98 (s, 3H)	19,4	19,3	0,98 (s, 3H)
20	36,1	36,1	-	40,5	40,5	-
21	18,8	18,7	-	21,2	21,2	-
22	33,9	34,0	-	138,3	138,3	-
23	26,0	26,0	-	129,2	129,2	-
24	45,8	45,7	-	51,2	51,2	-
25	29,1	29,0	-	32,4	29,0	-
26	19,8	19,8	0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3H)	20,1	20,1	0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3H)
27	19,0	19,0	0,79 (d, J = 5,6 Hz, 3H)	18,9	18,9	0,79 (d, J = 5,6 Hz, 3H)
28	23,0	23,0	-	25,3	25,4	-
29	12,0	12,0	-	12,2	12,2	-

Legenda: (s) simpleto; (d) dupleto; (m) multipleto.

5.2.2. Determinação estrutural de *Rb-2*

A substância *Rb-2* foi obtida como um sólido amorfo escuro com massa de 11,4 mg (correspondendo a 0,114 % em relação à massa da fase hexânica) apresentando ponto de fusão de 171,0 – 172,8 °C e fluorescência à luz ultravioleta que indica a presença de grupo cromóforo na estrutura química da molécula.

O espectro de IV (Figura 31, pág. 99) deste composto mostrou uma banda de absorção em 3414 cm^{-1} típico de deformação axial de N-H ou O-H, sugerindo a presença de amins e/ou hidroxilas. Absorções em 1734 e 1097 cm^{-1} , referente a estiramento de C=O e C-O, respectivamente, sugerem a presença de carbonila de éster. Também foi observada uma banda de absorção em 2854 e 2926 cm^{-1} , característico de estiramento C-H de CH_2 e CH_3 , que foi indicativo da presença de cadeias alifáticas (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).

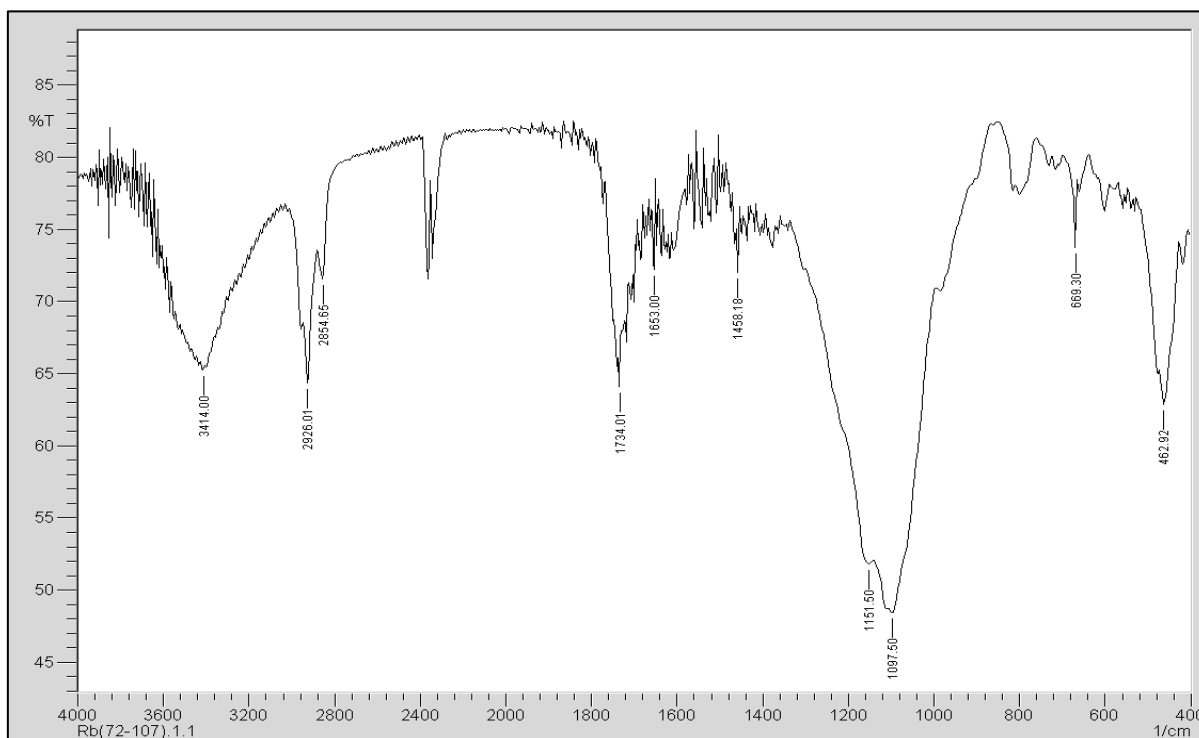
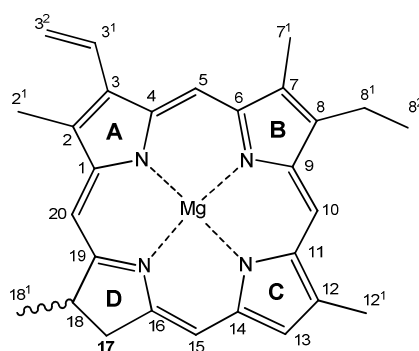


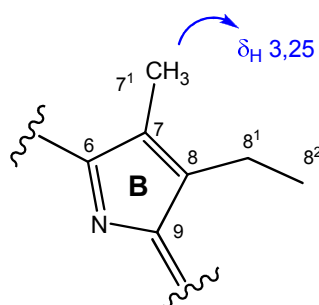
Figura 31. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *Rb-2*.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-2* e as expansões (Figura 32, 33, 34, 35 e 36, pág. 101, 102 e 103) apresentaram sinais característicos de compostos que possuem núcleo porfirínico: três simpletos em δ_{H} 9,74, 9,52 e 8,69 correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-10, H-5 e H-20, respectivamente; um duplo-duplete em δ_{H} 7,99 ($J = 11,5$ e $18,0$ Hz) acoplado *trans* com um duplo-duplete em δ_{H} 6,32 ($J = 1,5$ e $18,0$ Hz) e *cis* com outro duplo-duplete em δ_{H} 6,16 ($J = 1,5$ e $11,5$ Hz), condizentes aos hidrogênios vinílicos do grupo vinila terminal inserido na posição 3 (H-3¹, H-3²_(trans) e H-3²_(cis), respectivamente); e três simpletos em δ_{H} 3,88, 3,42 e 3,25 referentes aos hidrogênios H-12¹, H-2¹ e H-7¹ de três metilas olefínicas, respectivamente (TOMAZ et al., 2008; DUAN et al., 2002; SCHWIKKARD et al., 1998; HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007).

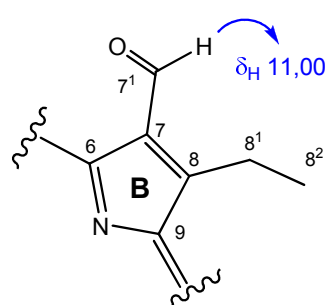


Esqueleto porfirínico

O deslocamento químico em δ_H 3,25 (s, 3H) (Figura 32 e 34, pág. 101 e 102) permitiu também classificar o derivado porfirínico como do tipo *a*, uma vez que este sinal corresponde aos hidrogênios do grupo metila na posição 7¹. A ausência de um sinal em, aproximadamente, δ_H 11,00 referente ao hidrogênio do grupo aldeído em C-7¹ dos derivados porfirínicos do tipo *b*, fortaleceu tal classificação (BUCHANAN et al., 1996; SCHWIKKARD et al., 1998).



Derivado porfirínico *a*



Derivado porfirínico *b*

Dois simpletos largos em δ_H -1,09 e -1,44 (Figura 32, pág. 101), atribuídos aos dois hidrogênios N-H pirrólicos protegidos pela corrente de anel formada quando o composto é submetido a um campo magnético, sugeriu a ausência do íon Mg^{2+} central na molécula, o que indicou que o composto tratava-se de um derivado da clorofila. Esses dados favoreceram a hipótese de que a banda de absorção em 3414 cm^{-1} , observada no espectro de IV (Figura 31, pág. 99), correspondia ao estiramento de N-H descartando a presença de O-H, isso em uma análise preliminar, pois esta informação leva a pensar que *Rb-2* tratava-se um derivado de clorofila hidroxilado, como o 13²-hidroxifeofitina (MATSUO et al., 1996; BUCHANAN et al., 1996;

KOBAYASHI et al., 1991) ou feofitina-13²-ácido carboxílico (SCHWIKKARD et al., 1998).

Um envelope de sinais em δ_H 0,76 – 1,87 (Figura 32, 35 e 36, pág. 101 e 103) devido a sobreposição de sinais de alta multiplicidade, provenientes dos hidrogênios CH, CH₂ e CH₃ de cadeias alifáticas, sugeriu a presença de um grupo fitil (-C₂₀H₃₉) comumente encontrado em moléculas de natureza porfirínica. O duplete em δ_H 4,43 ($J = 7,5$ Hz, 2H), bem como, o tripleto em δ_H 5,13 ($J = 7,0$ Hz, 1H) (Figura 34, pág. 102) reforçaram esta proposta uma vez que correspondem aos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-P1 e H-P2 da cadeia fitílica, respectivamente. Estes dados foram importantes na classificação da substância como feofitina pois a ausência destes caracterizaria a substância como sendo um feoforbídeo (SCHWIKKARD et al., 1998).

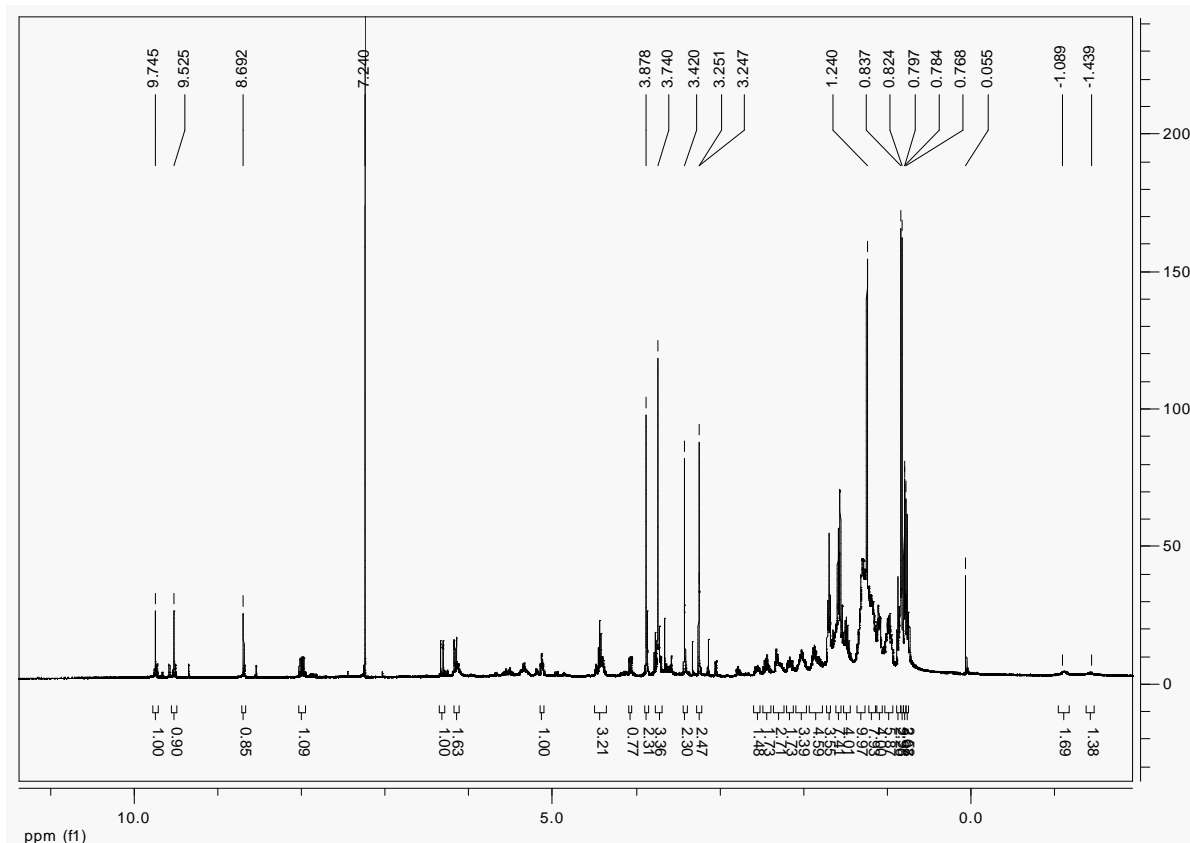
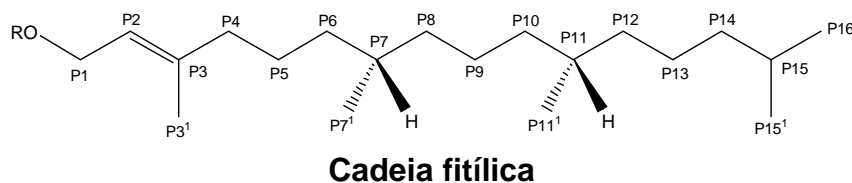


Figura 32. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-2*.

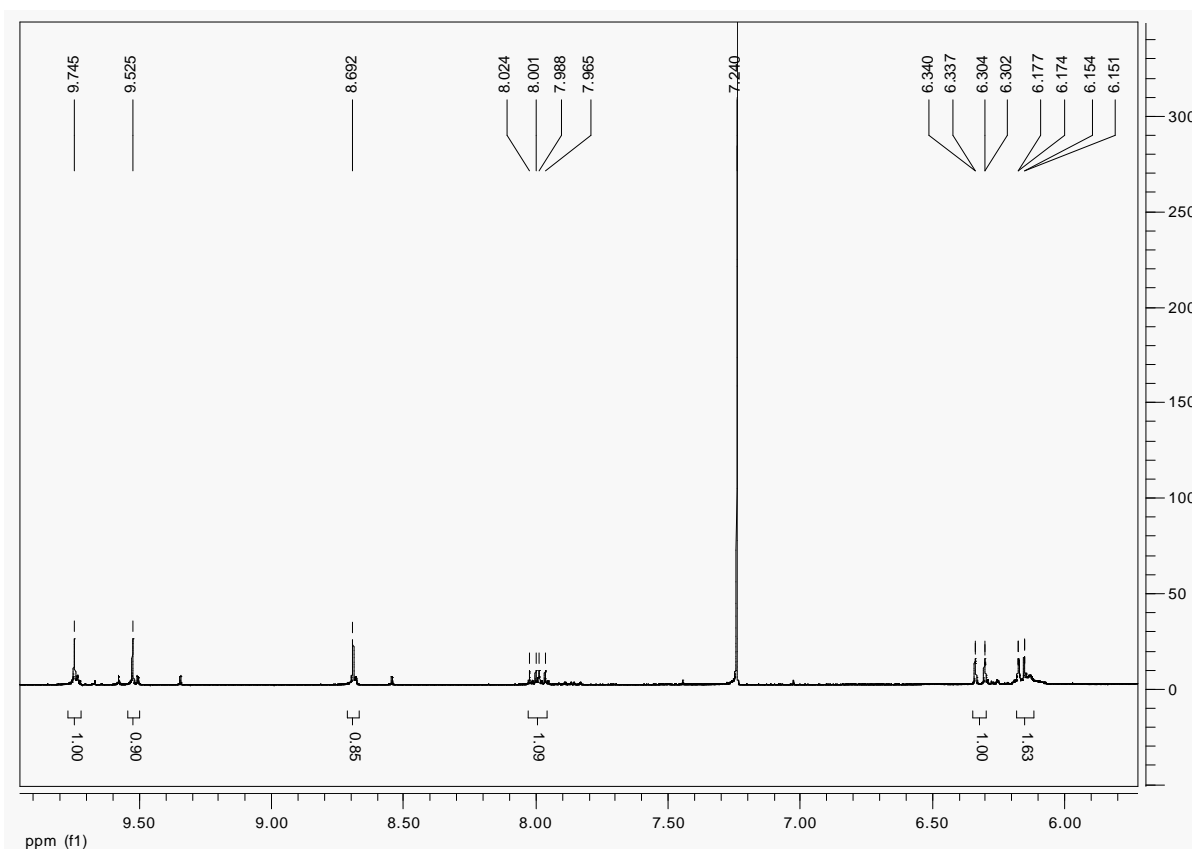


Figura 33. Expansão do espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-2* na região de 5,8 – 9,9 ppm.

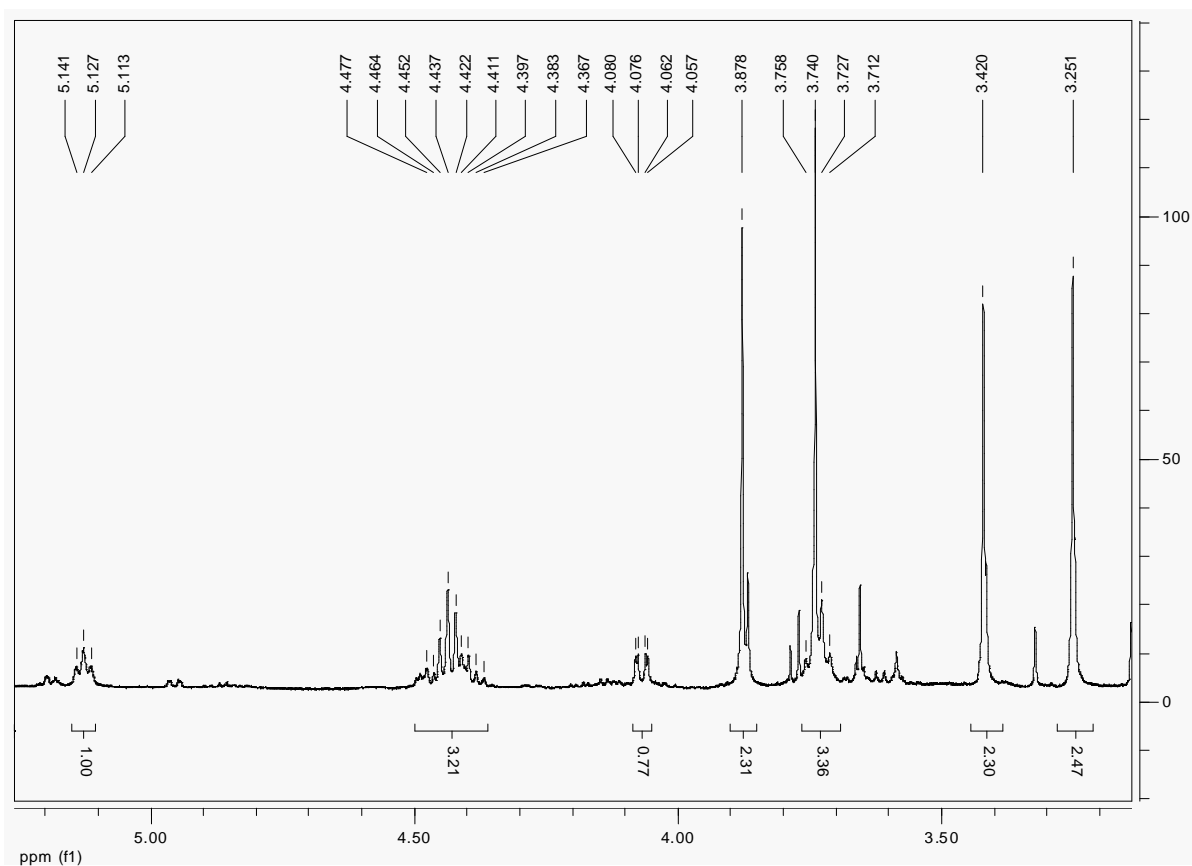


Figura 34. Expansão do espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-2* na região de 3,2 – 5,2 ppm.

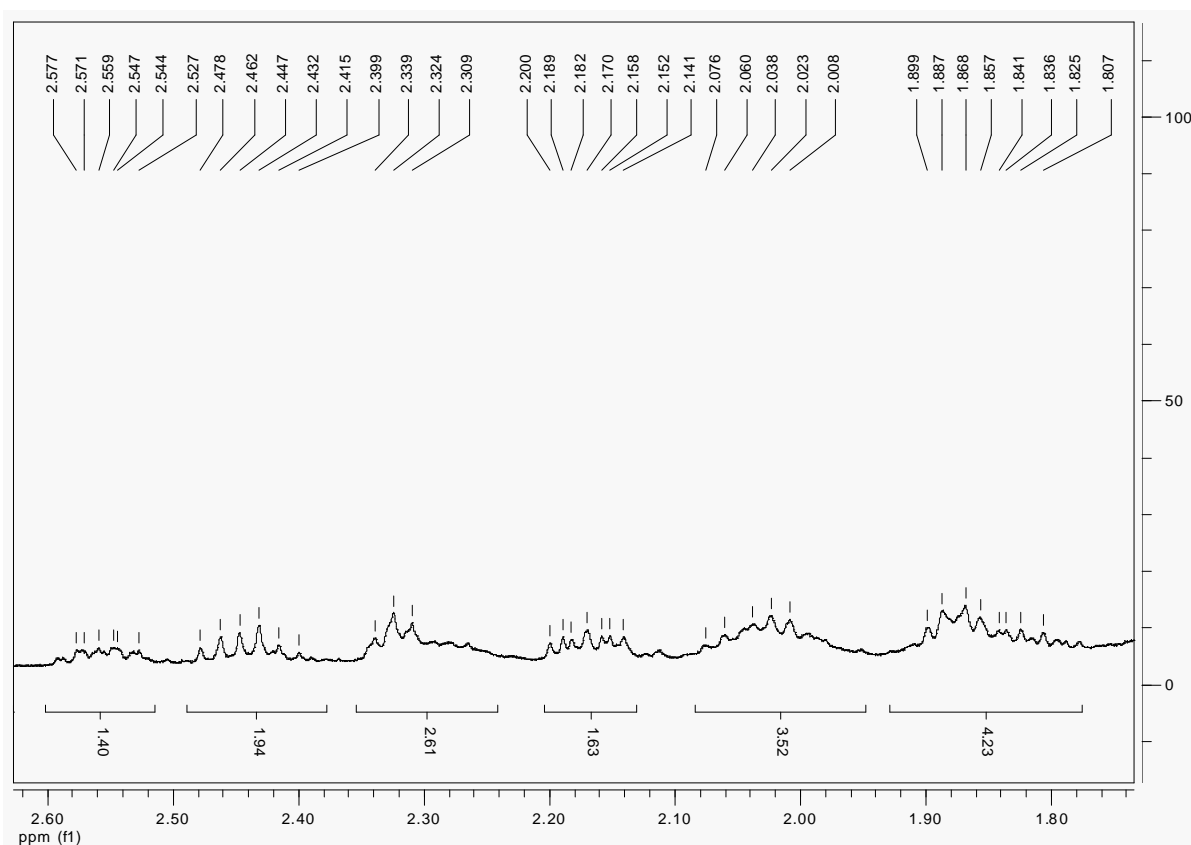


Figura 35. Expansão do espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-2* na região de 1,8 – 2,6 ppm.

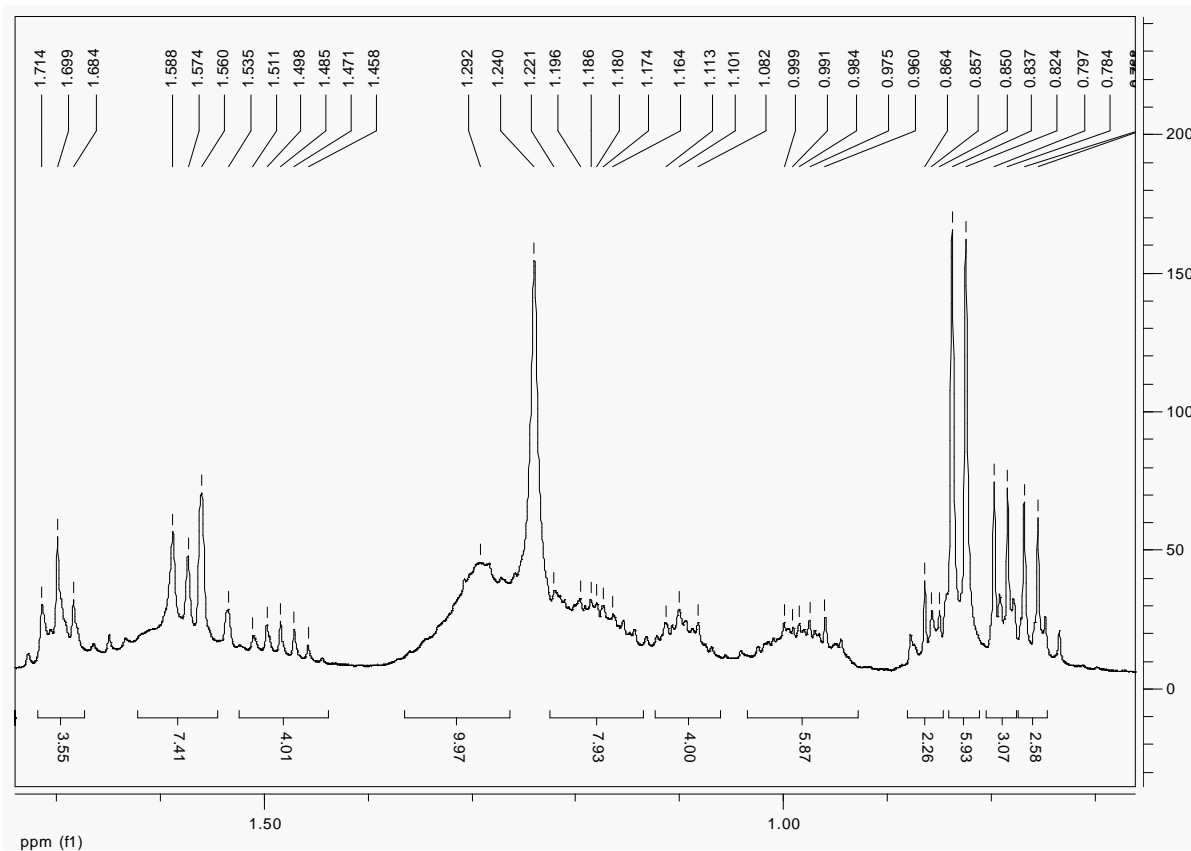
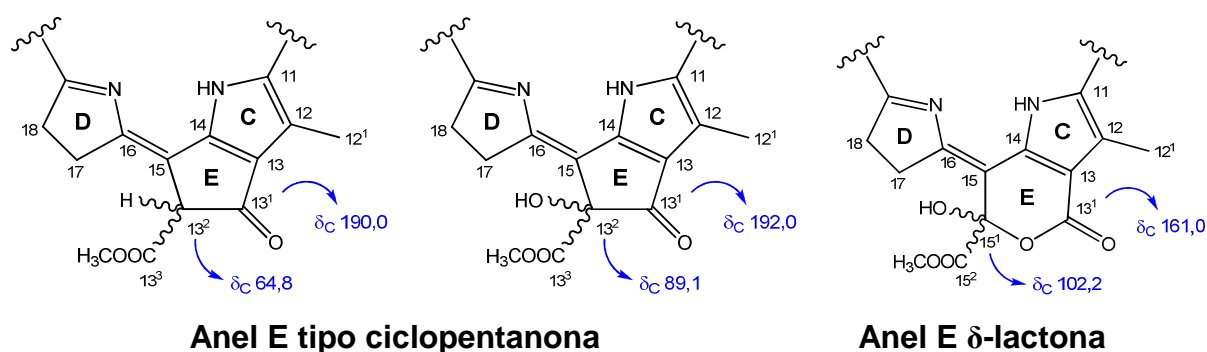


Figura 36. Expansão do espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-2* na região de 0,7 – 1,7 ppm.

O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) e as expansões (Figura 37, 38, 39, 40 e 41, pág. 105, 106 e 107) apresentaram 55 sinais, entre os quais se destacaram aqueles em δ_{C} 104,1, 99,7 e 93,9 referentes aos carbonos C-10, C-5 e C-20 do esqueleto carbônico do núcleo porfirínico, respectivamente. Além disso, verificou-se a presença de sinais para dois carbonos vinílicos em δ_{C} 129,0 e 122,7, típicos dos carbonos C-3¹ e C-3², bem como, sinais para três metilas em δ_{C} 12,4, 12,1 e 11,3 atribuídos aos carbonos C-12¹, C-2¹ e C-7¹, respectivamente (KOBAYASHI et al., 1991; SCHWIKKARD et al., 1998; TOMAZ et al., 2008).

Além dos 35 sinais atribuídos ao sistema porfirínico, foi observado a presença de 20 sinais que corroboraram com a proposta dos espectros de RMN ^1H para a presença de cadeia fitílica em *Rb-2*, sendo aqueles em δ_{C} 61,5, 117,8 e 142,8 (Figura 38, 39 e 40, pág. 106 e 107) atribuídos aos carbonos C-P1, C-P2 e C-P3, respectivamente (SCHWIKKARD et al., 1998; HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007; TOMAZ et al., 2008).

Derivados porfirínicos geralmente são encontrados na natureza apresentando o anel E do tipo ciclopentanona (ver pág. 106). Neste anel, a carbonila cetônica encontra-se localizada em C-13¹ e apresenta deslocamento químico em aproximadamente δ_{C} 190,0 – 192,0. O sinal para carbono C-13² pode variar conforme o tipo de substituinte que possui, sendo aproximadamente δ_{C} 89,1 quando se trata de um carbono quaternário hidroxilado ou δ_{C} 64,8 quando o mesmo é um carbono metínico não hidroxilado (KOBAYASHI et al., 1991; MATSUO et al., 1996). No entanto, existem pouquíssimos relatos na literatura de derivados porfirínicos com anel E do tipo δ -lactona conjugada que, segundo alguns autores, se trata de um produto de alomerização daqueles compostos que possuem sistema de anel ciclopentanona (OCAMPO; REPETA, 2004; HUANG et al., 2007). Neste tipo de anel, a carbonila cetônica foi convertida em carbonila de éster e o sinal da mesma deslocado para frequências menores, aproximadamente δ_{C} 161,0. O carbono C-15¹, outrora denominado C-13² (antes da alomerização), apresenta-se hidroxilado em todos os relatos e o sinal aparece em torno de δ_{C} 102,2.



A ausência de sinais em aproximadamente de δ_C 190,0 e 89,1 ou 64,8, bem como, a presença de sinais em δ_C 160,9 para carbonila conjugada e δ_C 102,0 para carbono não hydrogenado (Figura 37, 38, 39 e 40, pág. 105, 106 e 107) permitiram propor uma estrutura do tipo δ -lactona conjugada para o anel E de *Rb-2*. Sendo assim, o simpleto largo em δ_H 6,13, observado no espectro de RMN 1H (Figura 33, pág. 102), foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-15¹. Isto explica o fato do espectro de IV (Figura 31, pág. 99) desta feofitina só apresentar absorção para carbonila de éster em 1734 cm^{-1} .

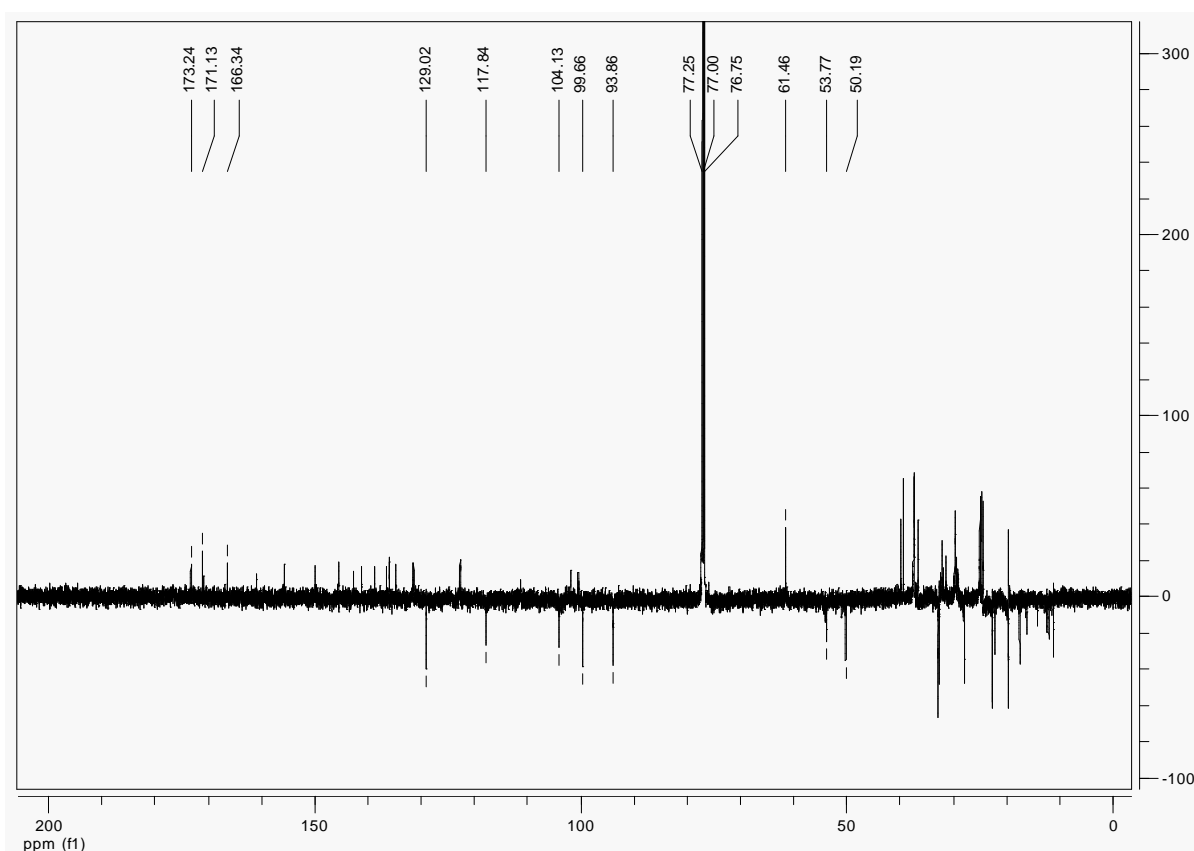


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C - APT ($CDCl_3$, 125 MHz) de *Rb-2*.

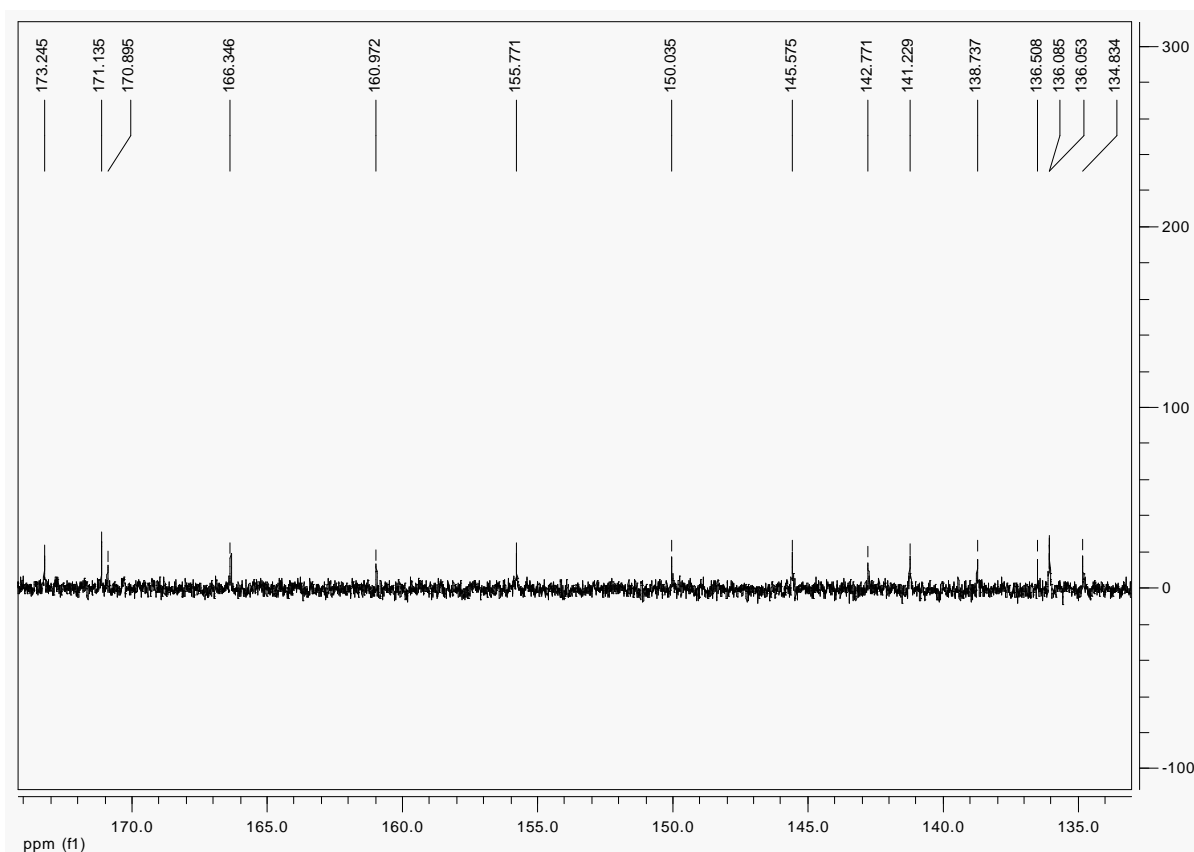


Figura 38. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 125 MHz) de *Rb-2* na região de 134,0 – 174,0 ppm.

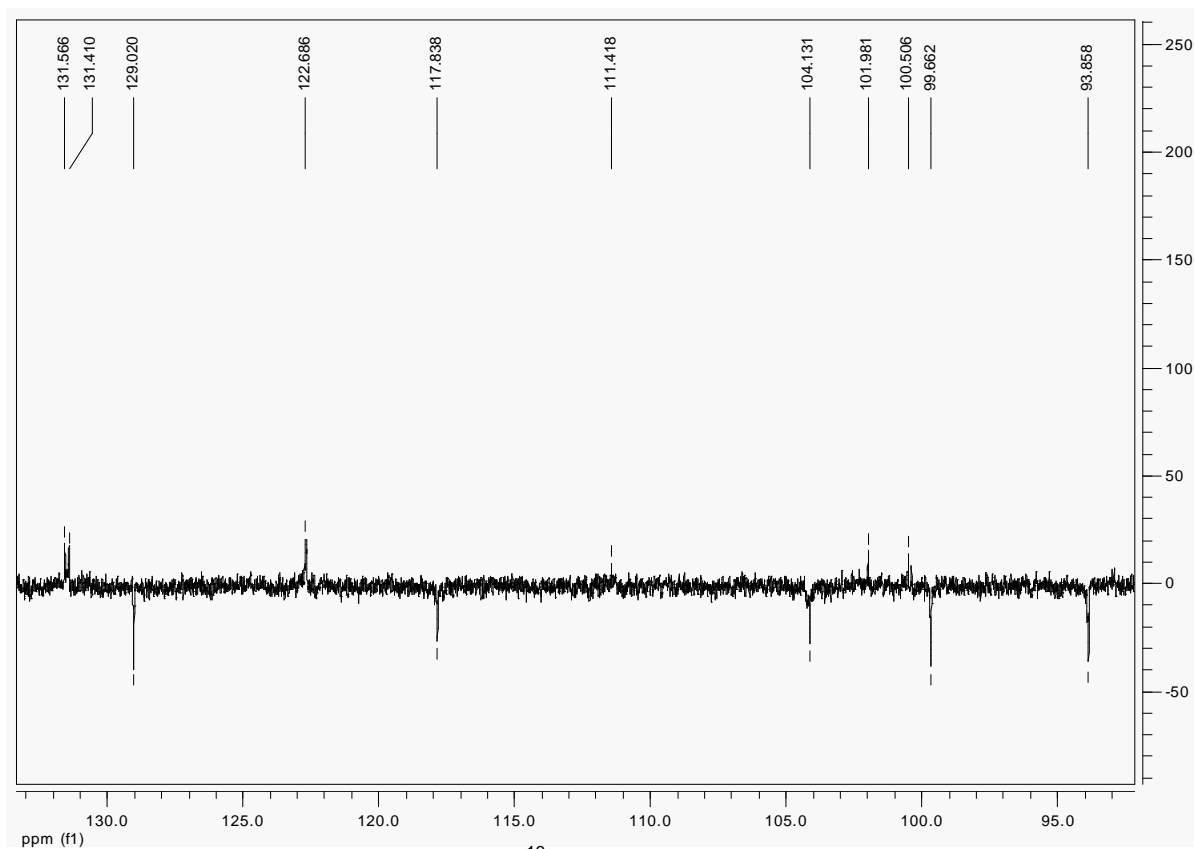


Figura 39. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 125 MHz) de *Rb-2* na região de 93,0 – 133,0 ppm.

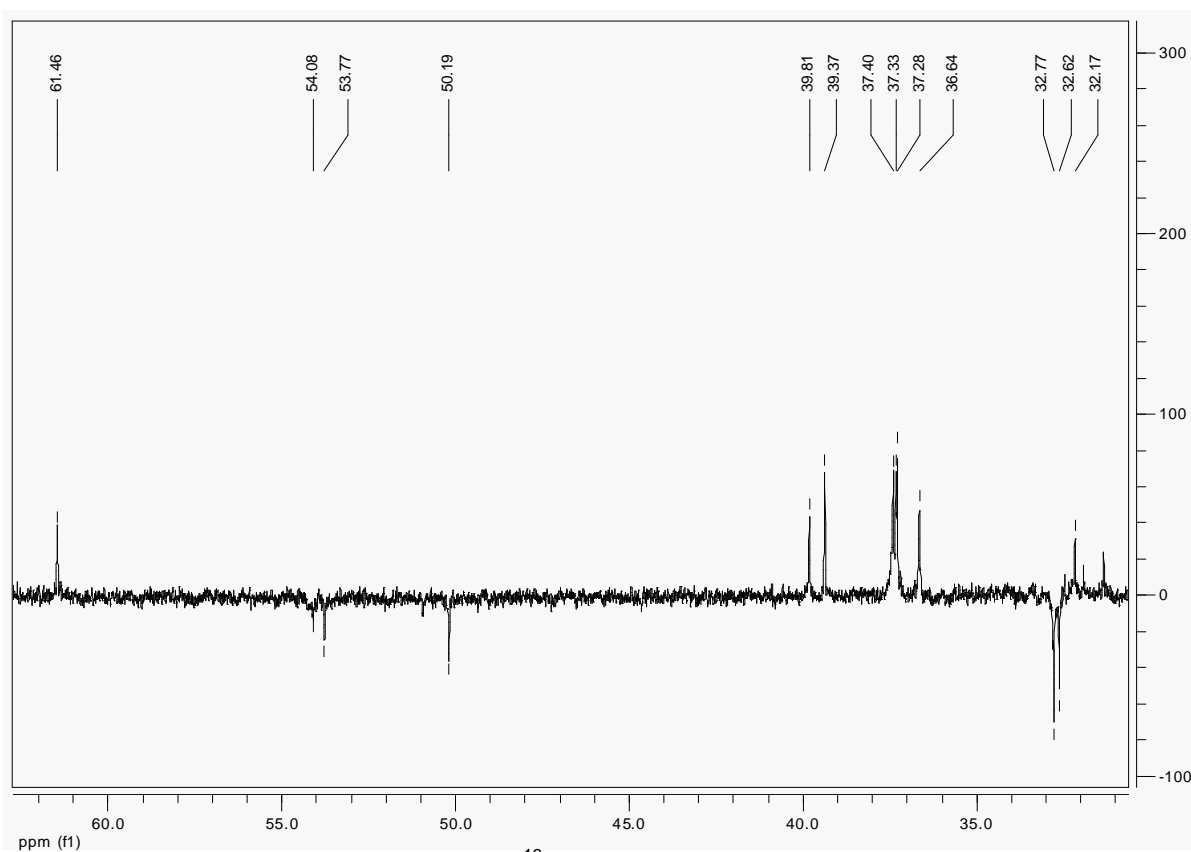


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 125 MHz) de Rb-2 na região de 31,0 – 62,0 ppm.

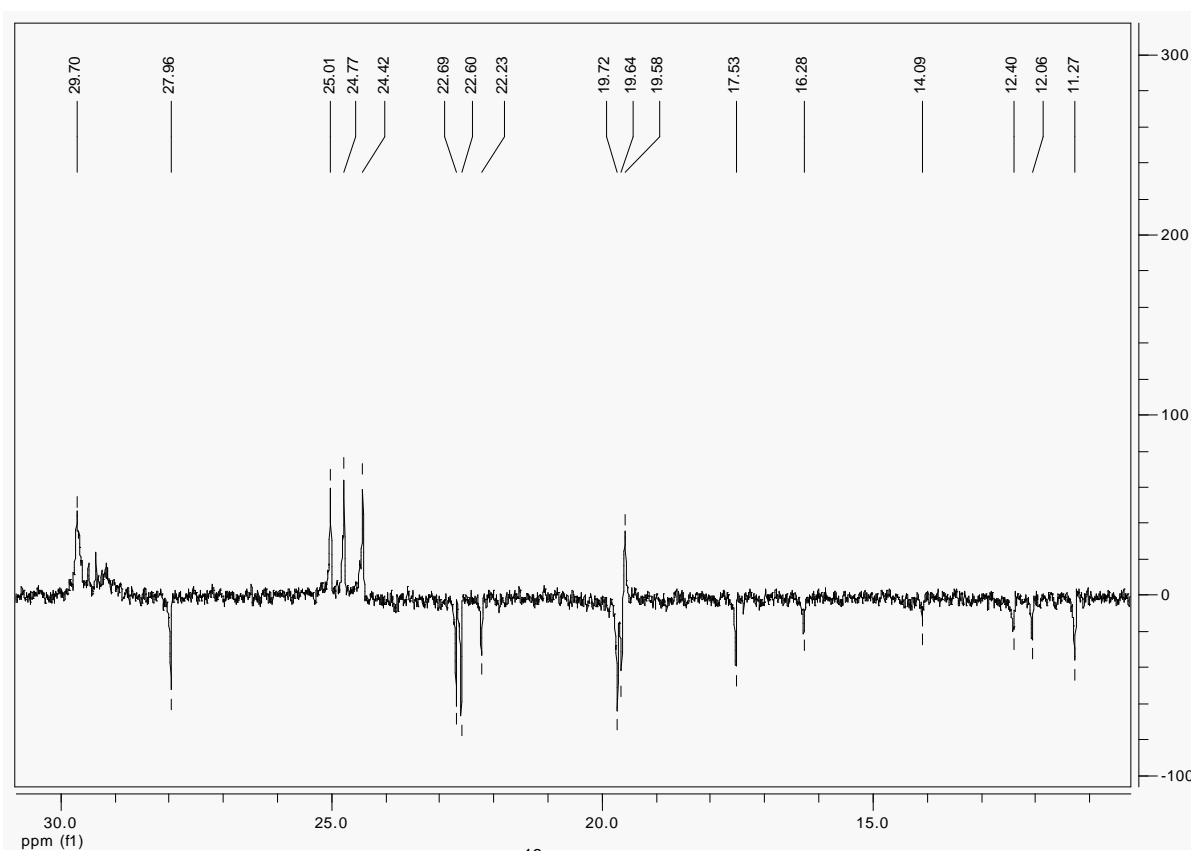


Figura 41. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 125 MHz) de Rb-2 na região de 10,0 – 30,0 ppm.

O espectro de correlação heteronuclear direta HMQC e as expansões (Figura 42, 43, 44, 45, 46 e 47, pág. 108, 109, 110 e 111) confirmaram as atribuições feitas aos hidrogênios e aos carbonos olefínicos do sistema porfirínico ao mostrar correlações dos sinais em δ_H 9,74 (H-10), 9,52 (H-5) e 8,69 (H-20) com aqueles em δ_C 104,1 (C-10), 99,7 (C-5) e 93,9 (C-20), respectivamente; do grupo vinila terminal pelas correlações entre δ_H 7,99 (H-3¹) e δ_C 129,0 (C-3¹) e entre δ_H 6,32/6,16 (H-3²_(trans)/H-3²_(cis)) e δ_C 122,7 (C-3²); das metilas alílicas em δ_H 3,88 (H-12¹), 3,42 (H-2¹) e 3,25 (H-7¹) com δ_C 12,4 (C-12¹), 12,1 (C-2¹) e 11,3 (C-7¹), respectivamente; bem como dos demais átomos da molécula (Tabela 2, pág. 121). Além disto, permitiram assinalar os hidrogênios e o carbono da metoxila em C-15³ ao mostrar correlação do sinal em δ_H 3,74 com o sinal em δ_C 54,1, valores estes muitas vezes apresentados na literatura trocados com aqueles para os hidrogênios e o carbono da metila 12¹.

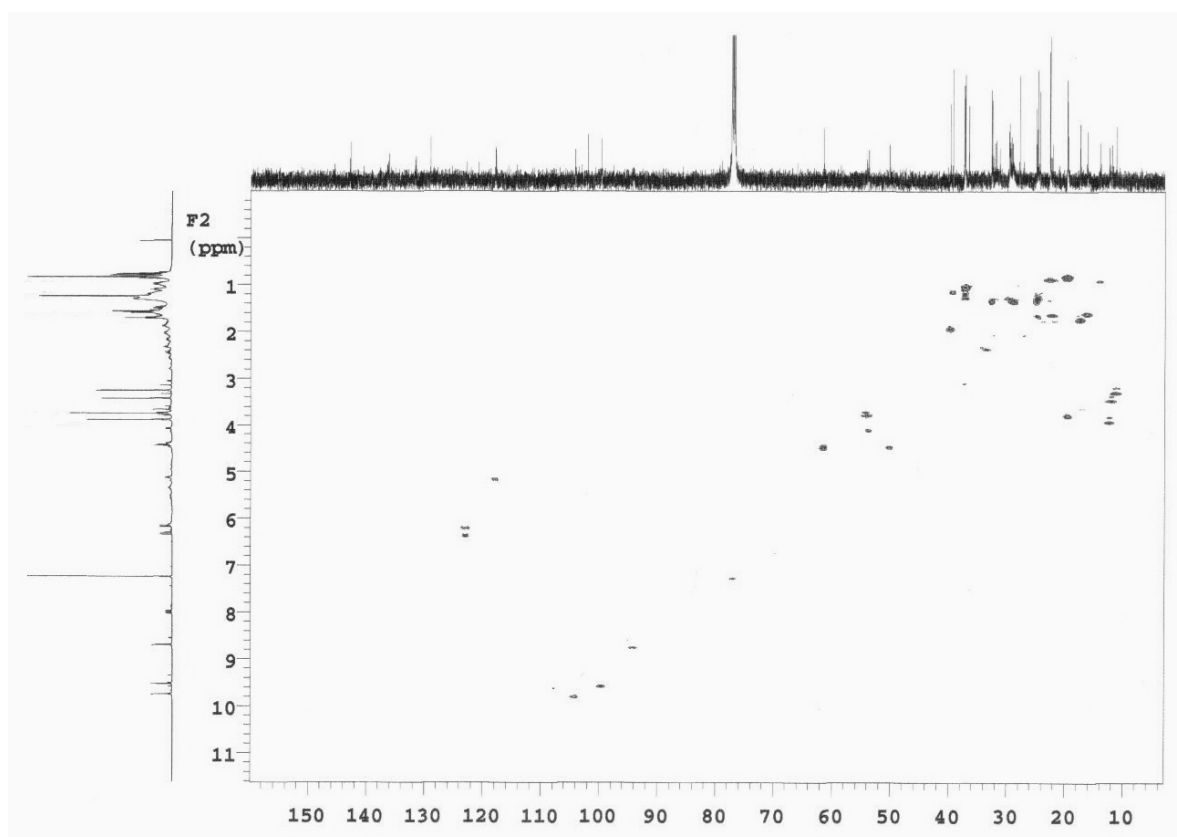


Figura 42. Espectro HMQC (CDCl₃, 500 e 125 MHz) de *Rb-2*.

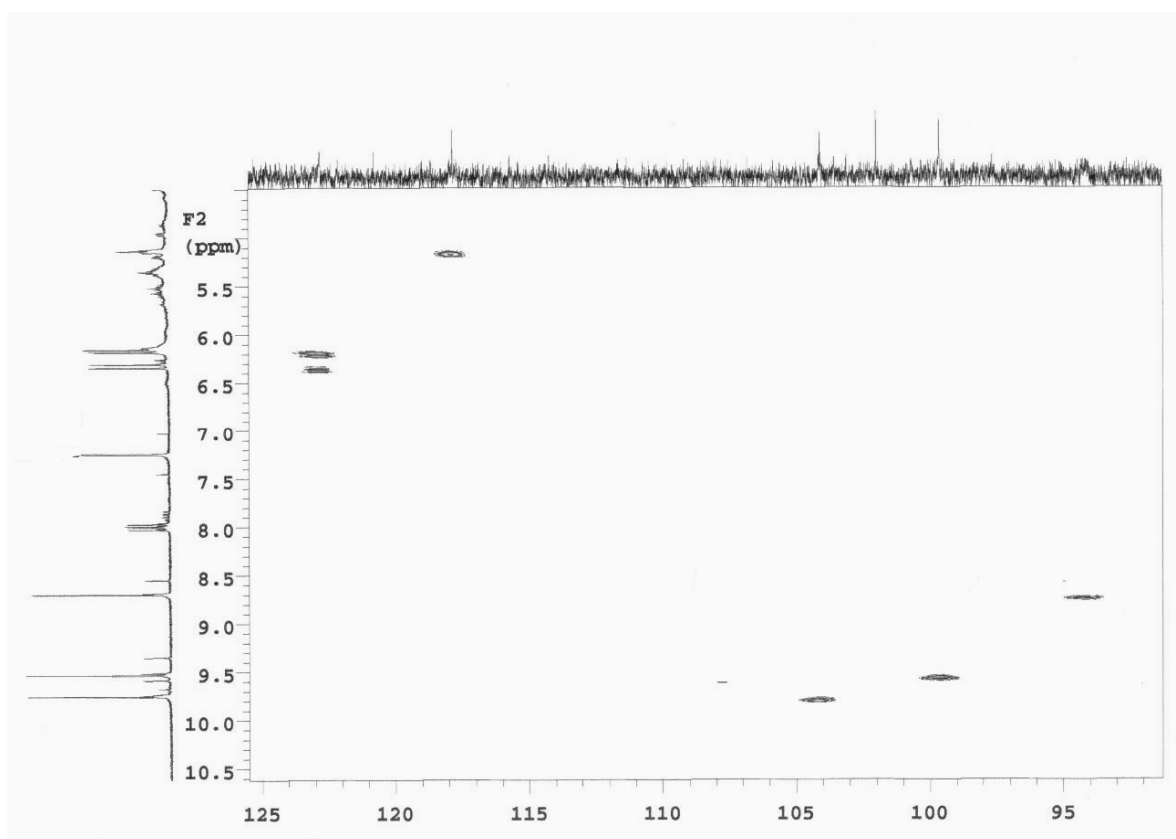


Figura 43. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-2* na região de (4,5 – 10,5 ppm) x (90,0 – 125,0 ppm).

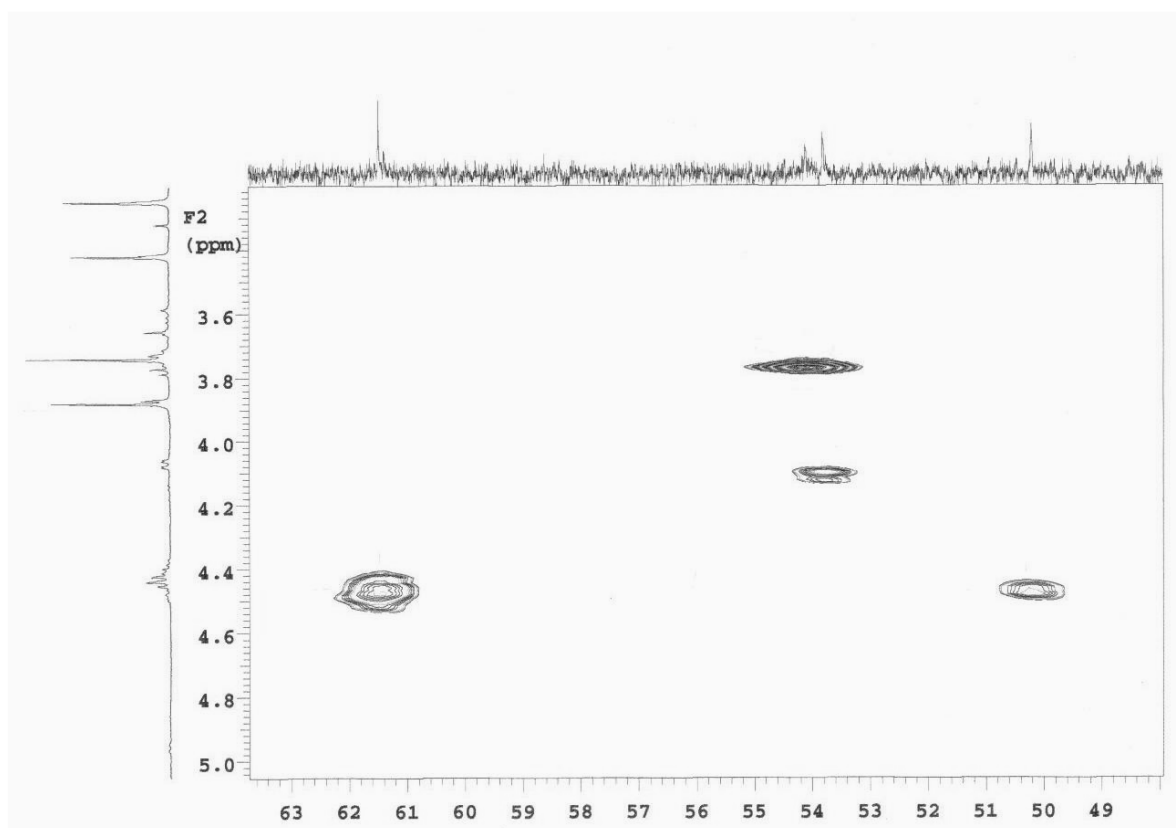


Figura 44. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-2* na região de (3,2 – 5,0 ppm) x (48,0 – 63,0 ppm).

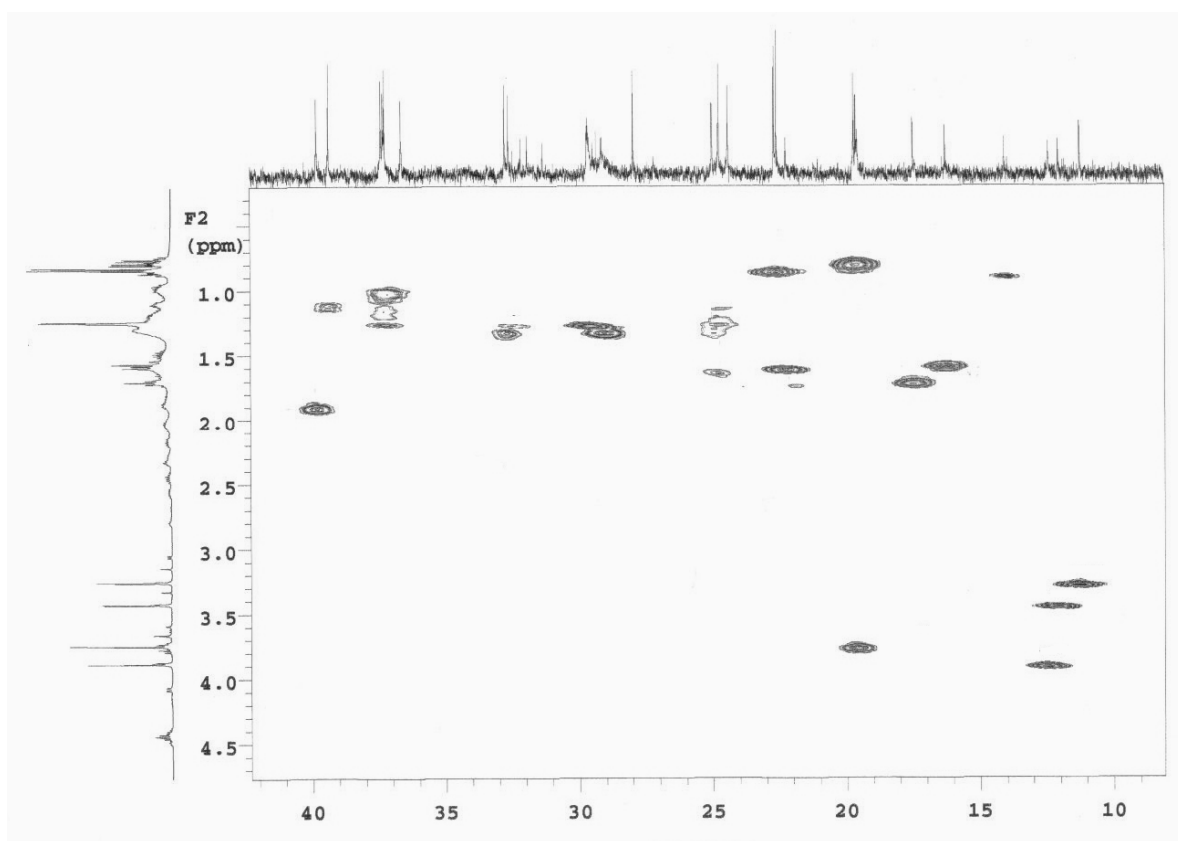


Figura 45. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-2* na região de (0,5 – 4,5 ppm) x (10,0 – 42,0 ppm).

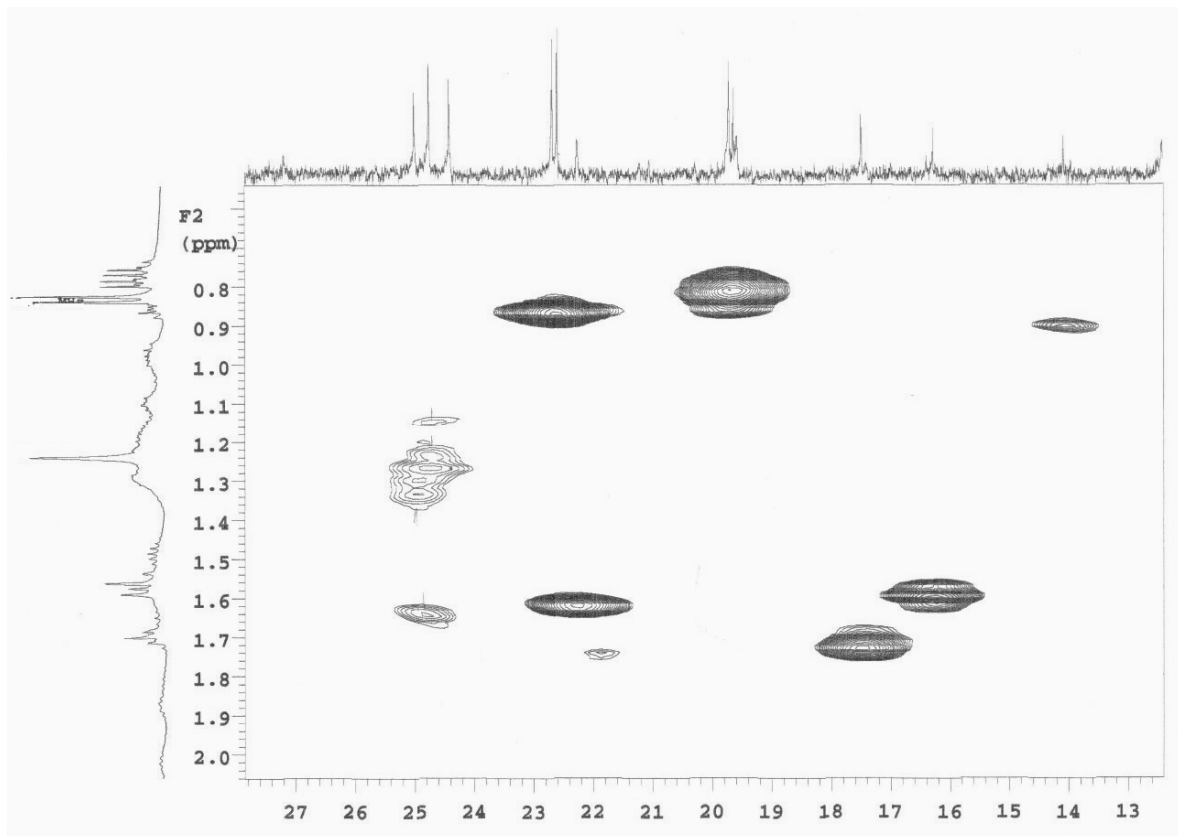


Figura 46. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-2* na região de (0,6 – 2,0 ppm) x (13,0 – 27,0 ppm).

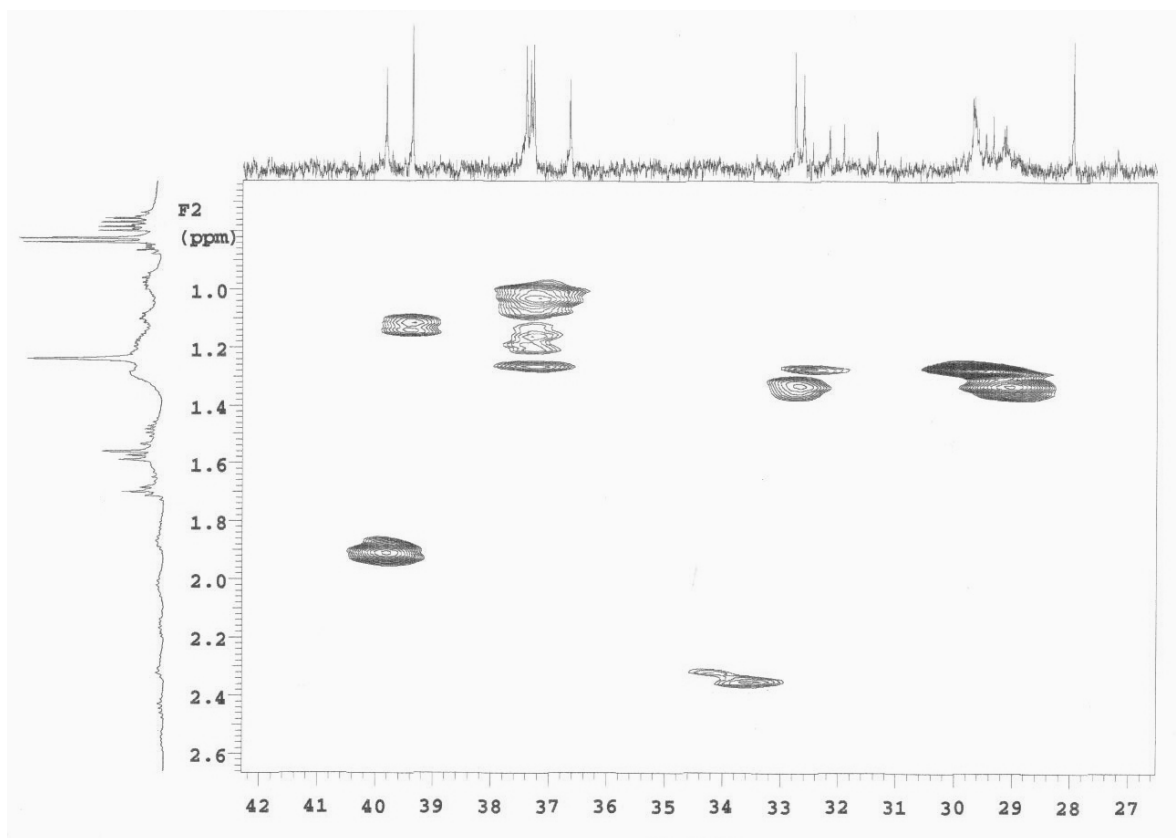


Figura 47. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-2* na região de (0,8 – 2,6 ppm) x (27,0 – 42,0 ppm).

O espectro de correlação homonuclear COSY e as expansões (Figura 48, 49 e 50, pág. 112 e 113) confirmaram o acoplamento observado para os hidrogênios H-3¹ e H-3² ao mostrar correlações entre δ_{H} 7,99 (H-3¹) e 6,32/6,16 (H-3²_(trans)/H-3²_(cis)) caracterizando o grupo vinila terminal. Correlação entre o quarteto em δ_{H} 3,74 (H-8¹) e o tripleto em δ_{H} 1,70 (H-8²) confirmou a presença de um radical etila inserido na posição 8. Nesse mesmo espectro (Figura 50, pág. 113) também foi possível ratificar os deslocamentos químicos para os hidrogênios H-17¹ (δ_{H} 1,87 e 2,56) e H-17² (δ_{H} 2,17 e 2,43), bem como, dos hidrogênios H-18 (δ_{H} 4,44) e H-18¹ (δ_{H} 1,58), ao mostrar correlação entre estes sinais. Outras correlações foram observadas e são apresentadas na Tabela 2 (pág. 121).

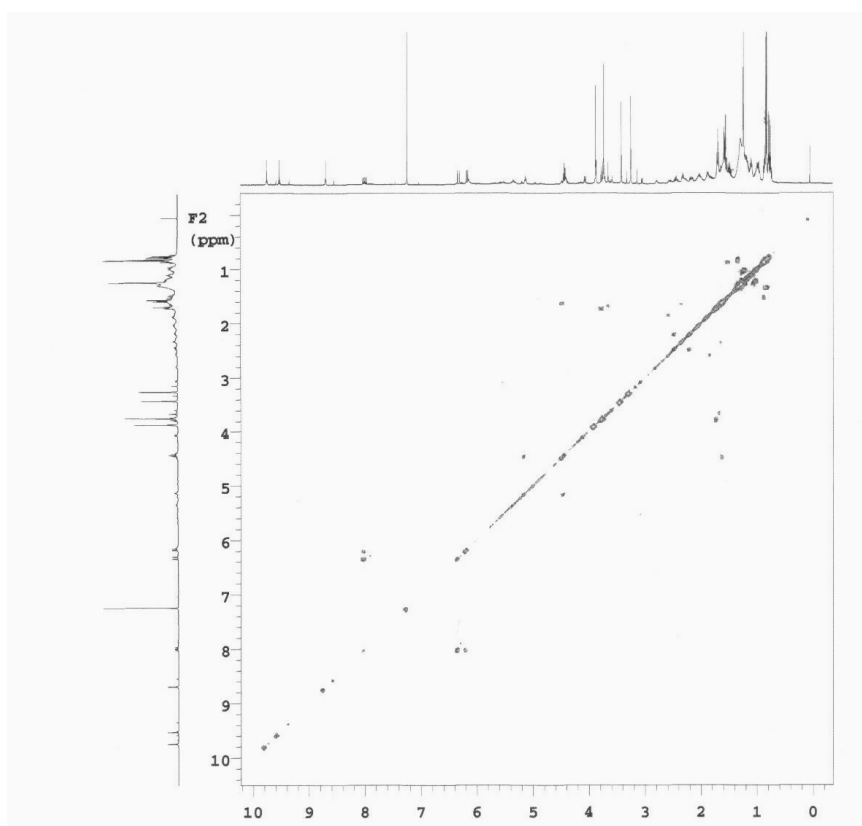


Figura 48. Espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de *Rb-2*.

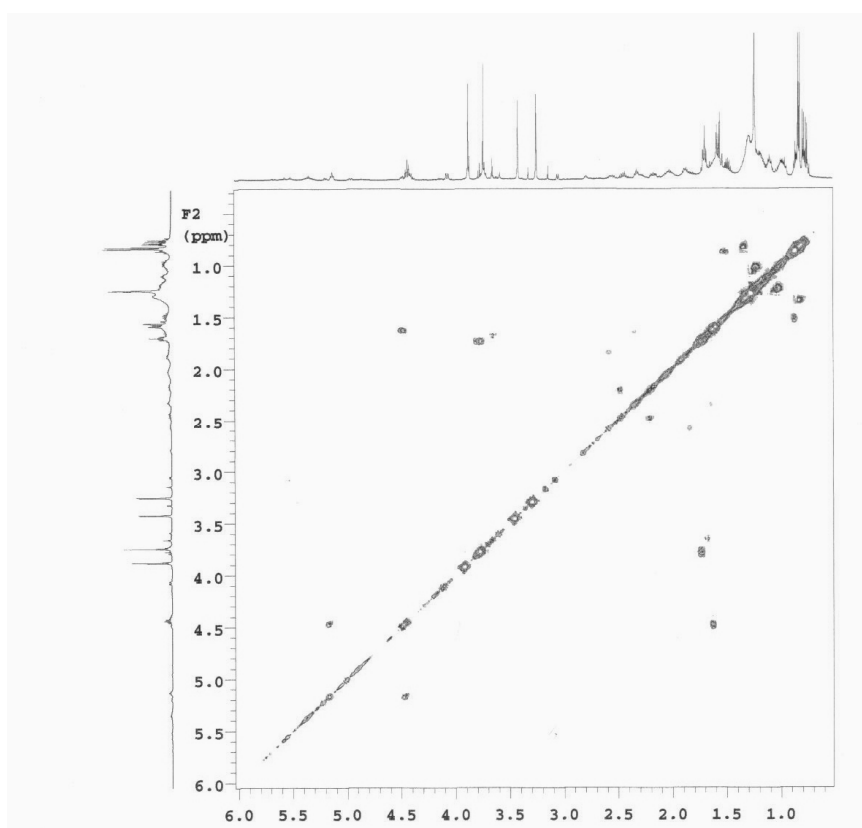


Figura 49. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de *Rb-2* na região de (0,5 – 6,0 ppm) x (0,5 – 6,0 ppm).

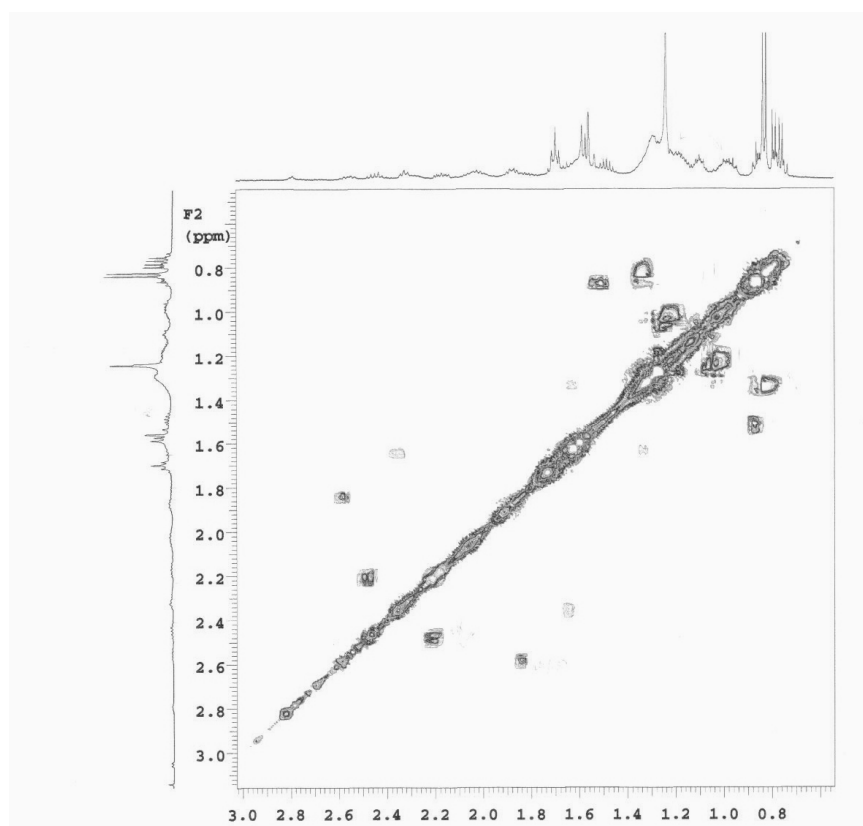


Figura 50. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-2* na região de (0,6 – 3,0 ppm) x (0,6 – 3,0 ppm).

A completa análise da estrutura porfirínica foi realizada por análise das correlações a duas (2J) e três ligações (3J), apresentadas nos espectros de correlação heteronuclear HMBC (Figura 51, 52, 53, 54, 55 e 56, pág. 114, 115 e 116), para os hidrogênios H-5, H-10 e H-20: o sinal de H-5 (δ_{H} 9,52) mostrou correlação a 3J com C-3 (δ_{C} 136,1) do anel A; O H-10 (δ_{H} 9,74) fez correlação a 3J com C-8 (δ_{C} 145,6) do anel B e a 2J e 3J com os carbonos C-11 (δ_{C} 138,7) e C-12 (δ_{C} 131,4) do anel C, respectivamente; e semelhantemente, o H-20 (δ_{H} 8,69) mostrou correlação a 2J e 3J com C-1 (δ_{C} 141,2) e C-2 (δ_{C} 131,6), ambos do anel A, que evidenciaram a conectividade entre os quatro anéis pirrólicos.

Os espectros HMBC também apresentaram dados que confirmaram a localização do grupo vinila terminal em C-3 ao mostrar correlação a 3J entre os hidrogênios terminais H-3² (δ_{H} 6,32 e 6,16) e o carbono C-3 (δ_{C} 136,1), bem como, do radical etila em C-8 pela correlação entre os hidrogênios H-8¹ (δ_{H} 3,74) e H-8² (δ_{H} 1,70) com C-8 (δ_{C} 145,6). Uma correlação a 3J dos hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,74 com o sinal para a carbonila C-15² em δ_{C} 170,9 definiu a posição do metil-éster.

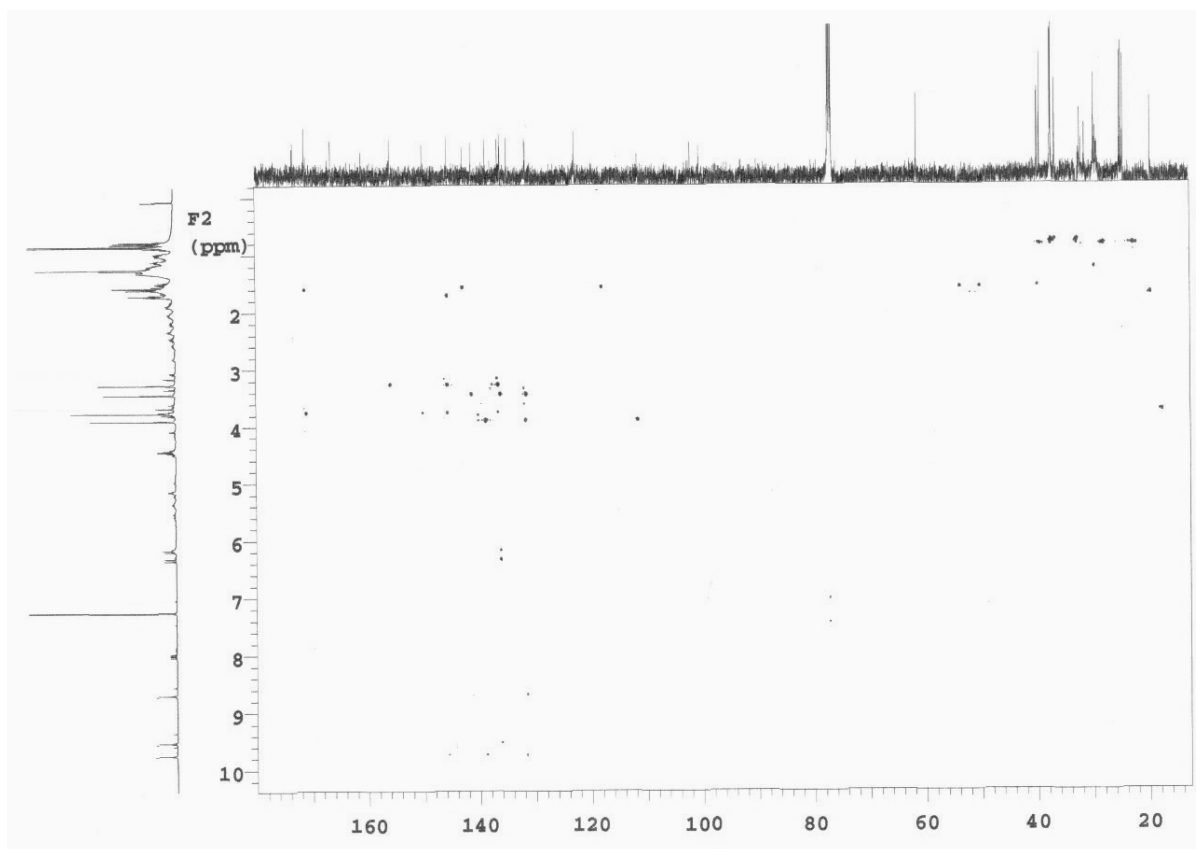


Figura 51. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-2*.

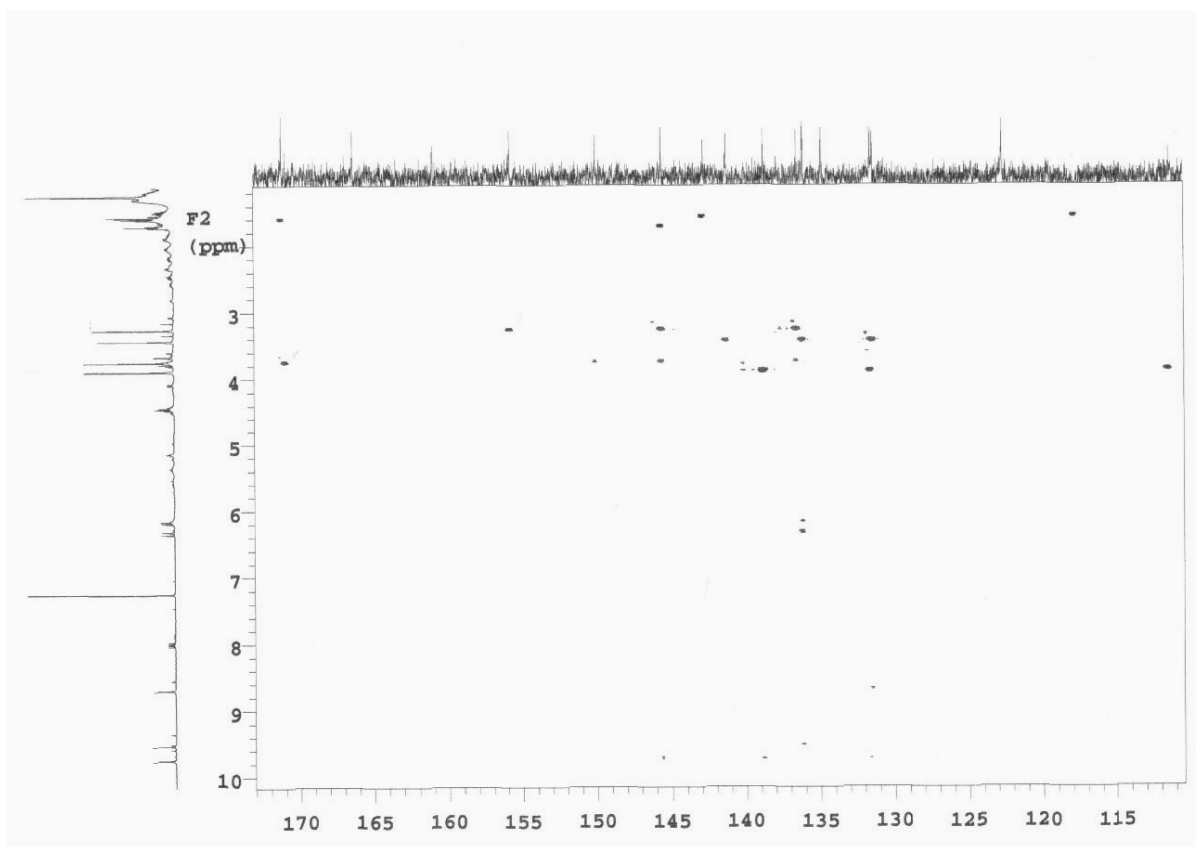


Figura 52. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-2* na região de (1,0 – 10,0 ppm) x (110,0 – 173,0 ppm).

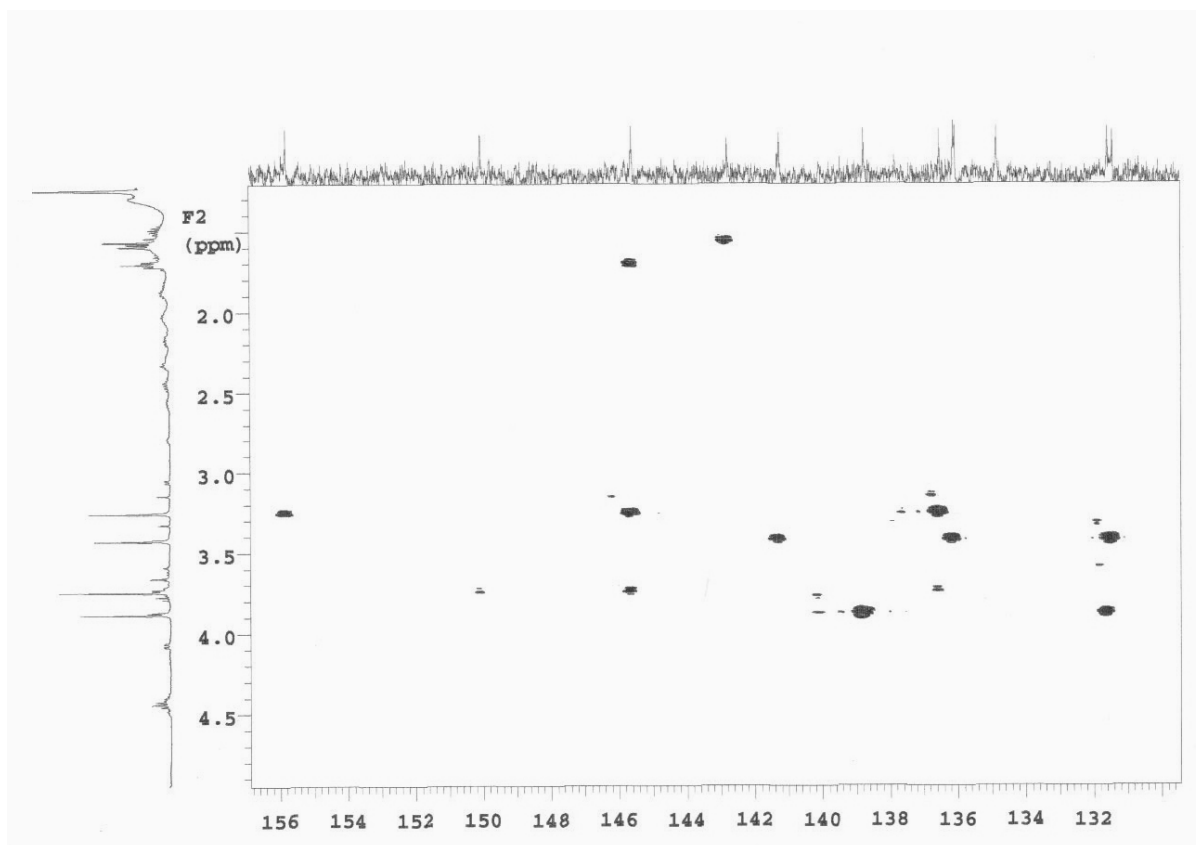


Figura 53. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *Rb-2* na região de (1,5 – 5,0 ppm) x (130,0 – 156,0 ppm).

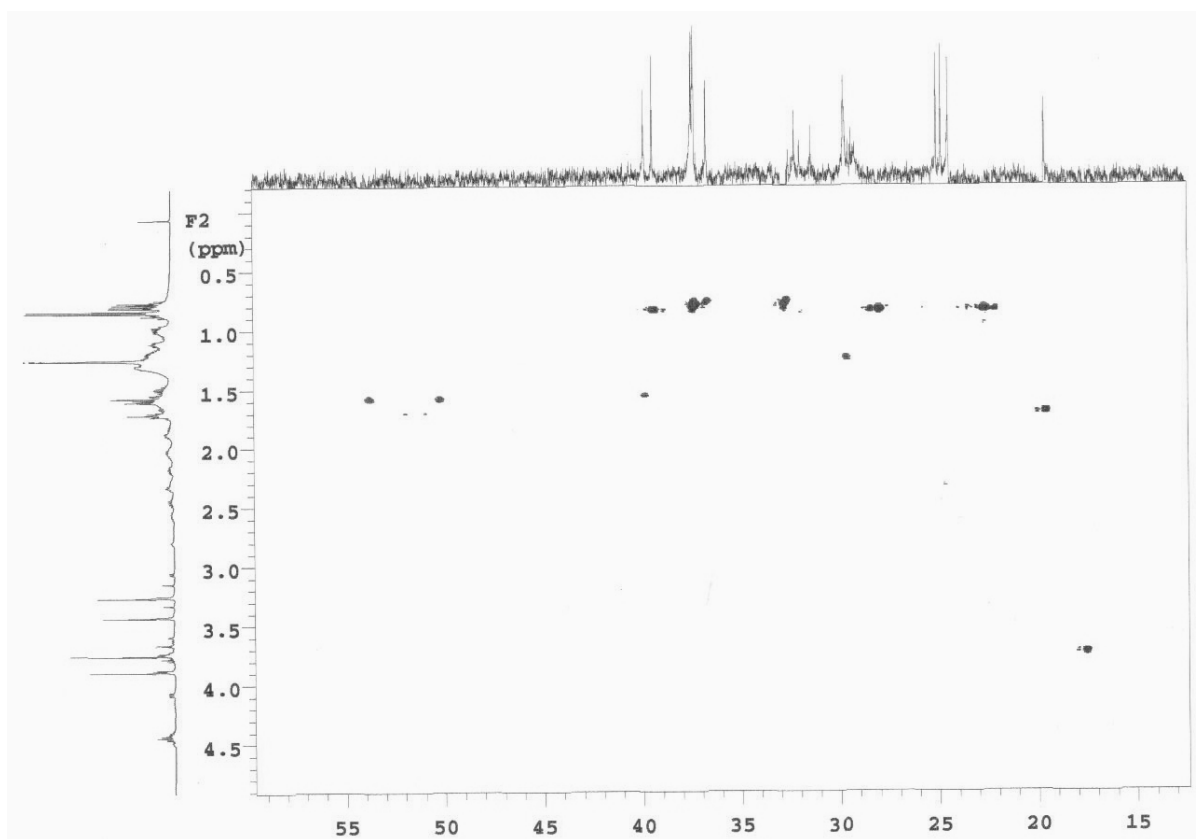


Figura 54. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *Rb-2* na região de (0,1 – 4,5 ppm) x (15,0 – 60,0 ppm).

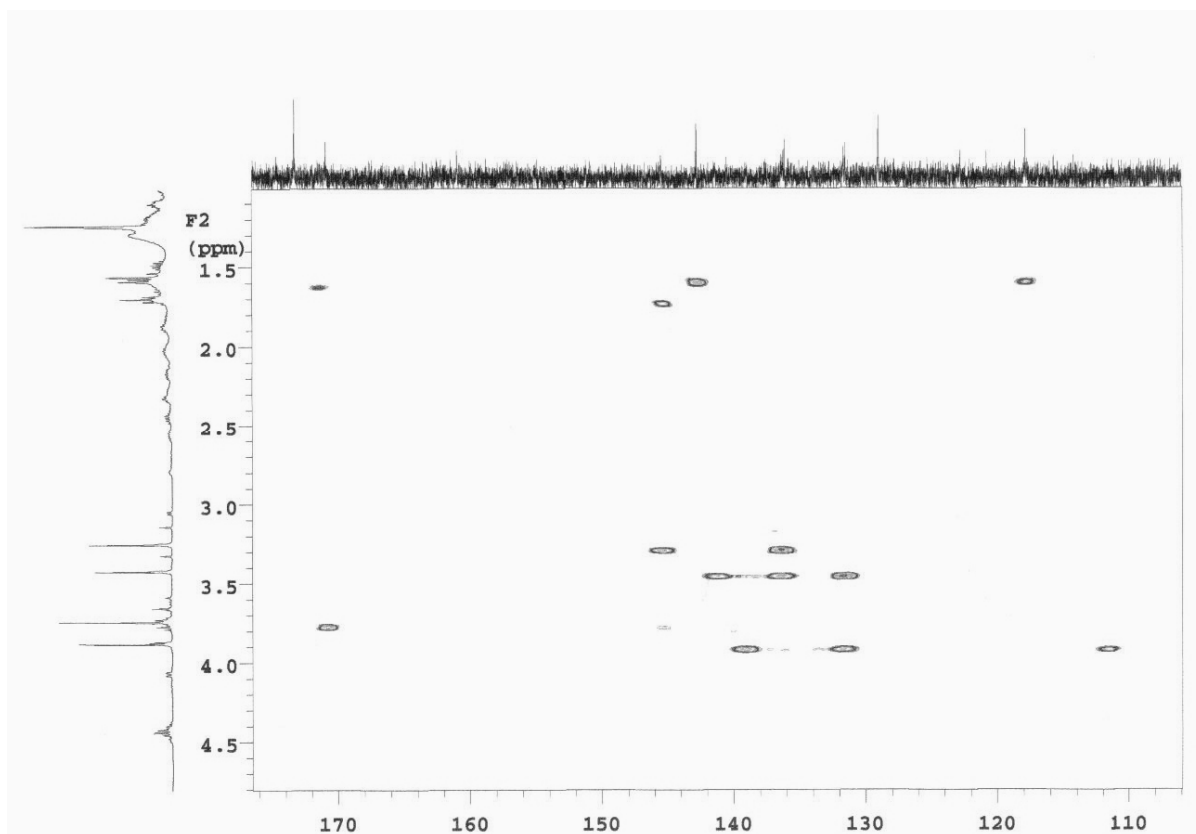


Figura 55. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *Rb-2* na região de (1,0 – 4,5 ppm) x (106,0 – 176,0 ppm).

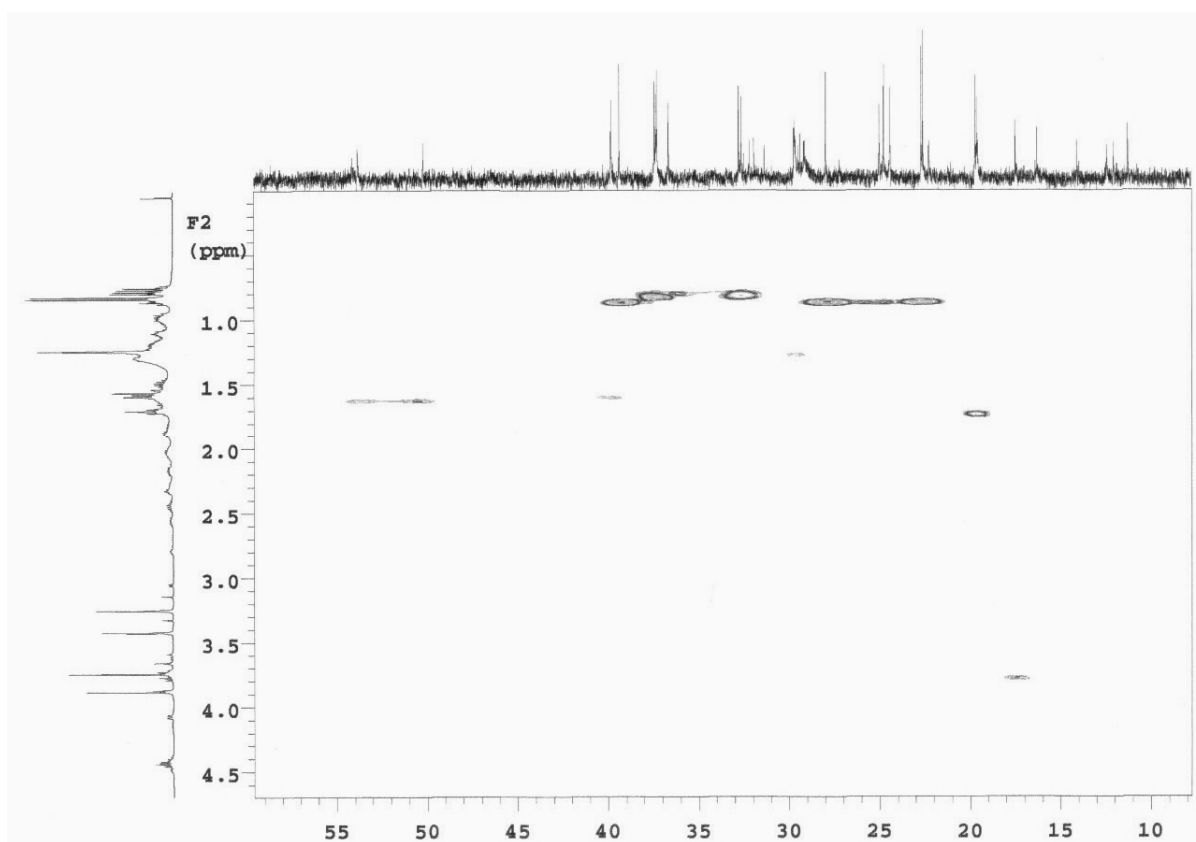
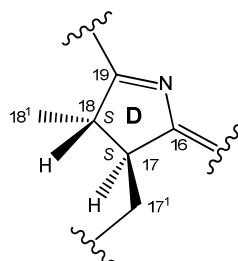


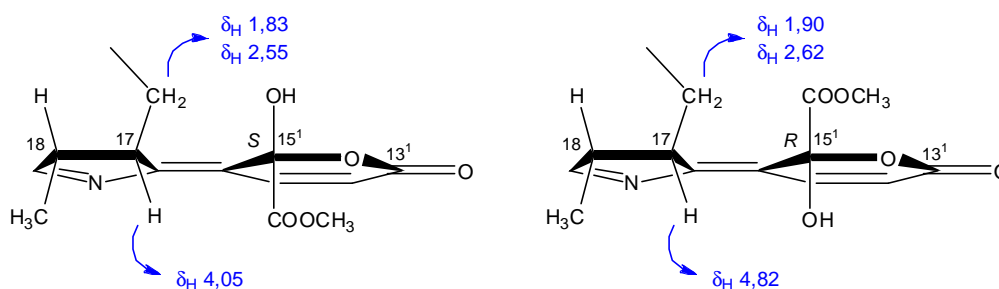
Figura 56. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *Rb-2* na região de (0,1 – 4,5 ppm) x (10,0 – 60,0 ppm).

A análise do espectro de correlação homonuclear NOESY e as expansões (Figura 57, 58 e 59, pág. 118 e 119) contribuíram para a confirmação do sistema porfirínico ao mostrar correlações espaciais entre hidrogênios H-5 (δ_H 9,52) com H-3¹ (δ_H 7,99) do anel A; H-7¹ (δ_H 3,25) do anel B; H-10 (δ_H 9,74) com H-8¹ (δ_H 3,74) do anel B e H-12¹ (δ_H 3,88) do anel C; e H-20 (δ_H 8,69) com H-2¹ (δ_H 3,42) do anel A e H-18 (δ_H 4,44) do anel D.

A estereoquímica relativa do anel D foi determinada pelo tipo de sinal gerado pelos hidrogênios H-17 e H-18 no espectro de RMN ¹H (Figura 34, pág. 102): o H-17 aparece como um duplo-duplete em δ_H 4,07 ($J = 2,0$ e $9,0$ Hz) o que faz sugerir que o mesmo só acopla com os dois hidrogênios H-17¹ (δ_H 1,87 e 2,56) não equivalentes quimicamente; o H-18 aparece como um quarteto em δ_H 4,44 ($J = 6,0$ e $13,5$ Hz), sinal este, que reflete acoplamento apenas com os três hidrogênios H-18¹ (δ_H 1,58). O não acoplamento ($J = 0$ Hz) entre os hidrogênios H-17 e H-18 só é possível se o ângulo diedro entre esses dois átomos vicinais for de 90° (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001), ou seja, se a orientação espacial desses hidrogênios for *trans* (HUANG et al., 2007). Sendo assim, a estereoquímica do anel D foi definida como 17S e 18S semelhante aos de outras feofitinas já relatadas na literatura. O espectro NOESY corroborou com estas observações ao mostrar uma correlação espacial entre os sinais para os hidrogênios H-17 e H-18¹.



A configuração de C-15¹ foi determinada como S, baseado na blindagem apresentada pelo hidrogênio H-17 (δ_H 4,07) (Figura 34, pág. 102), em contraste com δ_H 4,82 para a configuração R, como concluído por Nakatani e colaboradores (1981), Huang e colaboradores (2007), Kobayashi e colaboradores (1991) e apresentado abaixo:



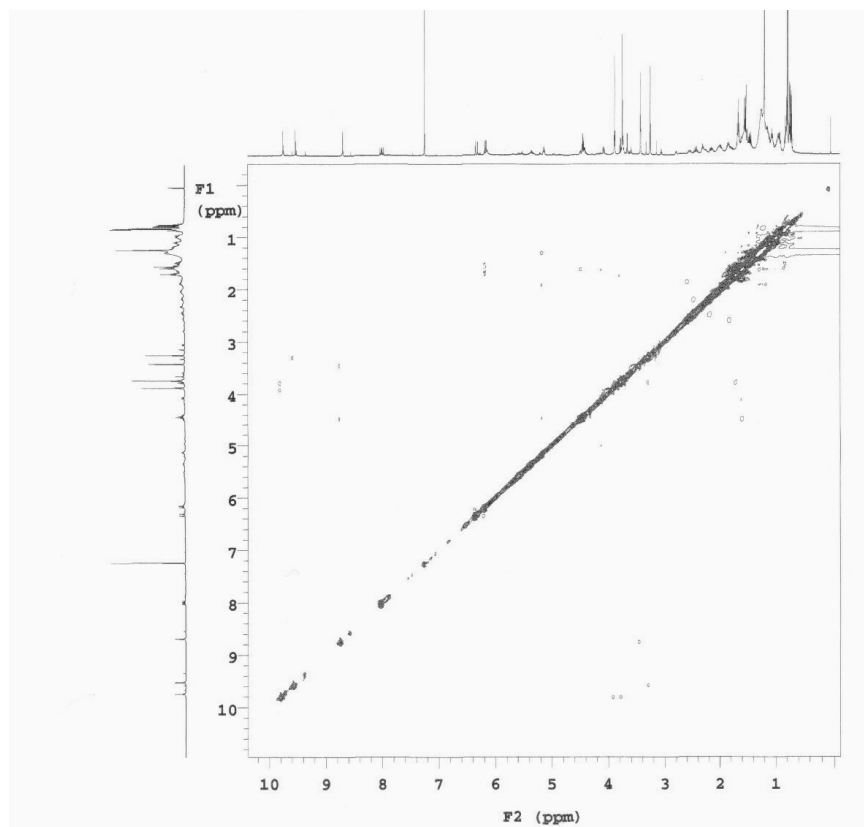


Figura 57. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-2*.

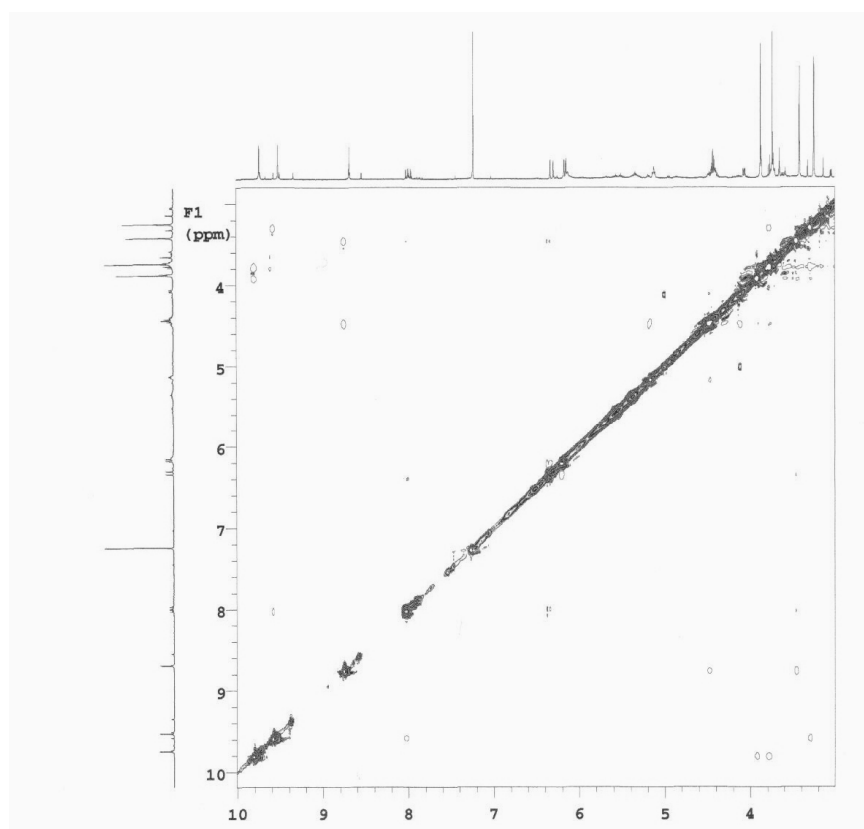


Figura 58. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-2* na região de (3,0 – 10,0 ppm) x (3,0 – 10,0 ppm).

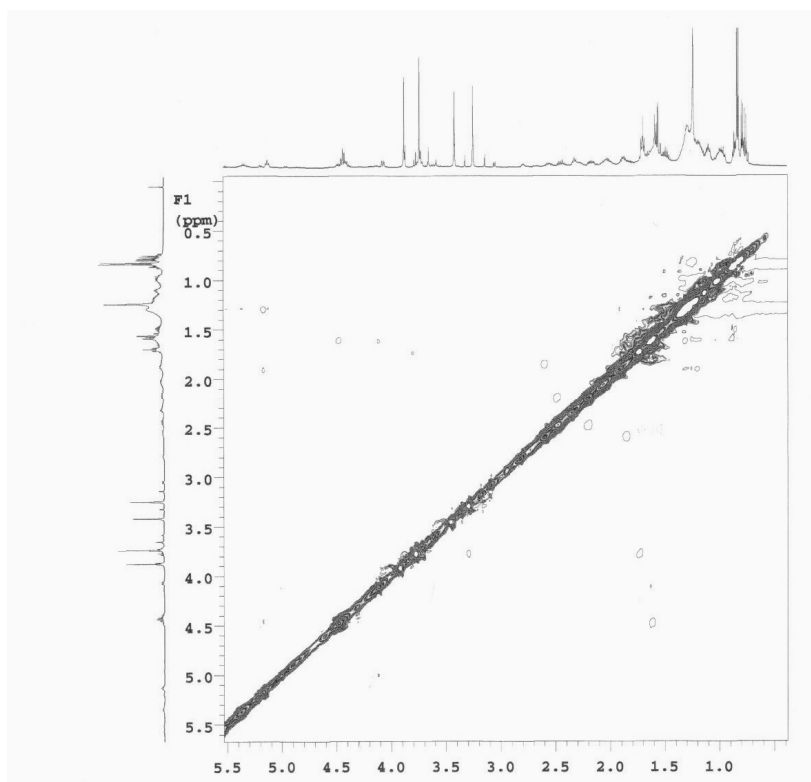


Figura 59. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-2* na região de (0,1 – 5,5 ppm) x (0,1 – 5,5 ppm).

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para os átomos do grupo fitol (Tabela 2, pág. 121) foram totalmente assinalados por análise extensiva dos espectros bidimensionais (HMQC, COSY, HMBC e NOESY), bem como, por comparação com os dados de Huang e colaboradores (2007) e Jerz e colaboradores (2007) para um derivado porfirínico semelhante à *Rb-2*. Embora os espectros HMBC não tenham evidenciado correlação a 3J entre os sinais em δ_{H} 4,43 (H-P1) e δ_{C} 173,2 (C-17 3) que permite definir a localização da cadeia fitílica, esta unidade foi conectada a carbonila C-17 3 para forma um éster, em concordância com os dados da literatura. Quando esta carbonila apresenta substituinte formando um éster, como no caso de *Rb-2*, o sinal que é gerado no espectro de RMN ^{13}C é aproximadamente δ_{C} 173,0; na ausência de substituinte nessa posição observa-se um sinal para ácido carboxílico em torno δ_{C} 176,1 para C-17 3 mais desprotegido (DUAN et al., 2002; MATSUO et al., 1996).

Os espectros HMBC e NOESY também mostraram outras correlações que auxiliaram na confirmação das atribuições feitas aos outros átomos de hidrogênio e carbono da molécula como podem ser observados na Figura 60 (pág. 120) e na Tabela 2 (pág. 121). A Tabela 3 (pág. 122) faz uma comparação dos dados de RMN

uni e bidimensionais apresentados por *Rb-2* com os dados citados por National (2004) para o mesmo composto.

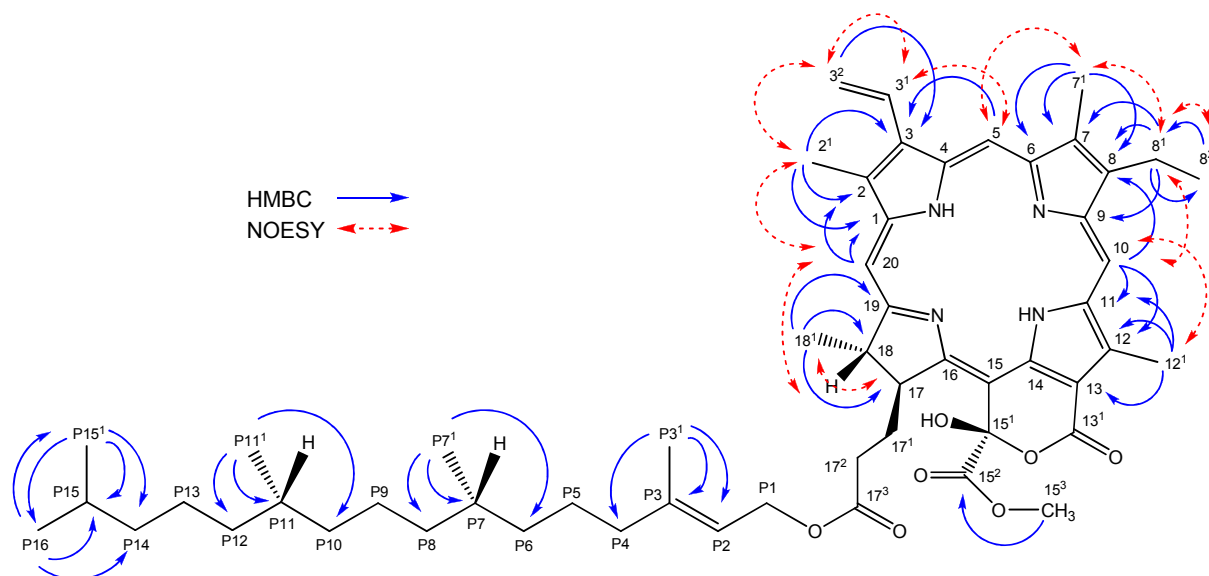


Figura 60. Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY para *Rb-2*.

O espectro de massas IES-EM no modo de ionização positivo (Figura 61, pág. 120) corroborou com as propostas dos espectros anteriores ao mostrar um pico de íon molecular em m/z 903,99 $[M + H]^+$, condizente com a fórmula molecular $C_{55}H_{74}N_4O_7$ (calc. 903,99).

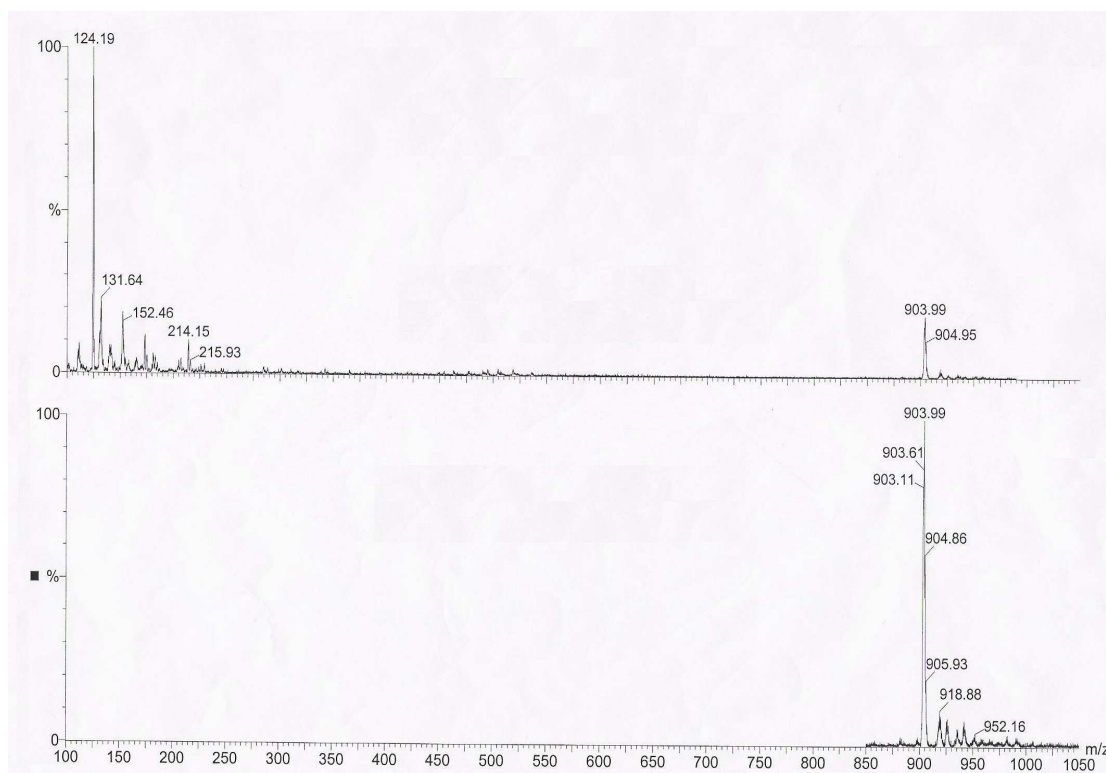


Figura 61. Espectro de massas IES-EM (pos) de *Rb-2*.

Tabela 2. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para *Rb-2*, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3 .

C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_{C}	δ_{H}	2J	3J		
1	141,2	-				
2	131,6	-				
2 ¹	12,1	3,42 (s, 3H)	C-2	C-1, C-3		H-20, H-3 ¹ , H-3 ²
3	136,1	-				
3 ¹	129,0	7,99 (dd, $J = 11,5$ e $18,0$ Hz, 1H)			H-3 ²	H-5, H-3 ² , H-2 ¹
3 ²	122,7	6,32 (dd, $J = 1,5$ e $18,0$ Hz, 1H) 6,16 (dd, $J = 1,5$ e $11,5$ Hz, 1H)		C-3	H-3 ¹	H-2 ¹
4	136,0	-				
5	99,7	9,52 (s, 1H)		C-3		H-3 ¹ , H-7 ¹
6	155,7	-				
7	136,5	-				
7 ¹	11,3	3,25 (s, 3H)	C-7	C-6, C-8		H-5, H-8 ¹
8	145,6	-				
8 ¹	19,6	3,74 (q, $J = 9,0$ e $15,5$ Hz, 2H)	C-8 ² , C-8	C-9, C-7	H-8 ²	H-10, H-7 ¹
8 ²	17,5	1,70 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H)	C-8 ¹	C-8	H-8 ¹	
9	150,0	-				
10	104,1	9,74 (s, 1H)	C-11	C-8, C-12		H-12 ¹ , H-8 ¹
11	138,7	-				
12	131,4	-				
12 ¹	12,4	3,88 (s, 3H)	C-12	C-11, C-13		H-10
13	111,4	-				
13 ¹	160,9	-				
14	145,6	-				
15	134,8	-				
15 ¹	102,0	-				
15 ²	170,9	-				
15 ³	54,1	3,74 (s, 3H)		C-15 ²		
16	166,3	-				
17	53,8	4,07 (dd, $J = 2,0$ e $9,0$ Hz, 1H)				H-18 ¹
17 ¹	32,2	1,87 (m, 1H) e 2,56 (m, 1H)			H-17 ¹	
17 ²	31,4	2,17 (m, 1H) e 2,43 (m, 1H)			H-17 ²	
17 ³	173,2	-				
18	50,2	4,44 (q, $J = 6,0$ e $13,5$ Hz, 1H)			H-18 ¹	H-20
18 ¹	22,2	1,58 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)	C-18	C-19, C-17	H-18	H-17
19	171,1	-				
20	93,9	8,69 (s, 1H)	C-1	C-2		H-18, H-2 ¹
P1	61,5	4,43 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H)			H-P2	
P2	117,8	5,13 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H)			H-P1	
P3	142,8	-				
P3 ¹	16,3	1,56 (sl, 3H)	C-P3	C-P2, C-P4		
P4	39,8	1,87 (m, 2H)				
P5	25,0	1,29 (m, 2H)				
P6	36,6	0,97 (m, 2H)				
P7	32,8	1,29 (m, 1H)			H-P7 ¹	
P7 ¹	19,6	0,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	C-P7	C-P6, C-P8	H-P7	
P8	37,4	1,24 (m, 2H)				
P9	24,4	1,24 (m, 2H)				
P10	37,3	0,97 (m, 2H)				
P11	32,6	1,24 (m, 1H)			H-P11 ¹	
P11 ¹	19,7	0,79 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	C-P11	C-P10, C-P12	H-P11	
P12	37,3	0,97 (m, 2H)				
P13	24,8	1,65 (m, 2H)				
P14	39,4	1,10 (m, 2H)				
P15	27,9	1,52 (m, 1H)			H-P15 ¹ , H-P16	
P15 ¹	22,7	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	C-P15	C-P14, C-P16	H-P15	
P16	22,6	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	C-P15	C-P14, C-P15 ¹	H-P15	
15 ¹ -OH	-	6,13 (sl, 1H)				
21-NH	-	-1,09 (sl, 1H)				
23-NH	-	-1,44 (sl, 1H)				

Tabela 3. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Rb-2* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de Porfirinolactona em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente).

C	<i>Rb-2</i>		Porfirinolactona	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	141,2	-	141,5	-
2	131,6	-	131,8	-
2 ¹	12,1	3,42 (s, 3H)	12,3	3,44
3	136,1	-	136,3	-
3 ¹	129,0	7,99 (dd, <i>J</i> = 11,5 e 18,0 Hz, 1H)	129,2	8,02
3 ²	122,7	6,32 (dd, <i>J</i> = 1,5 e 18,0 Hz, 1H) 6,16 (dd, <i>J</i> = 1,5 e 11,5 Hz, 1H)	123,0	6,34 6,17
4	136,0	-	136,3	-
5	99,7	9,52 (s, 1H)	99,9	9,55 (s)
6	155,7	-	155,6	-
7	136,5	-	136,7	-
7 ¹	11,3	3,25 (s, 3H)	11,5	3,28
8	145,6	-	145,8	-
8 ¹	19,6	3,74 (q, <i>J</i> = 9,0 e 15,5 Hz, 2H)	19,8	3,76
8 ²	17,5	1,70 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 3H)	17,8	1,72
9	150,0	-	149,9	-
10	104,1	9,74 (s, 1H)	104,4	9,77 (s)
11	138,7	-	139,0	-
12	131,4	-	131,7	-
12 ¹	12,4	3,88 (s, 3H)	12,7	3,92
13	111,4	-	111,6	-
13 ¹	160,9	-	161,2	-
14	145,6	-	145,8	-
15	134,8	-	135,0	-
15 ¹	102,0	-	102,2	-
15 ²	170,9	-	171,1	-
15 ³	54,1	3,74 (s, 3H)	54,4	3,76
16	166,3	-	166,5	-
17	53,8	4,07 (dd, <i>J</i> = 2,0 e 9,0 Hz, 1H)	53,9	4,05 e 4,96
17 ¹	32,2	1,87 (m, 1H) e 2,56 (m, 1H)	32,3	1,83 e 2,55
17 ²	31,4	2,17 (m, 1H) e 2,43 (m, 1H)	31,5	2,46
17 ³	173,2	-	173,6	-
18	50,2	4,44 (q, <i>J</i> = 6,0 e 13,5 Hz, 1H)	50,4	4,43
18 ¹	22,2	1,58 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H)	22,5	1,61
19	171,1	-	171,4	-
20	93,9	8,69 (s, 1H)	94,1	8,71 (s)
P1	61,5	4,43 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2H)	61,8	4,42
P2	117,8	5,13 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1H)	119,9	5,12
P3	142,8	-	142,4	-
P3 ¹	16,3	1,56 (sl, 3H)	16,7	1,58
P4	39,8	1,87 (m, 2H)	40,5	?
P5	25,0	1,29 (m, 2H)	?	?
P6	36,6	0,97 (m, 2H)	?	?
P7	32,8	1,29 (m, 1H)	?	?
P7 ¹	19,6	0,76 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H)	20,4	0,77 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz)
P8	37,4	1,24 (m, 2H)	?	?
P9	24,4	1,24 (m, 2H)	?	?
P10	37,3	0,97 (m, 2H)	?	?
P11	32,6	1,24 (m, 1H)	?	?
P11 ¹	19,7	0,79 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H)	20,4	0,80 (d, <i>J</i> = 6,4 Hz)
P12	37,3	0,97 (m, 2H)	?	?
P13	24,8	1,65 (m, 2H)	?	?
P14	39,4	1,10 (m, 2H)	?	1,11
P15	27,9	1,52 (m, 1H)	?	1,49
P15 ¹	22,7	0,83 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H)	23,4	0,84 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz)
P16	22,6	0,83 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H)	23,3	0,84 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz)
15 ¹ -OH	-	6,13 (sl, 1H)	-	6,12 (sl, 1H)
21-NH	-	-1,09 (sl, 1H)	-	-1,11
23-NH	-	-1,44 (sl, 1H)	-	-1,49

Assim, a análise dos espectros de IV, EM e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Rb-2*, bem como, a comparação com os dados da literatura permitiram identificá-la como sendo uma **15¹-hidroxi-(15¹-S)-porfirinolactona a** (Figura 62, pág. 123). O relato desta substância no reino vegetal é bastante escasso. A mesma já foi isolada das folhas do bambu *Phyllostachys pubescens* (Poaceae) (NATIONAL, 2004), de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae) (NUNES et al., 2008) e *Anisacanthus brasiliensis* Lindau (Acanthaceae) (DIAS et al., 2007), no entanto, trata-se do primeiro relato na família Rubiaceae.

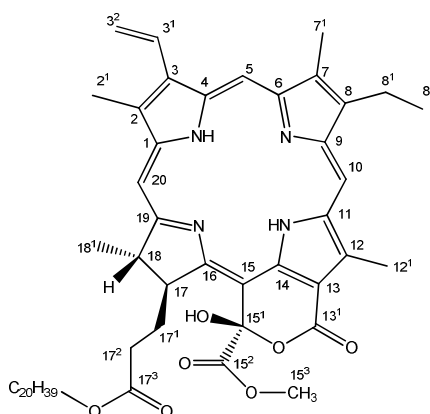


Figura 62. Estrutura química de *Rb-2*: 15¹-hidroxi-(15¹-S)-porfirinolactona a.

Esta substância apresenta algumas atividades farmacológicas *in vitro* que pode possibilitar seu uso na terapia do câncer: induz necrose ou apoptose em linhagem de células leucêmicas humanas U-937 sob radiação luminosa (NATIONAL, 2004) e CMK-7 e adenocarcinoma de colon humano (Colo320 DM), após irradiação à lâmpada fluorescente, por ativação de caspases e clivagem de DNA (KIM et al., 2003); e inibe a atividade da enzima topoisomerase II- α humana (MOURA et al., 2009).

5.2.3. Determinação estrutural de *Rb-3*

O composto *Rb-3* foi isolado na forma de cristais amarelos com massa de 2,9 mg (correspondendo a 0,029 % em relação à massa da fase clorofórmica). Apresentou ponto de fusão de 136,3 – 139,3 °C e fluorescência lilás sob UV indicando a presença de grupo cromóforo na estrutura.

O espectro de IV (Figura 63, pág. 124) mostrou absorção em 3356 cm^{-1} de estiramento de O-H que fez sugerir que a molécula possuía hidroxilas. Absorção em

1705 cm^{-1} referente a estiramento de C=O de ácidos carboxílicos inferiu a proposta de função ácido, no entanto, vibração em 1604 cm^{-1} , atribuída a estiramento de C=C de alcenos conjugados eliminou esta possibilidade, já que essas duas absorções são compatíveis com estruturas que apresentam carbonila de éster α,β -insaturada. A função fenólica foi sustentada pela absorção em 1288 cm^{-1} de estiramento de C-O que nesta frequência sugere a presença de fenóis. Isto foi corroborado pela proposta de um sistema aromático evidenciado pelas absorções atribuídas a estiramento de C=C de aromáticos em 1492 e 1573 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).

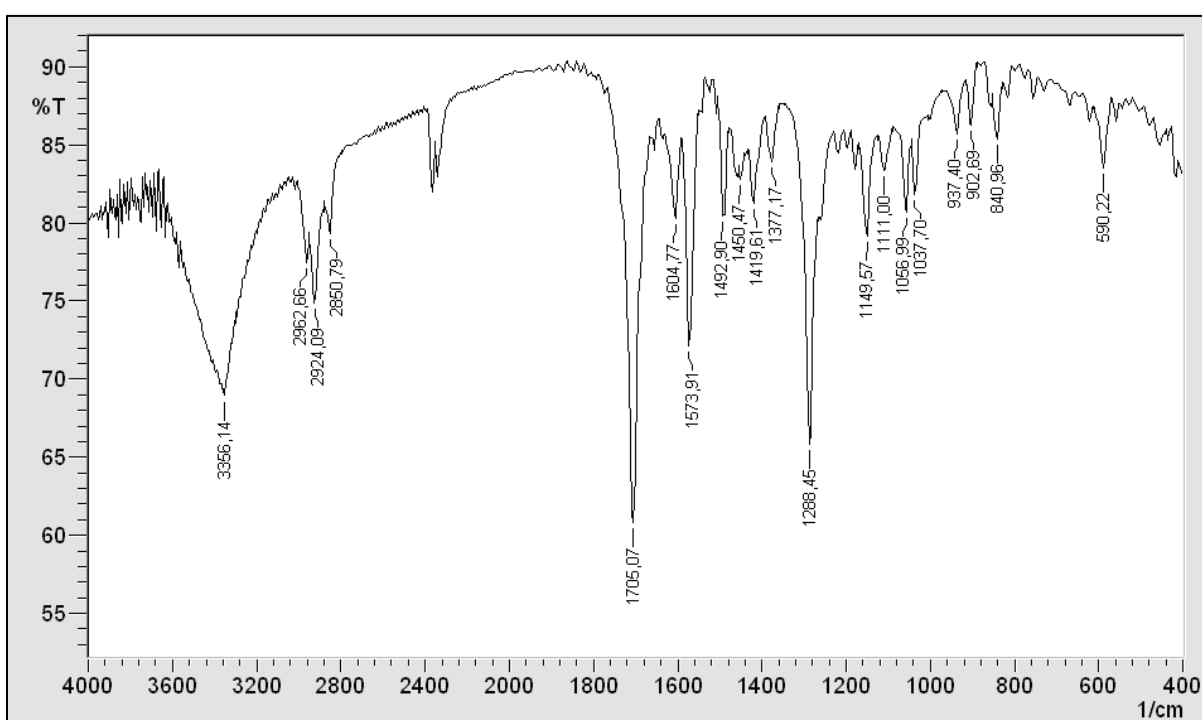
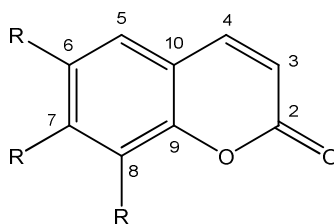


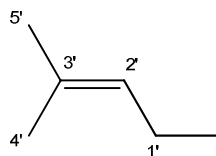
Figura 63. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *Rb-3*.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-3* e as expansões (Figura 64, 65, 66 e 67, pág. 126 e 127) exibiram deslocamentos químicos compatíveis com os de substâncias que apresentam esqueleto cumarínico: par de dupletos acoplado *cis* em δ_{H} 7,55 ($J = 9,5$ Hz) e 6,24 ($J = 9,5$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel δ -lactônico α,β -insaturado, respectivamente (CHEN et al., 2006; MULHOLLAND et al., 2002; UM et al., 2003), corroborando com o espectro de IV para a presença de carbonila de éster α,β -insaturada. Um simpleto em δ_{H} 6,70 atribuído ao hidrogênio H-5 (VASCONCELOS et al., 1998) fez sugerir que a cumarina era 6,7,8-trissubstituída:



Esqueleto cumarínico 6,7,8-trissubstituído

Os espectros de RMN ^1H (Figura 64, 65, 66 e 67, pág. 126 e 127) também mostraram um tripleto de quintetos em δ_{H} 5,27 ($J = 1,5$ e $7,5$ Hz, H-2') para um hidrogênio de alcenos trissubstituídos acoplado com um duplete em δ_{H} 3,55 ($J = 7,5$ Hz, H-1'), característicos de hidrogênios alil metilênicos; e dois simpletos em δ_{H} 1,66 (H-4') e 1,83 (H-5') para hidrogênios de duas metilas alílicas. Estes dados permitiram propor uma unidade 3-metil-2-butenil (ou unidade prenila) para *Rb-3* (MULHOLLAND et al., 2002; UM et al., 2003).



Unidade prenila (ou unidade 3-metil-2-butenil)

Além disso, um simpleto para três hidrogênios em δ_{H} 3,92 e um simpleto largo para um hidrogênio em δ_{H} 6,18 (Figura 64, 65 e 67, pág. 126 e 127) sugeriram a presença de metoxila e hidroxila, respectivamente. Esta última explica a absorção em 3356 cm^{-1} observada no espectro de IV (Figura 63, pág. 124).

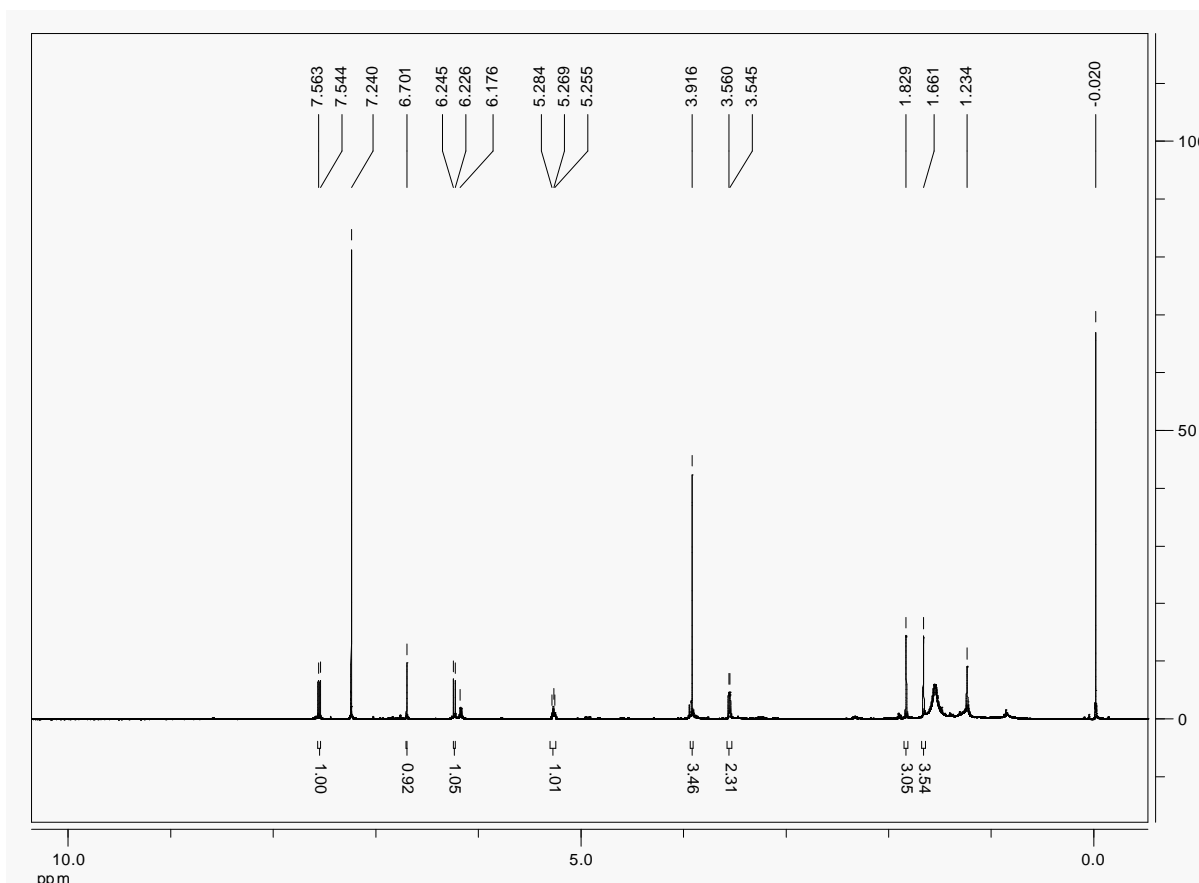


Figura 64. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-3*.

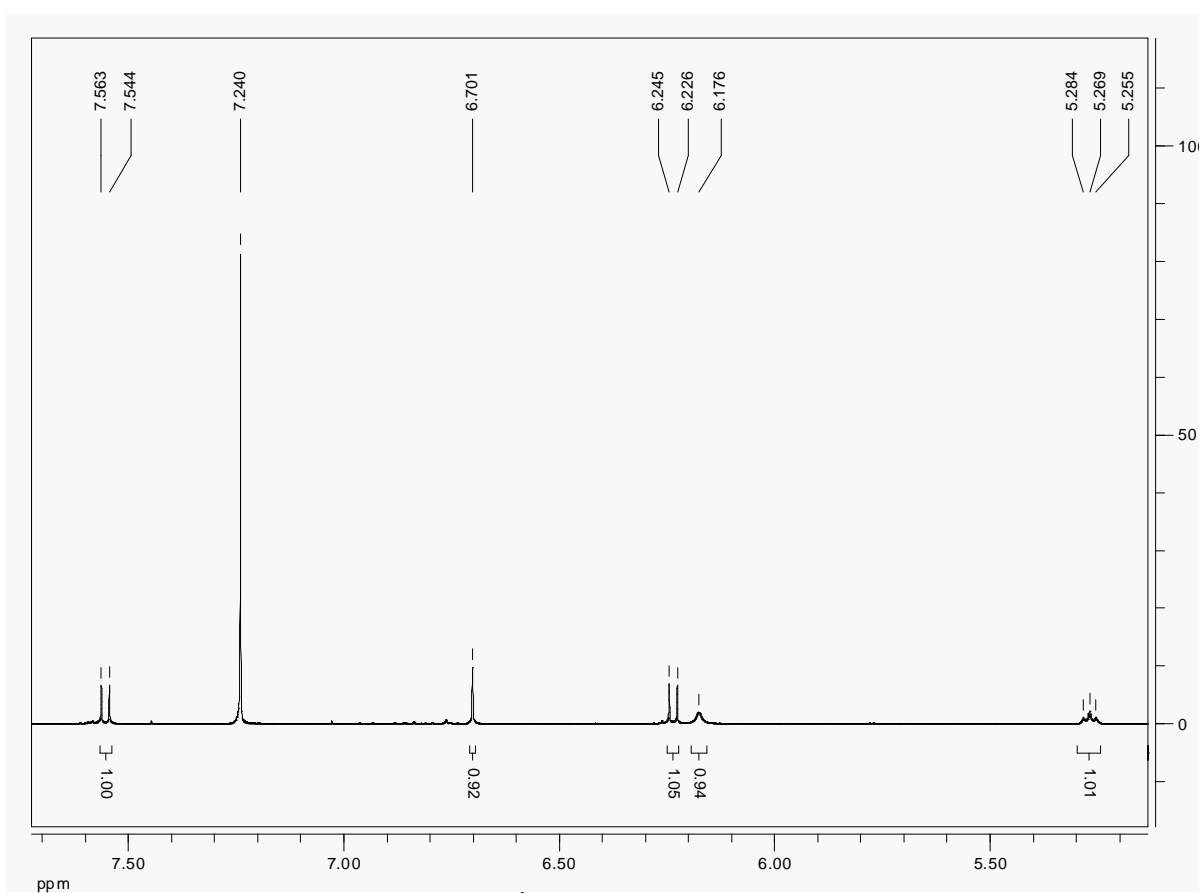


Figura 65. Expansão do espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-3* na região de 5,2 – 7,7 ppm.

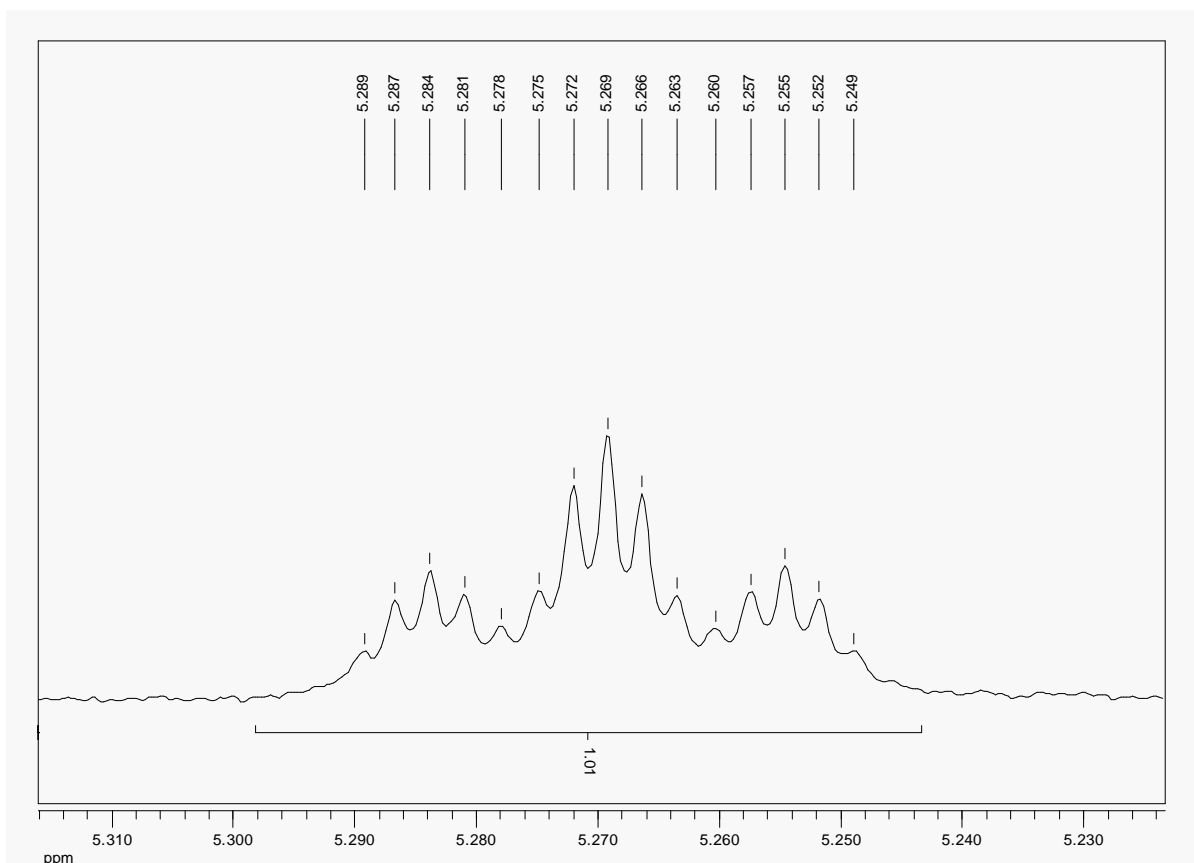


Figura 66. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Rb-3* na região de 5,2 – 5,3 ppm.

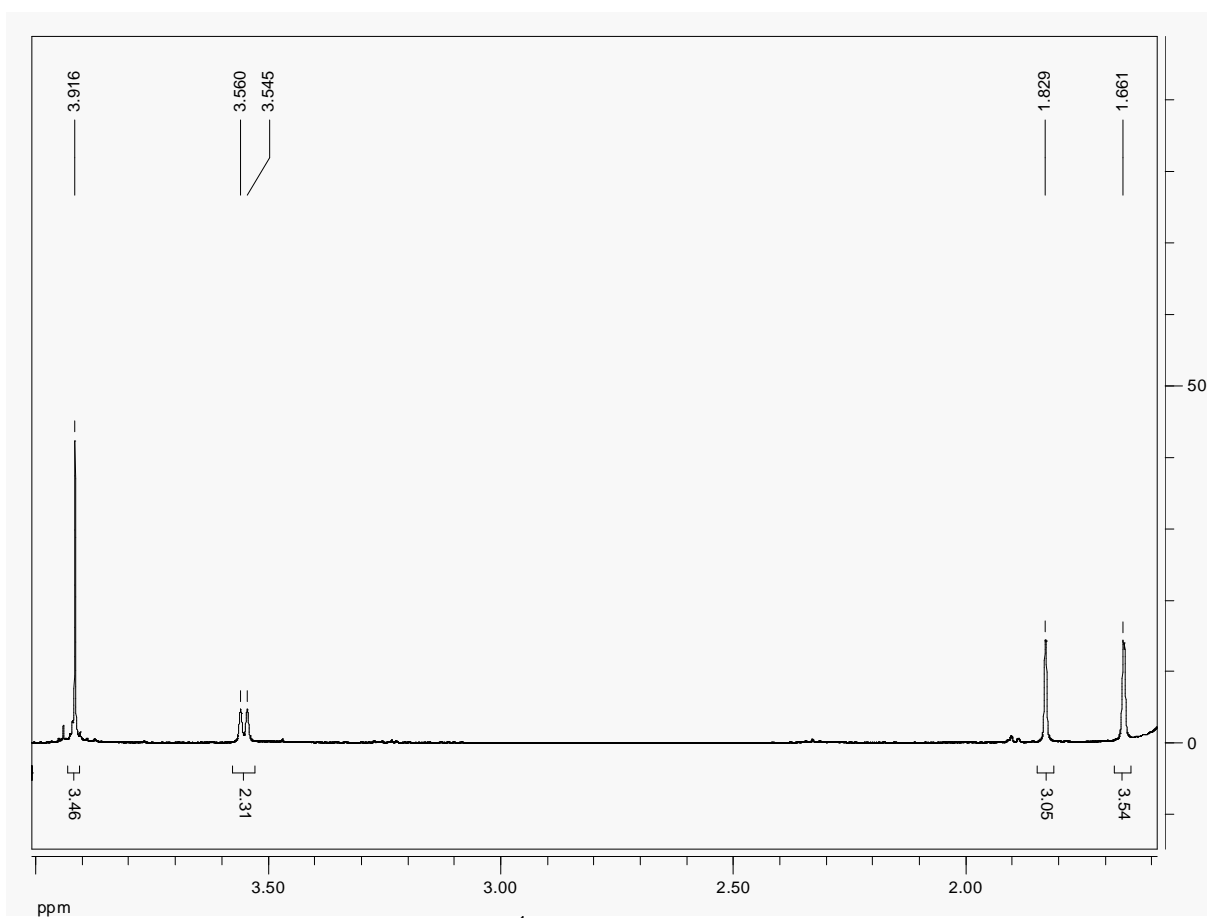


Figura 67. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Rb-3* na região de 1,6 – 4,0 ppm.

O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) e as expansões (Figura 68, 69 e 70, pág. 128 e 129) apresentaram sinais em δ_{C} 161,6 (C-2), 143,7 (C-4) e 113,1 (C-3) que reforçaram a proposta de esqueleto cumarínico para *Rb-3* oferecido nos espectro de RMN ^1H (PELTER et al., 1976). A presença de unidade prenil foi sustentada pelos deslocamentos químicos em δ_{C} 133,2 (C-3'), 120,7 (C-2'), 17,9 (C-5'), 22,2 (C-1') e 25,8 (C-4') (MULHOLLAND et al., 2002; UM et al., 2003).

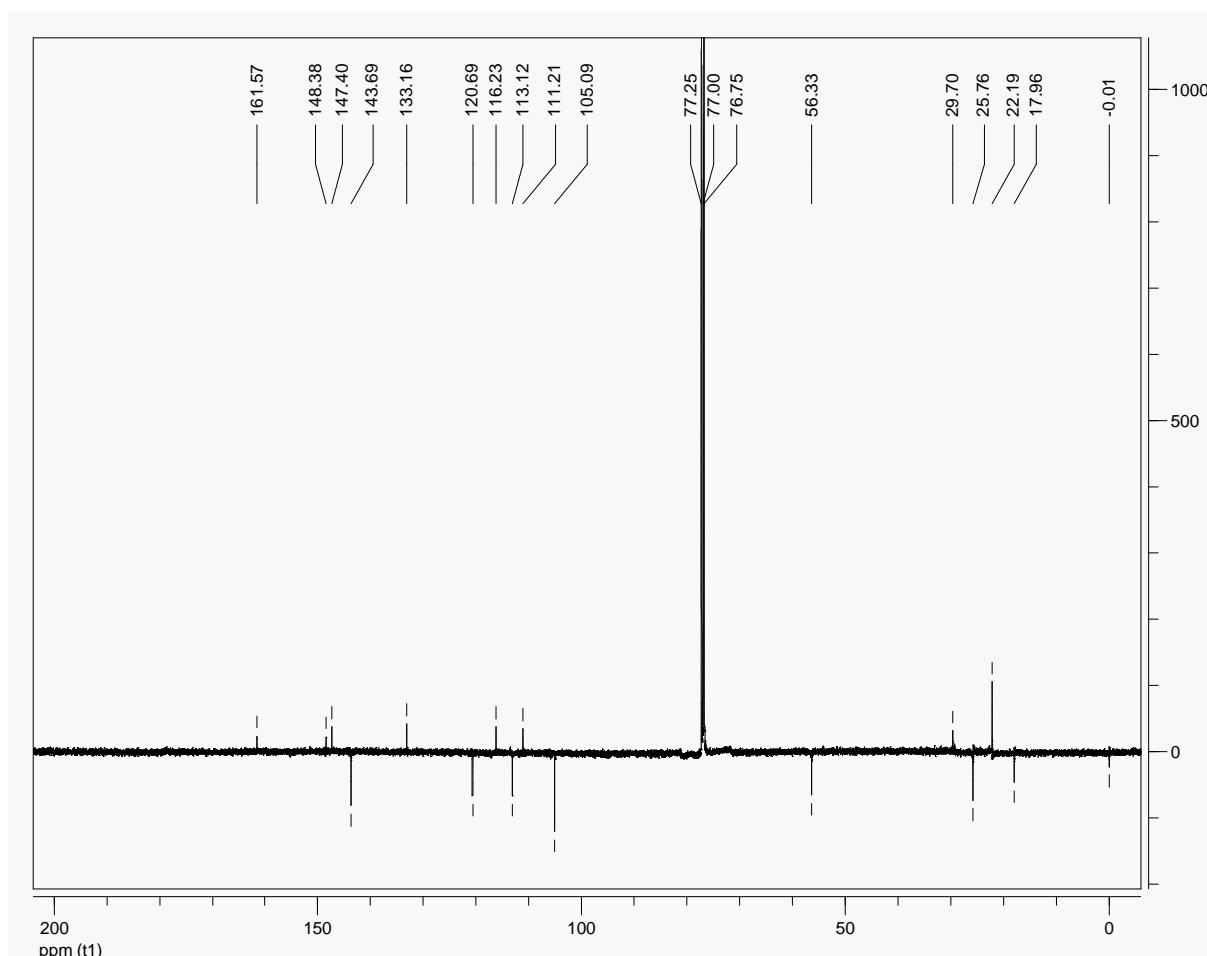


Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Rb-3*.

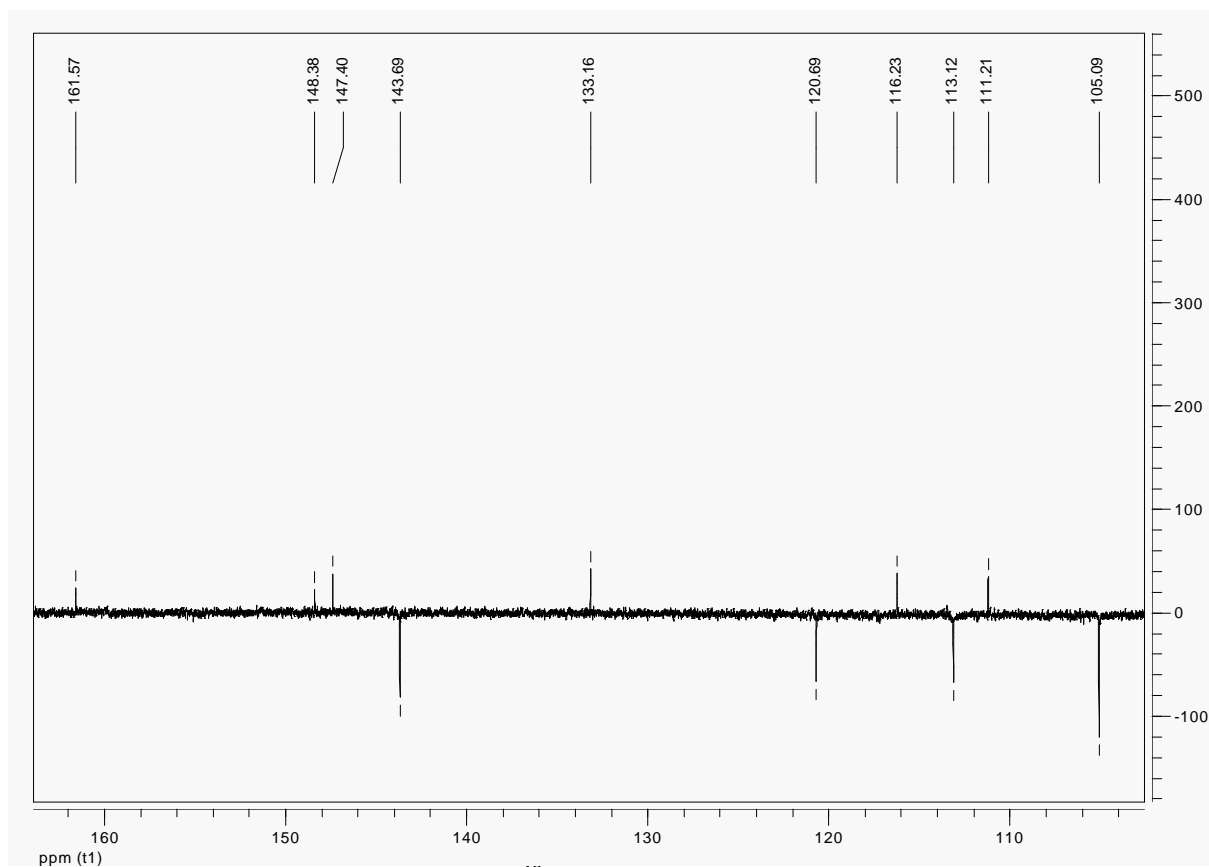


Figura 69. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 125 MHz) de *Rb-3* na região de 104,0 – 164,0 ppm.

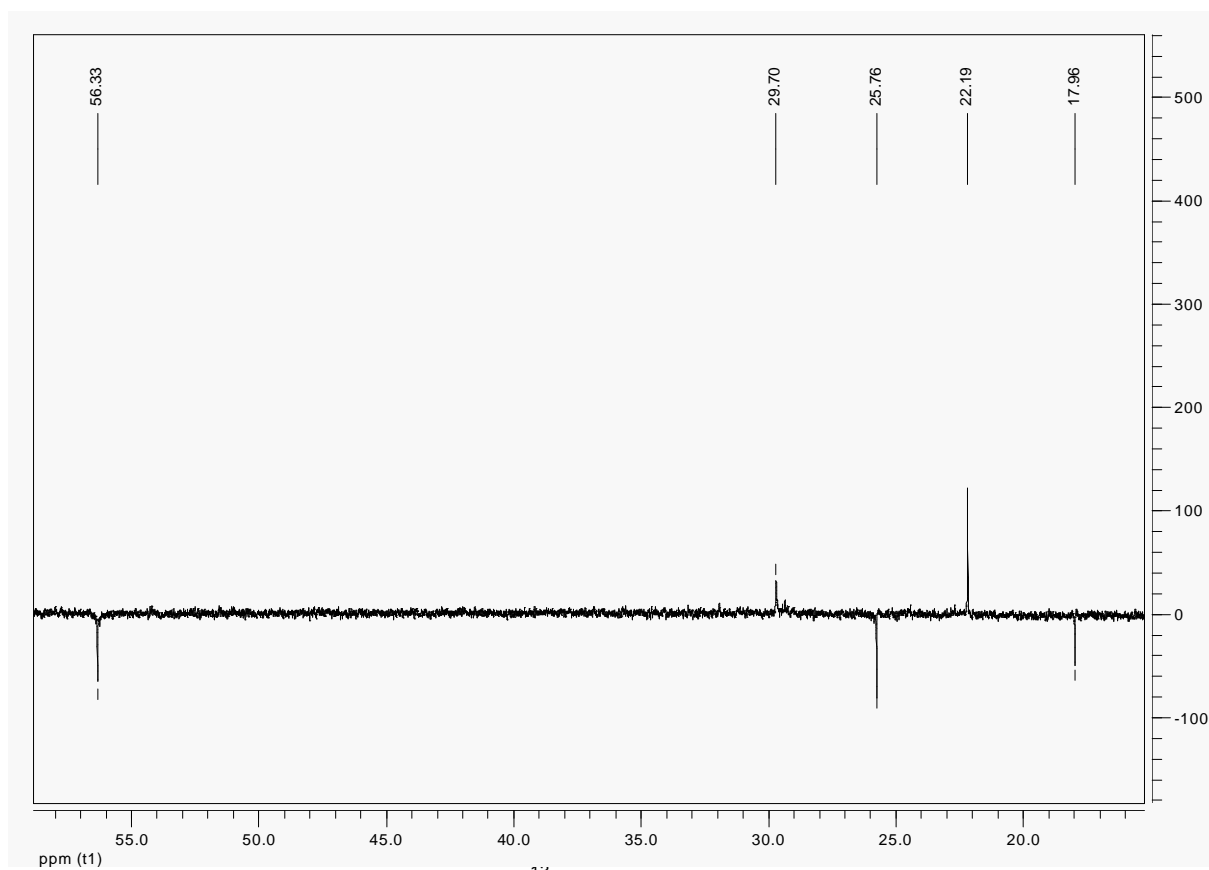


Figura 70. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 125 MHz) de *Rb-3* na região de 16,0 - 59,0 ppm.

O espectro de correlação heteronuclear HMQC e as expansões (Figura 71, 72 e 73, pág. 130 e 131) confirmaram as atribuições feitas a alguns átomos do esqueleto cumarínico, da metoxila e da unidade prenila ao mostrarem correlações entre os sinais dos hidrogênios e seus respectivos carbonos.

O espectro de correlação homonuclear COSY e as expansões (Figura 74 e 75, pág. 132) confirmaram o acoplamento observado para os hidrogênios α e β a carbonila ao mostrarem uma correlação entre os sinais em δ_H 7,55 (H-4) e 6,24 (H-3). Além disso, apresentaram correlações entre os deslocamentos químicos em δ_H 3,55 (H-1') e 5,27 (H-2'), e deste com o sinal em δ_H 1,66 (H-4'), que confirmaram o acoplamento vicinal entre os hidrogênios H-1' e H-2' e o acoplamento alílico entre H-2' e H-5', respectivamente, existentes na unidade prenila.

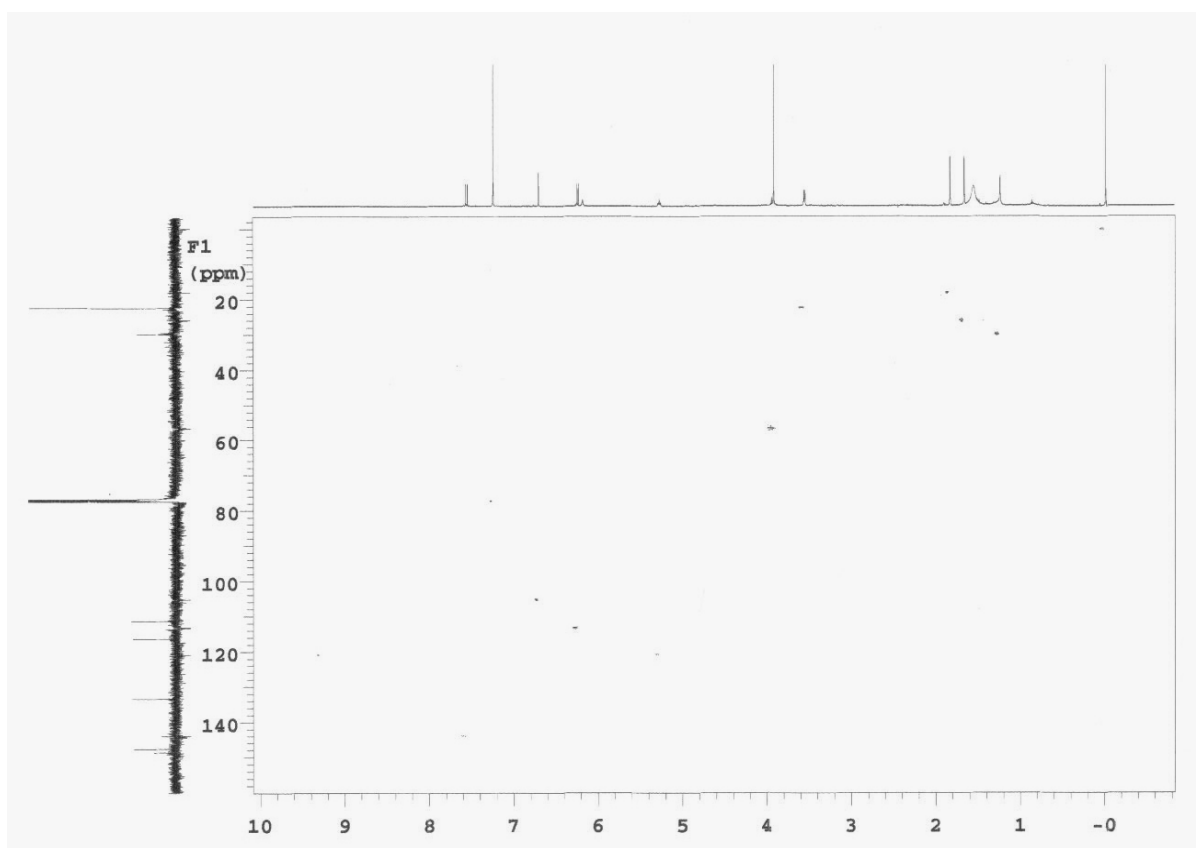


Figura 71. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-3*.

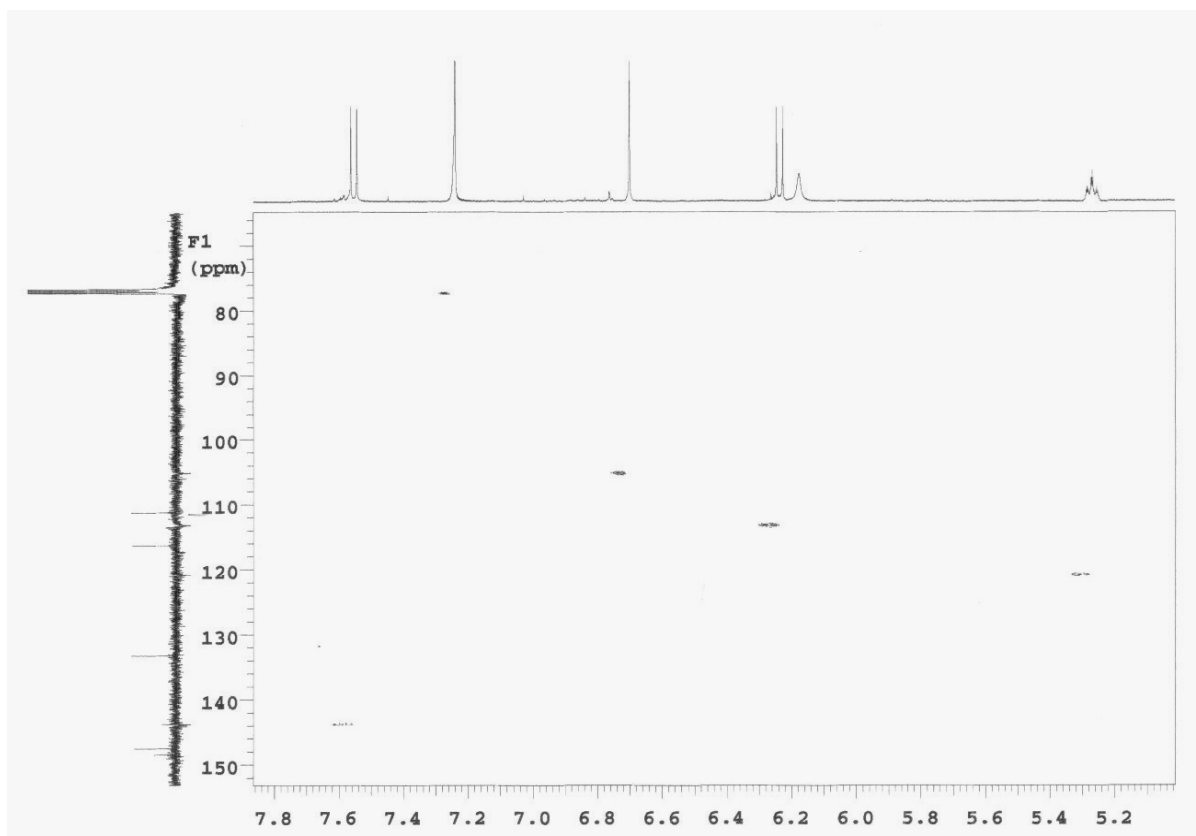


Figura 72. Expansão do espectro HMQC (CDCl₃, 500 e 125 MHz) de *Rb-3* na região de (5,0 – 7,8 ppm) x (70,0 – 150,0 ppm).

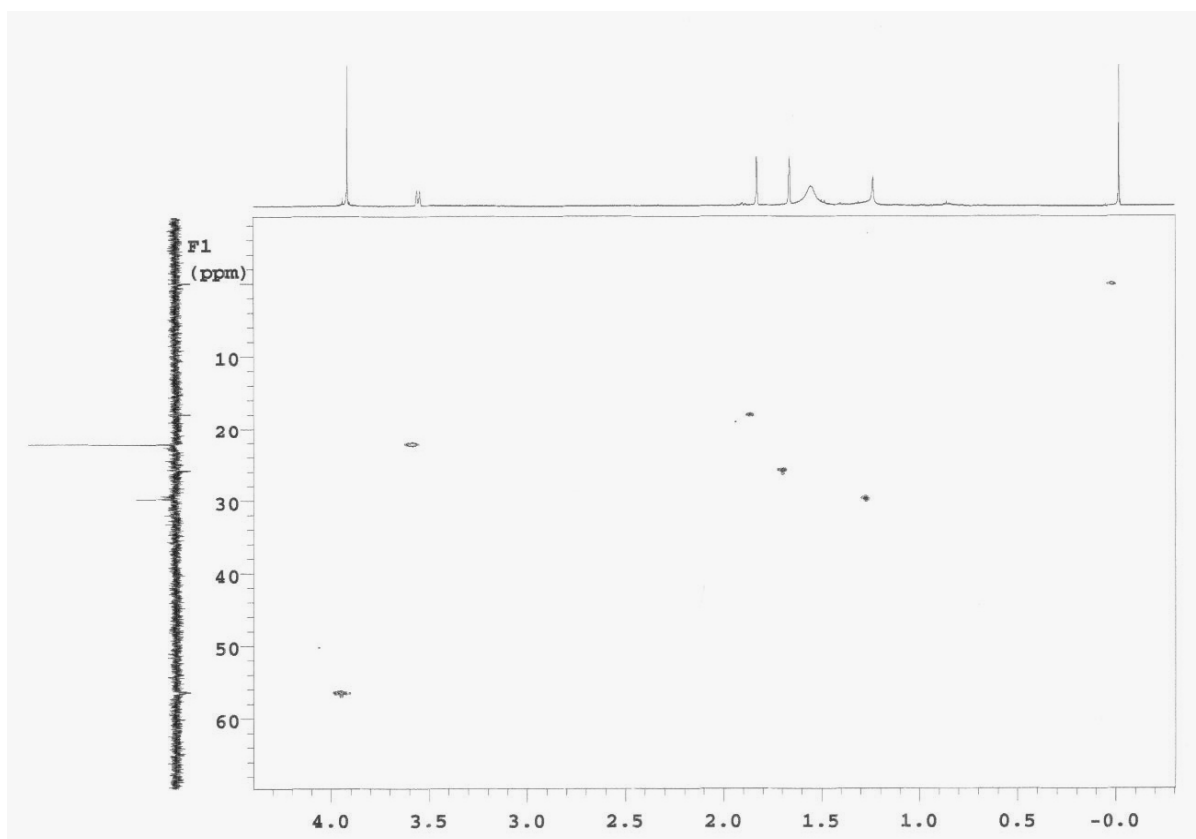


Figura 73. Expansão do espectro HMQC (CDCl₃, 500 e 125 MHz) de *Rb-3* na região de (0,0 – 4,3 ppm) x (0,0 – 70,0 ppm).

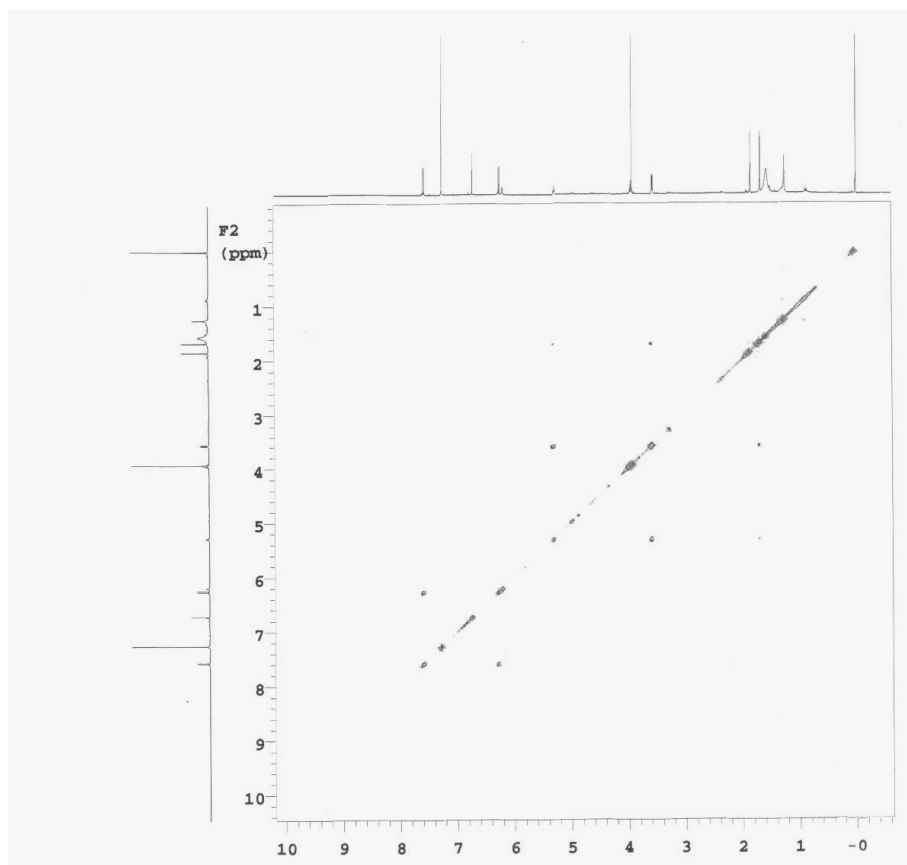


Figura 74. Espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de *Rb-3*.

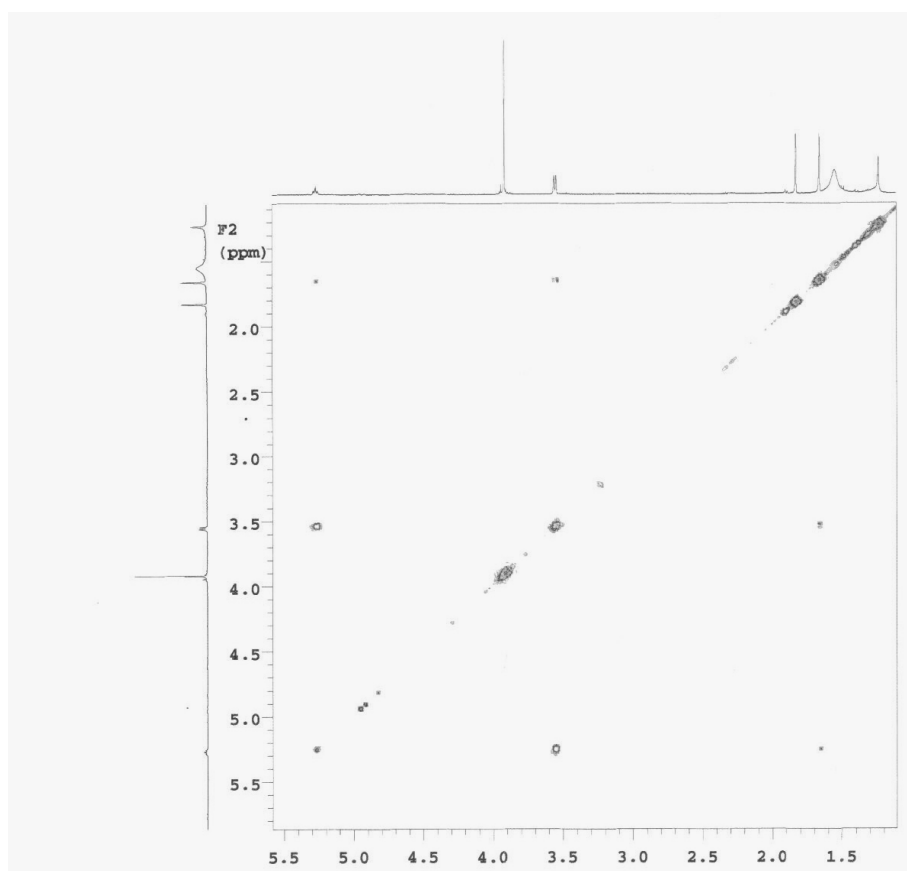
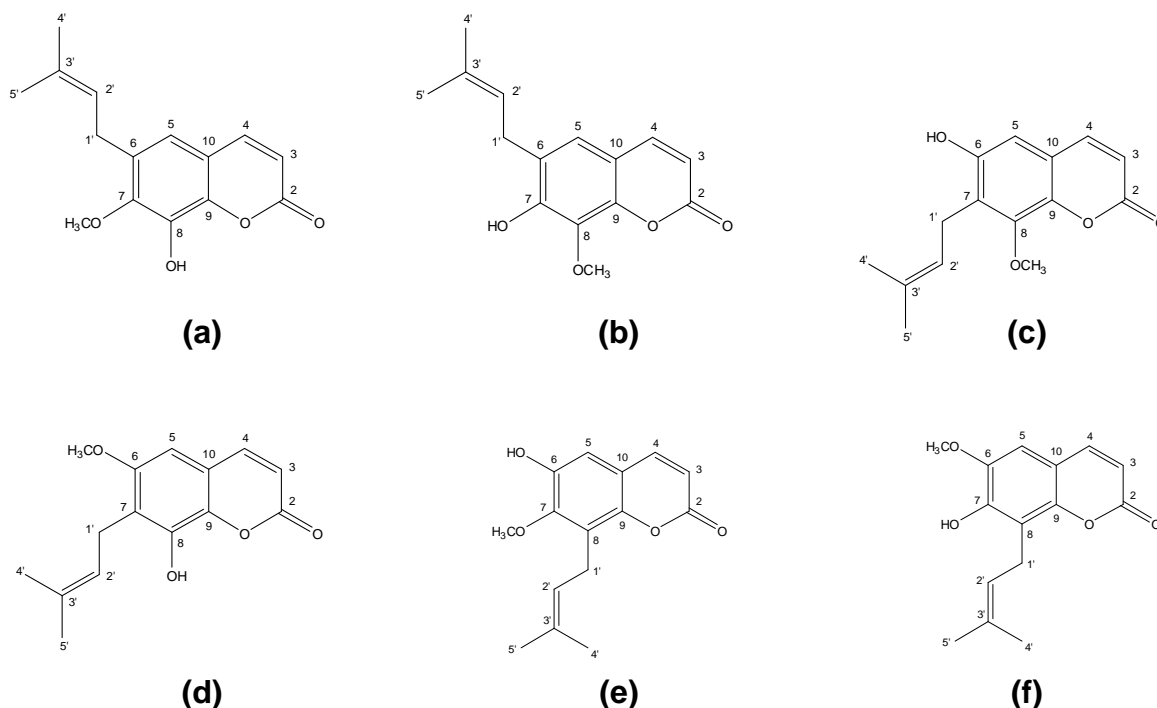


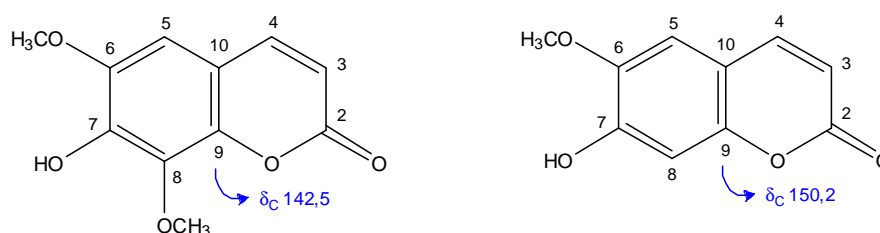
Figura 75. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de *Rb-3* na região de (1,0 – 5,5 ppm) x (1,0 – 5,5 ppm).

Sendo assim, foi possível sugerir seis possibilidades estruturais para *Rb-3* com hidroxila, metoxila e unidade prenil inseridas em diferentes posições do anel aromático da cumarina:



No espectro de RMN ¹³C – APT (Figura 68 e 70, pág. 128 e 129), o sinal em δ_C 56,3 atribuído ao carbono de uma metoxila não impedida estericamente, contrapondo-se ao sinal em aproximadamente δ_C 60,0 para metoxila estericamente impedida (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001), descartou as possibilidades estruturais **(a)**, **(b)**, **(c)** e **(e)**.

A literatura mostra que cumarinas com função oxigenada em C-8 apresenta um sinal em aproximadamente δ_C 142,5 para o carbono C-9 (PANICHAYUPAKARANANT et al., 1995), a ausência desse substituinte desprotege C-9 fazendo-o absorver em torno de δ_C 150,2 (VASCONCELOS et al., 1998). No espectro de correlação heteronuclear HMBC de *Rb-3* e as expansões (Figura 76, 77 e 78, pág. 134 e 135), uma correlação a ³J entre δ_H 7,55 (H-4) e o sinal em δ_C 148,4, que foi atribuído a C-9, inferiu a inexistência de substituinte oxigenado em C-8, eliminando a proposta estrutural **(d)** já que a mesma apresenta hidroxila em C-8.



Ainda no espectro HMBC (Figura 76, pág. 134), correlações a 3J entre δ_H 6,70 (H-5) e os sinais em δ_C 147,4 e 148,4 que permitiram atribuir estes deslocamentos químicos aos carbonos C-7 e C-9, respectivamente; e correlações dos hidrogênios H-1' da unidade prenila com esses mesmos sinais para carbonos confirmaram a unidade prenila em C-8 e reforçaram a proposta **(f)** para *Rb-3*.

A localização da metoxila em C-6 e, conseqüentemente, a hidroxila em C-7, como observado em **(f)**, foi confirmada no espectro NOESY e nas expansões (Figura 79 e 80, pág. 136) que mostraram correlações espaciais entre 6,70 (H-5) e o sinal para os hidrogênios da metoxila em δ_H 3,92 que só seria possível se este substituinte estivesse inserido em C-6.

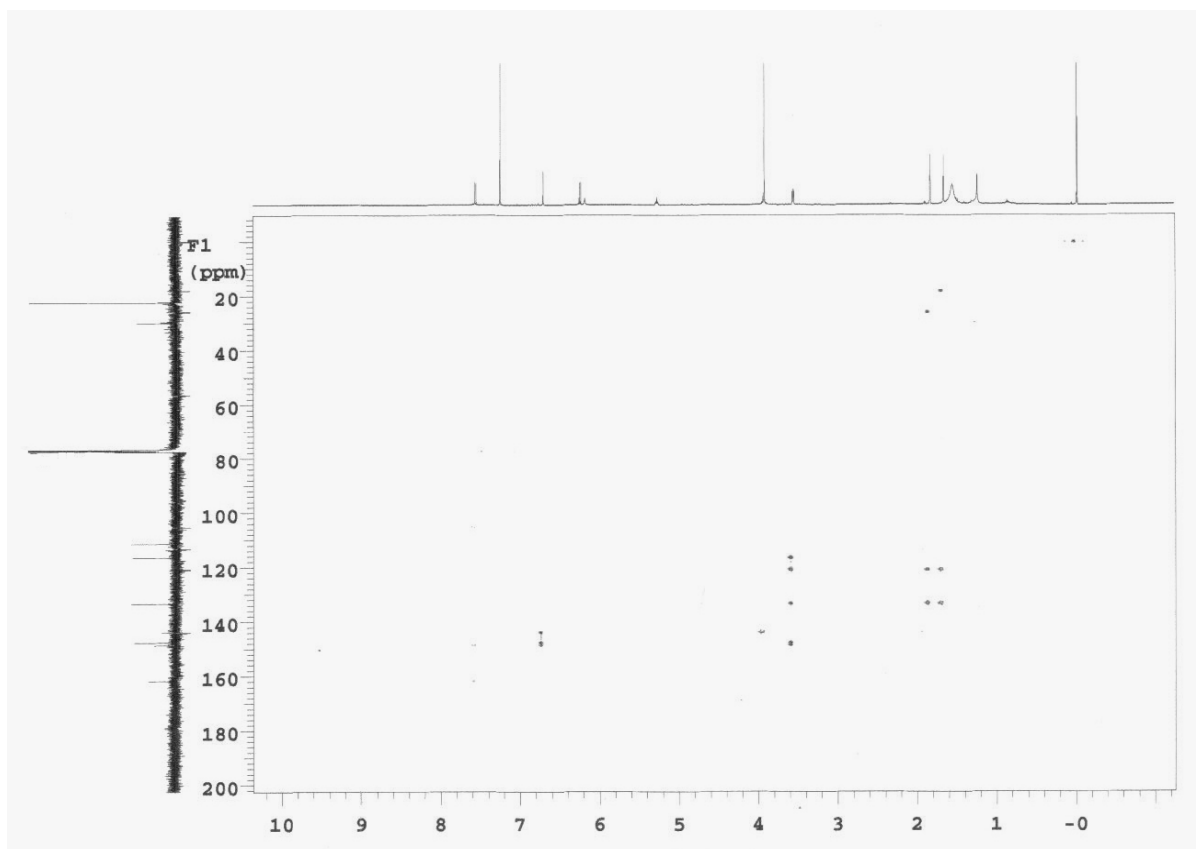


Figura 76. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, $CDCl_3$) de *Rb-3*.

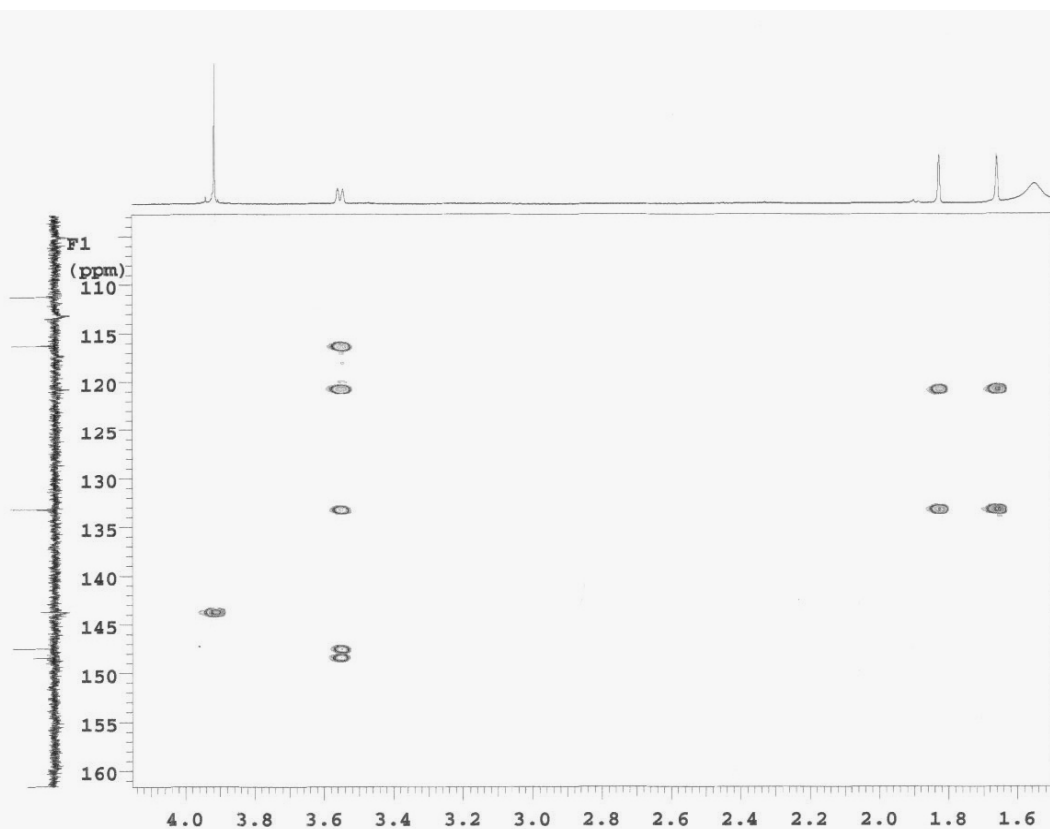


Figura 77. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-3* na região de (1,5 – 4,5 ppm) x (105,0 – 160,0 ppm).

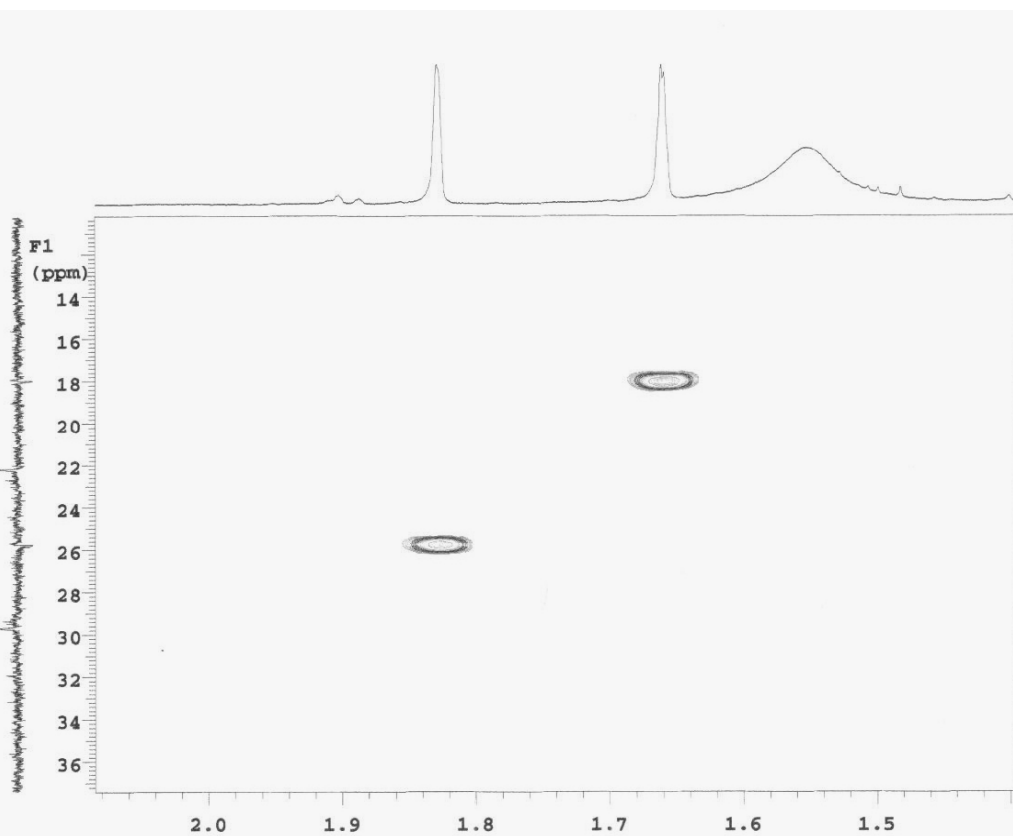


Figura 78. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-3* na região de (1,4 – 2,1 ppm) x (10,0 – 37,0 ppm).

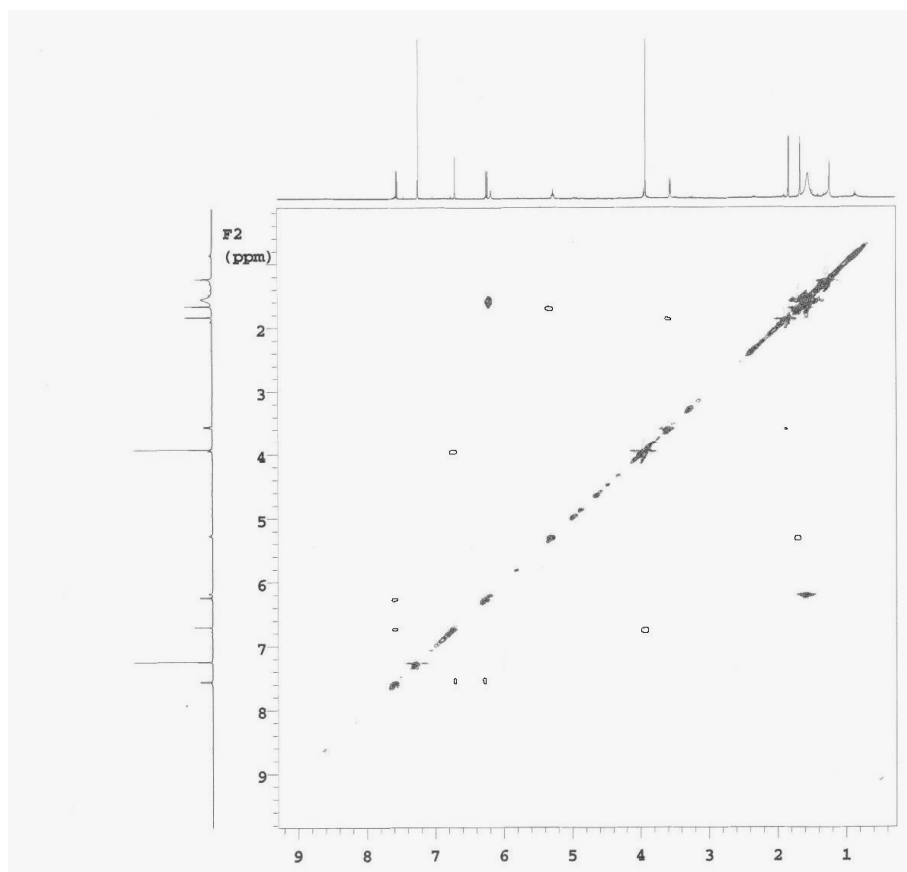


Figura 79. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl₃) de *Rb-3*.

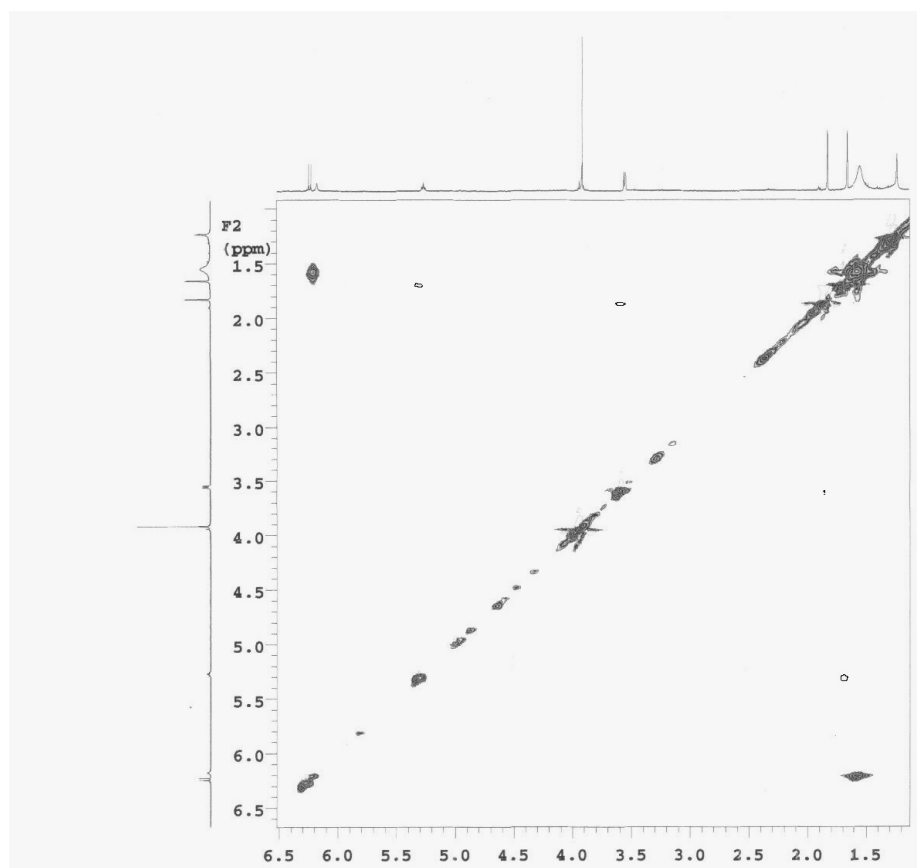


Figura 80. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl₃) de *Rb-3* na região de (1,0 – 6,5 ppm) x (1,0 – 6,5 ppm).

Outras correlações HMBC e NOESY que auxiliaram na confirmação das atribuições feitas aos outros átomos de hidrogênio e carbono da molécula podem ser observadas na Figura 81 (pág. 137).

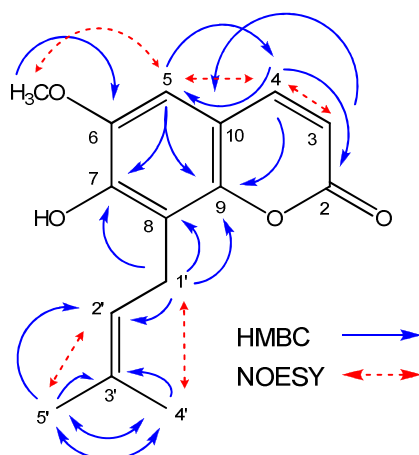


Figura 81. Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY para *Rb-3*.

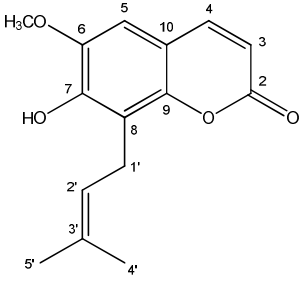
Os deslocamentos químicos e as principais correlações observadas nos espectros de RMN uni e bidimensionais para *Rb-3* estão compilados na Tabela 4 (pág. 137). A Tabela 5 (pág. 138) faz uma comparação dos valores de RMN ^1H e ^{13}C apresentados por esta substância com os dados citados por Simonsen e colaboradores (2004) para cedrelopsina e com os de Um e colaboradores (2003) para isocedrelopsina, um isômero de posição da cedrelopsina, que reforçam a proposta estrutural **(f)** para *Rb-3*.

Tabela 4. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono e hidrogênio da substância *Rb-3*, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3 .

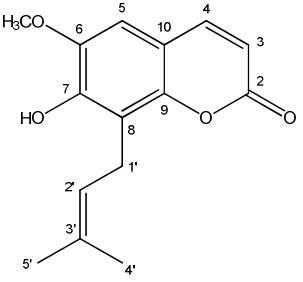
C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_c	δ_H	2J	3J		
2	161,6	-				
3	113,1	6,24 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)			H-4	H-4
4	143,7	7,55 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)		C-2, C-5, C-9	H-3	H-3, H-5
5	105,1	6,70 (<i>s</i> , 1H)		C-4, C-7, C-9		H-4, 6- CH_3
6	143,7	-				
7	147,4	-				
8	116,2	-				
9	148,4	-				
10	111,2	-				
1'	22,2	3,55 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz, 1H)	C-8, C-2'	C-7, C-9, C-3'	H-2', H-5'	H-4'
2'	120,7	5,27 (<i>tq</i> , $J = 1,5$ e 7,5 Hz, 1H)			H-1', H-5'	H-5'
3'	133,2	-				
4'	25,8	1,66 (<i>s</i> , 3H)	C-3'	C-2', C-5'	H-1', H-2'	H-2'
5'	17,9	1,83 (<i>s</i> , 3H)	C-3'	C-2', C-4'		H-1'
6-O CH_3	56,3	3,92 (<i>s</i> , 3H)		C-6		H-5
7-OH	-	6,18 (<i>sl</i> , 1H)				

Legenda: (*s*) simpleto; (*sl*) simpleto largo; (*d*) dupletto; (*tq*) tripleto de quintetos.

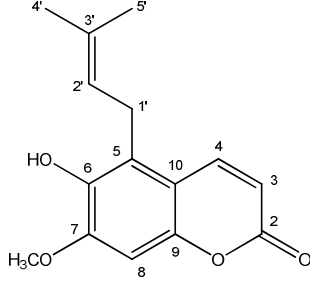
Tabela 5. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Rb-3* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente), de cedrellopsina em $\text{DMSO}-d_6$ (potência não informada) e de isocedrellopsina em CD_3OD (300 e 75 MHz, respectivamente).



Rb-3



Cedrellopsina



Isocedrellopsina

	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
2	161,6	-	160,6	-	163,0	-
3	113,1	6,24 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz)	111,5	6,22 (<i>d</i> , $J = 9,4$ Hz)	111,8	6,25 (<i>d</i> , $J = 9,7$ Hz)
4	143,7	7,55 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz)	144,7	7,90 (<i>d</i> , $J = 9,4$ Hz)	142,7	8,00 (<i>d</i> , $J = 9,7$ Hz)
5	105,1	6,70 (<i>s</i>)	106,7	7,13 (<i>s</i>)	124,1	-
6	143,7	-	144,5	-	149,8	-
7	147,4	-	147,5	-	152,0	-
8	116,2	-	115,3	-	97,5	6,85 (<i>s</i>)
9	148,4	-	148,1	-	149,6	-
10	111,2	-	110,3	-	111,2	-
1'	22,2	3,55 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	21,7	3,41 (<i>d</i> , $J = 7,2$ Hz)	24,3	3,60 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)
2'	120,7	5,27 (<i>tg</i> , $J = 1,5$ e $7,5$ Hz)	121,3	5,17 (<i>tg</i> , $J = 1,4$ e $6,5$ Hz)	122,8	5,09 (<i>t</i> , $J = 6,5$ Hz)
3'	133,2	-	131,5	-	132,0	-
4'	25,8	1,66 (<i>s</i>)	25,4	1,63 (<i>sl</i>)	25,0	1,67 (<i>s</i>)
5'	17,9	1,83 (<i>s</i>)	17,7	1,78 (<i>sl</i>)	17,4	1,82 (<i>s</i>)
6-OCH ₃	56,3	3,92 (<i>s</i>)	56,0	3,85 (<i>s</i>)	55,9	3,95 (<i>s</i>)
7-OH	-	6,18 (<i>sl</i>)	-	9,73 (<i>s</i>)	-	-

Legenda: (*s*) simpleto; (*sl*) simpleto largo; (*d*) duplete; (*tg*) tripleto de quintetos.

Desta forma, a análise dos espectros de IV e RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Rb-3*, bem como, a comparação com os dados da literatura permitiram identificá-la como sendo uma **7-hidroxi-6-metoxi-8-prenilcumarina** (Figura 82, pág. 138), cujo nome trivial é cedrellopsina.

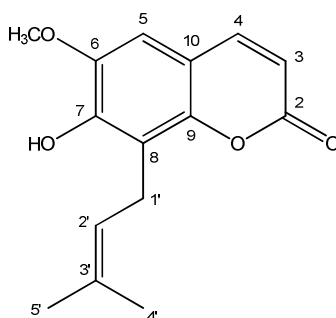


Figura 82. Estrutura química de *Rb-3*: 7-hidroxi-6-metoxi-8-prenilcumarina (cedrellopsina).

Ainda não foi evidenciada nenhuma atividade farmacológica para cedrellopsina. Esta foi citada pela primeira vez como produto natural por Eshiett e colaboradores (1968) a partir de estudo com a espécie *Cedrelopsis grevei*

(Ptaeroxylaceae), mas tem sido isolada de outras espécies pertencentes a outras famílias: *Melicope borbonica* (SIMONSEN et al., 2004), *Citrus grandis* (WU et al., 1988) e *Clausena excavata* (WU et al., 1999) todas da família Rutaceae; *Angelica dahurica* (Umbelliferae) (KOZAWA et al., 1981); *Cneorum pulverulentum* (Cneoraceae) (MONDON et al., 1975); e *Harrisonia perforata* (Simaroubaceae) (TANAKA et al., 1995), sendo este trabalho corresponde ao primeiro relato de cedrelopsina na família Rubiaceae.

5.2.4. Determinação estrutural de Rb-4

Rb-4 foi isolado como um sólido amorfo amarelo com massa de 4,3 mg (0,043 % em relação à massa de fase clorofórmica). Apresentou fluorescência lilás sob UV indicando a presença de grupo cromóforo e ponto de fusão de 140,3 – 141,7 °C.

O espectro de IV (Figura 83, pág. 139), semelhante ao de *Rb-3*, mostrou absorções em 3433 e 1296 cm^{-1} (estiramento de O-H e C-O, respectivamente), bem como, bandas em 1490 e 1570 cm^{-1} (estiramento de $\text{C}=\text{C}_{\text{aromáticos}}$), que sugeriram a presença de hidroxila fenólica. Absorção em 1716 cm^{-1} (estiramento de $\text{C}=\text{O}$) e outra em aproximadamente 1600 cm^{-1} (estiramento de $\text{C}=\text{C}_{\text{alcenos conjugados}}$) são compatíveis com estruturas que apresentam carbonila de éster α,β -insaturada (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).

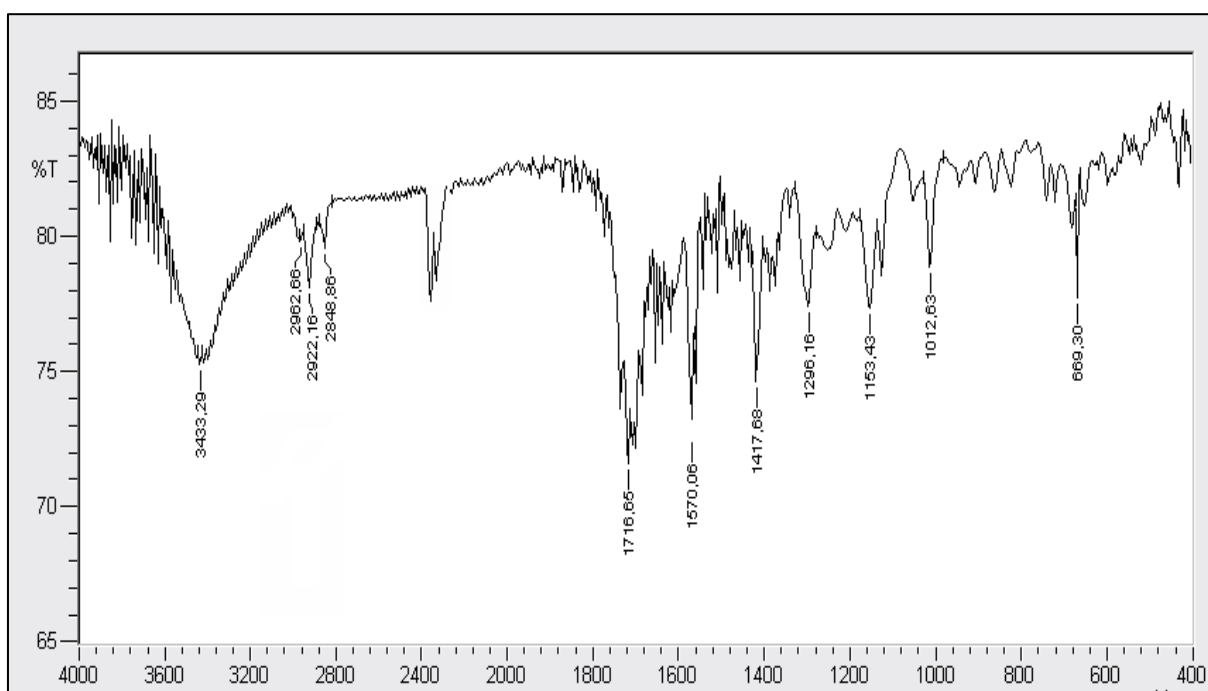
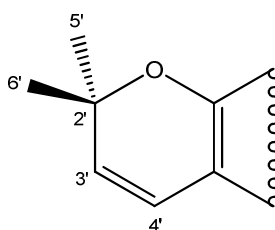


Figura 83. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *Rb-4*.

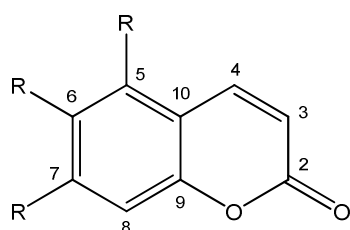
Semelhantemente ao de *Rb-3*, o espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-4* e as expansões (Figura 84 e 85, pág. 141) mostraram um par de dupletos acoplando *cis* em δ_{H} 7,53 ($J = 9,5$ Hz) e 6,24 ($J = 9,5$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H-4 e H-3 de núcleo cumarínico, respectivamente (CHEN et al., 2006; MULHOLLAND et al., 2002; UM et al., 2003), corroborando com o espectro de IV (Figura 83, pág. 139) para a presença de carbonila de ester α,β -insaturada.

Os espectros de RMN ^1H (Figura 84 e 85, pág. 141) também mostraram outros dois dupletos, acoplando *cis* entre si, em δ_{H} 6,87 ($J = 10,5$ Hz, H-4') e 5,72 ($J = 10,5$ Hz, H-3') atribuídos a dois hidrogênios de alceno dissubstituído e um simpleto para seis hidrogênios em δ_{H} 1,50 (H-5'/6'), característicos de hidrogênios de duas metilas alifáticas, que inferiram a presença de um grupo 2,2-dimetilpirano para *Rb-4* (YAMAGUCHI et al., 1989; MULHOLLAND et al., 2002; LASSAK; PINHEY, 1967).

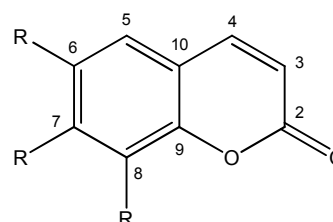


Unidade 2,2-dimetilpirano

Além disso, foi observado um simpleto em δ_{H} 6,84 atribuído a um próton aromático (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001) que também fez sugerir que a cumarina era 5,6,7- ou 6,7,8-trissubstituída. A ausência de outros sinais no espectro de RMN ^1H e as absorções em 3433 e 1296 cm^{-1} observadas no espectro de IV (Figura 83, pág. 139) são compatíveis com a presença de hidroxila como outro substituinte para *Rb-4*.



Cumarina 5,6,7-trissubstituída



Cumarina 5,6,7-trissubstituída

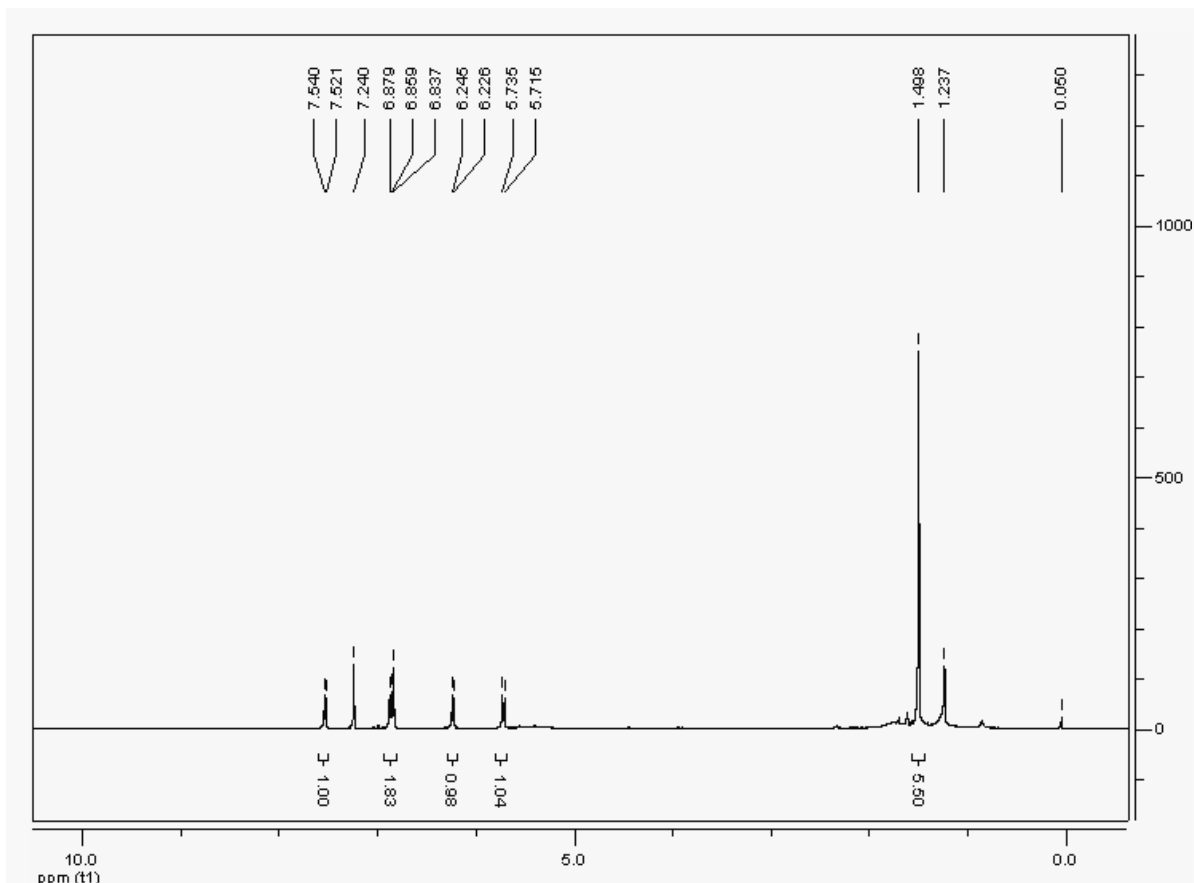


Figura 84. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-4*.

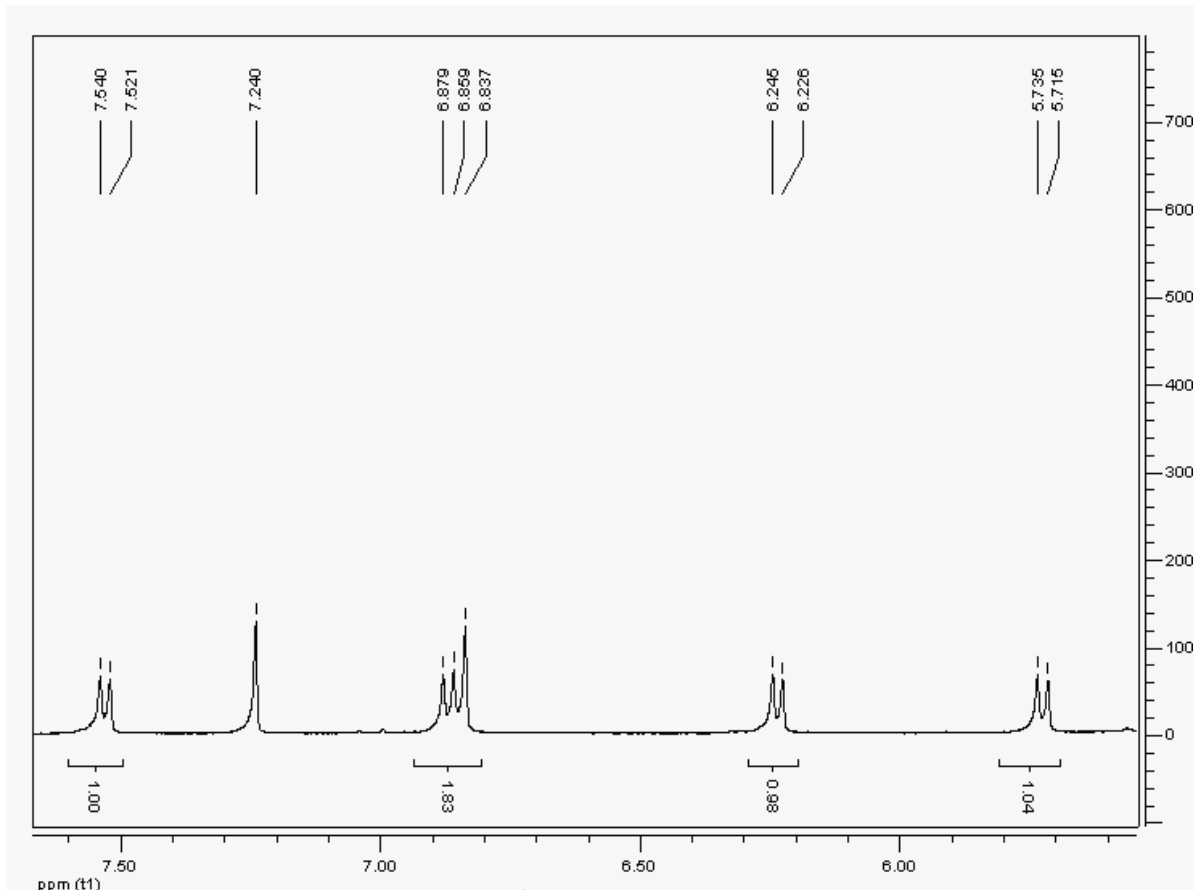


Figura 85. Expansão do espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *Rb-4* na região de 5,6 – 7,6 ppm.

O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) e as expansões (Figura 86 e 87, pág. 142 e 143) apresentaram sinais em δ_{C} 161,1 (C-2), 143,7 (C-4) e 113,6 (C-3) que reforçaram a proposta de esqueleto cumarínico (PELTER et al., 1976) para *Rb-4* oferecida nos espectros de RMN ^1H . Outros sinais em δ_{C} 130,6 (C-3'), 115,4 (C-4'), 78,9 (C-2') e 28,1 (C-5'/6') foram confirmativos de grupo 2,2-dimetilpirano (MULHOLLAND et al., 2002; RANDRIANARIVELOJOSIA; 2005).

O espectro de correlação heteronuclear HMQC e as expansões (Figura 88 e 89, pág. 143 e 144) confirmaram as atribuições feitas a alguns átomos do esqueleto cumarínico e do grupo 2,2-dimetilpirano ao mostrarem correlações entre os sinais dos hidrogênios e seus respectivos carbonos.

O espectro de correlação homonuclear COSY e as expansões (Figura 90, pág. 144) confirmou os acoplamentos observados para os hidrogênios α e β a carbonila e para os hidrogênios H-4' e H-3' do grupo 2,2-dimetilpirano ao mostrar correlações entre os sinais em δ_{H} 7,53 (H-4) e 6,24 (H-3) e entre δ_{H} 6,87 (H-4') e 5,72 (H-3'), respectivamente.

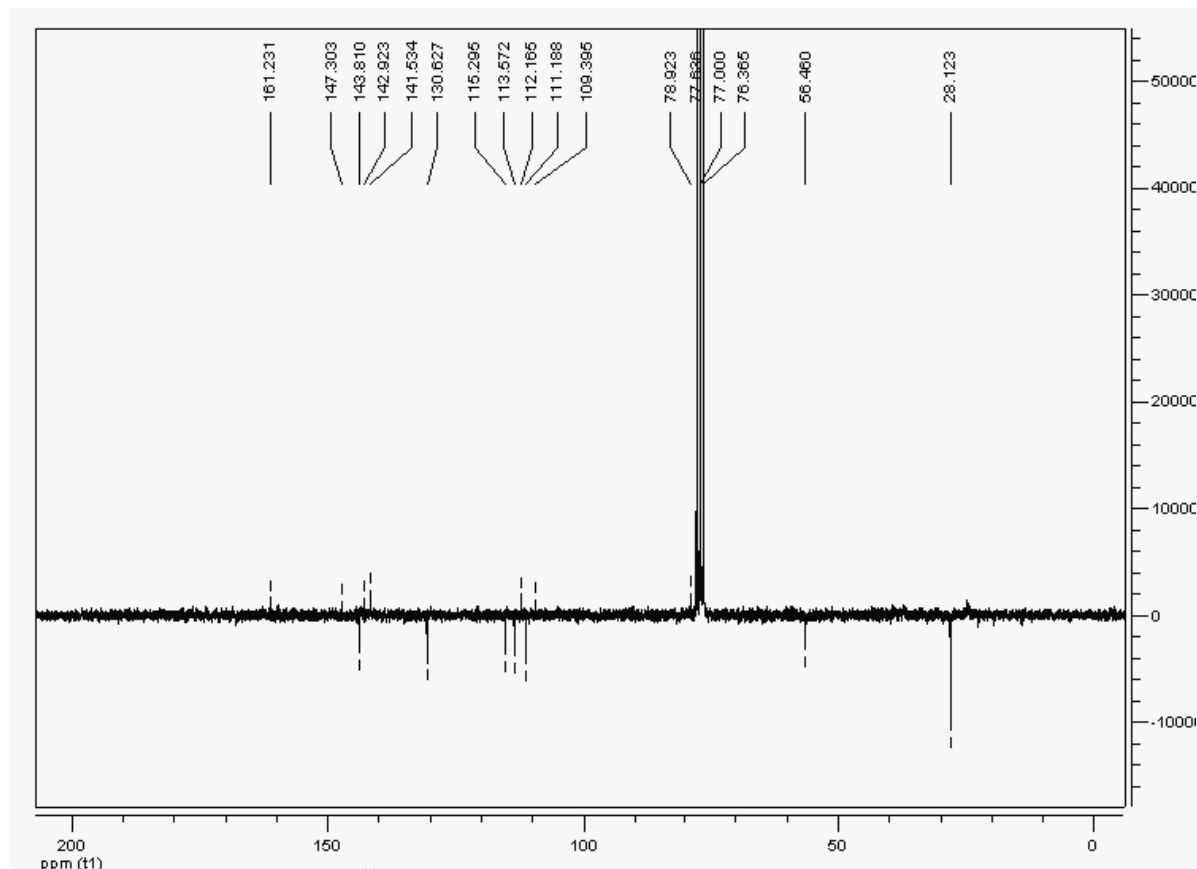


Figura 86. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Rb-4*.

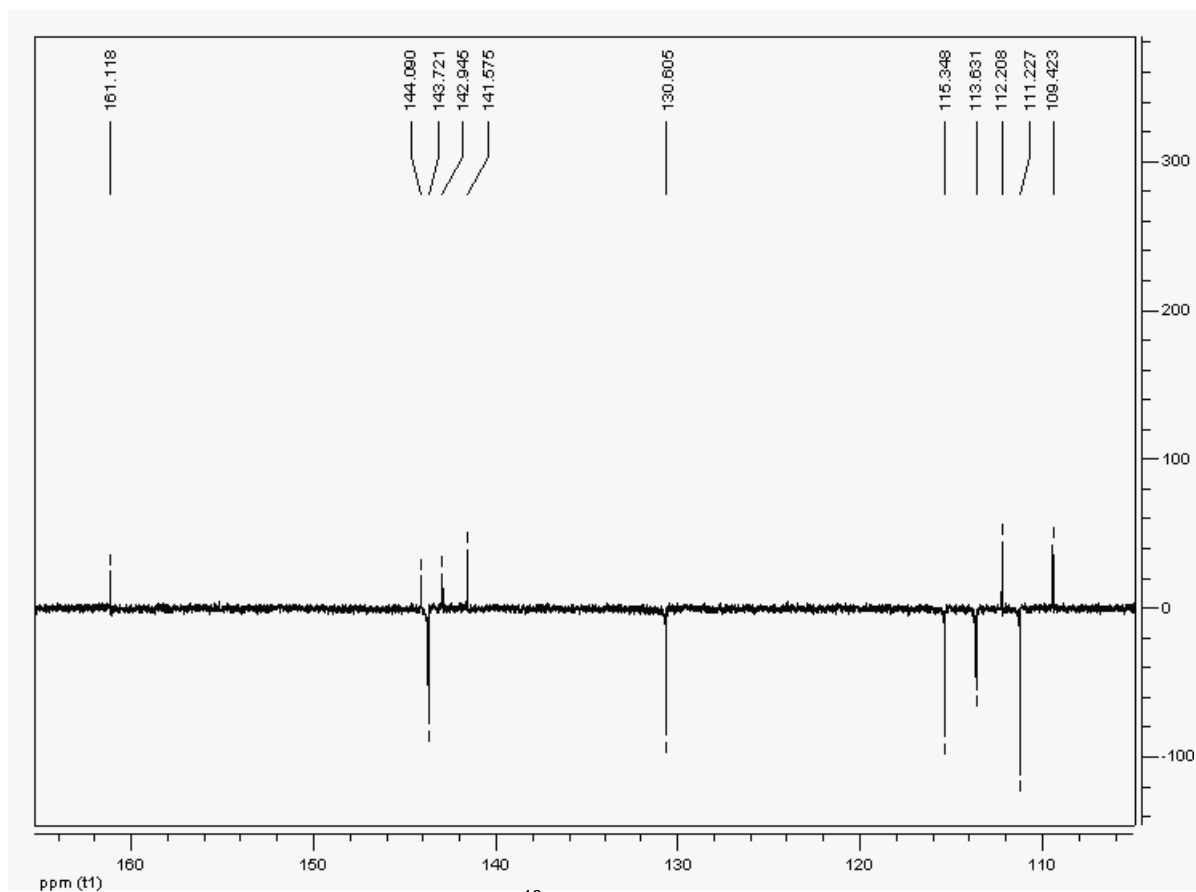


Figura 87. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Rb-4* na região de 104,0 – 164,0 ppm.

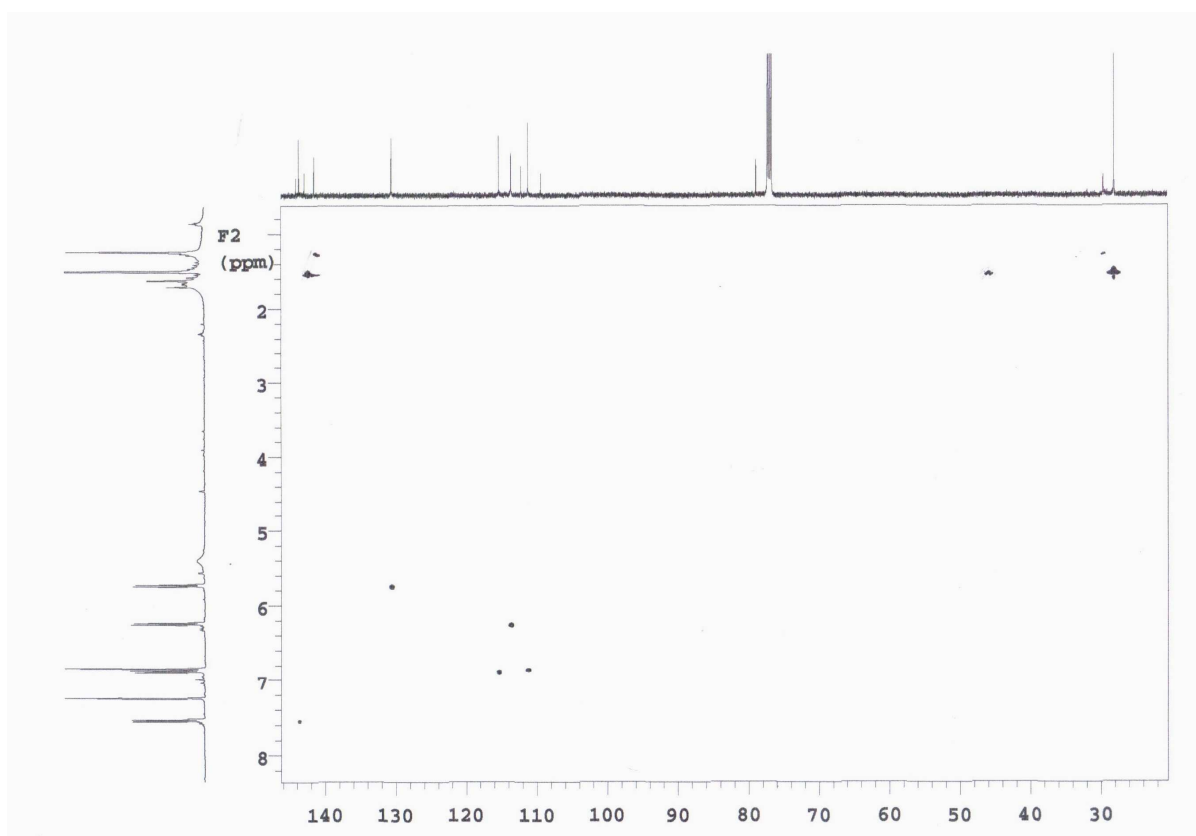


Figura 88. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-4*.

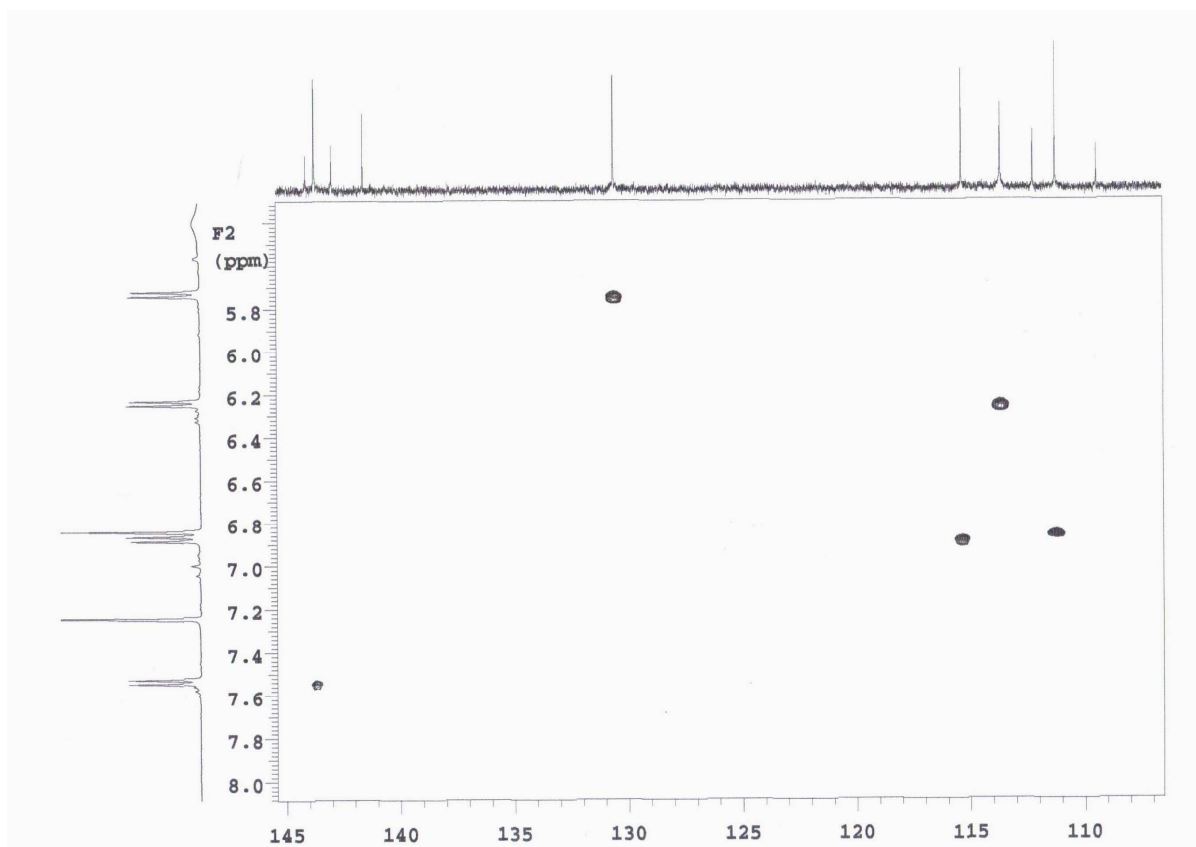


Figura 89. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-4* na região de (5,4 – 8,0 ppm) x (107,0 – 145,0 ppm).

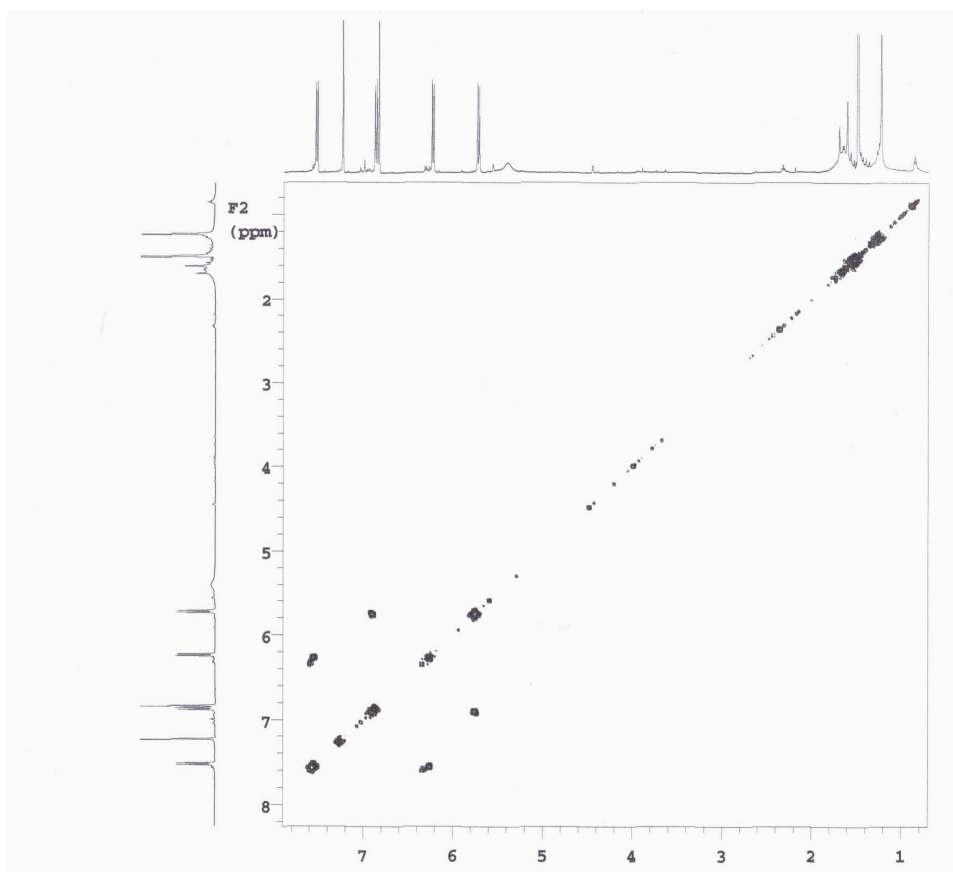
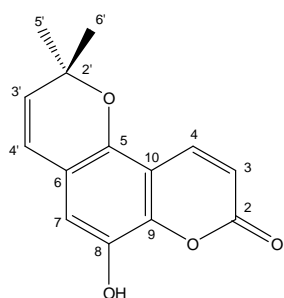
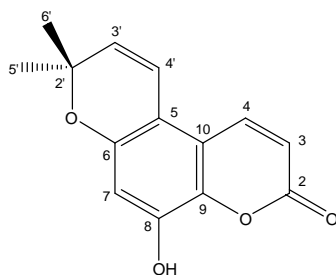


Figura 90. Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-4*.

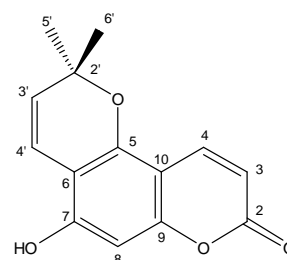
Sendo assim, foi possível sugerir doze possibilidades estruturais para *Rb-4* com hidroxila e grupo 2,2-dimetilpirano inseridos em diferentes posições do anel aromático da cumarina:



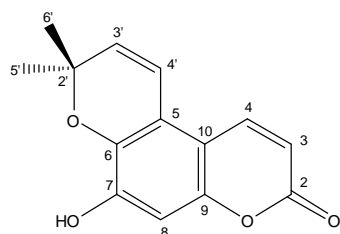
(a)



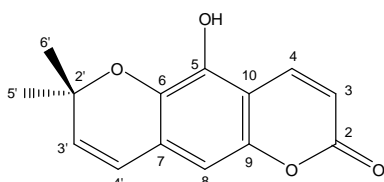
(b)



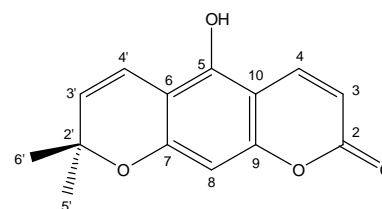
(c)



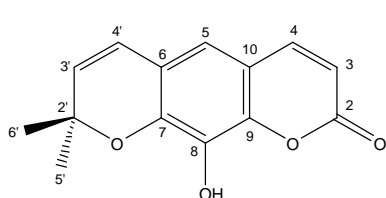
(d)



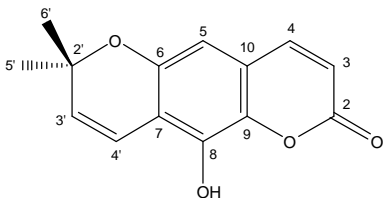
(e)



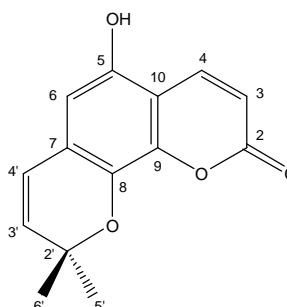
(f)



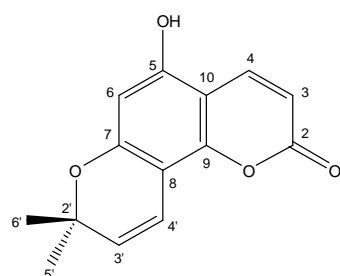
(g)



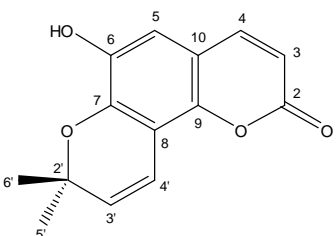
(h)



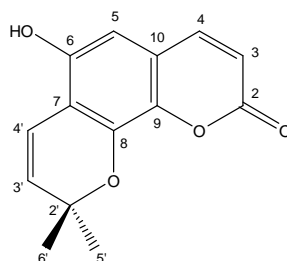
(i)



(j)



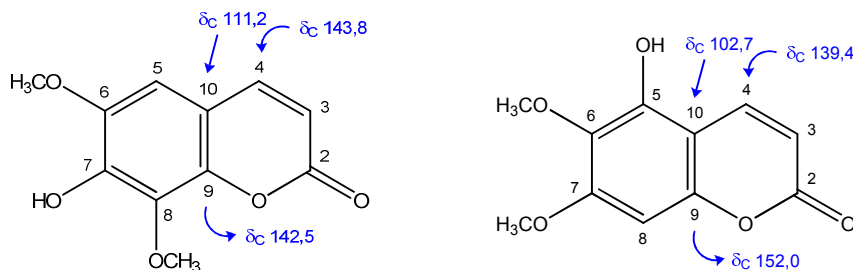
(k)



(l)

Os dados de RMN ^{13}C – APT para C-4 e C-10 do esqueleto cumarínico, quando não existe substituinte oxigenado em C-5, são aproximadamente δ_{C} 143,8 e

111,2, respectivamente (PANICHAYUPAKARANANT et al., 1995). Quando há substituinte oxigenado em C-5, os carbonos C-4 e C-10 sofrem proteção e apresentam deslocamentos químicos em aproximadamente δ_C 139,4 e 102,7, respectivamente (HAMMODA et al., 2008).



O espectro de correlação heteronuclear HMBC de *Rb-4* e as expansões (Figura 91, 92, 93 e 94, pág. 147 e 148) mostraram uma correlação a 3J entre δ_H 6,24 (H-3) e o sinal em δ_C 112,2, atribuído a C-10, que inferiu a inexistência de substituinte oxigenado em C-8, eliminando as propostas estruturais **(a)**, **(c)**, **(e)**, **(f)**, **(i)** e **(j)**.

Quando o carbono C-8 apresenta substituinte oxigenado (ver acima), o deslocamento químico de C-9 é aproximadamente δ_C 142,5 (PANICHAYUPAKARANANT et al., 1995); na ausência do mesmo, é δ_C 152,0 (HAMMODA et al., 2008). No espectro HMBC (Figura 91, 92 e 93, pág. 147 e 148), uma correlação a 3J entre δ_H 7,53 (H-4) e o sinal em δ_C 144,1, atribuído ao carbono C-9, indicou que C-8 não apresenta substituinte oxigenado e eliminou as propostas **(b)**, **(g)**, **(h)** e **(l)**.

Uma correlação HMBC (Figura 91 e 92, pág. 147) a 3J entre δ_H 7,53 (H-4) e o sinal em δ_C 111,2 (C-5) em conjunto com a correlação HMQC (Figura 88 e 89, pág. 143 e 144) entre δ_H 6,84 (H-5) e o sinal em δ_C 111,2 (C-5) foram sugestivos da presença de hidrogênio em C-5, descartando a possibilidade estrutural **(d)**, já que o hidrogênio da mesma encontra-se localizado em C-8. Isto foi corroborado pelo espectro de correlação espacial NOESY (Figura 95, pág. 149) que mostrou uma correlação entre δ_H 7,53 (H-4) e o sinal para o hidrogênio H-5 em δ_H 6,84.

Os espectros HMBC também apresentaram uma correlação a 3J entre δ_H 6,84 (H-5) e o sinal em δ_C 142,9, atribuído ao carbono C-7, e deste com o hidrogênio H-4' do grupo 2,2-dimetilpirano em δ_H 6,87 a 3J que permitiram conectar este grupo nas posições C-7 e C-8 do anel cumarínico, e conseqüentemente, a hidroxila em C-6, confirmando a proposta estrutural **(k)** para *Rb-4*.

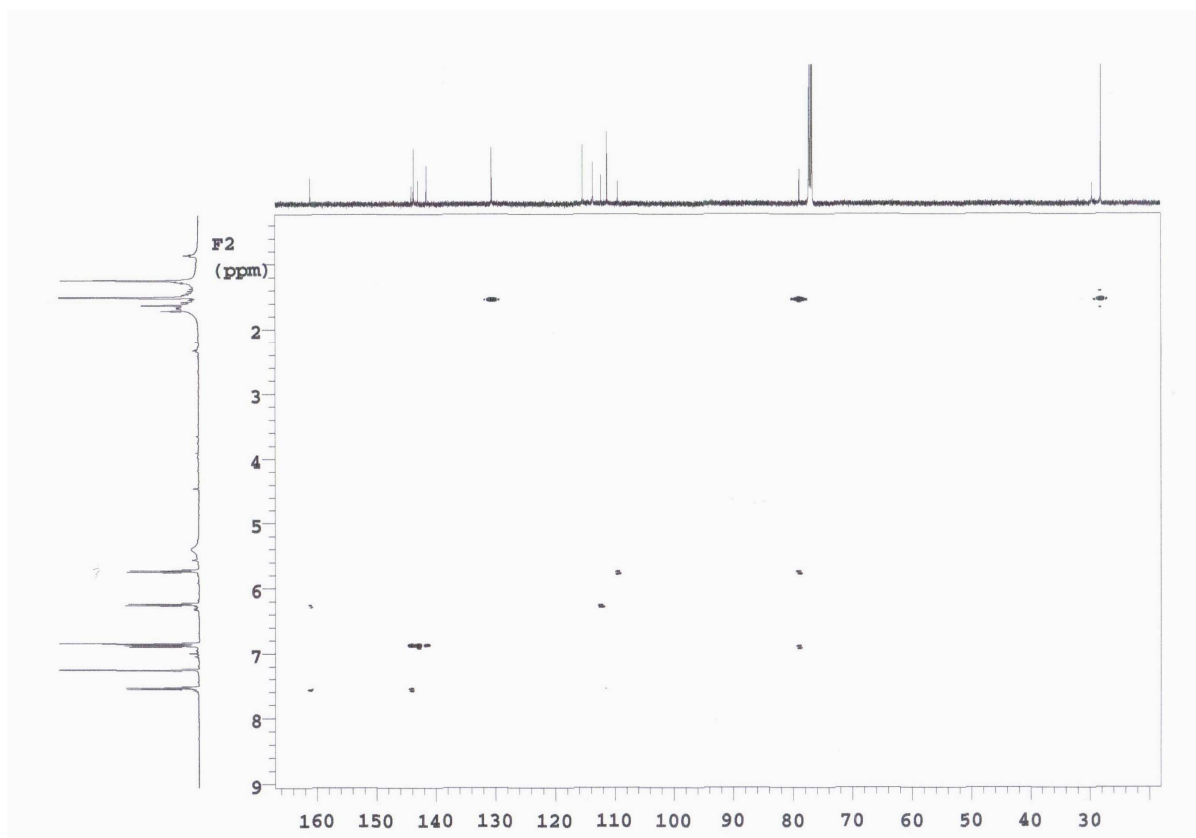


Figura 91. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-4*.

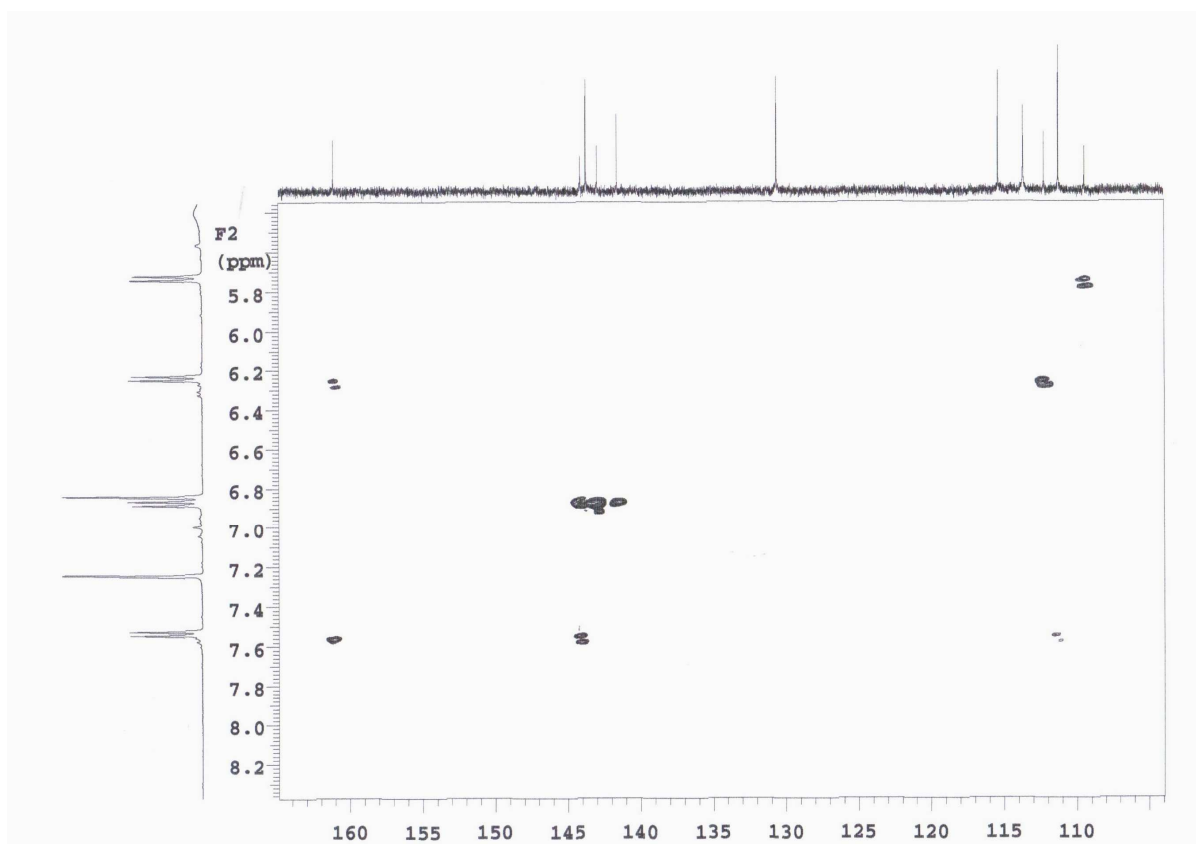


Figura 92. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-4* na região de (5,4 – 8,3 ppm) x (105,0 – 160,0 ppm).

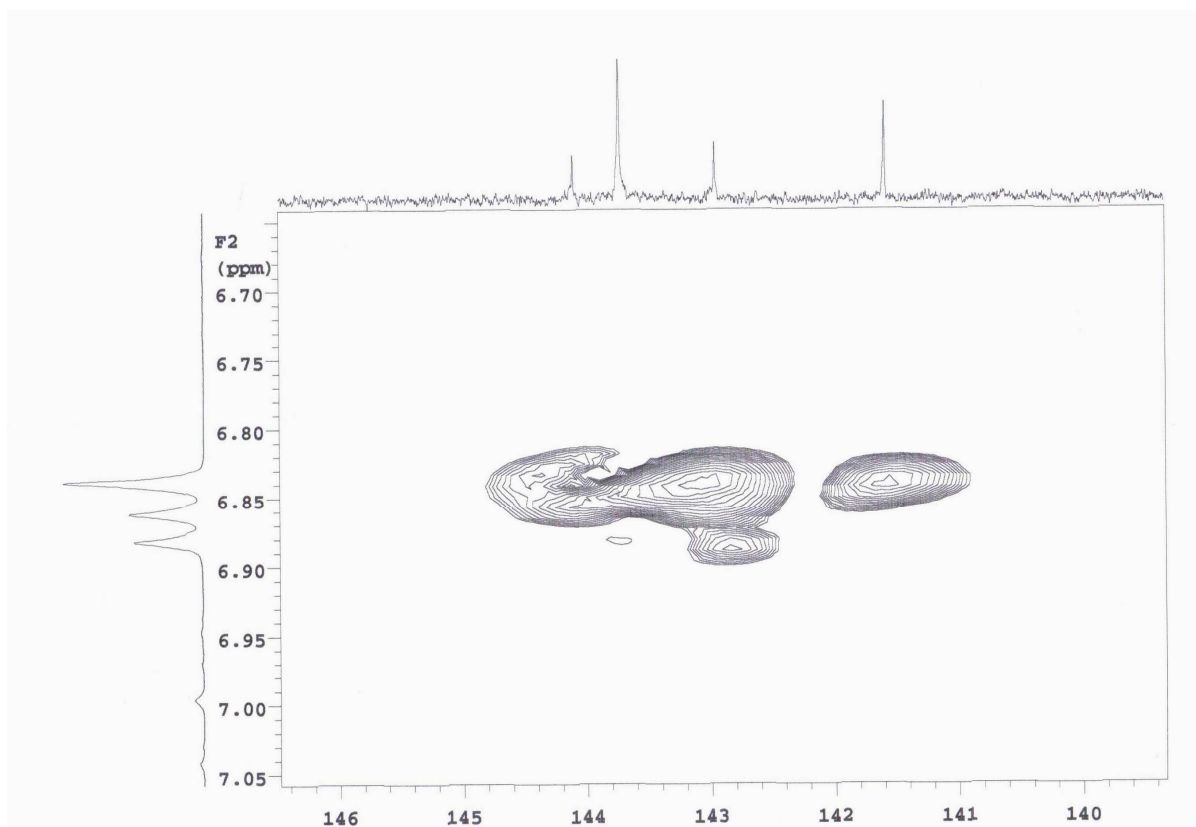


Figura 93. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-4* na região de (6,7 – 7,0 ppm) x (140,5 – 146,5 ppm).

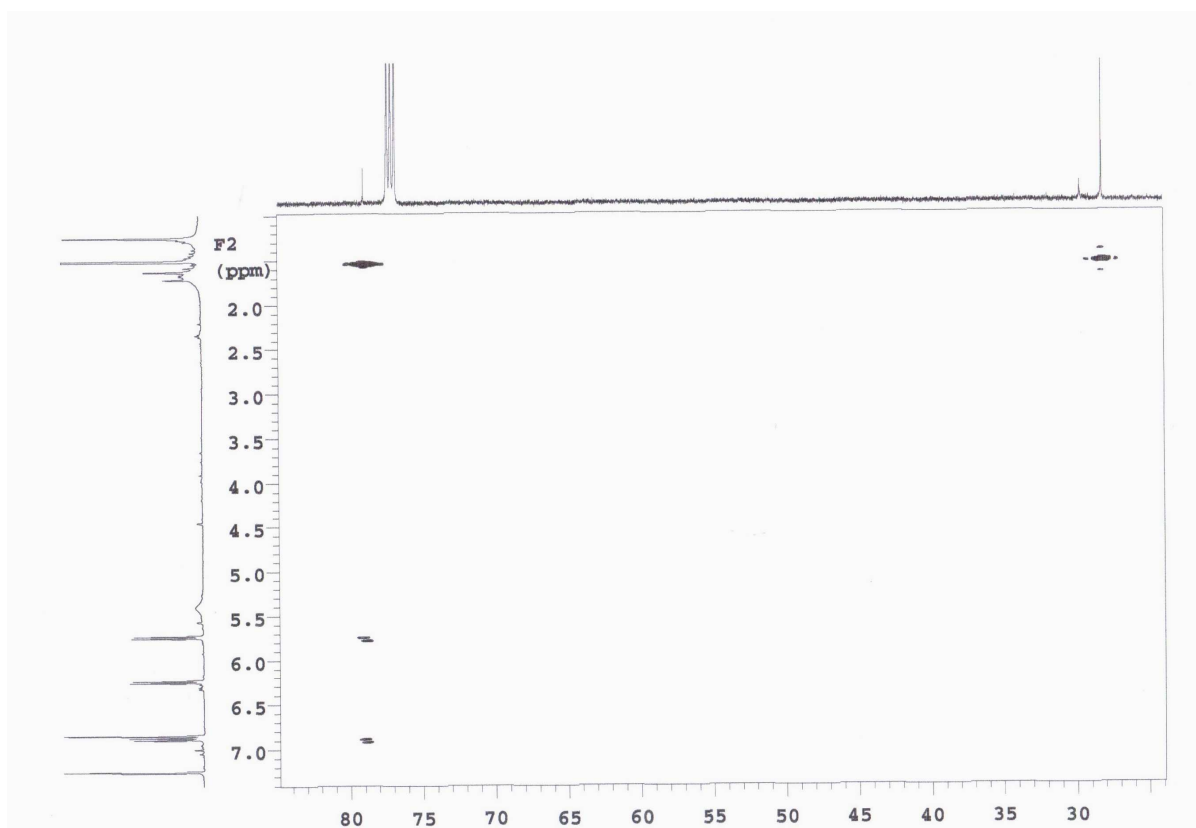


Figura 94. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-4* na região de (1,0 – 7,5 ppm) x (25,0 – 85,0 ppm).

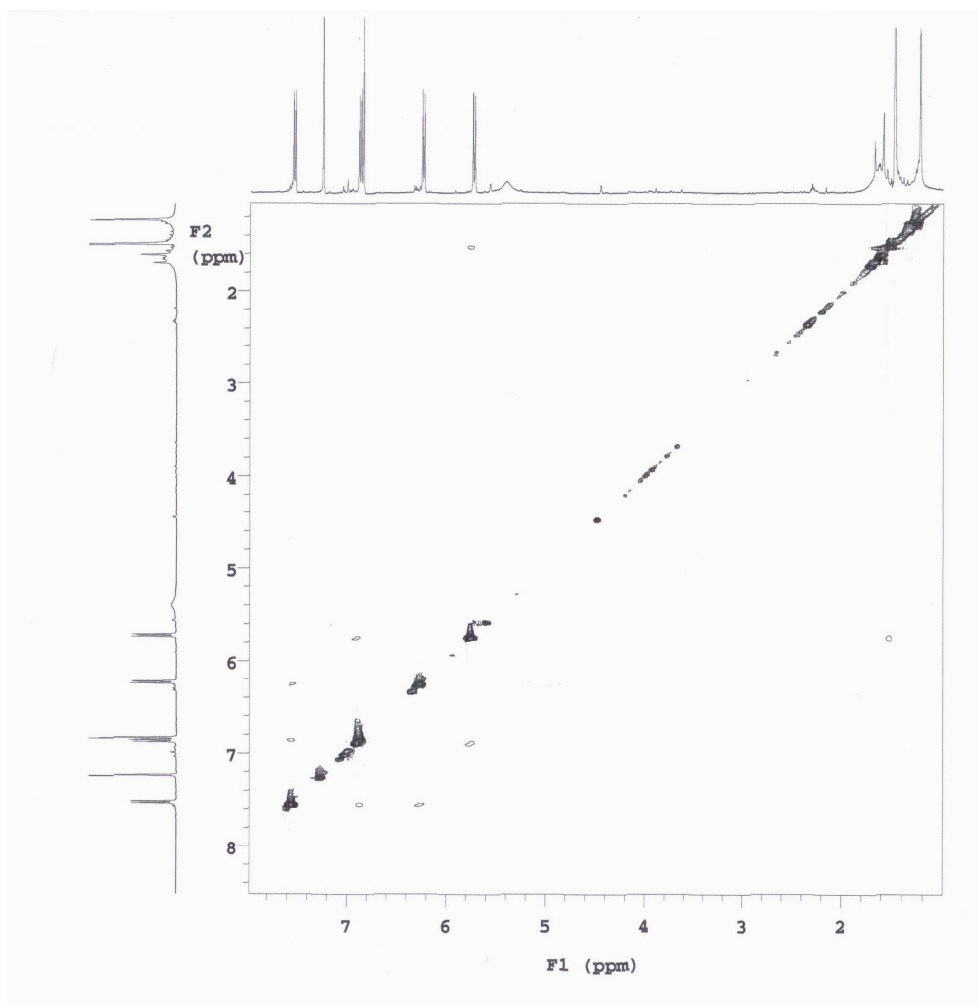


Figura 95. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-4*.

As correlações HMBC e NOESY citadas no texto e outras HMBC que auxiliaram na confirmação das atribuições feitas aos outros átomos de hidrogênio e carbono da molécula podem ser observadas na Figura 96 (pág. 149). Na Tabela 6 (pág. 150) estão compilados os deslocamentos químicos e as correlações observadas nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais para *Rb-4*.

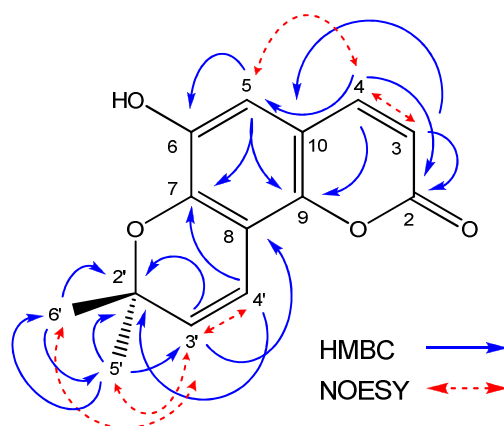


Figura 96. Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY para *Rb-4*.

Tabela 6. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono e hidrogênio da substância *Rb-4*, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3 .

C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_{C}	δ_{H}	2J	3J		
2	161,1	-				
3	113,6	6,24 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)	C-2	C-10	H-4	H-4
4	143,7	7,53 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)		C-2, C-5, C-9	H-3	H-3, H-5
5	111,2	6,84 (<i>s</i> , 1H)	C-6	C-7, C-9		H-4
6	141,6	-				
7	142,9	-				
8	109,4	-				
9	144,1	-				
10	112,2	-				
2'	78,9	-			H-1', H-5'	H-5'
3'	130,6	5,72 (<i>d</i> , $J = 10,5$ Hz, 1H)	C-2'	C-8	H-4'	H-4', H-5', H-6'
4'	115,4	6,87 (<i>d</i> , $J = 10,5$ Hz, 1H)		C-2', C-7	H-3'	H-3'
5'	28,1	1,50 (<i>s</i> , 3H)	C-2'	C-3', C-6'		H-3'
6'	28,1	1,50 (<i>s</i> , 3H)	C-2'	C-3', C-5'		H-3'

Legenda: (*s*) simples; (*d*) duplo.

A Tabela 7 (pág. 150) faz uma comparação dos valores de RMN ^1H e ^{13}C apresentados por esta substância com os dados citados Mulholland e colaboradores (2002) para cedrecumarina A, um isômero de posição de norbraylina, que reforçam a proposta estrutural (**k**) para *Rb-4*.

Tabela 7. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Rb-4* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de cedrecumarina A em CD_3OD (300 e 100 MHz, respectivamente).

C	<i>Rb-4</i>		Cedrecumarina A	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	161,1	-	162,5	-
3	113,6	6,24 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz)	111,4	6,19 (<i>d</i> , $J = 9,7$ Hz)
4	143,7	7,53 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz)	140,3	8,08 (<i>d</i> , $J = 9,7$ Hz)
5	111,2	6,84 (<i>s</i>)	117,6	-
6	141,6	-	137,8	-
7	142,9	-	150,0	-
8	109,4	-	102,6	6,63 (<i>s</i>)
9	144,1	-	150,4	-
10	112,2	-	107,3	-
2'	78,9	-	76,5	-
3'	130,6	5,72 (<i>d</i> , $J = 10,5$ Hz)	133,5	5,90 (<i>d</i> , $J = 10,0$ Hz)
4'	115,4	6,87 (<i>d</i> , $J = 10,5$ Hz)	116,7	6,79 (<i>d</i> , $J = 10,0$ Hz)
5'	28,1	1,50 (<i>s</i>)	26,3	1,43 (<i>s</i>)
6'	28,1	1,50 (<i>s</i>)	26,3	1,43 (<i>s</i>)

Legenda: (*s*) simples; (*d*) duplo.

Desta forma, a análise dos espectros de IV e RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Rb-4*, bem como, a comparação com os dados da literatura permitiram identificá-la como sendo uma piranocumarina angular, a **6-hidroxi-7,8-(2',2'-dimetilpirano)cumarina**, cujo nome trivial é norbraylina (Figura 97, pág. 151).

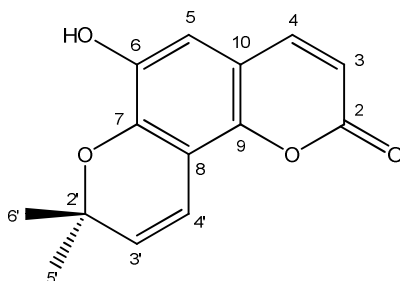


Figura 97. Estrutura química de *Rb-4*: 6-hidroxi-7,8-(2',2'-dimetilpirano)cumarina (norbraylina).

Norbraylina foi isolada pela primeira vez da espécie *Toddalia aculeata* (Rutaceae) (DESHMUKH et al., 1976; REISH; STROBEL, 1982) mas também já foi extraída de *Acronychia laurifolia* (também da família Rutaceae) (RAHMAN et al., 1996), *Coriaria nepalensis* (Coriariaceae) (SHEN et al., 2006; WEI et al., 2002) e *Cedrelopsis longibracteata* (Ptaeroxylaceae) (RANDRIANARIVELOJOSIA et al., 2005). Também foi isolada por fracionamento biomonitorado de *Cedrelopsis grevei* indicando possível participação na atividade vasorelaxante observada para o extrato (RAKOTOARISON et al., 2005) mas este trabalho corresponde ao primeiro relato de norbraylina na família Rubiaceae.

5.2.5. Determinação estrutural de *Rb-5*

A substância *Rb-5* também foi isolada como um sólido amorfo amarelo com massa de 1,5 mg (correspondendo a 0,015 % em relação à massa da fase clorofórmica) e apresentou fluorescência lilás sob UV.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3) de *Rb-5* e as expansões (Figura 98, 99, 100 e 101, pág. 152, 153 e 154) mostraram sinais semelhantes aos de *Rb-4* (Tabela 8, pág. 152) que inferiu um núcleo dimetilpiranocumarina também para *Rb-5*. Em adição, um simpleto para três hidrogênios em δ_{H} 3,95 e seu correspondente sinal para carbono em δ_{C} 56,5, observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente, fizeram sugerir a presença de metoxila não impedida estericamente e que *Rb-5* tratava-se de um derivado da substância *Rb-4* metoxilado em C-6.

Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Rb-5* em CDCl_3 (200 e 50 MHz, respectivamente), *Rb-4* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de braylina em CD_3OD (300 e 100 MHz, respectivamente).

C

	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	161,2	-	161,1	-	163,4	-
3	113,6	6,24 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,6 Hz)	113,6	6,24 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	113,4	6,29 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
4	143,8	7,54 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,6 Hz)	143,7	7,53 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	146,3	7,88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
5	111,2	6,84 (<i>s</i>)	111,2	6,84 (<i>s</i>)	110,5	7,10 (<i>s</i>)
6	141,5	-	141,6	-	146,6	-
7	142,9	-	142,9	-	147,3	-
8	109,4	-	109,4	-	111,1	-
9	147,3	-	144,1	-	146,7	-
10	112,2	-	112,2	-	113,2	-
2'	78,9	-	78,9	-	76,5	-
3'	130,6	5,72 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,2 Hz)	130,6	5,72 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,5 Hz)	132,5	5,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,1 Hz)
4'	115,3	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,2 Hz)	115,4	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,5 Hz)	115,7	6,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10,1 Hz)
5'	28,1	1,49 (<i>s</i>)	28,1	1,50 (<i>s</i>)	28,1	1,51 (<i>s</i>)
6'	28,1	1,49 (<i>s</i>)	28,1	1,50 (<i>s</i>)	28,1	1,51 (<i>s</i>)
6-OCH ₃	56,5	3,95 (<i>s</i>)	-	-	56,9	3,91 (<i>s</i>)

Legenda: (*s*) simpleto; (*d*) dupleto.

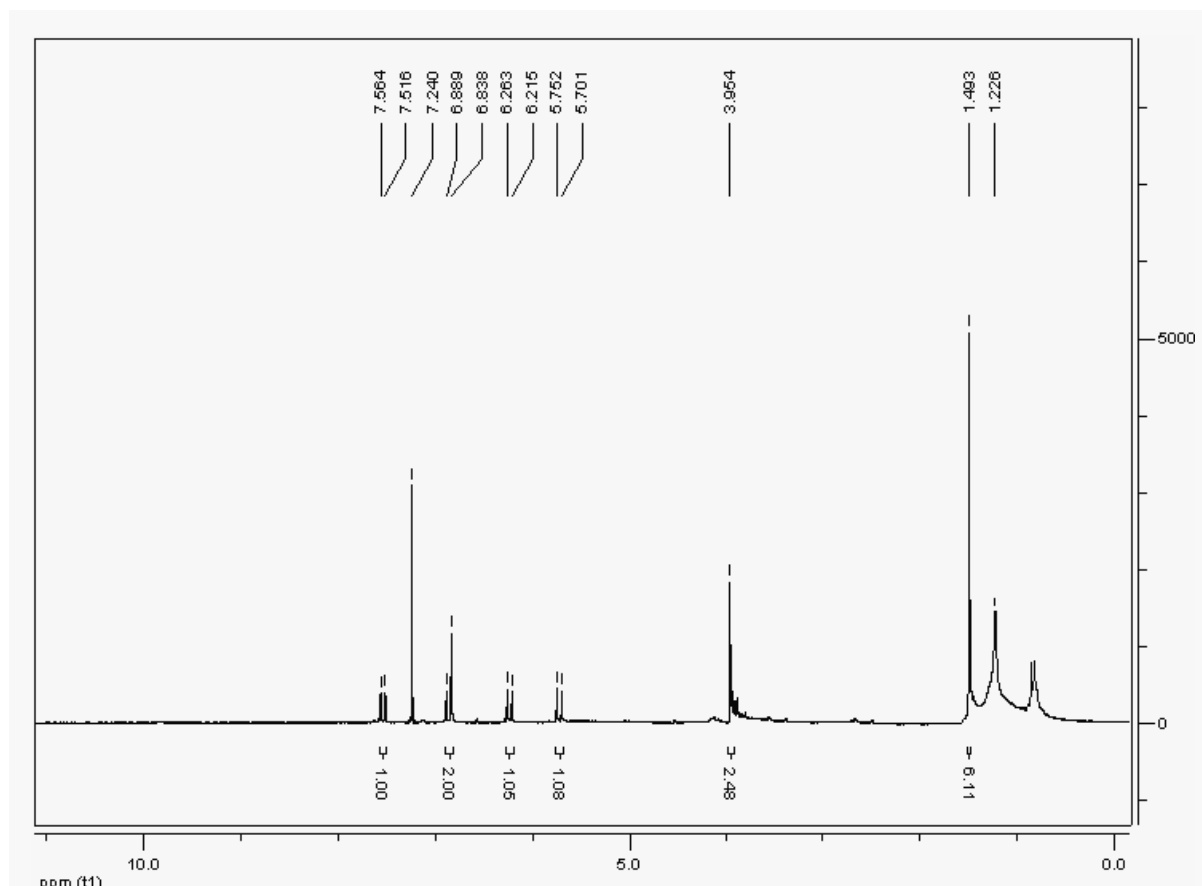


Figura 98. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *Rb-5*.

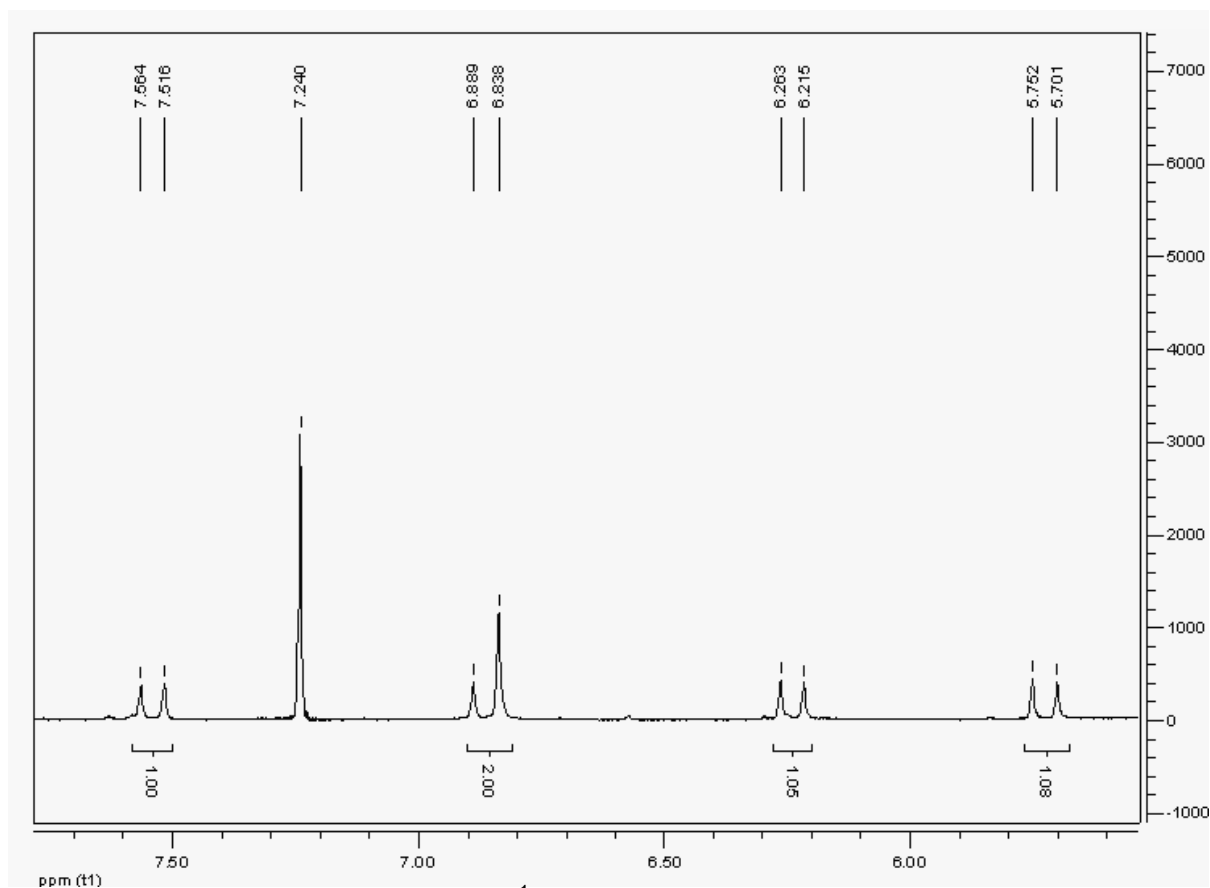


Figura 99. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *Rb-5* na região de 5,6 – 7,7 ppm.

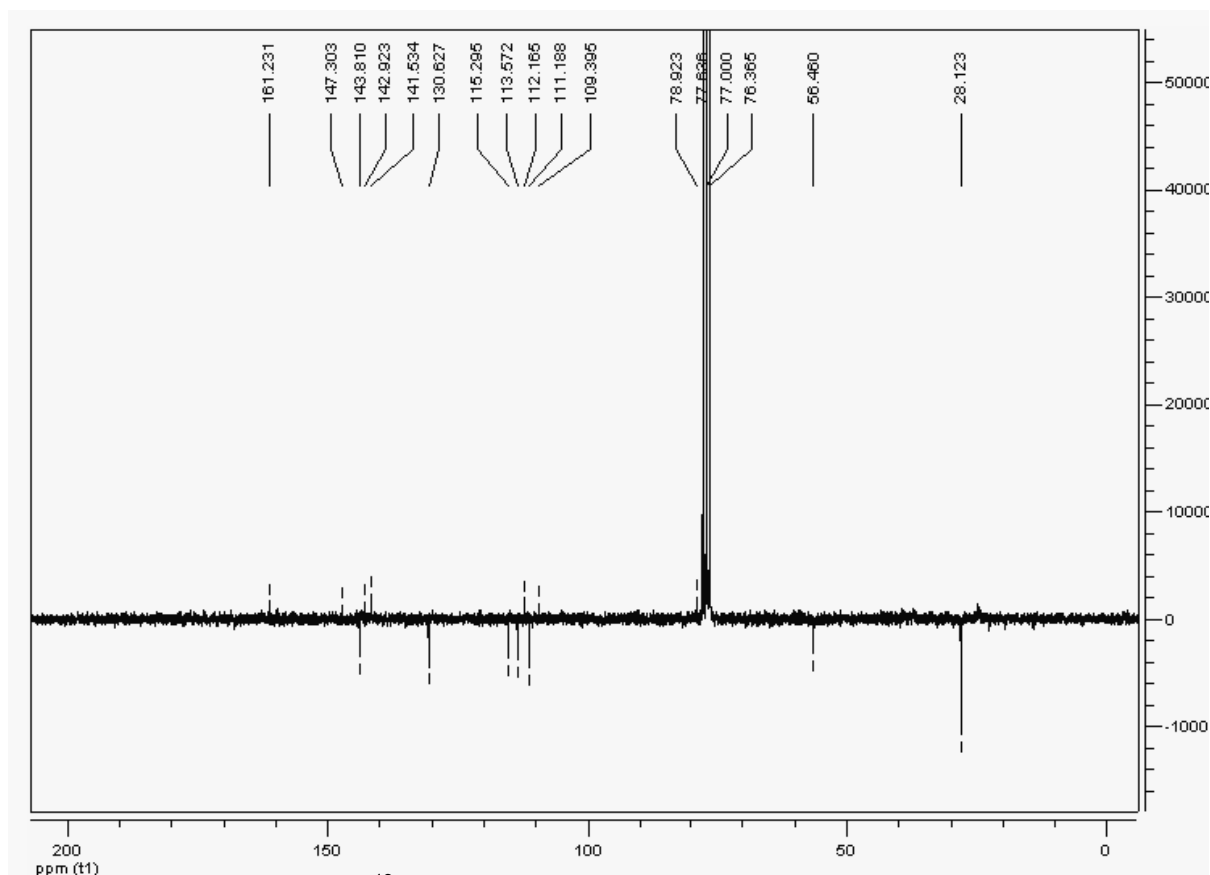


Figura 100. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de *Rb-5*.

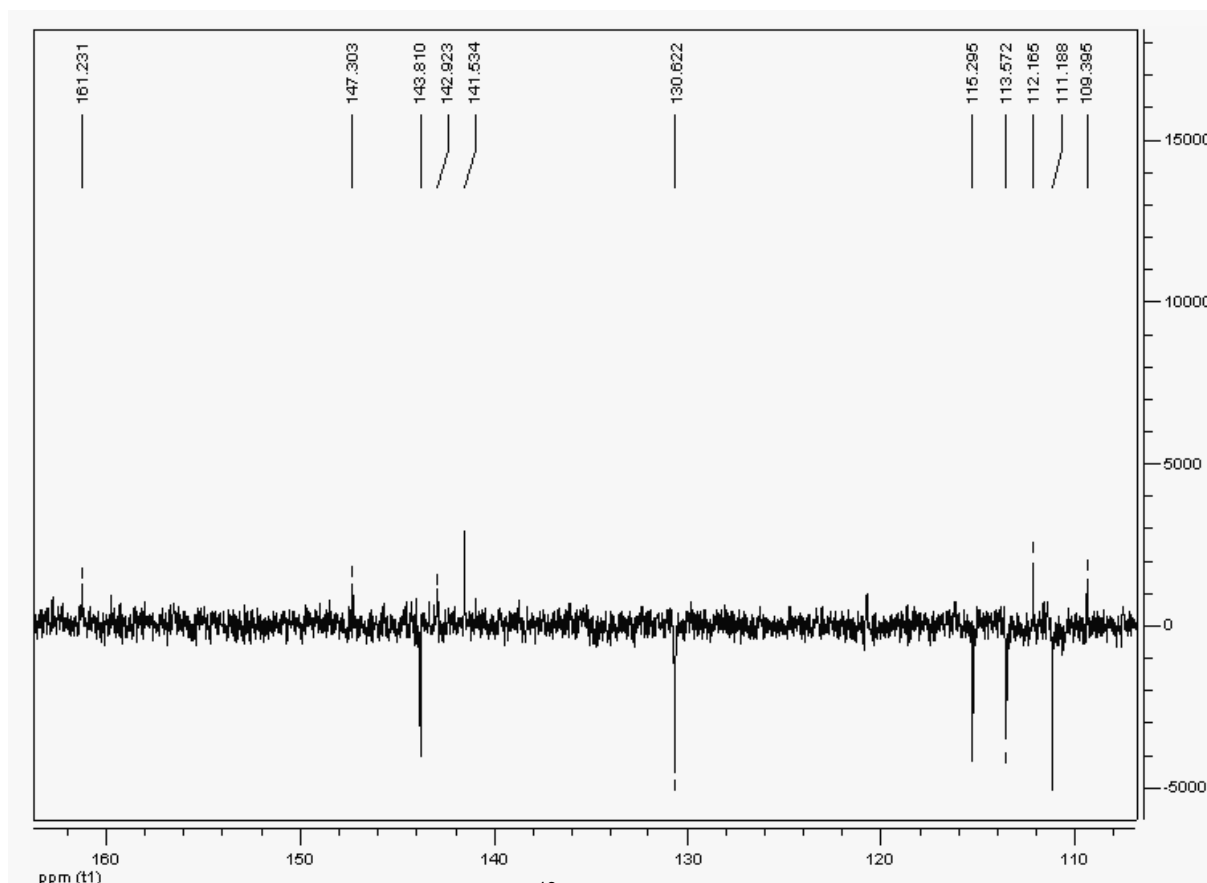


Figura 101. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de *Rb-5* na região de 106,0 – 164,0 ppm.

Sendo assim, a análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais de *Rb-5*, bem como, a comparação com os dados apresentados por *Rb-4* e os dados citados por Randrianarivelosoa e colaboradores (2005) (Tabela 8, pág. 152) permitiram identificá-la como sendo a **6-metoxi-7,8-(2',2'-dimetilpirano)cumarina**, mais conhecida por braylina (Figura 102, pág. 154).

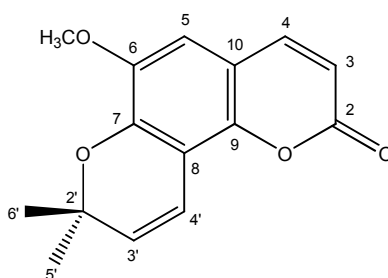


Figura 102. Estrutura química de *Rb-5*: 6-metoxi-7,8-(2',2'-dimetilpirano)cumarina (braylina).

Braylina é uma substância bastante encontrada em espécies da família Rutaceae (DESHMUKH et al., 1976; RAHMAN et al., 1996), no entanto, há relatos de sua presença em espécies da família Coriariaceae (SHEN et al., 2006),

Ptaeroxylaceae (RANDRIANARIVELOJOSIA et al., 2005) e também Meyanthaceae (ADAMCZYK et al., 1990), mas nenhum para Rubiaceae, sendo então, um resultado importante do ponto de vista quimiotaxonômico. Estudo realizado por Adamczyk e colaboradores (1990) mostrou potente atividade inibitória da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico e os ensaios biomonitorados feitos por Tsai e colaboradores (1998) utilizando *Cedrelopsis grevei* indicou possível participação na atividade vasorrelaxante uma vez que a substância foi isolada de frações que apresentaram tal atividade (RAKOTOARISON et al., 2005).

5.2.6. Determinação estrutural de Rb-6

A substância *Rb-6* foi obtida na forma de um sólido amorfo branco com massa de 9,4 mg (correspondendo a 0,094 % em relação à massa da fase clorofórmica), apresentando fluorescência lilás em UV e ponto de fusão de 106,5 – 109,2 °C.

Semelhantemente a *Rb-3* e *Rb-4*, o espectro de IV (Figura 103, pág. 155) de *Rb-5* mostrou absorções em 1716 e 1608 cm^{-1} que são compatíveis com carbonila de éster α,β -insaturada. Banda em 1300 – 1000 cm^{-1} de estiramento de C-O corroborou com a proposta de função éster para a molécula, além disso, exibiu bandas em 1585 e 1477 cm^{-1} sugerindo um sistema aromático (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).

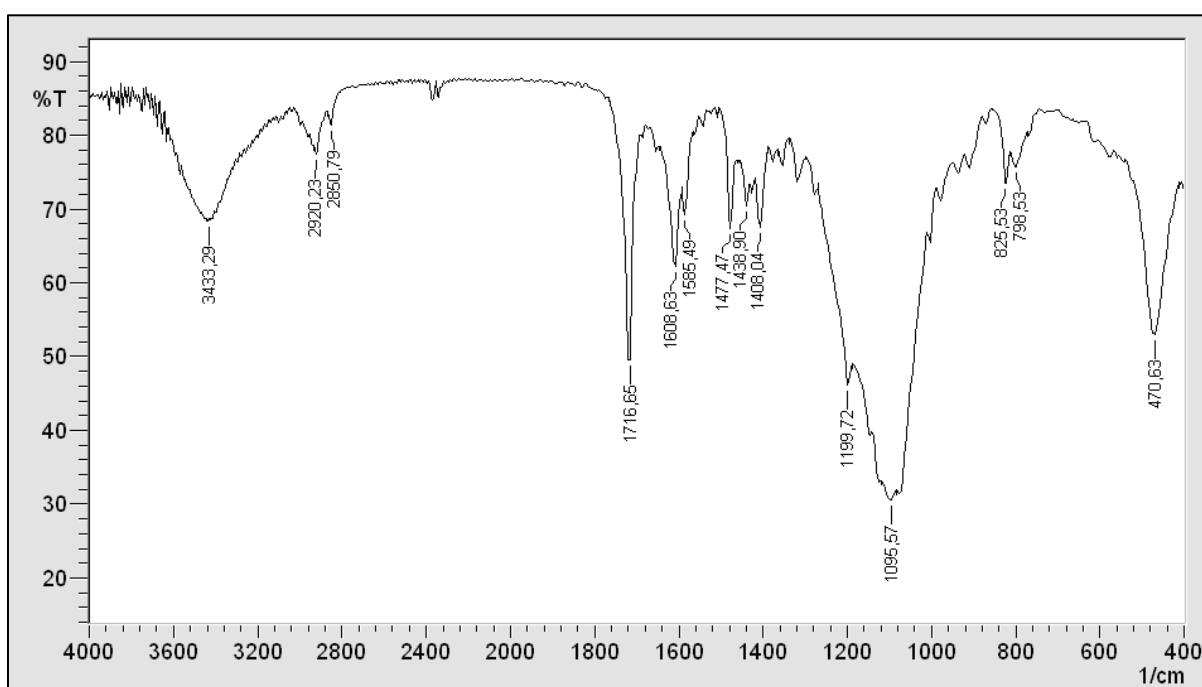
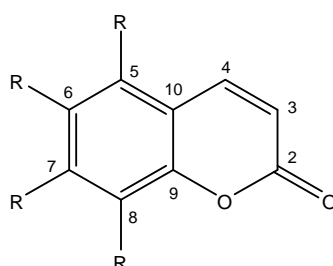


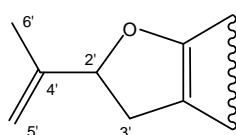
Figura 103. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *Rb-6*.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-6* e as expansões (Figura 104, 105 e 106, pág. 157 e 158) também apresentaram deslocamentos químicos característicos de esqueleto cumarínico, δ_{H} 7,89 (*d*, $J = 9,5$ Hz, H-4) e 6,14 (*d*, $J = 9,5$ Hz, H-3) (MULHOLLAND et al., 2002; UM et al., 2003; VASCONCELOS et al., 1998), o que explica as absorções apresentadas no espectro de IV (Figura 103, pág. 155). No entanto, diferentemente de *Rb-3*, *Rb-4* e *Rb-5*, a ausência de sinais para prótons aromáticos fez sugerir que a cumarina era totalmente substituída no anel em questão:



Esqueleto cumarínico 5,6,7,8-tetrassubstituído

Além disso, os espectros de RMN ^1H (Figura 104, 105 e 106, pág. 157 e 158) mostraram dois duplo-dupletos em δ_{H} 3,18 ($J = 7,5$ e 15,0 Hz, H-3') e 3,53 ($J = 9,5$ e 15,0 Hz, H-3') característicos de hidrogênios metilênicos geminais; um tripleto em δ_{H} 5,31 ($J = 9,0$ Hz, H-2') para hidrogênio oximetínico alílico; dois simpletos largos em δ_{H} 4,96 (H-5') e 5,11 (H-5') compatíveis com hidrogênios de grupo vinila terminal; e outro simpleto em δ_{H} 1,78 (H-6') de hidrogênios metil alílico. Todos estes dados foram consistentes com a proposta para presença de unidade 2-isopropenil-2,3-diidrofurano para *Rb-5* (CHEN et al., 2006; GAOXIONG et al., 1990; MALIKOV; SAIDKHODZHAEV, 1998). Também apresentou dois simpletos com integral para três hidrogênios cada em δ_{H} 3,91 e 3,96 que foram sugestivos de presença de duas metoxilas para a molécula (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).



Unidade 2-isopropenil-2,3-diidrofurano

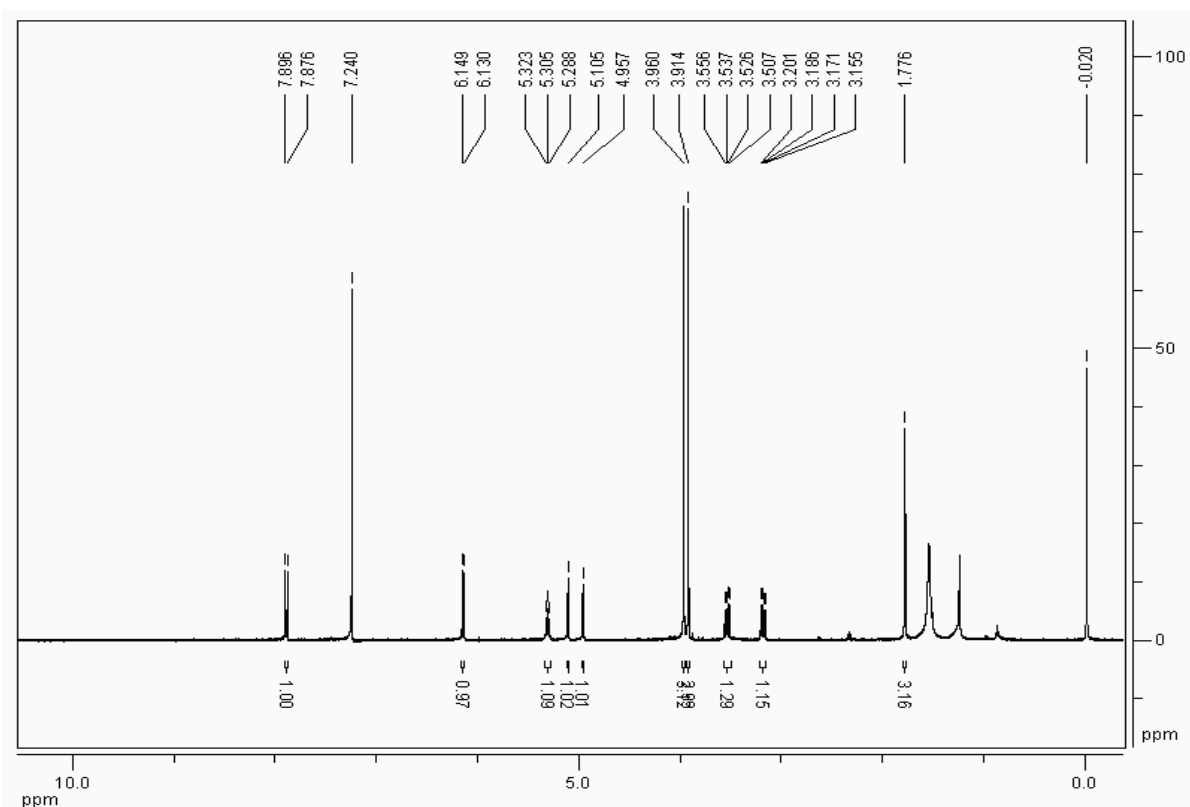


Figura 104. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Rb-6*.

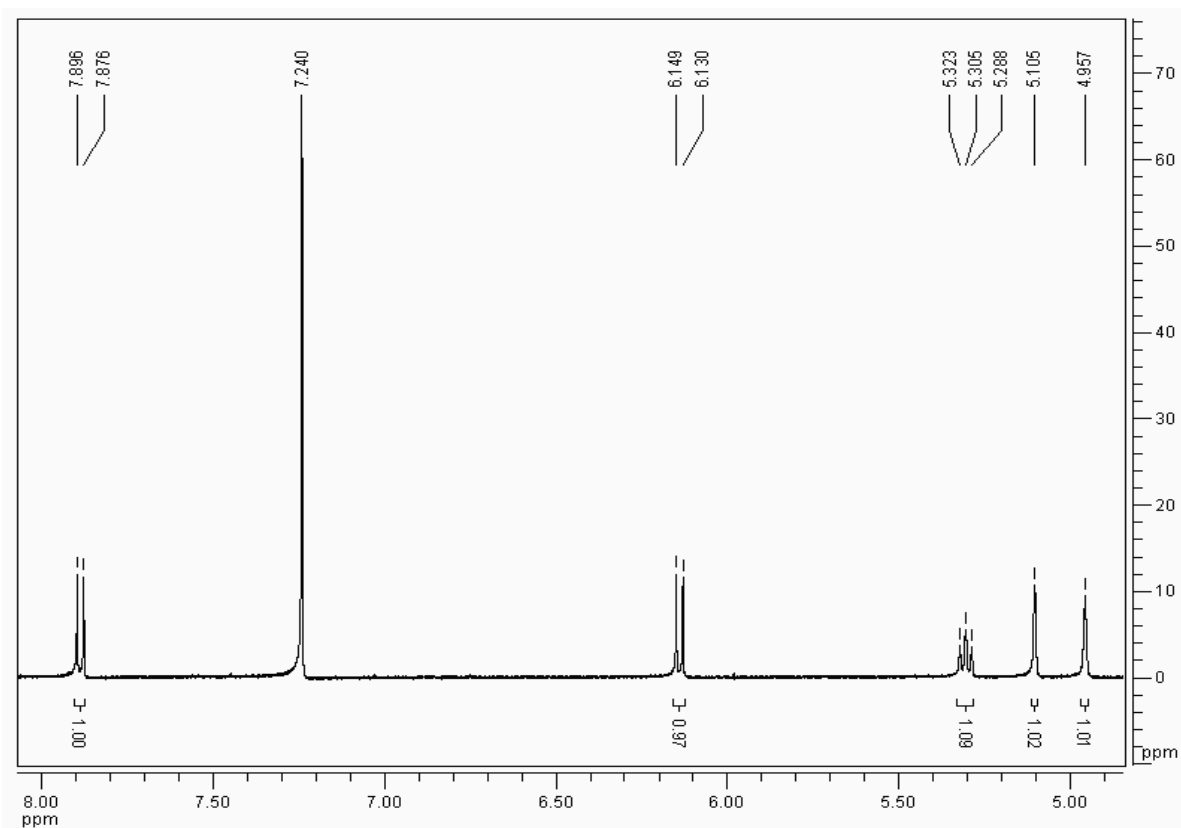


Figura 105. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Rb-6* na região de 5,0 – 8,0 ppm.

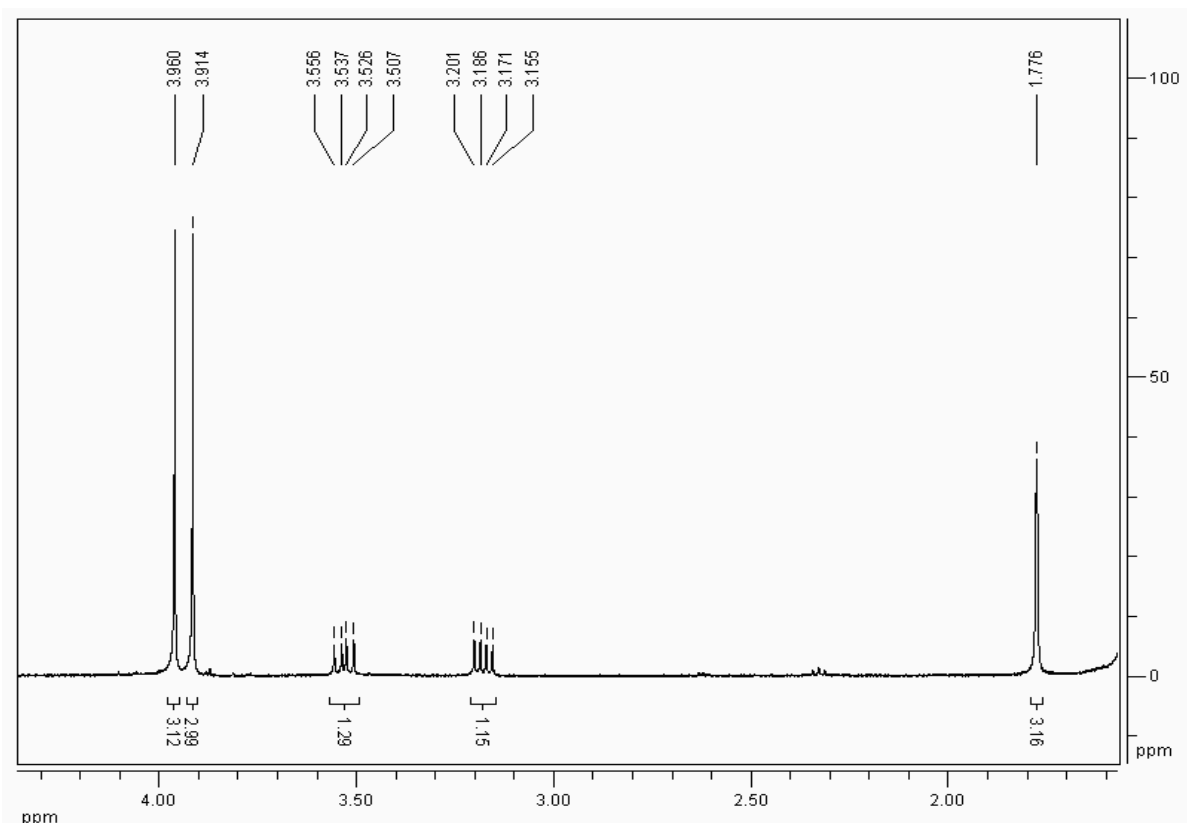


Figura 106. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Rb-6* na região de 1,5 – 4,3 ppm.

O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) e as expansões (Figura 107, 108 e 109, pág. 159 e 160) reforçaram a proposta dada pelo espectro de RMN ^1H ao mostrar sinais para esqueleto cumarínico em δ_{C} 160,8 (C-2), 111,0 (C-3) e 139,1 (C-4) (PELTER et al., 1976). Os sinais em δ_{C} 17,0 (C-6'), 33,1 (C-3'), 87,8 (C-2'), 113,1 (C-5') e 142,7 (C-4') são característicos da unidade 2-isopropenil-2,3-diidrofurano (CHEN et al., 2006) e os sinais em δ_{C} 60,1 e 61,3 foram atribuídos a duas metoxilas impedidas estericamente (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).

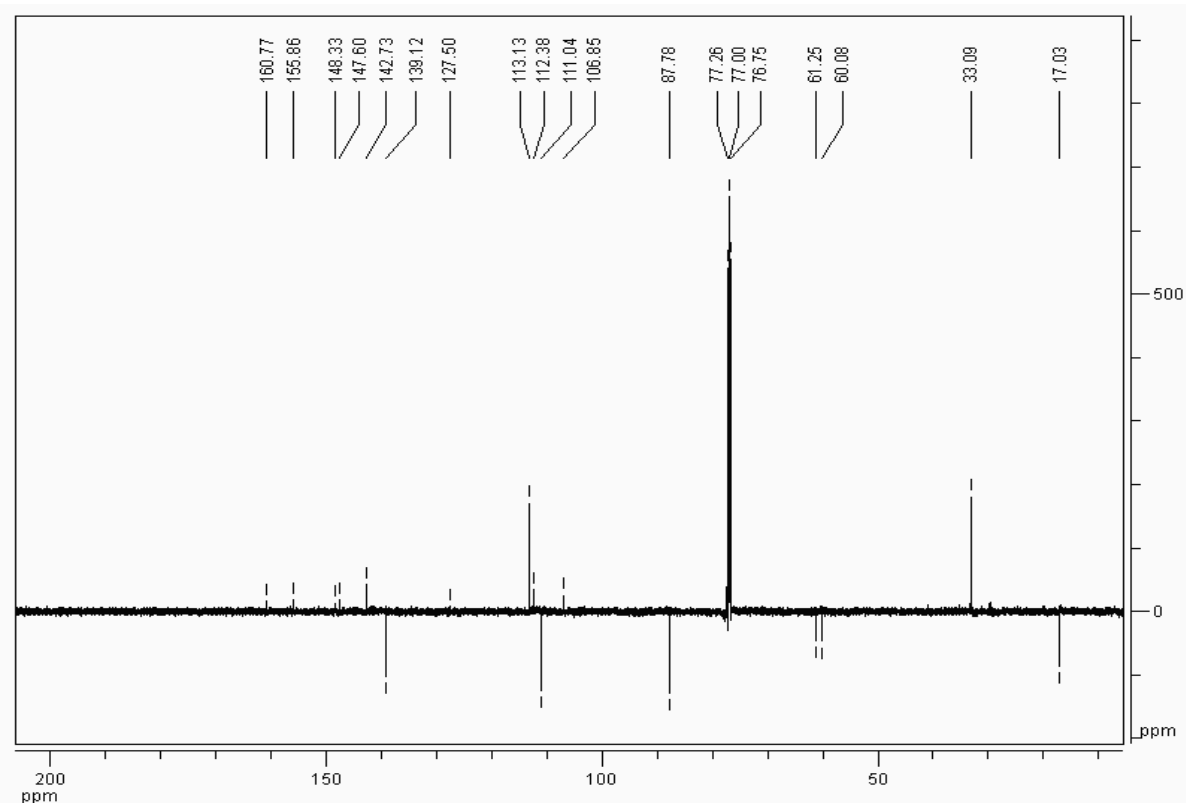


Figura 107. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Rb-6*.

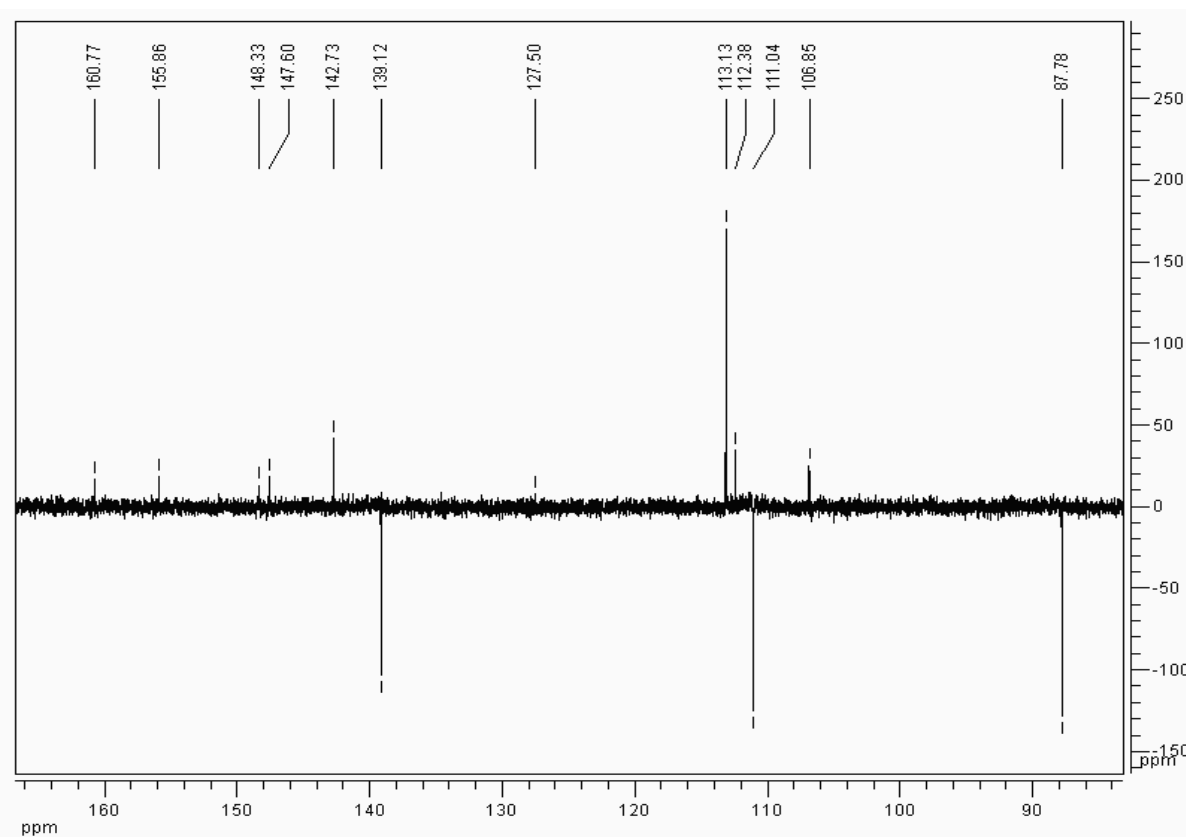


Figura 108. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Rb-6* na região de 84,0 – 166,0 ppm.

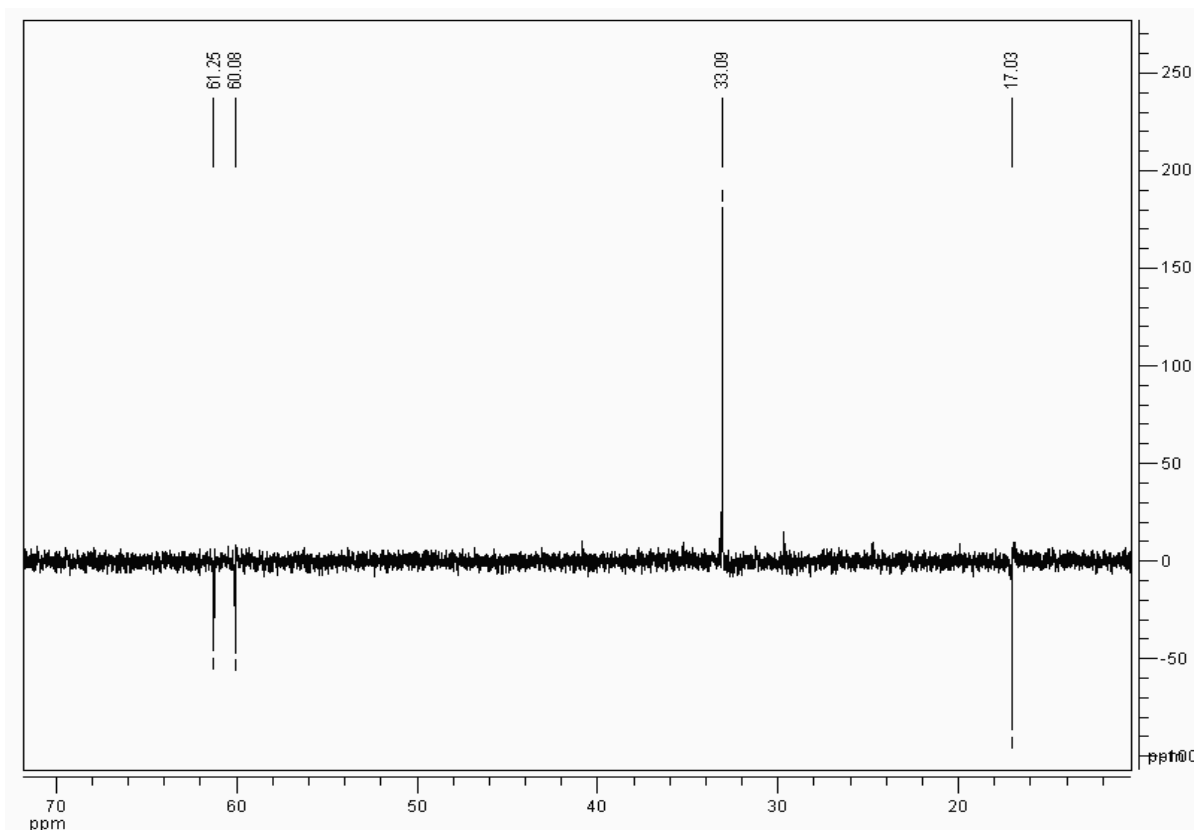


Figura 109. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Rb-6* na região de 10,0 – 70,0 ppm.

O espectro de correlação heteronuclear HMQC e as expansões (Figura 110 e 111, pág. 161) permitiram assinalar os hidrogênios e os carbonos das metoxilas ao mostrar correlações dos sinais em δ_{H} 3,91 e 3,96 com os sinais em δ_{C} 60,1 e 61,3, respectivamente. Além disto, confirmaram as atribuições feitas aos demais átomos da molécula ao mostrar correlações entre eles.

O espectro de correlação homonuclear COSY e as expansões (Figura 112 e 113, pág. 162) confirmaram o acoplamento observado no espectro de RMN ^1H para os hidrogênios α e β à carbonila em δ_{H} 7,89 (H-4) e 6,14 (H-3). Embora o acoplamento alílico entre os hidrogênios da metila em δ_{H} 1,78 e os da dupla terminal em δ_{H} 4,96 e 5,11 não tenha sido evidenciado no espectro de RMN- ^1H , este pode ser observado no espectro COSY. Isto, bem como o acoplamento geminal entre os sinais em δ_{H} 3,18 (H-3') e 3,53 (H-3') e destes com o hidrogênio oximetínico em δ_{H} 5,31 (H-2') corroboraram com a proposta para a presença da unidade 2-isopropenil-2,3-diidrofurano para *Rb-6*.

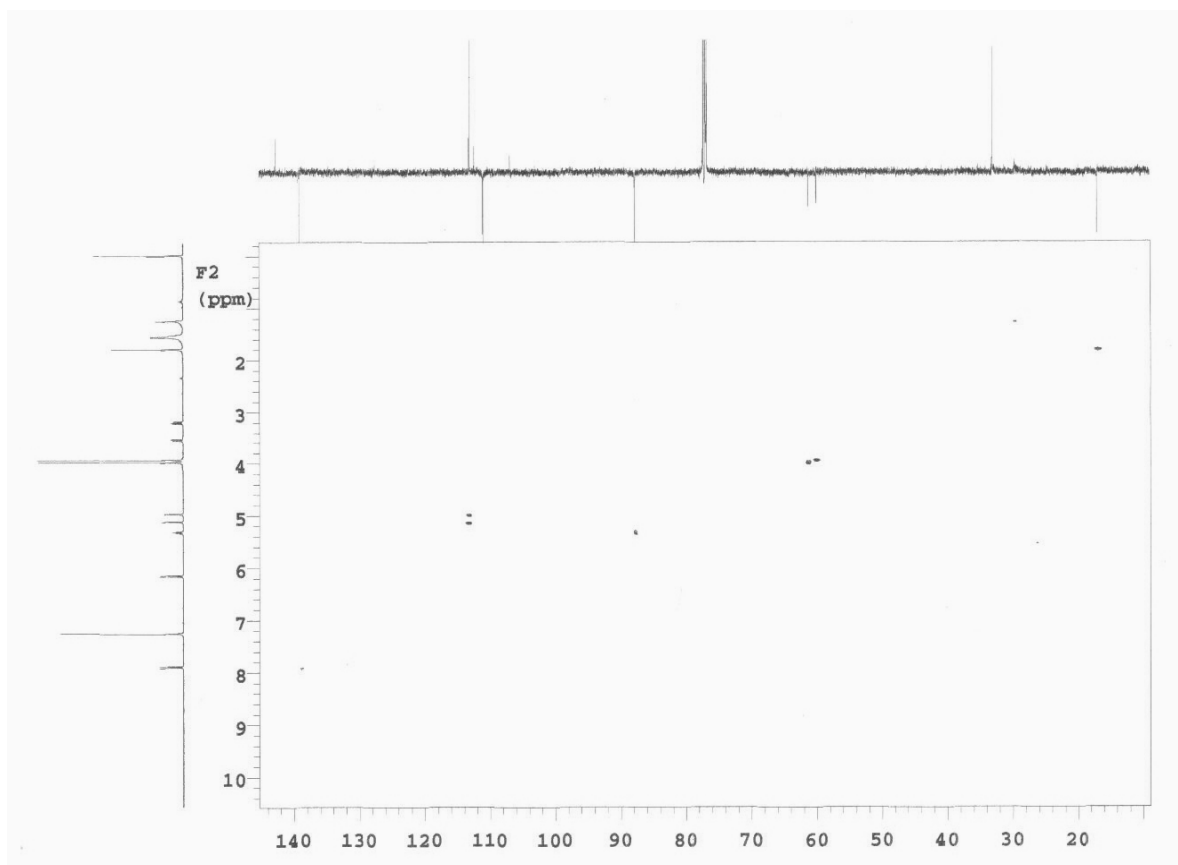


Figura 110. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-6*.

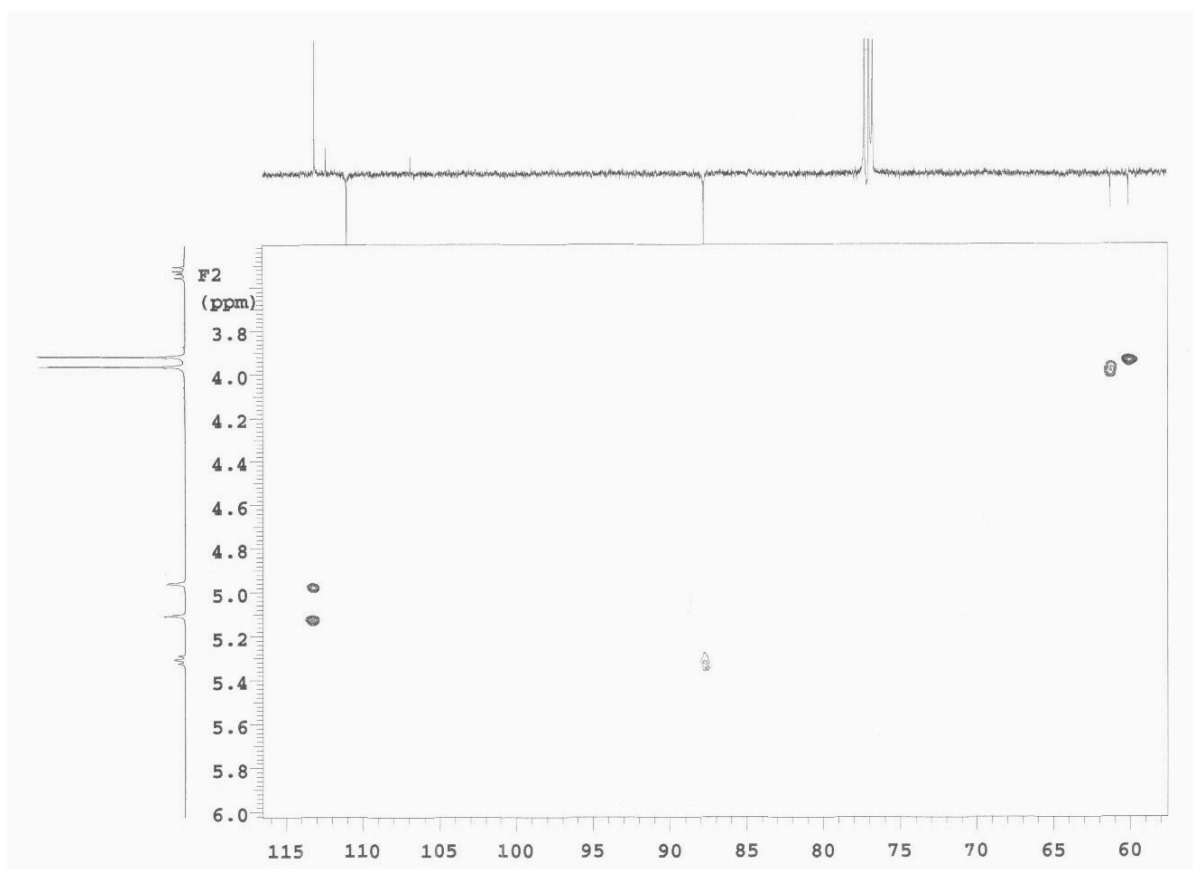


Figura 111. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Rb-6* na região de (3,4 – 6,0 ppm) x (58,0 – 116,0 ppm).

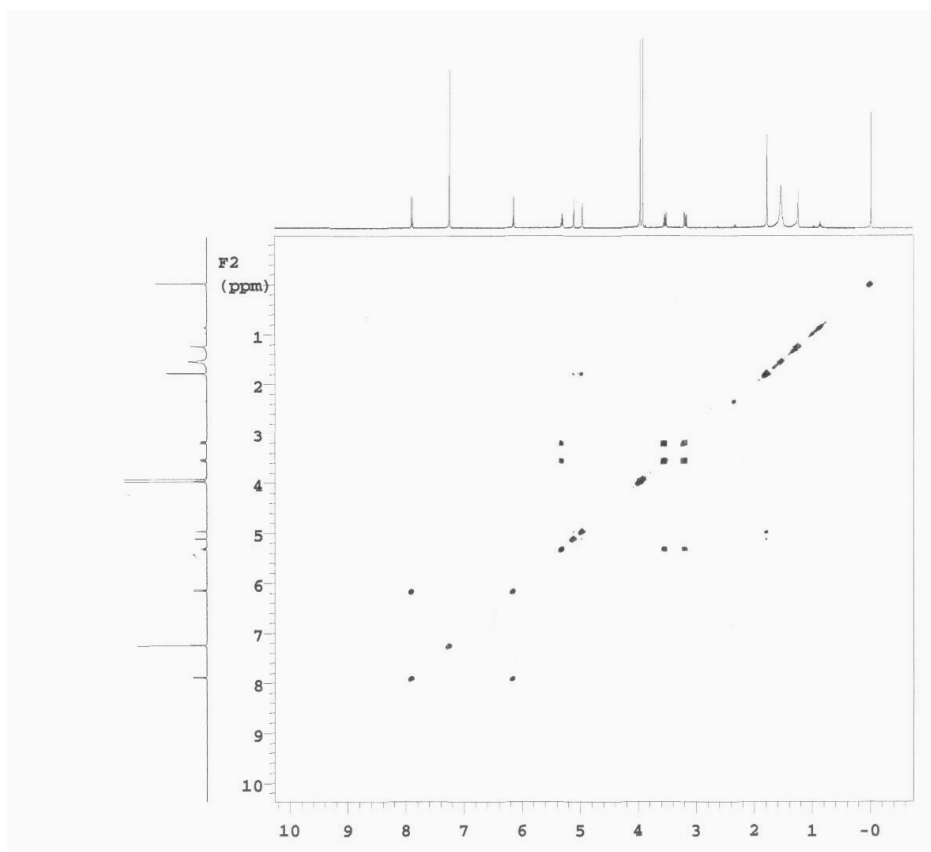


Figura 112. Espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de *Rb-6*.

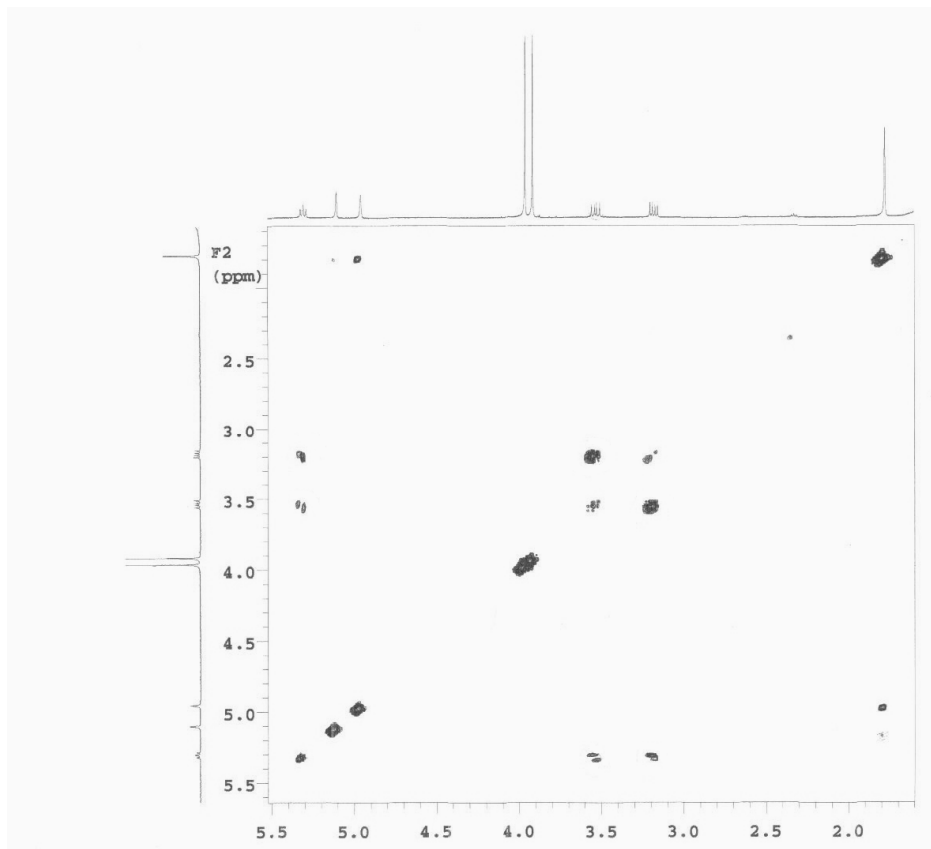


Figura 113. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de *Rb-6* na região de (1,6 – 5,6 ppm) x (1,6 – 5,5 ppm).

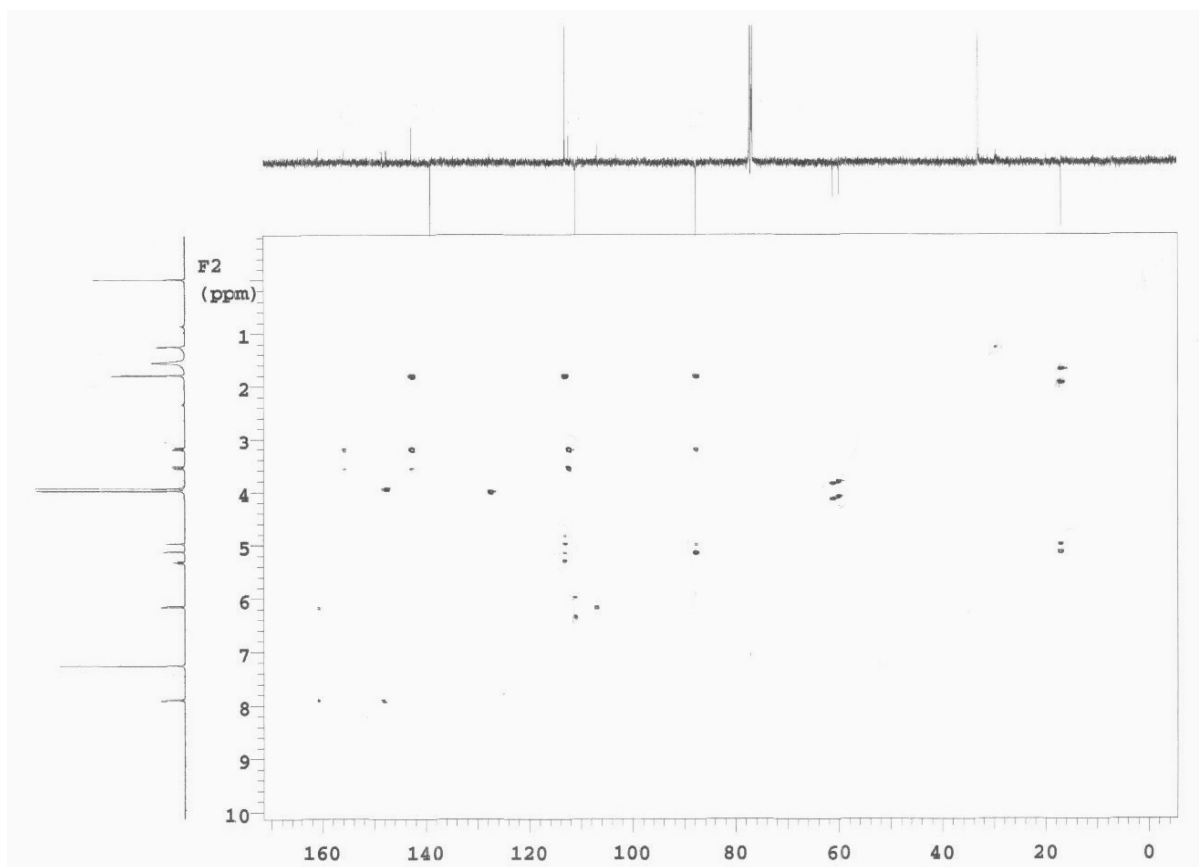


Figura 114. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-6*.

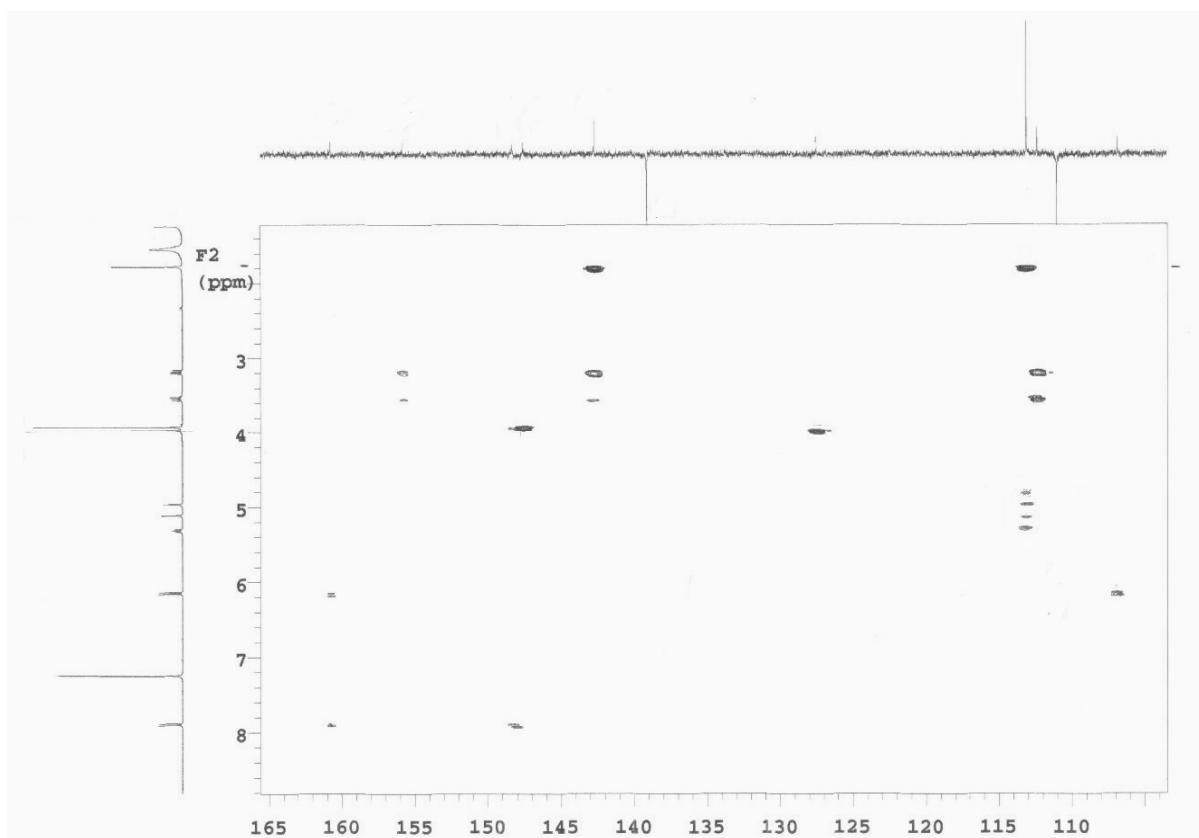


Figura 115. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-6* na região de (2,4 – 8,8 ppm) x (104,0 – 165,0 ppm).

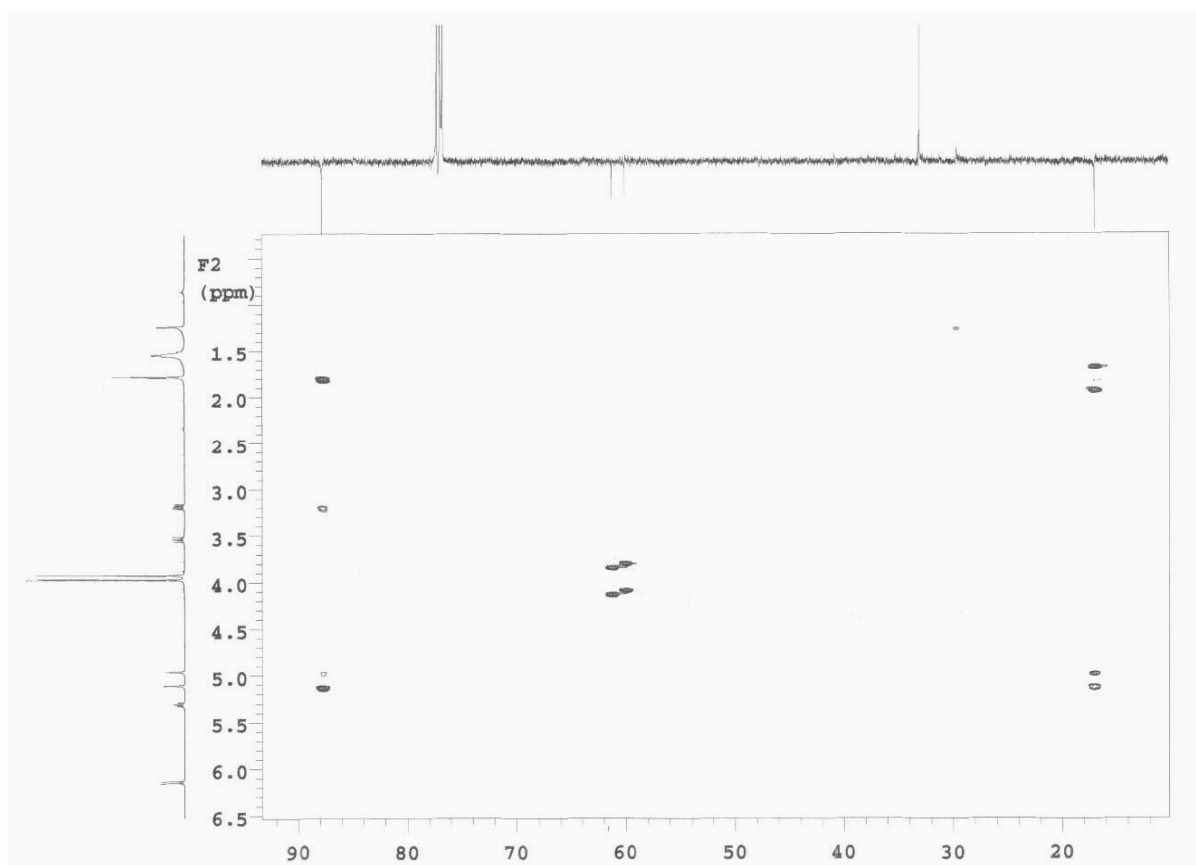


Figura 116. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Rb-6* na região de (0,8 – 6,5 ppm) x (10,0 – 92,0 ppm).

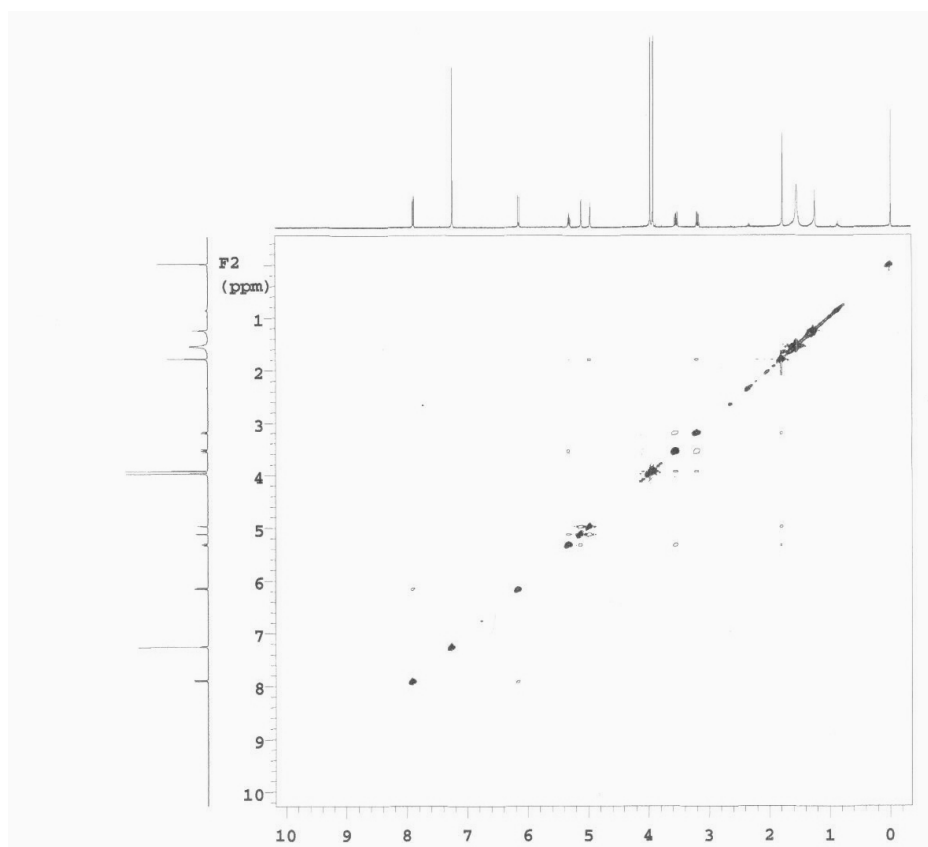


Figura 117. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-6*.

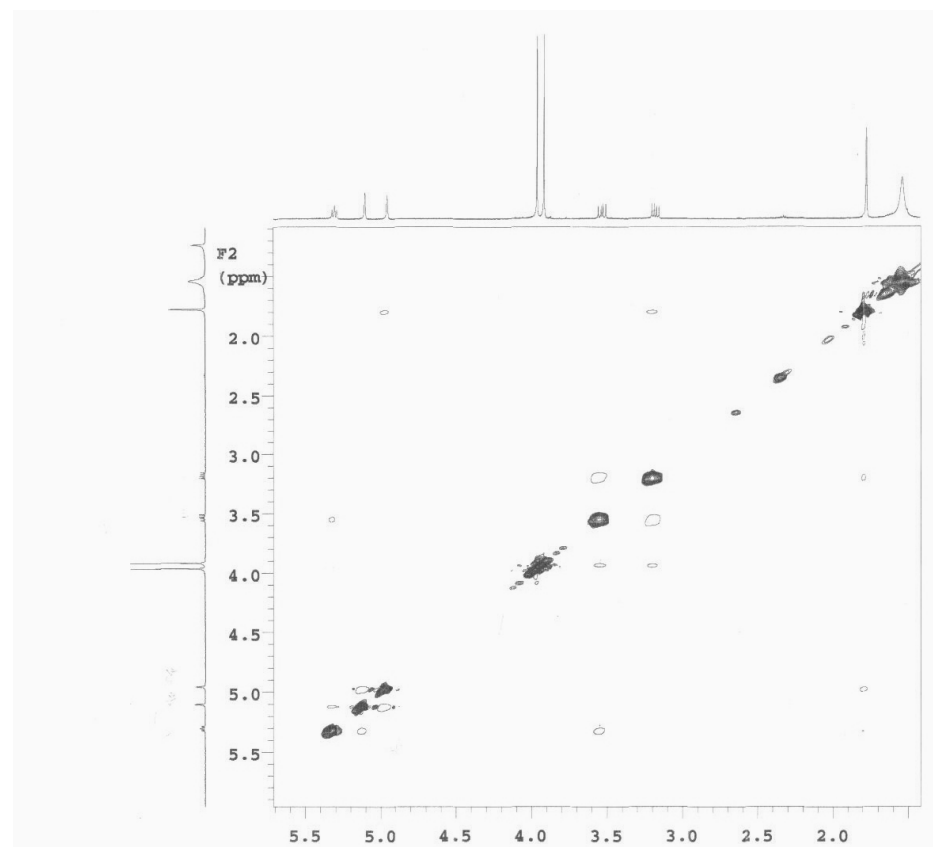


Figura 118. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Rb-6* na região de (1,1 – 5,9 ppm) x (1,4 – 5,7 ppm).

Os espectros HMBC e NOESY também mostraram outras correlações que auxiliaram na confirmação das atribuições feitas aos outros átomos de hidrogênio e carbono da molécula como podem ser observadas na Figura 119 (pág. 166).

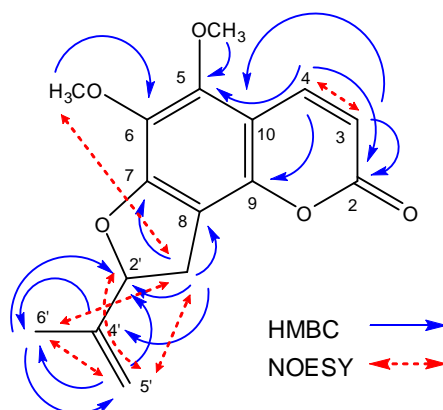


Figura 119. Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY para *Rb-6*.

Desta forma, a estrutura de *Rb-6* foi sugerida para ser uma furanocumarina angular com a função furano localizada nas posições C-7 e C-8 e as metoxilas em C-5 e C-6 como visualizada em (e) e corroborada pela proposta biossintética apresentada na Figura 120 (pág. 167).

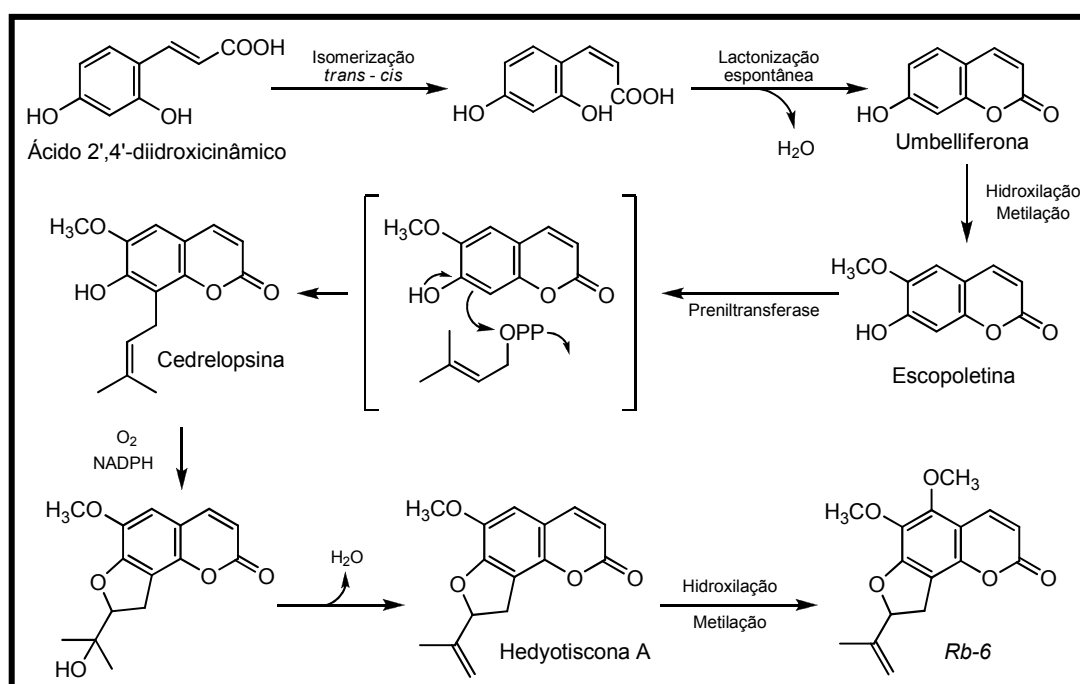


Figura 120. Proposta biossintética para *Rb-6* partindo do ácido 2',4'-diidroxicinâmico.

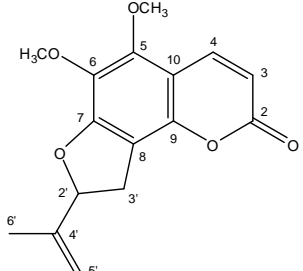
Os deslocamentos químicos e as principais correlações observadas nos espectros de RMN uni e bidimensionais para *Rb-6* estão compilados na Tabela 9 (pág. 167). A Tabela 10 (pág. 168) faz uma comparação dos valores de RMN 1H e ^{13}C apresentados por esta substância com os dados citados por Chen e colaboradores (2006) para hedyotiscona A, substância isolada de *Hedyotis biflora* (Rubiaceae), que reforçam a proposta estrutural (e) para *Rb-6*.

Tabela 9. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono e hidrogênio da substância *Rb-6*, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $CDCl_3$.

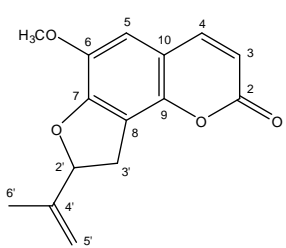
C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_C	δ_H	2J	3J		
2	160,8	-				
3	111,0	6,14 (d, J = 9,5 Hz, 1H)	C-2	C-10	H-4	H-4
4	139,1	7,89 (d, J = 9,5 Hz, 1H)		C-2, C-5, C-9	H-3	H-3
5	147,6	-				
6	127,5	-				
7	155,9	-				
8	112,4	-				
9	148,3	-				
10	106,9	-				
2'	87,8	5,31 (t, J = 9,0 Hz, 1H)		C-5'	H-3'	H-5', H-3'
3'	33,1	3,18 (dd, J = 7,5 e 15,0 Hz, 1H) 3,53 (dd, J = 9,5 e 15,0 Hz, 1H)	C-8, C-2'	C-7, C-4'	H-2', H-3'	H-3', H-6'
4'	142,7	-	C-8	C-7, C-4'	H-2', H-3'	H-2', H-3'
5'	113,1	4,96 (sl, 1H) 5,11 (sl, 1H)		C-2', C-6'	H-6'	H-5', H-6'
6'	17,0	1,78 (s, 3H)	C-4'	C-2', C-6	H-6'	H-2', H-5'
5-CH ₃	60,1	3,91 (s, 3H)		C-5', C-2'	H-5'	H-3', H-5'
6-CH ₃	61,3	3,96 (s, 3H)		C-5		
				C-6		H-3'

Legenda: (s) simpleto; (sl) simpleto largo; (d) duplete; (dd) duplo-duplete; (t) tripleto.

Tabela 10. Dados comparativos de RMN de ^1H e ^{13}C de *Rb-6* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e de hedyotiscona A em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente).



Rb-6



Hedyotiscona A

	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	160,8	-	161,2	-
3	111,0	6,14 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)	112,7	6,27 (<i>d</i> , $J = 9,6$ Hz, 1H)
4	139,1	7,89 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)	143,6	7,60 (<i>d</i> , $J = 9,6$ Hz, 1H)
5	147,6	-	109,4	6,78 (<i>s</i> , 1H)
6	127,5	-	142,4	-
7	155,9	-	152,7	-
8	112,4	-	114,8	-
9	148,3	-	146,1	-
10	106,9	-	112,5	-
2'	87,8	5,31 (<i>t</i> , $J = 8,5$ e 17,0 Hz, 1H)	88,7	5,42 (<i>t</i> , $J = 8,1$ Hz, 1H)
3'	33,1	3,18 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 15,5 Hz, 1H) 3,53 (<i>dd</i> , $J = 9,5$ e 15,5 Hz, 1H)	31,8	3,21 (<i>dd</i> , $J = 8,1$ e 16,2 Hz, 1H) 3,54 (<i>dd</i> , $J = 8,1$ e 16,2 Hz, 1H)
4'	142,7	-	141,9	-
5'	113,1	4,96 (<i>sl</i> , 1H) 5,11 (<i>sl</i> , 1H)	113,2	4,99 (<i>s</i> , 1H) 5,13 (<i>s</i> , 1H)
6'	17,0	1,78 (<i>s</i> , 3H)	16,9	1,79 (<i>s</i> , 3H)
5-CH ₃	60,1	3,91 (<i>s</i> , 3H)	-	-
6-CH ₃	61,3	3,96 (<i>s</i> , 3H)	56,4	3,92 (<i>s</i> , 3H)

Legenda: (*s*) simpleto; (*sl*) simpleto largo; (*d*) dupleteo; (*dd*) duplo-dupleteo; (*t*) tripleteo.

O espectro de massas HR-TOF-MS no modo de ionização positivo (Figura 121, pág. 169) corroborou com as propostas dos espectros anteriores ao mostrar um pico de íon molecular em m/z 289,1210 $[\text{M} + \text{H}]^+$, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ (calc. 289,1076).

O valor positivo obtido nos experimentos de rotação óptica $\{[\alpha]_{\text{D}} + 95,7^{\circ}$ (c 0,00047; EtOH)} e comparações com os dados de hedyotiscona A (CHEN et al., 2006) e angenomalina (YAMAGUCHI ET AL., 2003) indicaram que *Rb-6* tem configuração S em C-2'.

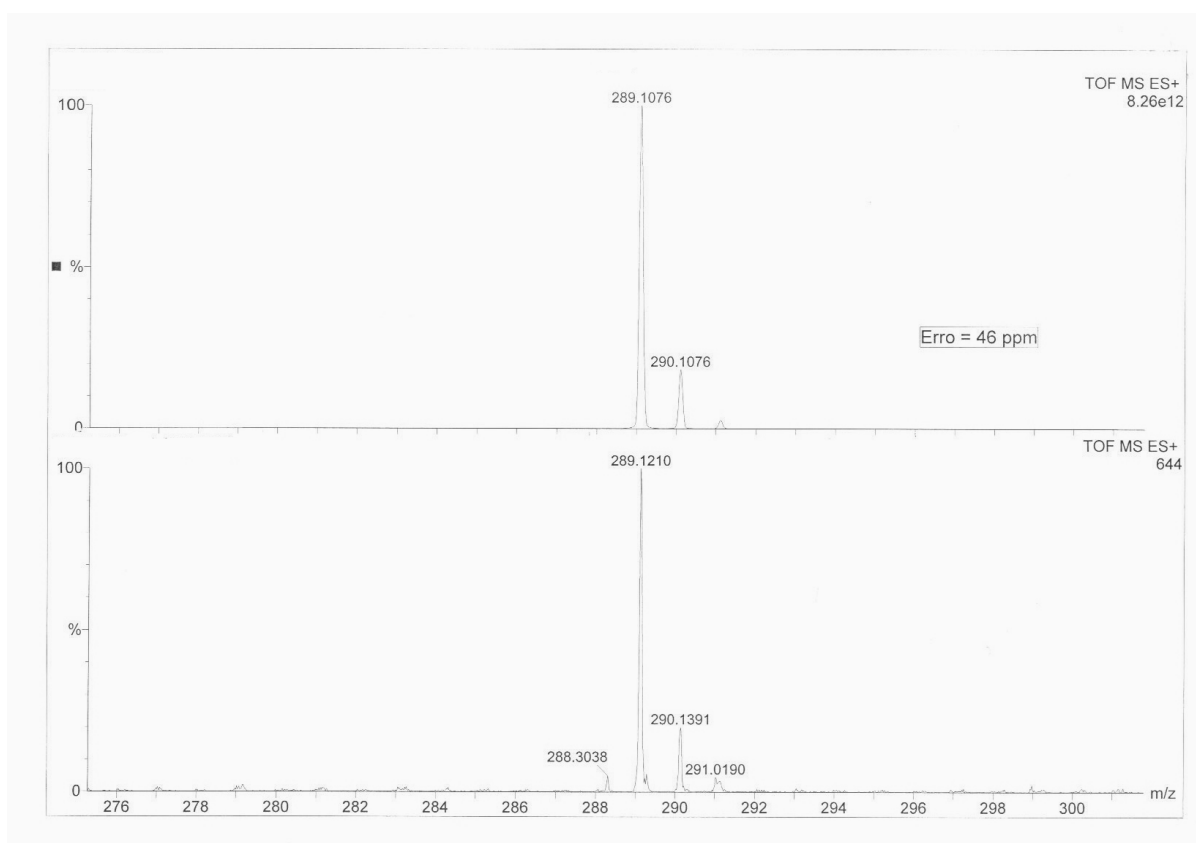


Figura 121. Espectro de massas HR-TOF-MS (pos) de *Rb-6*.

Desta forma, a análise dos espectros de IV, EM e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Rb-6*, bem como, a comparação com os dados da literatura permitiram identificá-la como sendo uma **5,6-dimetoxi-7,8-[2'-(prop-1-en-2-il)-(2'-S)-2',3'-diidrofurano] cumarina** (Figura 122, pág. 169) relatada pela primeira vez na literatura e cujo nome trivial atribuído foi cumarieletefina.

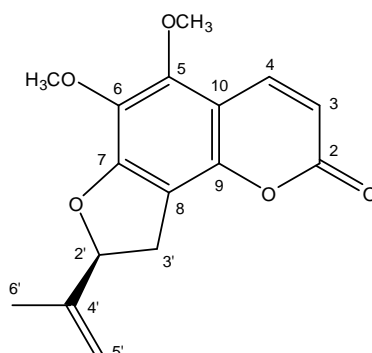


Figura 122. Estrutura química de *Rb-6*: 5,6-dimetoxi-7,8-[2'-(prop-1-en-2-il)-(2'-S)-2',3'-diidrofurano] cumarina (cumarieletefina).

5.2.7. Determinação estrutural de Rb-7

A substância *Rb-7* foi isolada como sólido amorfo amarelo, com massa de 61,0 mg (correspondendo a 0,122 % em relação à massa da fase acetato de etila), ponto de fusão 256,4 – 257,5 °C e sob luz ultravioleta apresentou fluorescência que fez sugerir a presença de grupo cromóforo na estrutura química.

O espectro de IV (Figura 123, pág. 170) mostrou características típicas de um composto com várias hidroxilas fenólicas não impedidas estericamente, pela presença de uma banda larga de grande intensidade em 3419 cm⁻¹ corroborada pela absorção em 1176 cm⁻¹ de estiramento de C-O fenólico. Absorções em 1658 e 1610 cm⁻¹ indicaram a presença de carbonila cetônica conjugada e as bandas em 1570 e 1508 cm⁻¹ revelaram a natureza aromática da substância (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001).

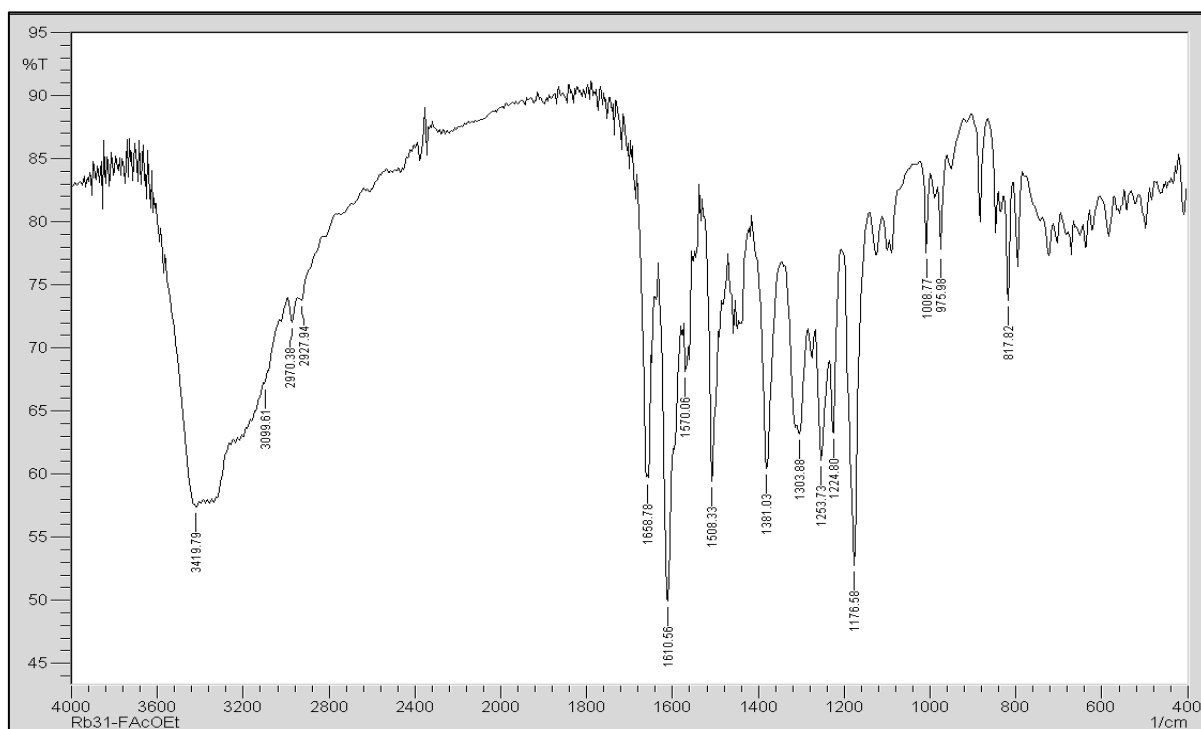
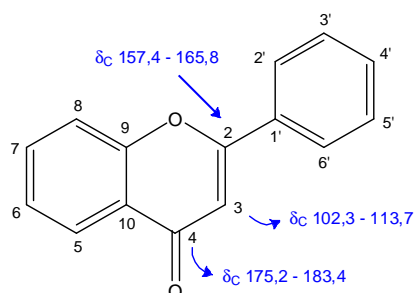


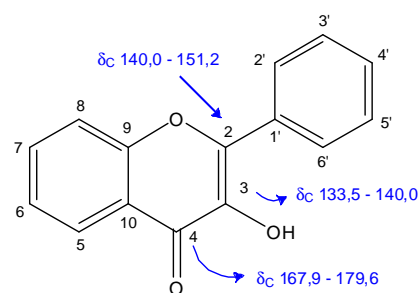
Figura 123. Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de *Rb-7*.

O espectro de RMN ¹³C - APT (50 MHz, CD₃OD) e as expansões (Figura 124 e 125, pág. 172) apresentaram 15 sinais para carbonos sp² que são compatíveis com a unidade C₆C₃C₆ característica de flavonóides (ALBUQUERQUE et al., 2007). O tipo de flavonóide foi determinado por análise dos dados de RMN ¹³C para

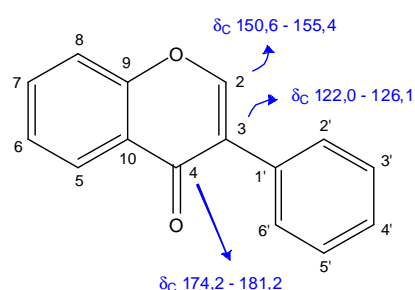
diferentes flavonóides compilados por Agrawal (1989) e Pelter e colaboradores (1976) e mostrado abaixo:



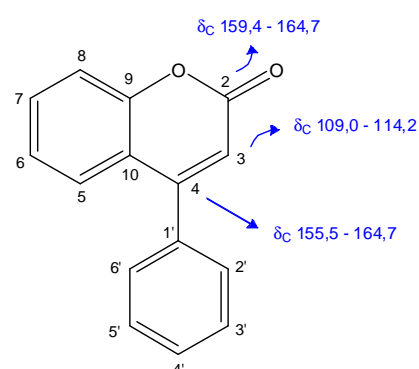
Flavona



Flavonol



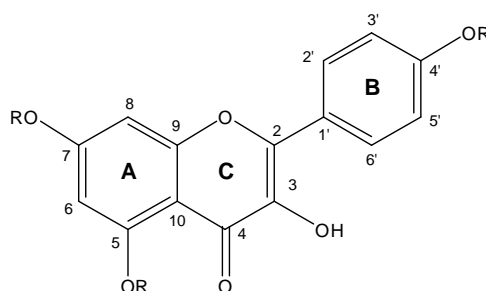
Isoflavona



Neoflavona

Os sinais para carbonos sp^2 não hidrogenados em δ_C 148,1 e 137,1, que sugeriram a presença de dupla ligação em C-2 e C-3, respectivamente; bem como, o sinal em δ_C 177,3 para carbonila em C-4, indicaram que o flavonóide correspondia a um flavonol, ou seja, uma flavona hidroxilada em C-3.

Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Figura 124 e 125, pág. 172), sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_C 99,3 (C-6) e 94,5 (C-8), bem como, sinais intensos em δ_C 130,7 (C-2'/6') e 116,3 (C-3'/5') permitiram sugerir a presença de um anel A 5,7-dissubstituído e um sistema AA'BB' de anel B com substituinte em C-4', respectivamente (ALBUQUERQUE et al., 2007).



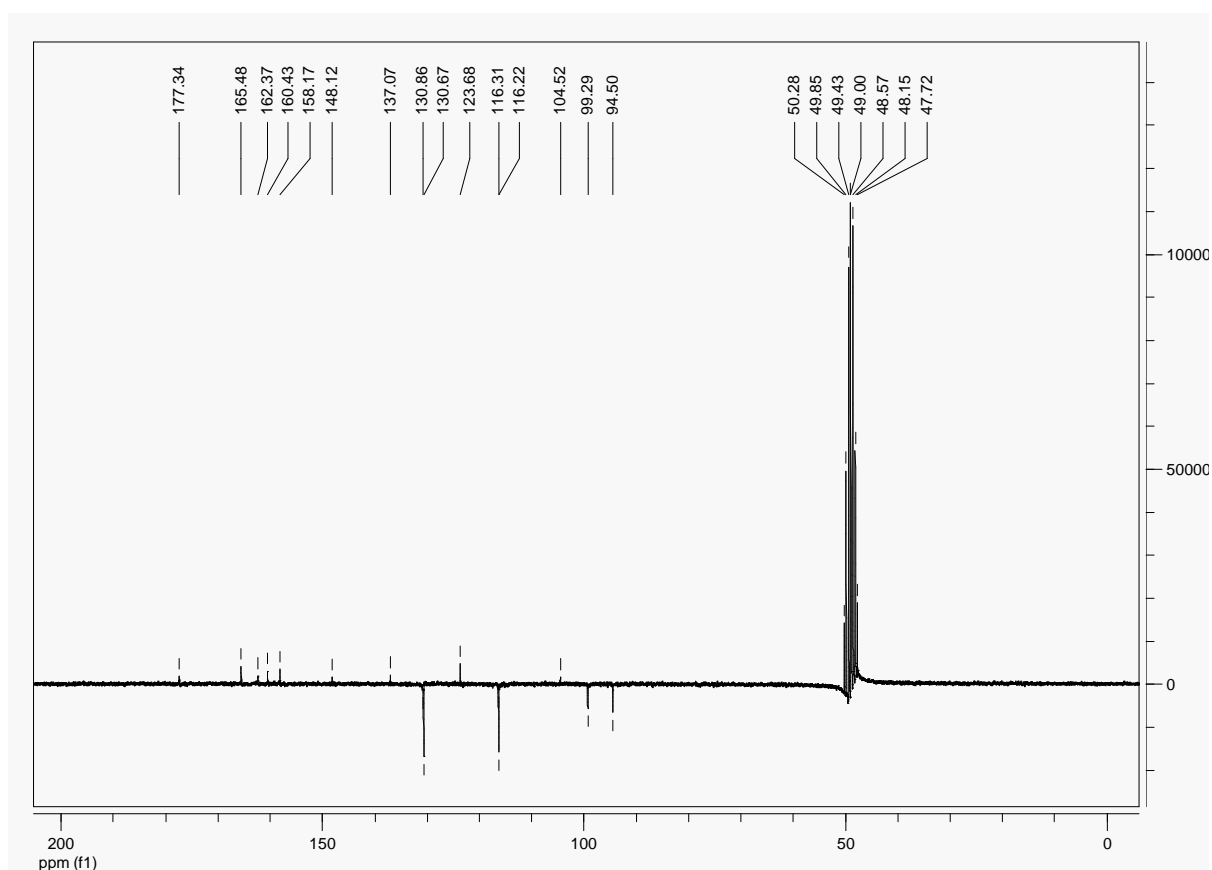


Figura 124. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de *Rb-7*.

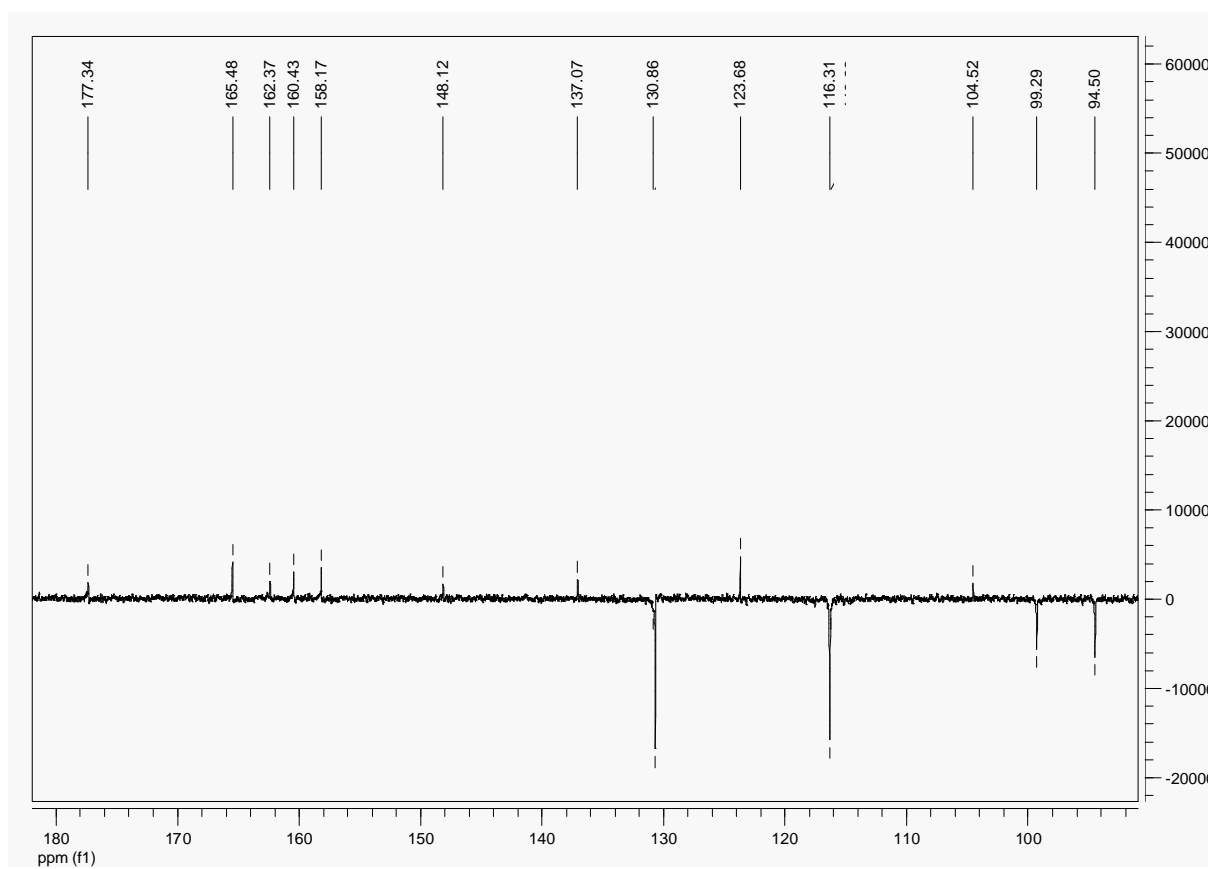


Figura 125. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de *Rb-7* na região de 90,0 – 180,0 ppm.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) e as expansões (Figura 126 e 127, pág. 173 e 174) apresentaram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 124 e 125, pág. 172) para a presença de um esqueleto flavonoídico com esse padrão de substituição: dois dupletos com integral para dois hidrogênios cada, acoplado *orto* entre si, em δ_{H} 8,07 ($J = 8,8$ Hz) e 6,90 ($J = 8,8$ Hz) compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, do sistema AA'BB' de anel B de flavonóide; e outros dois dupletos para um hidrogênio cada, acoplado *meta* entre si, em δ_{H} 6,39 ($J = 2,0$ Hz) e 6,18 ($J = 2,0$ Hz), característicos de flavonóides que possuem anel A 5,7-dissubstituído, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente (PIZZOLATTI et al., 2003).

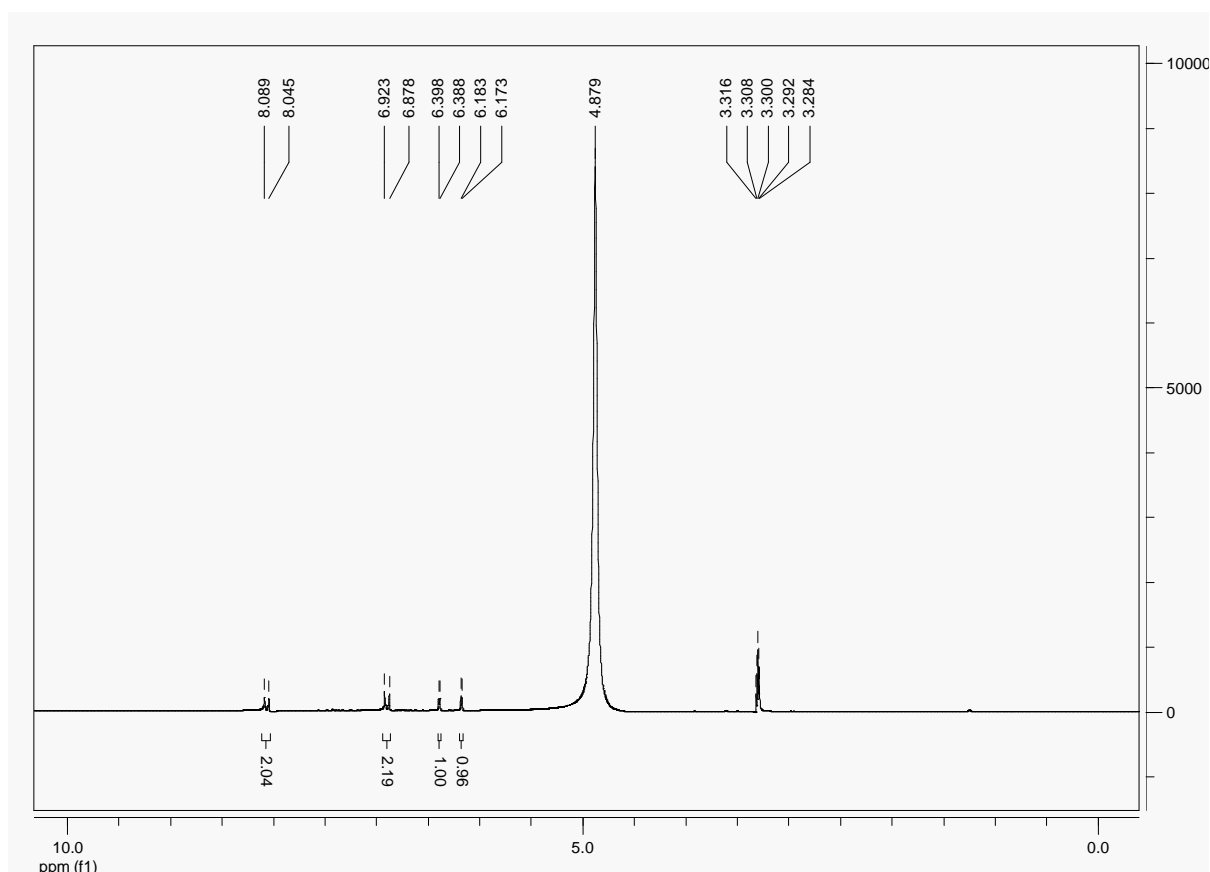


Figura 126. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *Rb-7*.

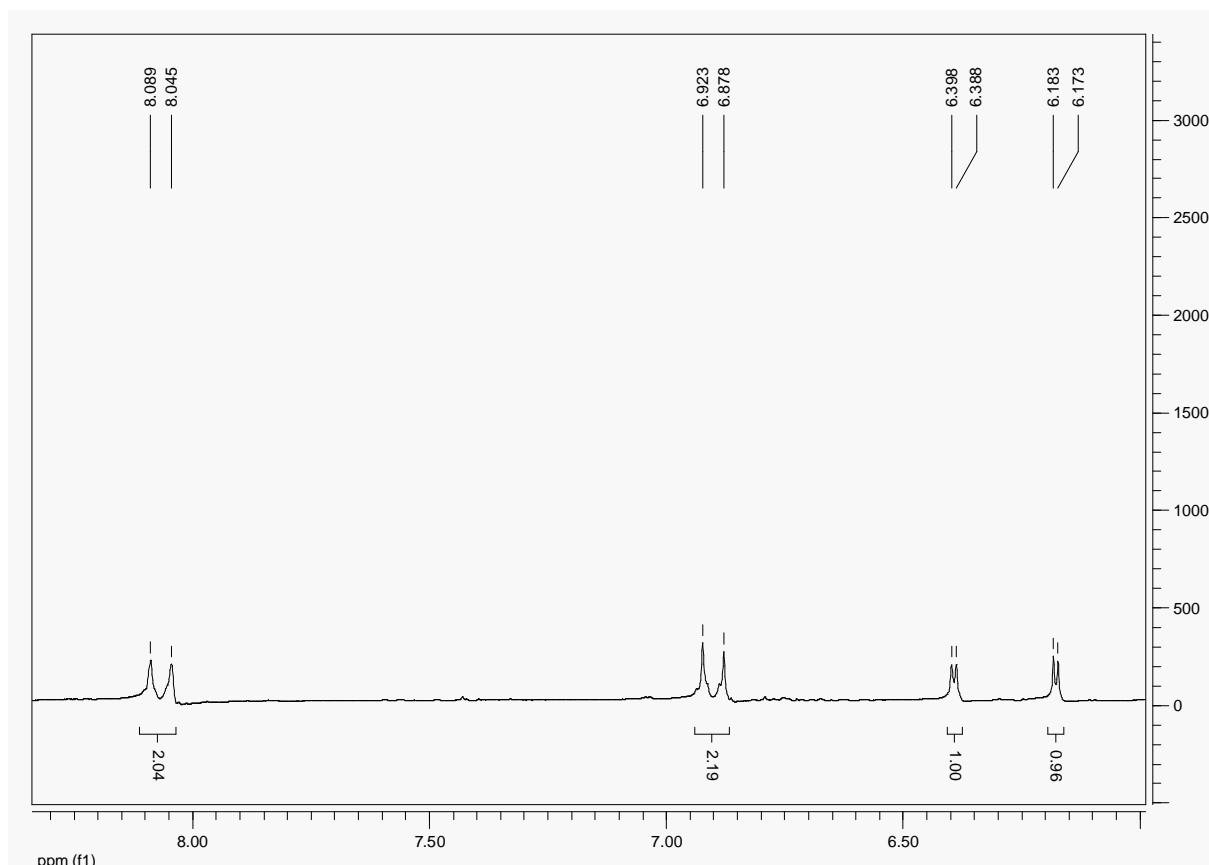
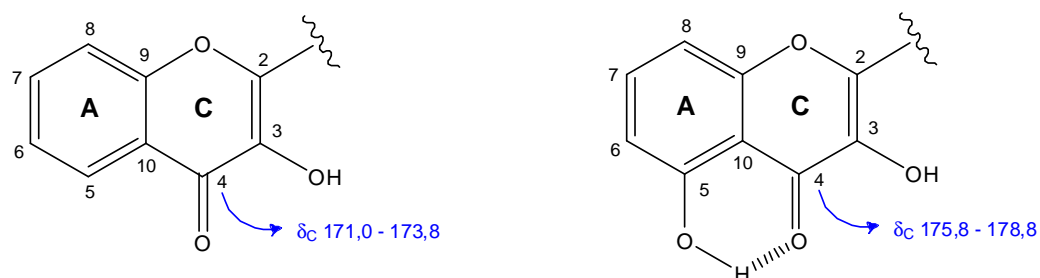


Figura 127. Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *Rb-7* na região de 5,2 – 7,7 ppm.

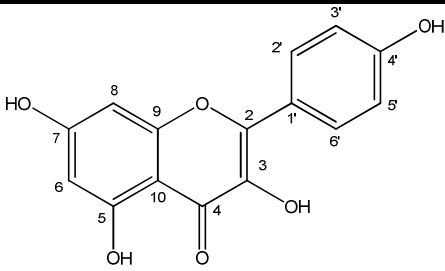
No espectro de RMN ^{13}C (Figura 124 e 125, pág. 172), o sinal em δ_{C} 177,3 (C-4), indicativo de carbonila quelada, inferiu a presença de hidroxila em C-5 em ligação de hidrogênio com a carbonila em C-4, já que a ausência desta força intramolecular protegeria a carbonila fazendo-a absorver em aproximadamente 171,0 - 173,8 ppm (AGRAWAL, 1989):



A ausência de outros sinais para substituintes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C possibilitou afirmar que *Rb-7* apresentava hidroxilas inseridas também nas posições C-7 e C-4'. A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C citados por Pizzolatti e colaboradores (2003) permitiu atribuir os demais sinais apresentados por *Rb-7* (Tabela 11, pág. 175).

Tabela 11. Deslocamentos químicos e tipos de sinais para os átomos de carbono e hidrogênio de *Rb-7*, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CD_3OD , bem como, os deslocamentos químicos dos hidrogênios (δ_{H}^*) e carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Pizzolatti (2003) para a mesma substância (600 e 150 MHz, respectivamente) em $\text{DMSO}-d_6$.

C



Canferol

	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^*	δ_{H}^*
2	148,1	-	147,1	-
3	137,1	-	136,7	-
4	177,3	-	176,6	-
5	162,4	-	162,3	-
6	99,3	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	99,2	6,27 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz, 1H)
7	165,5	-	165,1	-
8	94,5	6,39 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	94,5	6,52 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz, 1H)
9	158,2	-	157,8	-
10	104,5	-	104,2	-
1'	123,7	-	123,4	-
2'	130,9	8,07 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)	130,5	8,12 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)
3'	116,3	6,90 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)	116,4	6,99 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)
4'	160,4	-	160,0	-
5'	116,3	6,90 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)	116,4	6,99 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)
6'	130,9	8,07 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)	130,5	8,12 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)

Desta forma, os dados dos espectros de IV, RMN ^1H e ^{13}C , bem como, comparações com os dados apresentados na literatura permitiram identificar *Rb-7* como sendo **5,7,4'-triidroxiflavonol** ou 3,5,7,4'-tetraidroxiflavona, mais conhecido como canferol (Figura 128, pág. 175).

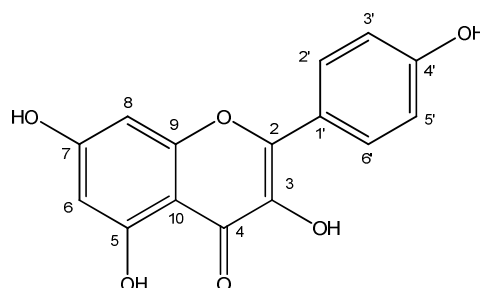


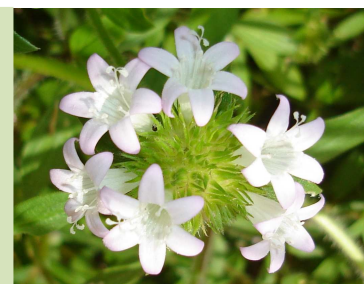
Figura 128. Estrutura química de *Rb-7*: 5,7,4'-triidroxiflavonol ou 3,5,7,4'-tetraidroxiflavona (canferol).

O canferol é uma substância bastante comum em espécies do Reino Vegetal que são bioprodutoras de flavonóides, como a família Rubiaceae, no entanto, o isolamento desta substância em *Richardia brasiliensis* Gomes corresponde ao primeiro relato no gênero *Richardia*, apresentando, portanto, significativa contribuição à quimiotaxonomia do gênero.

Apresenta diversas atividades farmacológicas, dentre as quais cita-se a capacidade de reduzir a produção de radicais livres, tendo portanto propriedade antioxidante (ALBUQUERQUE et al., 2007), o que pode explicar, em parte, o poder antioxidante apresentado pelo extrato etanólico bruto de *Richardia brasiliensis*, em particular, da fase acetato de etila (PINTO et al., 2008a), da qual o canferol foi isolado.

Embora não tenha apresentado ação hipoglicemiante significativa, seu derivado, o canferol 3-O-a-L-ramnopiranosil-b-D-glicopiranosídeo, foi capaz de reduzir a glicemia em ratos diabéticos, tanto por via oral quanto intraperitoneal (CAZAROLLI, 2004). Isto pode justificar o uso popular de *Richardia brasiliensis* como antidiabética, pois é provável que derivados glicosilados do canferol também estejam presentes no extrato bruto da planta já que outro tipo de flavonóide glicosilado já foi detectado em estudos feitos por Pinto e colaboradores (2008b).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No estudo farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes, a caracterização macroscópica das folhas, caule, raízes, inflorescência, infrutescência e sementes evidenciou aspectos que são comuns às espécies pertencentes à família Rubiaceae, tais como, folhas simples opostas, inflorescência cimosa, flores bissexuadas e actinomorfas, prefloração valvar e ovário ínfero.

As caracterizações macroscópica e microscópica das folhas, caule e raízes também forneceram dados padrões importantes na diagnose da droga vegetal que poderão auxiliar na identificação do vegetal frente a outras espécies do gênero *Richardia* e da família Rubiaceae, como também poderão ser utilizados no controle de qualidade de amostras caso esta espécie venha a ser comercializada no futuro.

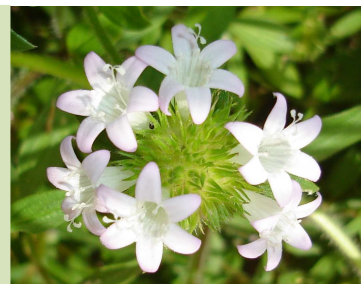
O estudo fitoquímico de *Richardia brasiliensis* Gomes corroborou com os trabalhos desenvolvidos por Pinto e colaboradores (2008) e Adolpho e colaboradores (2008) pois evidencia a espécie como bioprodutora de diferentes classes de metabólitos: terpenóides, flavonóides, derivados porfirínicos e cumarinas.

A espécie apresentou em sua constituição química uma cumarina, a 5,6-dimetoxi-7,8-[2'-(prop-1-en-2-il)-(2'-S)-2',3'-diidrofurano]cumarina, que está sendo relatada pela primeira vez na literatura. Também foram isoladas mais três cumarinas, a cedrelopsina, a norbraylina e a braylina, substâncias nunca descritas em Rubiaceae, contribuindo assim para o enriquecimento quimiotaxônomico desta família.

Além dessas, foram isolados uma mistura de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol), um derivado porfirínico (15¹-hidroxi-(15¹-S)-porfirinolactona a) e um flavonóide (canferol).

Este estudo além de fornecer importantes conhecimentos básicos sobre a espécie, embasa novos estudos, como os de atividade biológica. Sendo assim, pretende-se dar continuidade ao estudo químico, utilizando a fase acetato de etila e n-butanólica, bem como, realizar estudos de atividade farmacológica que possam comprovar o uso deste vegetal na medicina popular e verificar a possibilidade de aproveitamento desta espécie pelo setor farmacêutico.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, U.; BROWN, S. A.; LEWARS, E. G.; SWIATEK, L. Lactones of *Menyanthes trifoliata*. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v. 24, n. 2, p. 73-78, 1990.
- ADEKUNLE, A. A. Antifungal property of the crude extracts of *Rrachystegia eurycoma* and *Richardia brasiliensis*. **Nigerian of Journal Natural Products and Medicine** v. 4, p. 70-72, 2000.
- ADOLPHO, L. O.; DALCOL, I.; SILVA, V. S.; STÜCKER, C. Atividade antimicrobiana e antioxidante das frações de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). In: JORNADA DE JOVENS PESQUISADORES DO AUGM, 14., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: AUGM, 2006.
- ADOLPHO, L. O.; STÜCKER, C.; DALCOL, I. Isolamento de metabólitos e análise da inibição enzimática de *Richardia brasiliensis* Gomes. In: ENCONTO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 16., 2008, Blumenau. **Anais...** Blumenau: UFRGS, 2008.
- AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383–395, 2007a.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007b.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.
- AGRICULTURAL RESEARCH SERVICES. **Phytochemical and Ethnobotanical databases**. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/chemical.pl?stigmasterol>. Acesso em: 25 jan. 2009.
- AHMAD, R.; SHAARI, K.; LAJIS, N. H.; HAMZAH, A. S.; ISMAIL, N. H.; KITAJIMA, M. Anthraquinones from *Hedyotis capitellata*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1141-1147, 2005.
- ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 828-831, 2007.
- ALVES, R. M. S.; STEHMANN, J. R.; ISAIAS, R. M. S.; BRANDÃO, M. G. L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 49-56, 2004.
- AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A.; HIGINO, J. S.; SILVA, L. R. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Fitoterapia: instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v. 15, n. 1-3, p. 66-68, 2003.

- ANDERSSON, L. A provisional checklist of neotropical Rubiaceae. **Scripta Botanica Belgica**, v. 1, p. 1-199, 1992.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001.
- ASSIS, M. C.; GIULIETTI, A. M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de "ipecacuanha" - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 205-216, 1999.
- AWAD, A. B.; BURR, A. T.; FINK, C. S. Effect of resveratrol and β -sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 219-226, 2005.
- AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. **Traditional knowledge of Kani tribals in Kouthalai of Tirunelveli hills**, India: Tamil Nadu, 2005.
- BACKLUND, N. M.; BREMER, B. Phylogenetic relationship within the Gentianales based on *ndhF* and *rbcL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 1029-1043, 2000.
- BANDYOPADHYAY, D.; NAYAK, A.; BASAK, B.; BANERJI, A.; BANERJI, J.; CHATTERJEE, A.; PRANGE, T.; NEUMAN, A. *N*-(4-methylphenyl) benzenepropanamide – the first isolated amide from the genus *Paederia*. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 7, p. 753-754, 2007.
- BARKER, R. **Organic Chemistry of Biological Compounds**. New Jersey: FMB, 1977.
- BARTOLI, A.; SÁNCHEZ GULLÓN, E.; WEICKERT, P.; TORTOSA, R. D. Plantas americanas nuevas para la flora adventicia del sur de España. **Acta Botánica Malacitana**, v. 32, p. 276-282, 2007.
- BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. D. Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 8, p. 565-569, 2004.
- BERETZ, A.; CAZENAVE, J. P. **Plant flavonoids in biology and medicine II: progress in clinical and biological research**. New York: Alan R. Liss, 1988.
- BERG, P. A.; DANIEL, P. T. **Plant flavonoids in biology and medicine II: progress in clinical and biological research**. New York: Alan R. Liss, 1988.
- BOURGAUD, F.; HEHN, A.; LARBAT, R.; DOERPER, S.; GONTIER, E.; KELLNER, S.; MATERN, U. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Review**, v. 15, p.293-308, 2006.

BRACKE, M. E.; PESTEL, G.; GASTRONOVO, G.; UYNCKE, B.; FOIDART, J. M.; VAKAET, L. C. A.; MARCEL, M. M. **Plant flavonoids in biology and medicine II: progress in clinical and biological research**. New York: J. B. Liss, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº. 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 maio. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. DAF/SCTIE/MS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS – **RENISUS**, Brasília, DF, fevereiro. 2009.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Editorial Acribia, S. A., 1991.

BUCHANAN, M. S.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Phytol esters and phaeophytins from the hornwort *Megaceros flagellaris*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1373-1376, 1996.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.

CAPASSO, A.; PINTO, A.; SORRENTINO, R.; CAPASSO, F. Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically- induced contractions of guinea pig isolated ileum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 2/3, p. 279-281, 1991.

CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; FLAUSINO JÚNIOR, O. A.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcalóides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 878-881, 2004.

CARVALHO, M. G.; ALVES, J. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Pimarane diterpenes and a sesquiterpene from *Salzmannia nitida*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 78, n. 1, p. 17-21, 2006.

CAZAROLLI, L. H. **Estudo da atividade de flavonóides e de complexos de vanádio na glicemia de ratos diabéticos induzidos com aloxana**. 2004. 128 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHAUDRY, P. S.; CABRERA, J.; JULIANI, H. R.; VARIMA, S. D. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indometacin. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1195-1198, 1983.

CHEN, Y.; CHANG, F.; WU, C.; YEN, M.; LIAW, C.; HUANG, H.; KUO, Y.; WU, Y. New cytotoxic 6-oxygenated 8,9-dihydrofurocoumarins, hedyotiscone A - C, from *Hedyotis biflora*. **Planta Medica**, v. 72, n. 1, p. 75-78, 2006.

CHENG, H.; WANG, H.; ITO, J.; BASTOW, K. F.; TACHIBANA, Y.; NAKANISHI, Y.; XU, Z.; LUO, T.; LEE, K. Cytotoxic pheophorbide-related compounds from *Clerodendrum calamitosum* and *C. cyrtophyllum*. **Journal Product Natural**, v. 64, p. 915-919, 2001.

CHIKARAISHI, Y.; MATSUMOTO, K.; OGAWA, N. O.; SUGA, H.; KITAZATO, H.; OHKOUCHI, N. Hydrogen, carbon and nitrogen isotopic fractionations during chlorophyll biosynthesis in C3 higher plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 911-920, 2005.

CHUNGSAMARNYART, N.; SIRINARUMITR, T.; CHUMSING, W.; WAJJAWALKU, W. *In vitro* Study of Antiviral Activity of Plant Crude-extracts against the Foot and Mouth Disease Virus. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 41, p. 97-103, 2007.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltld.) K.Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 170-177, 2006.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potencial of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

COSENDEY, M. A. E.; BERMUDEZ, J. A. Z.; REIS, A. L. A.; SILVA, H. F.; OLIVEIRA, M. A.; LUIZA, V. L. Assistência farmacêutica na atenção básica de saúde: a experiência de três estados brasileiros. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 171-182, 2000.

CRONQUIST, A. **An integrated system of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DEL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) - Primera parte: Plantas nativas. **Multequina**, v. 6, p. 49-66, 1997.

DESCHNER, E. E.; RUPERTO, J.; WONG, G.; NEWMARK, H. L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1193-1196, 1991.

DESHMUKH, M. N.; DESHPANDE, V. H.; RAO, A. V. R. Two new coumarins from *Toddalia aculeata*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 9, p. 1419-1420, 1976.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. New York: John Wiley & Sons Ltd., 1997.

DI CARLO, G.; AUTORE, G.; IZZO, A. A.; MAIOLINO, P.; MASCLO, N. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationship. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 1054-1059, 1993.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Minireview flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIAS, C. S.; MOURA, M. D.; CABRAL, A. G. S.; MOTA, S. G. R.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, T. M. S.; HARLEY, A. M. G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Nuevas feofitinas aisladas de *Anisacanthus brasiliensis* Lindau (Acanthaceae). **LABCIENCIA notícias técnicas del laboratorio**, v. 1, pág. 14-15, 2007.

DICKISON, W. C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Academic Press, 2000.

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; MOMOTA, H.; OHMOTO, Y.; TAKI, T. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 85-90, 2002.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.

ESHLETT, I. T.; TAYLOR, DAVID A. H. Isolation and structure elucidation of some derivatives of dimethylallylcoumarin, chromone, quinoline, and phenol from *Fagara* species, and from *Cedrelopsis grevei*. **Journal of the Chemical Society (C)**, v. 5, p. 481-484, 1968.

EVANS, J. E. Osteoporosis and the role of diet. **British Journal of Biomedical Science**, v. 51, p. 358-370, 1994.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. 2 ed. Pergamon Press: Great Britain, 1974.

FAHN, A.; CUTLER, D. **Xerophytes**. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1992.

FONSECA, A. P. N. D.; SILVA, G. D. F.; CARVALHO, J. J.; SALAZAR, G. D. C. M.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; TAGLIATI, C. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 842-847, 2007.

FORMAN, L.; BRIDSON, D. **The herbarium handbook**. Great Britain: Royal Botanic Gardens, Kew, 1989.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* Mont., Arecaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, 2005.

GAOXIONG, R.; ZHONGWEI, L.; HANDONG, S. Chemical constituents of *Peucedanum decumbens*. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 12, n. 3, p. 335-339, 1990.

GONZÁLEZ, F.; ROA, E. Z.; MONTIEL, E. Productividad primaria del fitoplancton en la bahía de Mochima, Venezuela. **Investigaciones Marinas, Valparaíso**, v. 34, n. 2, p. 37-45, 2006.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 185-224 (suplemento), 1989.

GREGORY, R. P. F. **Biochemistry of Photosynthesis**. 2 ed. London: John Wiley & Sons LTD, 1978.

GROENINCKX, I.; DESSEIN, S.; OCHOTERENA, H.; PERSSON, C.; MOTLEY, T. J.; KAREHED, J.; BREMER, B.; HUYSMANS, S.; SMETS, E. Phylogeny of the herbaceous tribe Spermaceae (Rubiaceae) based on plastid DNA data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, p. 109-132, 2009.

GROTH, D. Identificação botânica de plantas e sementes de espécies invasoras na cultura da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 2, n. 3, p. 59-95, 1980.

GUERRERO-ANALCO, J. A.; HERSCH-MARTÍNEZ, P.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v. 71, n. 12, p. 1099-1105, 2005.

GYLMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. México: McGraw-Hill, 1996.

HAMERSKI, L.; CAVALHEIRO, A. J.; CARBONEZI, C. A.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, 2005.

HAMMODA, H. M.; ELA, M. A. A.; EL-LAKANY, A. M.; EL-HANBALI, O.; ZAKI, C. S.; GHAZY, N. M. New constituents of *Artemisia monosperma* Del. **Pharmazie**, v. 63, n. 8, p. 611-614, 2008.

HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry: plant phenolics**. v. 1. London: Academic Press, 1989.

HAUSER, E. W.; PARHAM, S. A. Effects of annual weeds and cultivation on the yield of peanuts. **Weed Research**, v. 9, n. 3, p. 192-197, 1969.

HUANG, X.; LI, M.; XU, B.; ZHU, X.; DENG, Z.; LIN, W. Proteasome and NF- κ B inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 582-592, 2007.

IWU, M. M.; IGBOK, O. A.; OKAUNJ, C. O.; TEMPESTA, M. S. Antidiabetic and aldose reductase activities of biflavanones of *Garcinia kola*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42, p. 290-292, 1990.

JERZ, G.; ARREY, T. N.; WRAY, V.; DU, Q.; WINTERHALTER, P. Structural characterization of 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 413-413, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5843-5848, 2004.

KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. New anthraquinone and iridoid from the fruits of *Morinda citrifolia*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 12, p. 1597-1599, 2005.

KANASHIRO, M. **As diferenças entre as árvores**. São Paulo: Pesquisa FAPESP, 2002.

KIM, K. K.; KAWANO, Y.; YAMAZAKI, Y. A novel porphyrin photosensitizer from bamboo leaves that induces apoptosis in cancer cell lines. **Anticancer Research**, v. 23, n. 3B, p. 2355-2361, 2003.

KOBAYASHI, M.; ISHIDA, K.; TERABAYASHI, S.; MITSUHASHI, H. 10-hydroxypheophytins and a new norlabdame diterpene from the leaves of *Cupressus funebris* Endl. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 3348-3349, 1991.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

KONG, L.; MIN, Z.; SHI, J. Chemical constituents from roots of *Jatropha curcas*. **Zhiwu Xuebao**, v. 38, n. 2, p. 161-166, 1996.

KOZAWA, M.; BABA, K.; OKUDA, K.; FUKUMOTO, T.; HATA, K. Studies on chemical components of "Bai Zhi" (supplement 1). On coumarins from "Japanese Bai Zhi". **Shoyakugaku Zasshi**, v. 35, n. 2, p. 90-95, 1981.

LARKUM, A. W. D.; KÜHL, M. Chlorophyll *d*: the puzzle resolved. **TRENDS in Plant Science**, v. 10, n. 8, p. 355-357, 2005.

LASSAK, E. V.; PINHEY, J. T. The Proton Magnetic Resonance of some coumarins and 2,2-dimethylchromens: further examples of inter-ring spin-spin coupling. **Journal of the Chemical Society (C)**, v. 5, p. 2000-2001, 1967.

LEWIS, W. H.; OLIVER, R. L. Revision of *Richardia* (Rubiaceae). **Brittonia**, v. 26, p. 271-301, 1974.

LING, W. H.; JONES, P. J. H. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. **Life Sciences**, v. 57, p. 195-206, 1995.

LOPES, L. E.; BUZATO, S. Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 785-795, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MALIKOV, V. M.; SAIDKHODZHAEV, A. I. Coumarins. Plants, structure, properties. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 34, n. 3, p. 345-432, 1998.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. **Coleta e Identificação de Espécimes Botânicos**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém: DOC 13, 2002.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MATSUO, A.; ONO, K.; HAMASAKI, K.; NOZAKI, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 427-430, 1996.

MCANUFF, M. A.; HARDING, W. W.; OMORUYI, F. O.; JACOBS, H.; MORRISON, E. Y.; ASEMOTA, H. N. Hypoglycemic effects of steroidal saponins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoids*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1667-1672, 2005.

MERÉTIKA, A. H. C. **Conhecimento e utilização de plantas medicinais por comunidades de pescadores do município de Itapoá – SC**. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Centro de Ciências Biológica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. v. 1., Oxford: Clarendon Press, 1979.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide- physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONDON, A.; CALLSEN, H.; HARTMANN, P. Extractives from Cneoraceae. III. Separation methods for *Cneorum pulverulentum* and investigation of the fraction of waxes and phytosterols. **Chemische Berichte**, v. 108, n. 6, p. 1989-2004, 1975.

MONGRAND, S. ; BADOUC, A. ; PATOUILLE, B. ; LACOMBLEZ, C. ; CHAVENT, M. ; BESSOULE, J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. **Phytochemistry**, v. 66, p. 549-559, 2005.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação freqüente do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 63-69, 2003.

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 123-132, 2005.

MOOT, K. A.; GIBSON, A. C.; O'LEARY, J. W. The adaptative significance of amphistomatic leaves. **Plant Cell and Environment**, v. 5, p. 455-460, 1982.

MOURA, M. D.; CABRAL, A. G. S.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; MOTA, S. G. R.; LINS, A. C. S.; HARLEY, A. M. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, C. F.; DIAS, C. S. Fitoquímica e atividade inibitória da topoisomerase II-a humana de *Anisacanthus brasiliensis* Lindau (Acanthaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 60., 2009, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, 2009.

MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTIN, S. M. O.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 452-455, 2006.

MULHOLLAND, D. A.; KOTSOS, M.; MAHOMED, H. A.; KOORBANALLY, N. A.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; VAN UFFORD, L. Q.; VAN DEN BERG, A. J. J. Coumarins from *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 919-922, 2002.

NAKATANI, Y.; OURISSON, G.; BECK, J. P.; Chemistry and biochemistry of Chinese drugs. VII. Cytostatic pheophytins from silkworm excreta, and derived photocytotoxic pheophorbides. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2261-2269, 1981.

NASCIMENTO, M. V. O.; GOMES, D. M. S.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Bathysa stipulata* (Vell.) Presl. (Rubiaceae). **Revista Unimar**, v. 18, n. 2, p. 387-401, 1996.

NATIONAL Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan). Yukinae Yamazaki, Yasuhiro Kono. **Photosensitizers and tumor cytotoxic agents containing porphyrins from plants**. JP 2004217541, 05 agosto 2004.

NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J. L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 383-388, 2002.

NIÑO, J.; NARVÁEZ, D. M.; MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 566-570, 2006.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, V. 18 (Supl.), p. 718-723, 2008.

OCAMPO, R.; REPETA, D. J. 13²(S)-OH methyl bacteriopheophorbide a allomer in sedimentary organic matter. **Organic Geochemistry**, v. 35, p. 209-214, 2004.

OLIVEIRA, R. A. G. **Plantas medicinais usadas na dermatologia: avaliação da atividade biológica de seus extratos, óleos essenciais e suas associações**. 2006. 220 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa, 2006.

OLMEDO, D.; RODRIGUEZ, N.; VASQUEZ, Y.; SOLIS, P. N.; LOPEZ-PEREZ, J. L.; FELICIANO, A. S.; GUPTA, M. P. A new coumarin from the fruits of *Coutarea hexandra*. **Natural Product Research**, v. 21, n. 7, p. 625-631, 2007.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; NOGUCHI, H.; DE-EKNAMKUL, W.; SANKAWA, U. Naphthoquinones and coumarins from *Impatiens balsamina* root cultures. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1141-1143, 1995.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents recent advances. **Fitoterapia**, v. 62, p. 371-389, 1991.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3. ed. [s.l.]: Thomson Learning, 2001.

PEDRINHO JÚNIOR, A. F. F.; BIANCO, S.; PITELLI, R. A. Acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Richardia brasiliensis*. **Planta daninha**, v. 22, n. 1, p. 53-61, 2004.

PELTER, A.; WARD, R. S.; GRAY, T. I. The Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of Flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 23, p. 2475-2483, 1976.

PEREIRA, G. F. **A família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do alto Rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermaceae**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007a.

PEREIRA, M. M.; SOUZA-JÚNIOR, S. N.; ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R. B.; MACHADO, P. O.; AZEVEDO, A. O.; MOREIRA, F. H.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae), **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n.3, p.1-8, 2006a.

PEREIRA, M. S.; BARBOSA, M. R. V. A Família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 305-318, 2004.

PEREIRA, Z. V. **Rubiaceae Juss. do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul: florística, sistema reprodutivo, distribuição espacial e relações alométricas de espécies distílicas**. 2007. 100 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007b.

PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M.; GARCIA, F. C. P. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 207-224, 2006b.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PINTO, D. S. **Primeiros estudos quimiotaxonômicos do gênero *Richardia*: fitoquímica da espécie *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2008. 148 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa, 2008.

PINTO, D. S.; TOMAZ, A. C. A.; NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; ALMEIDA, J. R. G. S.; CAVALCANTE, L. S.; DIAS, C. S.; CUNHA, E. V. L. Antioxidant activity of *Richardia brasiliensis* Gomes. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 20., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 2008a.

PINTO, D. S.; TOMAZ, A. C. A.; TAVARES, J. F.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; DIAS, C. S.; BRAZ-FILHO, R.; DA-CUNHA, E. V. L. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 367-372, 2008b.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA-JUNIOR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

PROCÓPIO, S. O.; SILVA, E. A. M.; SILVA, A. A.; FERREIRA, E. A. **Anatomia foliar de plantas daninhas do Brasil**. Viçosa: UFV, 2003.

RAHMAN, M.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; SUKARI, M. A. Constituents of *Acronychia laurifolia*. **Fitoterapia**, v. 67, n. 2, p. 180, 1996.

RAKOTOARISON, O.; RABENAU, I.; LOBSTEIN, A.; UM, B.; SCHOTT, C.; ANTON, R.; RANDRIANTSOA, A.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Vasorelaxing properties and bio-guided fractionation of *Cedrelopsis grevei*. **Planta Medica**, v. 69, n. 2, p. 179-181, 2005.

RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; MULHOLLAND, D. A.; FARLAND, K. M. Prenylated coumarins from *Cedrelopsis longibracteata* (Ptaeroxylaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 301-304, 2005.

REISCH, J.; STROBEL, H. New constituents from *Toddalia aculeata* PERS., Rutaceae. **Pharmazie**, v. 37, n. 12, pág. 862-863, 1982.

ROGERS, G. K. The genera of Rubiaceae in the southeastern United States, part II. Subfamily Rubioideae, and subfamily Cinchonoideae revisited (*Chiococca*, *Erithalis*, and *Guettarda*). **Harvard Papers in Botany**, v. 10, p. 1-45, 2005.

RONCHI, C. P.; TERRA, A. A.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R. Acúmulo de nutrientes pelo cafeeiro sob interferência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 219-227, 2003.

ROSSI, A. A. B.; OLIVEIRA, L. O.; VIEIRA, M. F. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 2, p. 285-294, 2005.

RÜDIGER, W. Chlorophyll metabolism: from outer space down to the molecular level. **Phytochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1151-1167, 2005.

SAKDARAT, S.; SHUYIPROM, A.; PIENTONG, C.; EKALAKSANANAN, T.; THONGCHAI, S. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutas* Lindau. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1857-1860, 2009.

SALATINO, A.; MONTENEGRO, G.; SALATINO, M. L. F. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, n. 2, p. 117-124, 1986.

SAN MARTIN MATHEIS, H. A. **Efeitos de diferentes coberturas mortas obtidas a partir do manejo mecânico com roçadeira lateral na dinâmica populacional de plantas daninhas em citros**. 2004. 100 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, João Pessoa, 2004.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SCHWIKKARD, S. L.; MULHOLLAND, D. A.; HUTCHINGS, A. Phaeophytins from *Tapura fisheri*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2391-2394, 1998.

SHEN, Y. H.; LI, S. H.; HAN, Q. B.; LI, R. T.; SUN, H. D. Coumarins from *Coriaria nepalensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 8, n. 4, p. 345-350, 2006.

SILVA, A. J. R.; ANDRADE, L. H. C. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral – Mata do estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 45-60, 2005.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1250-1254, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007.

SIMONSEN, H. T.; ADSERSEN, A.; BREMNER, P.; HEINRICH, M.; SMITT, U. W.; JAROSZEWSKI, J. W. Antifungal constituents of *Melicope borbonica*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 542–545, 2004.

SMITH, D. A.; BANK, S. W. **Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure- activity relationship**. New York: Alan R. Liss, 1986.

SOARES, E. L. C.; VENDRUSCOLO, G. S.; EISINGER, S. M.; ZÁCHIA, R. A. Estudo etnobotânico do uso de recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de 2001. I – Origem e fluxo do conhecimento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 69-95, 2004.

SOARES, R. R. S. **Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. 2006. 92 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SOIKE, H.; PESCHLOW, E. L. Characterization of flavonoids from *Bacharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Médica**, v. 53, p. 37-39, 1987.

SOUZA, M. F. V.; SILVA, D. A. **Extração, isolamento e reações de caracterização de constituintes químicos**. In: Psicofarmacologia: fundamentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, Disponível em : <http://www.mobot.org>. Acesso em: 25 out. 2009.

STRAIN, H. H.; MANNING, W. M. Chlorofucine (chlorophyll γ): a green pigment of diatoms and brown algae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 144, p. 625–636, 1942.

STREET, H. E.; COCKBURN. Plant metabolism. **Pergamon international libray**, p. 204-205, 1972.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

SU, B.; KANG, Y.; PINOS, R. E.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; SOEJART, D. D.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Isolation and absolute stereochemistry of coussaric acid, a new bioactive triterpenoid from the stems of *Coussarea brevicaulis*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 293-302, 2003.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TANAKA, A.; ITO, H.; TANAKA, R.; TANAKA, N. K.; YOSHIDA, K.; OKADA, K. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. **Plant Biology**, v. 95, p. 12719-12723, 1998.

TANAKA, T.; KOIKE, K.; MITSUNAGA, K.; NARITA, K.; TAKANO, S.; KAMIOKA, A.; SASE, E.; OUYANG, Y.; OHMOTO, T. Chromones from *Harrisonia perforata*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1787-1790, 1995.

TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; DA-CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 47-52, 2008.

TSAI, I.; WUN, M.; TENG, C.; ISHIKAWA, T.; CHEN, I. Anti-platelet aggregation constituents from Formosan *Toddalia asiatica*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1377-1382, 1998.

UM, B. H.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; SPIEGEL, C.; YICE, F.; RAKOTOARISON, O.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; ANTON, R. New coumarins from *Cedrelopsis grevei*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7-8, p. 638-642, 2003.

VASCONCELOS, J. M. F.; SILVA, M. A. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1421-1424, 1998.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, M. F.; PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M. Fenologia da floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 3, p. 471-480, 2006.

VON ELBE, J. H. Colorantes. In: FENNEMA, O. W. **Química de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Wisconsin – Madison, 2000.

WEI, H.; ZENG, F.; LU, M.; TANG, R. Studies on chemical constituents from the root of *Coriaria nepalensis* Wall (*Coriaria sinica* Maxim). **Yaoxue Xuebao**, v. 33, n. 9, pág. 688-692, 2002.

WERKER, E. Trichome diversity and development. In: HALLAHAN, D. L.; GRAY, J. C. **Plant Trichomes**. London: Academic Press, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Legal status of traditional medicine and complementary alternative medicine**. Geneva: World Health Organization, 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/em>>. Acesso em: 20 set. 2008.

WU, T.; HUANG, S. C.; JONG, T. T.; LAI, J. S.; KUOH, C. S. Coumarins, acridone alkaloids and a flavone from *Citrus grandis*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 2, p. 585-587, 1988.

WU, T.; HUANG, S.; WU, P.; KUOH, C. Alkaloidal and other constituents from the root bark of *Clausena excavata*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 3, p. 523-527, 1999.

XU, H.; VAVILIN, D.; VERMAAS, W. Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 14168-14173, 2001.

YAMAGUCHI, S.; MIYAZAWA, R.; YONEZAWA, S.; KAWASE, Y. The synthesis of some dimethylpyranocoumarins and isopropenyldihydrofuranocoumarins. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 62, p. 3593-3597, 1989.

YAMAGUCHI, S.; MURO, S.; KOBAYASHI, M.; MIYAZAWA, M.; HIRAI, Y. Absolute structures of some naturally occurring isopropenyldihydrobenzofurans, remirol, remiridiol, angenomalin, and isoangenomalin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 16, p. 6274-6278, 2003.