



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

LÁZARO ROBSON DE ARAÚJO BRITO PEREIRA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Richardia grandiflora* (Cham. &
Schltdl.) Steud. (RUBIACEAE)**

JOÃO PESSOA – PB
2011

LÁZARO ROBSON DE ARAÚJO BRITO PEREIRA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (RUBIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica

ORIENTADOR: Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

**JOÃO PESSOA – PB
2011**

P436c Pereira, Lázaro Robson de Araújo Brito.

Contribuição ao estudo fitoquímico de *Richardia grandiflora* (Cham.&Scltdl.) Steud.(Rubiaceae) /Lázaro Robson de Araújo Brito Pereira. -- João Pessoa: [s.n.], 2011.

99 f. : il.

Orientador : Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha.

Co-Orientadora: Maria de Fátima Vanderlei de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1.Produutos naturais. 2.Farmacocímica. 3.Rubiaceae. 4.*Richardia grandiflora*.
5.Métodos Cromatográficos. 6. Métodos espectroscópicos.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

LÁZARO ROBSON DE ARAÚJO BRITO PEREIRA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Richardia grandiflora* (Cham. &
Schltdl.) Steud. (RUBIACEAE)**

BANCA EXAMINADORA

**Prof^a. Dr^a. Ivana Maria Fachine Sette/UEPB
(Examinador externo)**

**Prof^a. Dr^a. Maria Célia de Oliveira Chaves/UFPB
(Examinador interno)**

**Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha/UFPB
(Orientador)**

**Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza/UFPB
(Co-orientadora)**

À minha mãe, Marluce de Araújo Brito, pelos princípios e valores transmitidos, pela dedicação e amor em favor da minha formação. A ela, dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Marluce, e aos meus irmãos, Braz e Magnólia, pelo verdadeiro sentido de família partilhado, pelo amor, carinho, paciência, conselho, auxílio, apoio e incentivo que vêm me proporcionando em todos os momentos da minha vida.

A todos os meus familiares que, mesmo ausentes ou distantes, desejaram o meu êxito.

Ao Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha e à Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza, pela disponibilidade com que aceitaram me orientar, pelos ensinamentos valiosos transmitidos, pela confiança em mim depositada, pela compreensão, paciência, incentivo e amizade nesta caminhada acadêmica.

Aos Professores da Pós-graduação, cujos preciosos ensinamentos profissionais e para a vida não serão esquecidos.

À Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Dantas de Medeiros pelo apoio e incentivo quando da minha decisão em tentar fazer pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Agra pela identificação botânica da espécie estudada.

À banca examinadora pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelos diversos serviços prestados, especialmente Ataíde Matias, Glória, Raimundo Nonato, Alexsandro, Sócrates Golzio, Tânia Alves e Vicente Carlos pela amizade e por não medirem esforços para proporcionar o bom andamento de nossos trabalhos.

A todos que fizeram e fazem parte da equipe da Prof^a. Fátima Vanderlei pelo acolhimento e enriquecedora convivência científica e de amizade: Anna Cláudia, Davi, Eugênia, Édila, Francisco, Jéssica, Marianne, Otemberg, Rafael, Raquel, Roosevelt, Tiago, Wemerson e Yanna.

A todos os alunos da turma do mestrado 2009, especialmente aos amigos Augusto, Jocelmo, Camila, Amanda, Jaqueline, Ana Sílvia, Isis, Ingrid, Severino, Yanna, Paula, Jaime e Juliana.

Aos demais alunos pelo companheirismo e agradável convívio.

Aos queridos amigos: Gustavo Pereira, Isabel Cristina, Glaucienne Félix, Jahamunna Abrantes, Edilson Dantas, Davy Macgyver, Fernanda Granja e Gustavo Henrique pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

A todos os colegas da turma de Peritos Químico-Legais do curso de formação da Polícia Civil da Paraíba 2010, pela motivação e apoio durante a elaboração desta dissertação.

A todos os meus amigos que, mesmo na distância, acompanharam minha trajetória e sabem o quanto significam para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos os cidadãos brasileiros que, mediante o pagamento dos seus impostos, financiaram o desenvolvimento desta pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt: Acetato de etila

APT: Attached Proton Test

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCEN: Centro de Ciências Exatas e da Natureza

CDCl_3 : Clorofórmio deuterado

CD_3OD : Metanol deuterado

CHCl_3 : Clorofórmio

CH_3 : Metil

cm: Centímetro

d: Dubleto

DCF: Departamento de Ciências Farmacêuticas

dd: Duplo dubleto

dl: Dubleto largo

DMADP: Dimetilalil Difosfato

DOXP: 1-desoxi-d-xilulose fosfato

dq: Duplo quarteto

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EtOH: Etanol

FDP: Difosfato de Farsenilo

FeCl_3 : Cloreto Férrico

FT-IR: Fourier Transform-Infrared

g: Grama

GDP: Difosfato de Geranilo

GGDP: Difosfato de Geranilgeranilo

Hz: Hertz

IPP: Isopentenil Pirofosfato

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

KBr: Brometo de potássio

LTF: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

m: Multiplete

MeOH: Metanol

MEP: Metileritritol

MHz: Megahertz

mg: Miligrama

mL: Mililitro

NAPRALERT: Natural Products Alert

nm: Nanômetro

o: Orto

OMS: Organização Mundial da Saúde

p: Para

ppm: Partes por milhão

p.: Página

Rf: Fator de Retenção

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Singleto

sl: Singleto largo

t: Tripleto

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UV: Ultravioleta

δ : Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	27
3.1 Aspectos gerais da família Rubiaceae.....	28
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Richardia</i>	31
3.3 Considerações sobre a espécie <i>Richardia grandiflora</i> (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae).....	32
3.4 Considerações sobre as classes de constituintes químicos isolados de <i>Richardia grandiflora</i> e seus aspectos biossintéticos.....	35
3.4.1 Terpenos.....	35
3.4.1.1 Considerações gerais.....	35
3.4.1.2 Aspectos biossintéticos dos terpenos.....	35
3.4.2 Feofitinas.....	39
4 EXPERIMENTAL.....	41
4.1 Levantamento bibliográfico.....	42
4.2 Coleta do material botânico.....	42
4.3 Processamento da planta.....	42
4.4 Triagem fitoquímica.....	43
4.5 Obtenção do extrato etanólico bruto.....	43
4.6 Cromatografia líquido-líquido do extrato etanólico bruto.....	43
4.7 Isolamento e purificação dos constituintes químicos da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de <i>Richardia grandiflora</i>	44

4.7.1 Procedimentos cromatográficos.....	44
4.7.1.1 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila.....	45
4.7.1.2 Processamento cromatográfico da fração 03/05 da Coluna 01.....	45
4.7.1.3 Recristalização da fração 06 da Coluna 01.....	46
4.7.1.4 Processamento cromatográfico da fração 10/12 da Coluna 01.....	46
4.8 Caracterização estrutural dos constituintes químicos.....	47
4.8.1 Infravermelho.....	47
4.8.2 Ressonância magnética nuclear.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Substâncias isoladas de <i>Richardia grandiflora</i>	54
5.2 Caracterização estrutural de Rg-1.....	55
5.3 Caracterização estrutural de Rg-2.....	64
5.4 Caracterização estrutural de Rg-3.....	74
6 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial do gênero <i>Richardia</i>	31
Figura 2 – Espécie <i>Richardia grandiflora</i>	32
Figura 3 – Espécie <i>Richardia grandiflora</i>	33
Figura 4 – Distribuição da espécie <i>Richardia grandiflora</i>	33
Figura 5 – Representação esquemática da biossíntese dos terpenos (TAIZ & ZEIGER, 2004).....	37
Figura 6 – Esquema geral da biossíntese dos terpenos (DABAGUE, 2008).....	38
Figura 7 – Formação dos feoforbídeos.....	39
Figura 8 – Diferença estrutural entre as clorofilas A e B.....	40
Figura 9 – Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Rg-1.....	60
Figura 10 – Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200MHz) de Rg-1.....	61
Figura 11 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200MHz) de Rg-1.....	61
Figura 12 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200MHz) de Rg-1.....	62
Figura 13 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de Rg-1.....	62
Figura 14 – Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de Rg-1..	63
Figura 15 – Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de Rg-1...	63
Figura 16 – Estruturas parciais de triterpenos das séries olean-12-enos (a) e urs-12-enos (b).....	65
Figura 17 – Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Rg-2.....	68
Figura 18 – Espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 200 MHz) de Rg-2.....	69
Figura 19 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 200 MHz) de Rg-2.....	69
Figura 20 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 200 MHz) de Rg-2.....	70
Figura 21 – Expansão 3 do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 200 MHz) de Rg-2.....	70
Figura 22 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CD_3OD , 50MHz) de Rg-2.....	71
Figura 23 – Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CD_3OD , 50MHz) de Rg-2.	71
Figura 24 – Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CD_3OD , 50MHz) de Rg-2.	72
Figura 25 – Expansão 3 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CD_3OD , 50MHz) de Rg-2.	72
Figura 26 – Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Rg-3.....	79
Figura 27 – Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) de Rg-3.....	80
Figura 28 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) de Rg-3.....	81
Figura 29 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) de Rg-3.....	82

Figura 30 – Expansão 3 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) de Rg-1.....	83
Figura 31 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50MHz) de Rg-3.....	84
Figura 32 – Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50MHz) de Rg-3....	85
Figura 33 – Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50MHz) de Rg-3....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Fontes bibliográficas de algumas classes de metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família Rubiaceae.....	29
Quadro 2 – Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de <i>Richardia grandiflora</i>	50
Quadro 3 – Fracionamento cromatográfico da subfração 03/05 da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de <i>Richardia grandiflora</i>	51
Quadro 4 – Fracionamento cromatográfico da subfração 10/12 da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de <i>Richardia grandiflora</i>	52

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Obtenção e cromatografia líquido-líquido do extrato etanólico bruto de <i>Richardia grandiflora</i>	48
Esquema 2 – Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de <i>Richardia grandiflora</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz, respectivamente) da substância Rg-1.....	58
Tabela 2 – Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C da substância Rg-1 em CDCl_3 com valores encontrados na literatura para o ácido oleanólico, codificado como Mo-1 (δ , CDCl_3 , 50 MHz;) (MAHATO & KUNDU, 1994).....	59
Tabela 3 – Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de Rg-2 (δ , CD_3OD , 200 e 50 MHz, respectivamente) com os modelos Mo-1 – ácido oleanólico - (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz; MAHATO & KUNDU, 1994) e Mo-2 – ácido ursólico - (δ , CDCl_3 , 300 e 75 MHz; FALCAO, 2003).....	67
Tabela 4 – Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de Rg-3 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz respectivamente) com os modelos Mo-3 (δ , CDCl_3 , 300 e 75 MHz; JERZ ET al., 2007) e Mo-4 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz; NOGUEIRA, 2009).....	77
Tabela 5 – Dados comparativos de RMN ^{13}C da cadeia de fitila de Rg-3 (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com os modelos Mo-5 (δ , CDCl_3 , 125 MHz; TOMAZ, 2008) e Mo-6 (δ , CDCl_3 , 75 MHz; MELOS et al., 2007).....	78

RESUMO

As plantas medicinais constituem uma alternativa terapêutica para a prevenção e cura de doenças desde o início da humanidade. Tal relacionamento é tão íntimo que se confunde com a própria evolução do homem. O Brasil tem grande diversidade de plantas com potenciais medicinais, não-pesquisadas, e que são promissoras fontes de inovações terapêuticas e farmacológicas. A família Rubiaceae, considerada a maior da ordem Gentianales, possui cerca de 637 gêneros e 10.700 espécies. A espécie *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud., conhecida popularmente como ervaço, poaia ou ipeca-mirim, tem indicações etnofarmacológicas para uso contra hemorróidas e como vermífugo na forma de decocto. Visando a contribuir com o estudo quimiotaxonômico da família Rubiaceae e tendo em vista a pouca quantidade de dados na literatura acerca da constituição química da espécie *Richardia grandiflora*, esta foi submetida a um estudo fitoquímico para o isolamento de seus constituintes químicos, através dos métodos cromatográficos usuais, e posterior identificação estrutural dos mesmos, utilizando-se os métodos espectroscópicos de IV e RMN ^1H e ^{13}C , além de comparações com modelos da literatura. Deste estudo foram isolados e identificados três constituintes: o ácido oleanólico, o ácido ursólico, inéditos na espécie, e a 13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina (a), inédita no gênero.

PALAVRAS-CHAVE: Rubiaceae; *Richardia grandiflora*, constituintes químicos, métodos cromatográficos e espectroscópicos.

ABSTRACT

Medicinal plants are an alternative therapy for the prevention and cure of disease since the beginning of humanity. This relationship is so intimate that mingles with the own evolution of man. Brazil has a great diversity on plants that possess non-researched medicinal potential and are promising sources of therapeutic and pharmacological innovations. The Rubiaceae family is considered the biggest one of the order Gentianales, presenting around 637 genera and 10,700 species. The species *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud., known popularly as “ervanço”, “poaia” or “ipeca-mirim”, has ethnopharmacological indications to use as decoction against hemorrhoids and as vermifuge. Aiming at contributing to the chemotaxonomic study of the the family Rubiaceae and considering the small amount of data in literature about the chemical constitution of the species *Richardia grandiflora*, the latter was submitted to a phytochemical study to isolate its chemical constituents, through usual chromatographic methods, and after identifying them by means of spectroscopic methods such as IR and ^1H and ^{13}C NMR, besides comparison with literature data. Three constituents were isolated through this phytochemical study: oleanolic acid, ursolic acid, unpublished in the species, and 132-hydroxy-(132-S)-phaeophytin (a), isolated for the first time from the genre.

KEY WORDS: Rubiaceae; *Richardia grandiflora*, chemical constituents, chromatographic and spectroscopic methods.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais na terapêutica é muito antigo, e está intimamente relacionado com a própria evolução do homem. Dados revelam a sua utilização já pelo homem de Neanderthal, que usava de suas propriedades mágico-simbólicas quando se deparava com algum tipo de malefício. Para utilizar as plantas como medicamentos, os homens antigos valiam-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro, e da observação do uso de plantas pelos animais para determinadas doenças. Em suma, percebe-se que mitos, lendas e tradições apontam para o emprego amplo de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e quase em toda a humanidade (OLIVEIRA, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% dos países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais, as quais se encontram incorporadas à medicina tradicional. Esse fato demonstra a peculiar forma de transmissão e poder do conhecimento popular, que deve ser resgatado e desenvolvido não apenas na forma empírica, mas também nas instituições oficiais (SIMÕES, 1995).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso. Considerando-se as plantas medicinais importantes instrumentos da Assistência Farmacêutica, vários comunicados e resoluções da OMS expressam a posição do organismo a respeito da necessidade de valorizar o uso desses medicamentos, no âmbito sanitário. É sabido que 80% da população mundial depende das práticas tradicionais no que se refere à atenção primária à saúde, e 85% dessa parcela utiliza plantas ou preparações à base de vegetais. Ressalte-se aí que 67% das espécies vegetais medicinais do mundo são originadas dos países em desenvolvimento (OLIVEIRA, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2002 a 2005 reforçou o compromisso de estimular o desenvolvimento de políticas públicas, a fim de inseri-las no sistema oficial de saúde dos seus Estados-membros (OMS, 2002).

Face a esse reconhecimento oficial de seu valor como recurso clínico, farmacêutico e econômico, o uso das plantas medicinais cresce progressivamente em vários países, que vêm se normalizando e legislando acerca dos diferentes critérios de segurança, eficácia e qualidade que devem envolver esses produtos.

A química medicinal, utilizando diferentes estratégias metodológicas complementares, é, tradicional e reconhecidamente, ferramenta importante nesse processo de padronização do uso de fitoterápicos na medida em que, dentre suas inúmeras atribuições, ela engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e atividade) até suas características estruturais quando da(s) interação(ões) com os diferentes sistemas biológicos; a compreensão a nível molecular de processos bioquímicos, farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos (AMARAL; MONTANARI, 2002).

Dessa forma, as plantas, inicialmente usadas na sua forma natural, na preparação de chás, ungüentos, emplastros e que, mais tarde, especialmente no início do século XIX, serviram como fonte para obtenção de matéria-prima para a síntese de fármacos, mais recentemente, emergiram como peças-chave para o descobrimento de protótipos que servem como base racional para o desenvolvimento de medicamentos (VILEGAS; CARDOSO, 2007).

O valor deste atalho deve ser apreciado no seguinte contexto: a indústria farmacêutica considera razoável a relação de 1:10.000 entre compostos comercializados/estudados partindo

de pesquisas etnodirigidas; em comparação com aqueles que contam com procedimentos de triagem associados a química combinatória, clonagem de receptores e automação/robotização, os quais têm como razão 1:250.000. Mesmo em casos em que se conhece o mecanismo de ação desejado e se tem o ensaio in vitro apropriado para detectá-lo, a maior parte dos compostos que eventualmente interagem com a enzima ou o receptor em questão não é, infelizmente, biodisponível; ou, quando o é, acaba por demonstrar toxicidade inesperada em humanos (ELISABETSKY, 2003).

A química de produtos naturais, especialmente a fitoquímica, objetiva o isolamento, através de métodos cromatográficos, e o conhecimento estrutural dos metabólitos secundários, responsáveis pelos efeitos biológicos das plantas, através de técnicas espectroscópicas (SOUZA; SILVA, 2006). Possui, portanto, importante papel não apenas como embasamento científico de uma medicina alternativa, mas também como fonte de novos fármacos.

A ampliação das opções terapêuticas relacionados à fitoterapia é de importância estratégica para o Brasil, que possui vantagens e oportunidades para desenvolvimento da terapêutica, sendo o país de maior biodiversidade do planeta e possuidor de uma rica diversidade étnica e cultural, assegurando um valioso conhecimento tradicional relacionado ao uso de plantas medicinais, possuindo potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas que resultem em novas tecnologias e serviços (OLIVEIRA, 2006).

É de grande relevância o estudo das várias famílias de plantas de nossa flora, rica e diversificada, dando continuidade aos trabalhos científicos já iniciados e na busca de investigar novas potencialidades terapêuticas, através de estudos fitoquímicos, realizando o monitoramento através de ensaios biológicos e microbiológicos, desenvolvendo e otimizando o processo de produção de fitofármacos, a fim de se obter extratos, frações e substâncias isoladas para uso em formulações e realizar pesquisas para validação de medicamentos de origem vegetal.

Desde o ano de 1978, o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) desenvolve estudos utilizando espécies vegetais da flora brasileira visando a engrandecer o conhecimento químico e farmacológico das mesmas. Portanto, a espécie *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud., pertencente à família Rubiaceae, foi alvo do nosso interesse científico, visto que trata-se de uma espécie com apenas uma citação na literatura (TOMAZ et al, 2008). Este estudo contribuirá para a quimiotaxonomia da família Rubiaceae através do seu estudo fitoquímico, buscando-se desse modo conhecer sua composição química, que é a base essencial para o direcionamento de estudos farmacológicos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para o estudo fitoquímico da espécie *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. colaborando, portanto, para o conhecimento quimiotaxonômico da família Rubiaceae.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolamento de constituintes químicos de *Richardia grandiflora* através do uso de métodos cromatográficos adequados.
- ✓ Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados utilizando-se para este fim técnicas espectroscópicas convencionais, tais como IV e RMN de ^1H e ^{13}C .
- ✓ Disponibilizar os extratos, frações, substâncias isoladas e caracterizadas estruturalmente para a realização de testes farmacológicos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aspectos gerais da família Rubiaceae

A família Rubiaceae é considerada a maior da ordem Gentianales (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006), representada por aproximadamente 637 gêneros e 10.700 espécies (MONGRAND et al., 2005). No Brasil foram registrados 96 gêneros e mais de mil espécies, dos quais Barbosa *et al* (2006) cita que 66 gêneros e 309 espécies encontram-se no Nordeste. Na Paraíba estima-se uma representação de 37 gêneros e cerca de 70 espécies, sendo *Psychotria* L., *Borreria* G.Mey., *Guettarda* L., *Diodia* L., e *Mitracarpus* Zucc. os gêneros mais diversos. Em um estudo da família realizado no principal remanescente de Mata Atlântica no norte do Estado da Paraíba por Pereira (2002) e Barbosa (2007), foram registrados 20 gêneros e 31 espécies.

A família é representada por plantas de hábito variado, cosmopolita, suas espécies estão classificadas em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae) e 44 tribos, essencialmente tropicais (ROBBRECHT, 1988). Segundo Mabberley (1997), ela ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermas, perdendo apenas para as Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae. Diversos gêneros são endêmicos da região neotropical com aproximadamente 4.555 espécies (ANDERSSON, 1992).

As espécies representantes da família Rubiaceae apresentam-se como árvores, arbustos, subarbustos, ervas ou plantas volúveis e seus ramos são lisos ou estriados, cilíndricos ou comprimidos lateralmente e glabros ou pilosos. As Estípulas apresentam-se interpeciolares inteiras, bipartidas, bífidas ou fimbriadas, persistentes ou caducas, glabras ou pilosas. Outra característica das Rubiaceae é apresentar folhas sésseis ou pecioladas, simples, opostas, opostas-cruzadas ou verticiladas, lanceoladas, oblongo-lanceoladas, oblongas, ovadas

ou obovadas e glabras ou pilosas. As Inflorescências são sésseis ou pedunculadas, racemosas ou cimosas, terminais ou axilares, brácteas presentes ou ausentes. Flores andróginas ou unissexuais, sésseis ou pediceladas. Cálice subulado, campanulado, truncado ou subtruncado, 2-6 laciniado, persistente ou decíduo, glabro ou piloso. Corola tubulosa, infundibuliforme, hipocrateriforme ou campanulada, tetra-hexâmera, branca, amarela, roxa, azul, rosada ou esverdeada, glabra ou pilosa. Os Estames de 4-6, são exsertos ou inclusos, alternos aos lobos da corola; com filetes glabros ou pilosos; anteras oblongas ou lineares, dorsifixas ou basifixas, glabras ou pilosas. O ovário é ínfero, bi-multilocular, um a muitos óvulos por lóculo. Estilete em geral exserto, inteiro, capitado, bífido ou bilobado. Frutos deiscentes ou indeiscentes, capsulares, esquizocárpicos, drupáceos ou bacáceos, brancos, vermelhos, amarelos, alaranjados, roxos, azuis, negros, castanhos, esverdeados ou castanhos, glabros ou pilosos (PEREIRA; BARBOSA, 2004).

As espécies de Rubiaceae destacam-se por sua grande importância econômica, que são exploradas como alimentícias (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Ixora* spp., *Mussaenda* spp., *Gardenia* spp. etc.), e também na indústria farmacêutica, como por exemplo *Cinchona pubescens* Vahl, produtora de quinina, empregada no tratamento da malária. Além disso, várias espécies são referidas popularmente como medicinais e/ou tóxicas, dentre as quais se destacam: *Coutarea hexandra* (Jacq.) K.Schum. e diversas espécies dos gêneros *Borreria*, *Cinchona*, *Richardia*, como medicinais; *Palicourea* e *Psychotria*, popularmente conhecidas como “mata-ratos”, que são consideradas venenosas (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006).

No que diz respeito ao estudo com relação às características fitoquímicas das plantas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos, que são importantes para o seu desenvolvimento: os metabólitos primários e os metabólitos secundários (NIERO et al., 2003). Os primários são indispensáveis para o vegetal, sendo utilizados principalmente

como matéria-prima industrial e incluem: carboidratos, ácidos graxos, lipídios, aminoácidos e proteínas. Os secundários, por sua vez, são originados por rotas sintéticas diversas, sendo sua produção restrita a determinados grupos de organismos, e são identificados como alcalóides, flavonóides, terpenóides, cumarinas, lignóides, taninos, dentre outros.

A família Rubiaceae apresenta uma ampla variedade de metabólitos secundários isolados de espécies dos seus mais diversos gêneros. O Quadro 1, p. 29 mostra esses dados.

Quadro 1 – Fontes bibliográficas de algumas classes de metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família Rubiaceae.

Metabólitos Secundários	Referências
Alcalóides	HENRIQUES et al., 2004; HE et al., 2005; SIMÕES-PIRES et al., 2006; XUAN et al., 2006; GUERRERO-ANALCO et al., 2007; KITAJIMA et al., 2007
Amidas	BANDYOPADHYAY et al., 2007
Antraquinonas	AHMAD et al., 2005; KAMIYA et al., 2005; PAWLUS et al., 2005; GUVENALP et al., 2006b; SANG, HO, 2006; SIDDIQUI et al., 2006; SIDDIQUI et al., 2007a; SIDDIQUI et al., 2007b
Cucurbitacinas	GUERRERO-ANALCO et al., 2005; GUERRERO-ANALCO et al., 2007; OLMEDO et al., 2007
Cumarinas	BENEVIDES; YOUNG; BOLZANI, 2004; LUCIANO et al., 2004; AHMAD et al., 2005; GUERRERO-ANALCO et al., 2005; GUERRERO-ANALCO et al., 2007; OLMEDO et al., 2007; SIDDIQUI et al., 2007b
Esteróides	SU et al., 2003; SANTOS et al., 2004; SU et al., 2005; GUVENALP et al., 2006a; MOURA et al., 2006; TOMAZ et al., 2008
Flavonóides	WANG et al., 1999; KRAFT et al., 2003; BENEVIDES; YOUNG; BOLZANI, 2004; LUCIANO et al., 2004; TUCHINDA et al., 2004; DEMIREZER et al., 2006; GUVENALP et al., 2006a; NAZARI et al., 2006; DJOUDI et al., 2007; NOIARSA et al., 2007; ZIN et al., 2007
Glicosídeos aromáticos	KAEWKRUD et al., 2007
Iridóides	HAMERSKI et al., 2003; DINDA et al., 2005; KAMIYA et al., 2005; KIM et al., 2005; SU et al., 2005; DEMIREZER et al., 2006; DINDA et al., 2006; GUVENALP et al., 2006a; GUVENALP et al., 2006b; MOURA et al., 2006; SAMOYLENKO et al., 2006; DJOUDI et al., 2007; JUMA; MAJINDA, 2007; KAEWKURUD et al., 2007; NOIARSA et al., 2007
Lignananas	KAMIYA et al., 2004; SU et al., 2005; SALMOUN et al., 2007

Terpenos	KRAFT et al., 2003; SU et al., 2003; SUKSAMRARN; TANACHATCHAIRATANA; KANOKMEDHAKUL, 2003; LUCIANO et al., 2004; BENEVIDES; YOUNG; BOLZANI, 2004; MUKHERJEE et al., 2004; TUCHINDA et al., 2004; DINDA et al., 2005; DEMIREZER et al., 2006; GUVENALP et al., 2006a; GUVENALP et al., 2006b; SALMOUN et al., 2007, PINTO et al, 2008.
Ácidos fenólicos	TOMAZ et al, 2008
Feofitina a	TOMAZ et al, 2008

O estudo químico dos vegetais é realizado mais precisamente quando o perfil químico do gênero ou família é conhecido. Portanto, além dos aspectos morfológicos e anatômicos, é muito importante a determinação da composição química das plantas. Desta forma, tendo em vista a variedade de constituintes químicos apresentados pela família Rubiaceae e na importância destes na pesquisa de potencialidades terapêuticas, é de extrema relevância a contribuição à quimiotaxonomia da referida família, através de uma investigação fitoquímica da espécie *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud., objeto deste estudo, haja vista que a quimiotaxonomia consiste no campo da ciência que utiliza as características químicas, especialmente os metabólitos secundários (alcalóides, terpenóides, flavonóides, lignóides, dentre outros) de um grupo de organismos para determinar sua classificação hierárquica entre os seres vivos.

3.2 Considerações sobre o gênero *Richardia*

O gênero *Richardia* possui cerca de 15 espécies, pertence à família Rubiaceae, subfamília Rubioideae, tribo Spermacoceae, com distribuição mundial, destacando-se do sul da América do Norte até o centro da América do Sul (Figura 1) (LEWIS; OLIVER, 1974). As plantas deste gênero são anuais ou perenes e apresentam inflorescências terminais com algumas ou numerosas flores suportadas por duas a quatro folhas involucrais, com partes florais geralmente trímeras ou hexâmeras e tetrâmeras, com cálice decíduo e circunséssil, e com frutos de 2 a 6 mericarpos decíduos de um eixo basal imperceptivelmente não-dividido (LEWIS; OLIVER, 1974).

Espécies do gênero *Richardia* são relatadas como “daninhas” (HAUSER; PARHAM, 1969; MONQUERO, 2003; MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; RONCHI et al., 2003; PEDRINHO-JÚNIOR; BIANCO; PITELLI, 2004; SAN MARTIN MATHEIS, 2004; MONQUERO, 2005; MONQUERO; CURY; CHRISTOFFOLETI, 2005) e reconhecê-las é importante no sentido de utilizá-las de forma a beneficiar o planejamento agrícola.

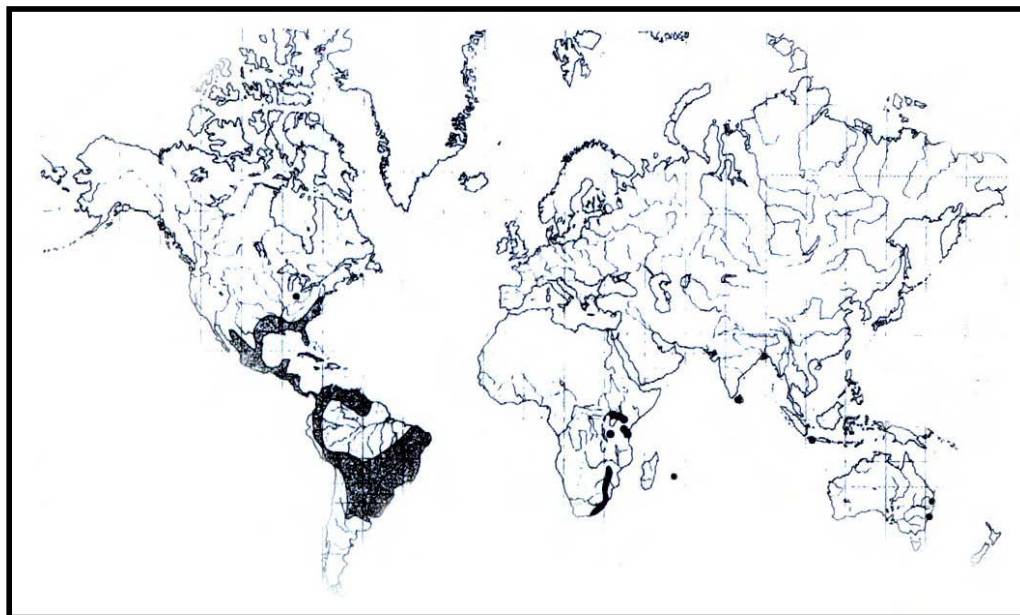


Figura 1 – Distribuição mundial do gênero *Richardia*.
(Adaptado de LEWIS; OLIVER, 1974)

3.3 Considerações sobre a espécie *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae)

A espécie *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Figuras 2 e 3) (TOMAZ, 2008) é anual, possui raízes adventícias formadas principalmente nos nós; seus caules medem 7 dm de comprimento, procumbentes e prostradas, densamente hirsutos, com pêlos comumente medindo 2 mm de comprimento. Suas folhas são linear-lanceoladas e sésseis, tipicamente com 1,5-4,5 cm de comprimento, 2-8 mm de largura, raramente são estritamente elípticas e pecioladas, hirsutas a comumente estrigosas em ambas as superfícies; a bainha é estipular com 2-3 mm de largura, e as setas com 2,5-8 mm de comprimento. Seus capítulos são multifloros com longos lobos do cálice prevalecentes; 4 brácteas foliáceas, ovais, ápice acuminado, hirsuto. Cálice 5-8 mm de comprimento, hirsuto a escabroso, os 6 lobos são linear-lanceolados, com 4-7 mm de comprimento, margens ciliadas; corola tipicamente rosada, lavanda ou lilás, ocasionalmente branca com lobos lilás, raramente laranja rosado, funicular, 12-20 mm de comprimento, os lobos de 2,5-5 mm de comprimento, freqüentemente com tufo de pêlos apicais; estigma clavado, trilobulado; ovário tricarpelar. Os 3 mericarpos, tem 3 mm de comprimento, com excrescências arredondadas (LEWIS; OLIVER, 1974).



Figura 2 – Espécie *Richardia grandiflora*.
(TOMAZ, 2008)



Figura 3 – Espécie *Richardia grandiflora*.
(TOMAZ, 2008)

Richardia grandiflora é nativa dos países Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil, ocorre desde o Estado do Maranhão até o Rio Grande do Sul (Figura 4) (LEWIS; OLIVER, 1974).



Figura 4 – Distribuição da espécie *Richardia grandiflora* (★).
(Adaptado de LEWIS; OLIVER, 1974)

Segundo Agra et al. (2007), a espécie *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud., conhecida popularmente como ervaço, poaia ou ipeca-mirim, tem indicações etnofarmacológicas para uso contra hemorróidas e como vermífugo na forma de decocto.

Em triagem fitoquímica preliminar, Edeoga et al. (2005) verificaram a presença de alcalóides, taninos, saponinas, esteróides, terpenóides, flavonóides e glicosídeos cardiotônicos na espécie *Richardia brasiliensis* Gomes e relataram ainda que esta é utilizada na medicina popular para o cura de eczema, tratamento de queimaduras e cura ativa para a malária avícola. Os extratos aquoso e etanólico, desta espécie, apresentaram atividade antifúngica observada por Adekunle (2000).

Paralelamente a este estudo, a espécie *Richardia brasiliensis* Gomes foi também investigada sob o ponto de vista fitoquímico, resultando no isolamento de metabólitos secundários pertencentes às seguintes classes: flavonóides, cumarinas, ácidos fenólicos; e terpenóides (PINTO et al., 2008).

A *Richardia grandiflora* foi objeto de estudo fitoquímico realizado por TOMAZ et al. (2008) onde foi atestada a presença de uma mistura de esteróides, ácidos fenólicos e da feofitina a. Porém esse estudo não esgotou as possibilidades de investigação fitoquímica da planta haja vista o grande número de metabólitos secundários existentes em outras espécies no gênero e na família desta planta.

Desta forma, é de grande importância a contribuição à quimiotaxonomia da família Rubiaceae mediante uma abordagem fitoquímica da espécie *Richardia grandiflora*, visando a enriquecê-la com dados para o seu perfil fitoquímico.

O presente estudo possibilitou o isolamento e caracterização estrutural de constituintes químicos pertencentes às seguintes classes: triterpenos e feofitinas.

3.4 Considerações sobre as classes de constituintes químicos isolados de *Richardia grandiflora* e seus aspectos biossintéticos

3.4.1 Terpenos

3.4.1.1 Considerações gerais

Terpenos são metabólitos secundários derivados biossinteticamente de uma unidade com 5 átomos de carbonos, o isopentenil pirofosfato – IPP, e constituem a maior classe de produtos naturais existente, com cerca de 30.000 exemplares. Os terpenóides desempenham importantes funções na planta atuando na atração de polinizadores e dispersores de semente (óleos essenciais e carotenóides), na sinalização e defesa contra injúria (compostos antibióticos e fitoalexinas), contra a herbivoria (repelentes), nas interações químicas entre plantas (alelopatia) agindo como fitotoxinas competitivas, atuam também como reguladores de crescimento (giberelinas e ácido abscísico), também exercem papel essencial na fotossíntese (pigmentos fotossintéticos como os carotenóides) e são componentes estruturais de membranas (fitoesteróis). Além disso, alguns terpenos constituem metabólitos farmacologicamente importantes como, por exemplo, o agente anti-tumoral taxol, e outros são extensivamente empregados na indústria química fina de sabores e fragrâncias (RODRIGUES, 2006).

3.4.1.2 Aspectos biossintéticos dos terpenos

Os terpenos são biossintetizados, a partir de acetil CoA e piruvato, por no mínimo duas rotas diferentes (Figura 5, p. 37): a rota do ácido mevalônico, onde três moléculas de acetil-CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas da rota, para formar este ácido e

posteriormente, o **IPP** (isopentenil-pirofosfato) o qual originará terpenos maiores; e a rota do metileritritol fosfato (**MEP**), onde o gliceraldeído 3-fosfato e piruvato levam à formação do isopentenil-pirofosfato (**IPP**) (DABAGUE, 2008).

Apesar da sua diversidade, todos os terpenóides derivam de duas unidades básicas comuns de cinco carbonos, o isopentenilo difosfato (**IPP**) e o seu isómero dimetilalil difosfato (**DMADP**), a partir dos quais todos os outros isoprenóides são formados por adição cabeça-cauda. Estas unidades são sintetizadas em duas vias paralelas: a via acetato/mevalonato (**MVA**), activa no citosol, e a via da 1-desoxi-D-xilulose fosfato (**DOXP**), activa nos plastídios. De uma forma geral, a via acetato/mevalonato é a via de biossíntese de esteróis, sesquiterpenos e triterpenóides, enquanto que a via da 1-desoxi-D-xilulose fosfato é a via de biossíntese de carotenóides, fitol (cadeia lateral das clorofilas), plastoquinonas, isopreno, monoterpenos e diterpenos. Os precursores directos dos isoprenóides, os compostos de cadeia linear difosfato de geranilo (**GDP**, C10), difosfato de farnesilo (**FDP**, C15) e difosfato de geranilgeranilo (**GGDP**, C20) são produzidos pelas atividades de três prenil transferases, que catalisam a adição de unidades **IDP** a difosfatos de prenilo com uma dupla ligação alílica ao grupo difosfato. A conversão dos vários difosfatos de prenilo em monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos é catalisada pelas enzimas terpeno sintetases. Os triterpenos, esteróides e tetraterpenos derivam da condensação de duas moléculas de **FDP** e **GGDP** (Figura 6, p. 38).

Após a formação das unidades terpênicas básicas (acíclicas) até a síntese completa das unidades definitivas, ocorrem reações de fusão e acoplamento de unidades, de prenilação adicional e outras reações de modificação responsáveis pelas fases finais da biossíntese de terpenos, como oxidações, metilações e ligações a compostos fenólicos ou lipídicos, por exemplo.

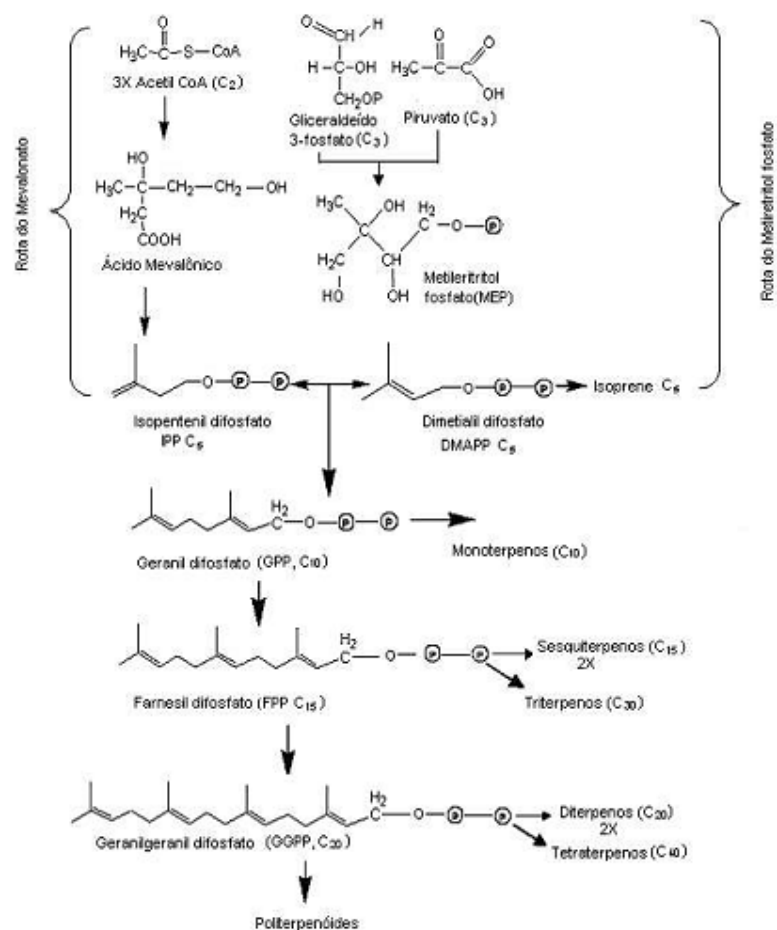
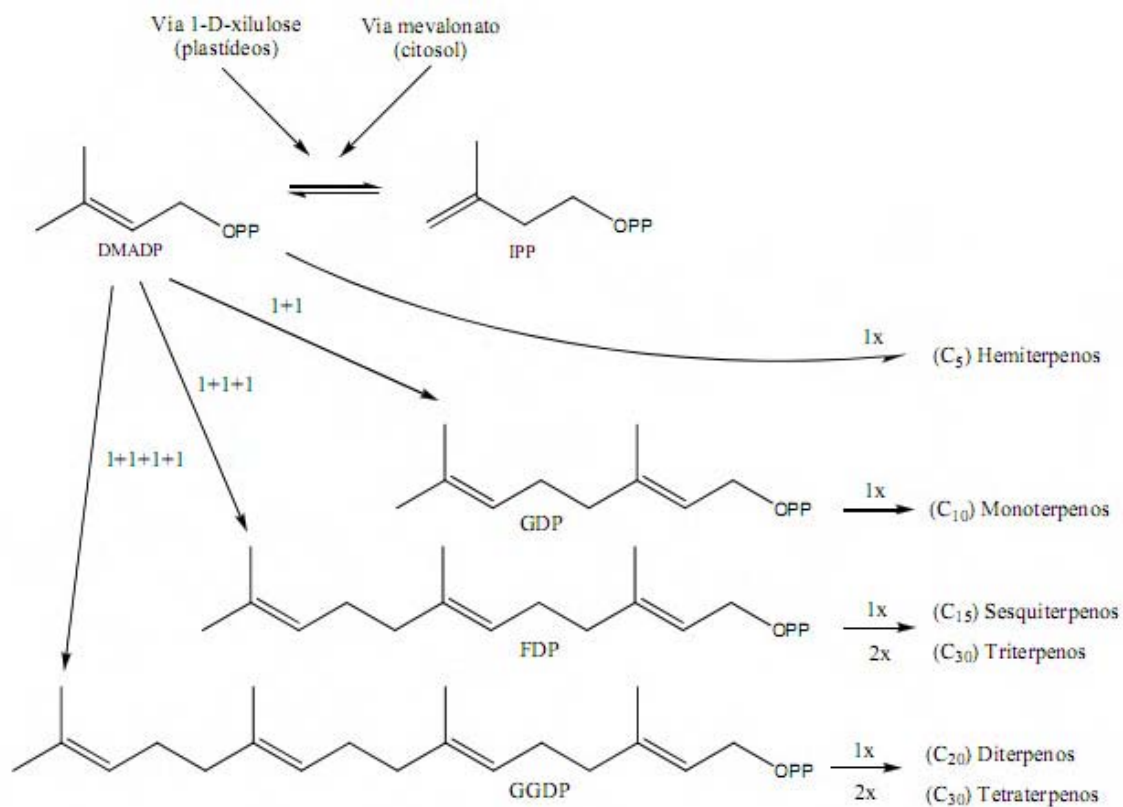


Figura 5 – Representação esquemática da biossíntese dos terpenos (TAIZ e ZEIGER, 2004)



DMADP: dimetilalil difosfato; FDP: difosfato de farnesilo; GDP: difosfato de geranilo; GGDP: difosfato de geranilgeranilo; IPP: isopentenilo difosfato.

Figura 6 – Esquema geral da biossíntese de terpenos
(DABAGUE, 2008)

3.4.2 Feofitinas

As feofitinas são substâncias contendo um sistema tetrapirrólico do tipo porfirínico. Originam-se biossinteticamente da clorofila a que sofre a perda de magnésio em meio ácido dando origem às feofitinas (sendo este fenômeno conhecido como feofitinização). Estas, por sua vez, são hidrolisadas na porção éster (remoção da cadeia fitol) por ação da enzima clorofilase, produzindo os feoforbídeos a e o fitol (SOARES, 2006; GREGORY, 1978; BARKER, 1977), conforme pode ser observado na Figura 7 (TOMAZ, 2008).

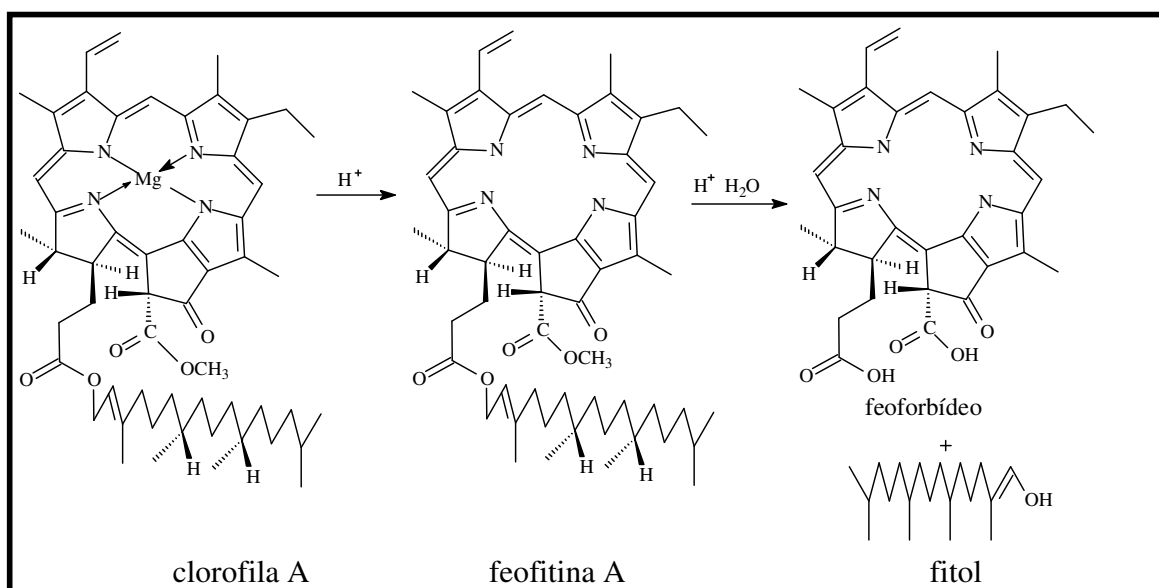


Figura 7 – Formação dos feoforbídeos (TOMAZ, 2008).

A diferença entre as clorofilas a e b está na posição 7¹, onde a clorofila a o grupo substituinte é $-CH_3$, enquanto na clorofila b o substituinte é $-CHO$, conforme Figura 8 (p. 40) (TOMAZ, 2008). Essa mesma designação é utilizada para feofitinas (UNIPR-IT, 2006). Estas possuem cor verde oliva, enquanto os feoforbídeos têm cor verde acastanhado e sofrem possivelmente transformações oxidativas que dão origem a produtos incolores de degradação. As clorofilas e as feofitinas são lipossolúveis, em decorrência de sua porção fitol, enquanto os feoforbídeos (sem o fitol) são hidrofílicos (MARTINS; SILVA, 2002).

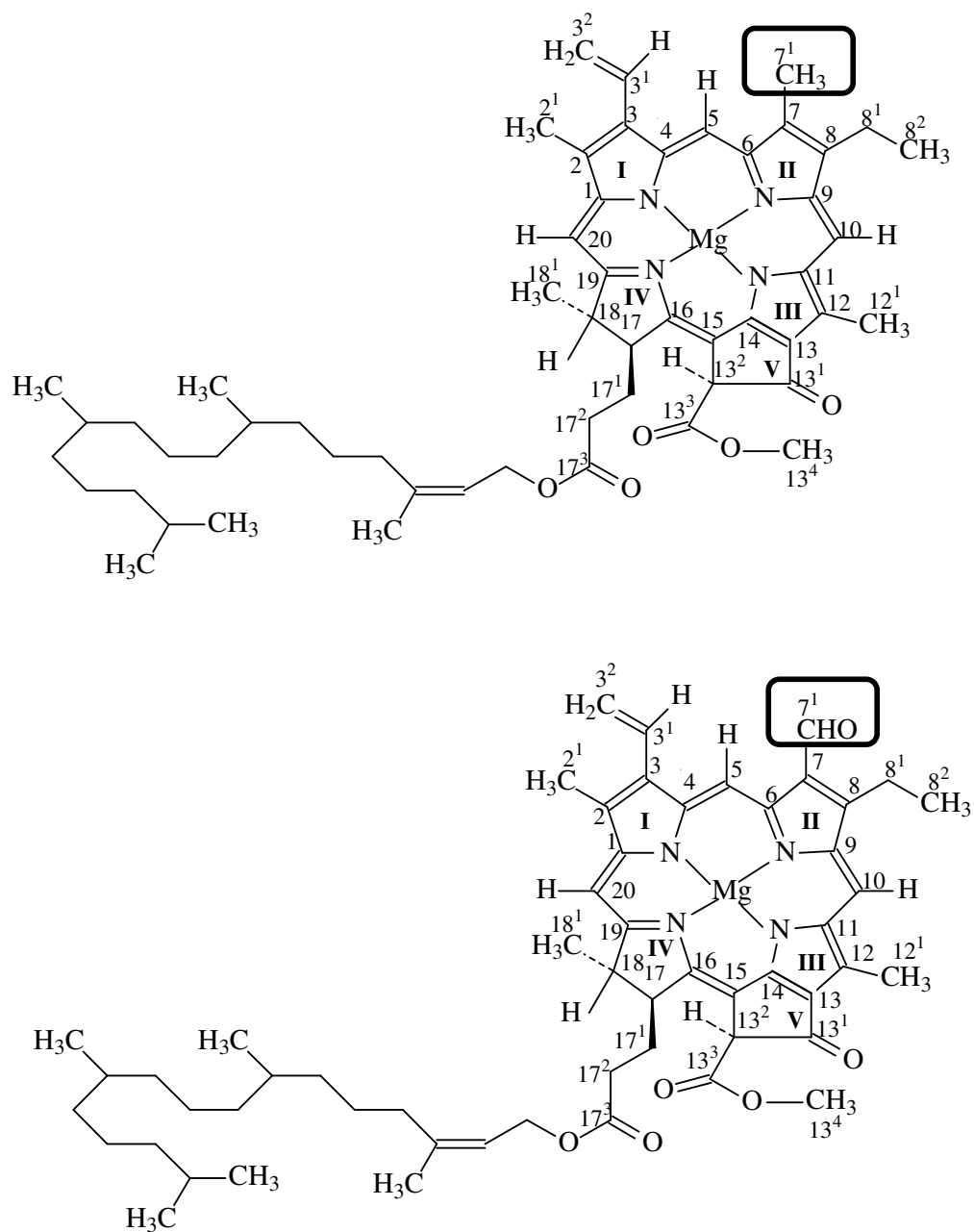


Figura 8 – Diferença estrutural entre as clorofilas a e b, respectivamente (TOMAZ, 2008).

EXPERIMENTAL

4 EXPERIMENTAL

4.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico de *Richardia grandiflora* foi realizado no decorrer do estudo na Biblioteca Central/UFPB (Campus I – João Pessoa, PB), utilizando-se também como ferramentas para tanto os bancos de dados Chemical Abstracts, Biological Abstracts, NAPRALERT (Natural Products Alert) e Web of Science, bem como pesquisas na Internet e em anais de eventos nacionais e internacionais.

4.2 Coleta do material botânico

O material botânico, *Richardia grandiflora* (planta total), foi coletado no Aeroclube da Paraíba, município de João Pessoa - PB, em julho de 2006. Sua identificação botânica foi realizada pela Prof^a Dr^a Maria de Fátima Agra do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais LTF/DCF/UFPB, sendo uma exsicata depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN/UFPB) sob o código M. F. Agra et al. 2953 (JPB).

4.3 Processamento da planta

O material botânico fresco (10.000 g) foi desidratado em estufa com ar circulante a 40°C durante 72 horas; após isto, foi triturado em moinho mecânico fornecendo 3.164 g do pó da planta (Esquema 1, p. 48).

4.4 Triagem fitoquímica

Marchas sistemáticas para detecção da presença de determinados grupos de metabólitos foram realizadas para um melhor direcionamento do trabalho. Frações do extrato da planta foram testadas com os reagentes de Bouchardat, Mayer, Dragendorff e ácido sílico tunguístico, mostrando resultado negativo para a possível presença de alcalóides. Os testes também foram negativos para taninos mediante reação com gelatina 0,5% e FeCl_3 (MATOS,1997).

Testes de espuma, Lieberman-Bouchardat e fita de magnésio demonstraram a presença de saponinas, esteróides e flavonóides, respectivamente (MATOS,1997).

4.5 Obtenção do extrato etanólico bruto

O pó da planta (3.164 g) foi submetido à maceração durante 72 horas a temperatura ambiente com etanol (EtOH) a 95%, sendo este processo repetido até extração exaustiva dos seus constituintes químicos. Em seguida, a solução etanólica foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se 400 g do extrato etanólico bruto, com rendimento de 12,64% (EEB) (Esquema 1, p. 48).

4.6 Cromatografia líquido-líquido do extrato etanólico bruto

Uma alíquota de 100 g do EEB *Richardia grandiflora* foi submetida a uma extração líquido-líquido (partição) com etanol-água (8:2), obtendo-se solução hidroalcoólica, a qual foi extraída utilizando-se como eluentes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, resultando nas suas respectivas fases e na fase hidroalcoólica. As fases foram concentradas

em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Esquema 1, p. 48). Tomando por base a polaridade das classes de constituintes químicos detectadas na triagem fitoquímica realizada e o peso final das fases concentradas, a fase acetato de etila foi tomada como preferencial, para dar início ao trabalho de pesquisa.

4.7 Isolamento e purificação dos constituintes químicos da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de *Richardia grandiflora*

O isolamento, purificação e análise dos constituintes químicos foram realizados através de técnicas cromatográficas.

4.7.1 Procedimentos cromatográficos

Para as cromatografias em coluna utilizou-se como suporte colunas de vidro cilíndricas com dimensões variando de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada; como fase estacionária adotou-se sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh) e/ou Sílica Flash (Merck). Solventes comerciais redistilados no LTF foram utilizados como fase móvel. A cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi empregada para a análise e reunião das frações obtidas por cromatografia em coluna. Foram utilizadas placas de vidro com dimensões de 5x20, 10x20 e 20x20 cm, preparadas com uma suspensão de sílica gel PF₂₅₄ 7749 (Merck) em água, seguindo técnica descrita por Matos (1997). As cromatoplas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 110 °C durante duas horas.

As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta (UV) sob os comprimentos de onda de 254 e 366 nm por meio de aparelho Mineralight, modelo

UVGL-58, como também pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo.

O critério de pureza adotado foi à visualização, através do UV, de uma única mancha após eluição das placas analíticas em, no mínimo, três sistemas de eluentes.

4.7.1.1 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila

Uma alíquota da fase acetato de etila (10,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna (Coluna 01) utilizando-se como adsorvente sílica gel 60 e como eluentes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade (Esquema 2, p. 49). Desta coluna foram coletadas 20 frações de 200 mL, concentradas em evaporador rotativo, analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (R_f 's) (Quadro 2, p. 50).

4.7.1.2 Processamento cromatográfico da fração 03/05 da Coluna 01

A fração 03/05 (1,25 g) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando-se como adsorvente sílica flash e como eluentes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade (Esquema 2, p. 49). Deste processo cromatográfico foram obtidas 54 frações de 50 mL cada, concentradas em evaporador rotativo, analisadas e reunidas de acordo com a metodologia anterior (Quadro 3, p. 51). A subfração 05, após recristalização em hexano, forneceu um sobrenadante e um precipitado (36 mg) o qual mostrou-se sob a forma de cristais esbranquiçados e, quando analisado em CCDA em vários sistemas de solventes, revelou-se puro, sendo, codificado como **Rg-4**. A subfração 23/24, após recristalização em hexano, mostrou-se sob a forma de pó esbranquiçado,

fornecendo 29 mg da substância codificada como **Rg-1**. A subfração 34 (25 mg) mostrou-se como um sólido amorfo de coloração verde-escura, codificado como **Rg-3**.

4.7.1.3 Recristalização da fração 06 da Coluna 01

A fração 06, após recristalização em hexano, forneceu um sobrenadante e um precipitado (98 mg) o qual mostrou-se sob a forma de pó esbranquiçado e, quando analisado em CCDA em vários sistemas de solventes, revelou-se puro, sendo, codificado como **Rg-2**.

4.7.1.4 Processamento cromatográfico da fração 10/12 da Coluna 01

A fração 10/12 (0,301 g), por cromatografia em coluna utilizando-se como adsorvente sílica flash e como eluentes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade (Esquema 2, p. 53), forneceu 49 frações de 25 mL cada (Esquema 2, p. 49) que foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus respectivos Rf's (Quadro 4, p. 52). A subfração 10/11, após recristalização em clorofórmio, forneceu um sobrenadante e um precipitado (17 mg), este mostrou-se sob a forma de cristais e, quando analisado por CCDA em vários sistemas de solventes, revelou-se puro, recebendo, então, o código **Rg-5**.

4.8 Caracterização estrutural dos constituintes químicos

A caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de *Richardia grandiflora* foi realizada através da análise dos espectros obtidos através dos métodos espectroscópicos de Infravermelho (IV) e de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono 13 (RMN ^{13}C), além de comparações com modelos da literatura.

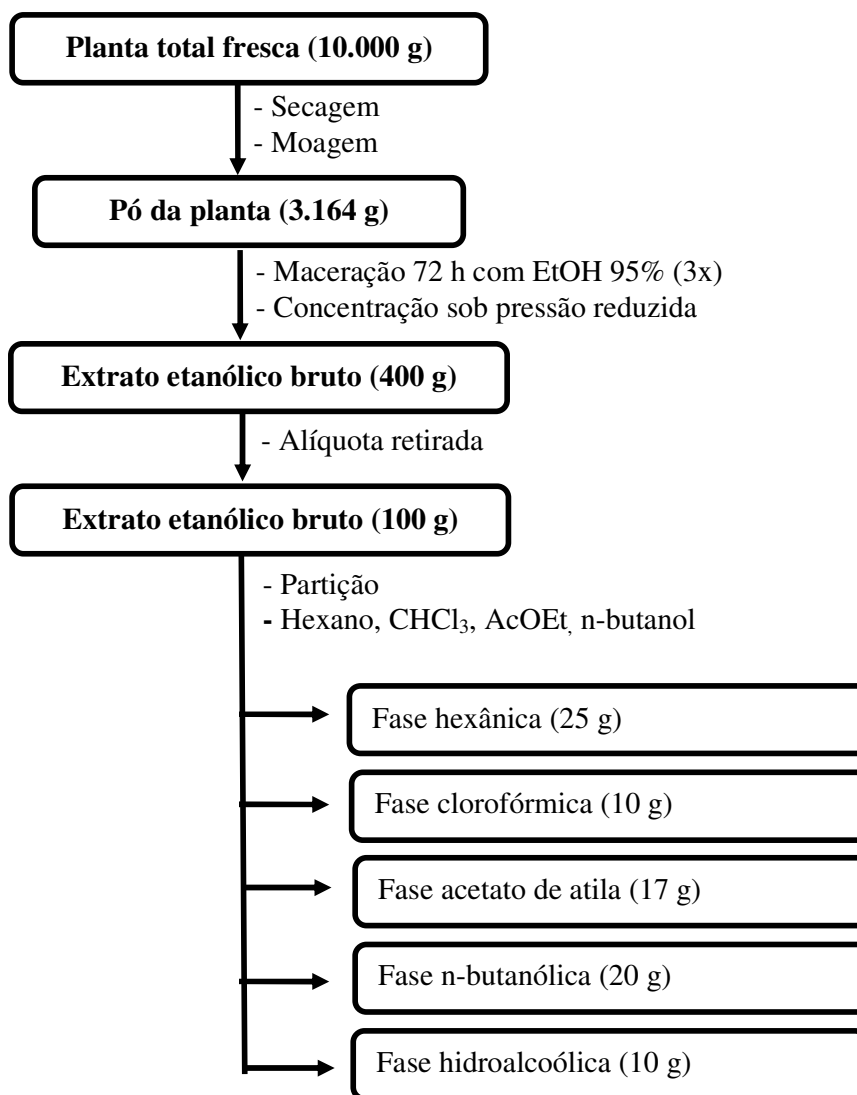
4.8.1 Infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho foram obtidos em aparelho Perkin-Elmer, FT-IR-1750 do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica-UFPB, utilizando-se de 1 a 3 mg da amostra em pastilhas de KBr, registrados em cm^{-1} .

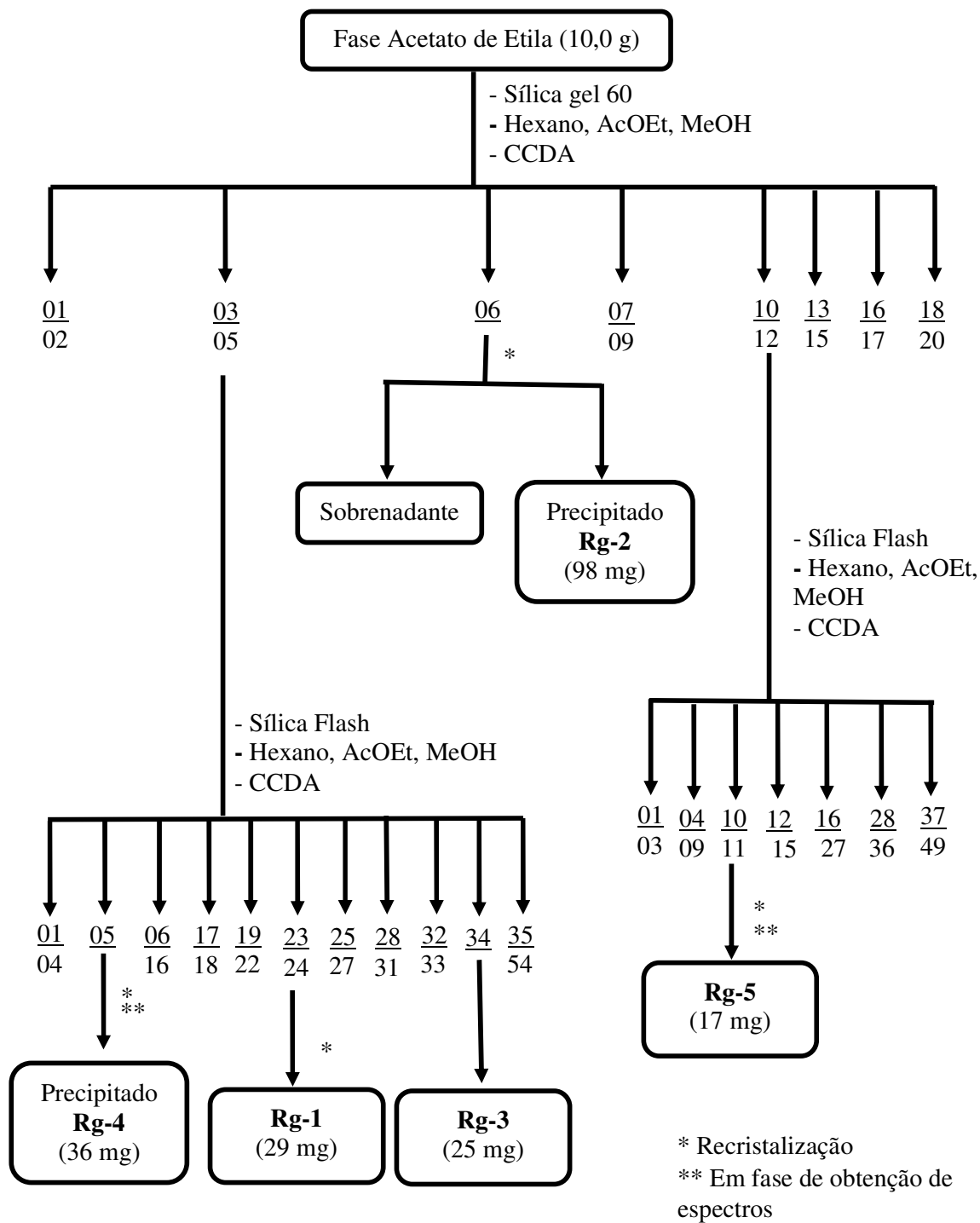
4.8.2 Ressonância magnética nuclear

Foram utilizados os espectrômetros Mercury-Varian a 200 (^1H) e 50 MHz (^{13}C) do LTF/UFPB, utilizando-se quantidades variáveis de amostras. Os solventes empregados foram clorofórmio e metanol deuterados (CDCl_3 e CD_3OD), tendo como referências os picos δ 77,0 em RMN de ^{13}C e δ 7,24 no RMN ^1H para o CDCl_3 e δ 49,2 em RMN de ^{13}C e δ 3,31; 4,78 no RMN ^1H para o CD_3OD .

Esquema 1 – Obtenção e cromatografia líquido-líquido do extrato etanólico bruto de *Richardia grandiflora*.



Esquema 2 – Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de *Richardia grandiflora*



Quadro 2 – Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de *Richardia grandiflora*

Eluentes	Frações obtidas	Frações reunidas
Hexano	01	01
Hexano: AcOEt (90:10)	02	02
Hexano: AcOEt (80:20)	03	03/05
Hexano: AcOEt (70:30)	04-05	06
Hexano: AcOEt (60:40)	06-08	07/09
Hexano: AcOEt (1:1)	09	10/12
Hexano: AcOEt (40:60)	10	13/15
Hexano: AcOEt (30:70)	11	16/17
Hexano: AcOEt (20:80)	12	18/20
Hexano: AcOEt (10:90)	13	
AcOEt	14	
AcOEt: MeOH (90:10)	15	
AcOEt: MeOH (80:20)	16-17	
AcOEt: MeOH (70:30)	18	
AcOEt: MeOH (60:40)	19	
AcOEt: MeOH (1:1)	20	

Quadro 3 – Fracionamento cromatográfico da subfração 03/05 da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de *Richardia grandiflora*

Eluentes	Frações obtidas	Frações reunidas
Hexano	-	01/04
Hexano: AcOEt (98:02)	01-02	05
Hexano: AcOEt (95:05)	-	06/16
Hexano: AcOEt (92:08)	03	17/18
Hexano: AcOEt (90:10)	04-26	19/22
Hexano: AcOEt (85:15)	27-33	23/24
Hexano: AcOEt (80:20)	34	25/27
Hexano: AcOEt (75:25)	35	28/31
Hexano: AcOEt (70:30)	36	32/33
Hexano: AcOEt (60:40)	37-38	34
Hexano: AcOEt (1:1)	39	35/54
Hexano: AcOEt (40:60)	40	
Hexano: AcOEt (30:70)	41	
Hexano: AcOEt (20:80)	42	
Hexano: AcOEt (10:90)	43	
AcOEt	44	
AcOEt: MeOH (90:10)	45	
AcOEt: MeOH (80:20)	46-48	
AcOEt: MeOH (70:30)	49	
AcOEt: MeOH (60:40)	50	
AcOEt: MeOH (1:1)	51-54	

Quadro 4 – Fracionamento cromatográfico da subfração 10/12 da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto de *Richardia grandiflora*

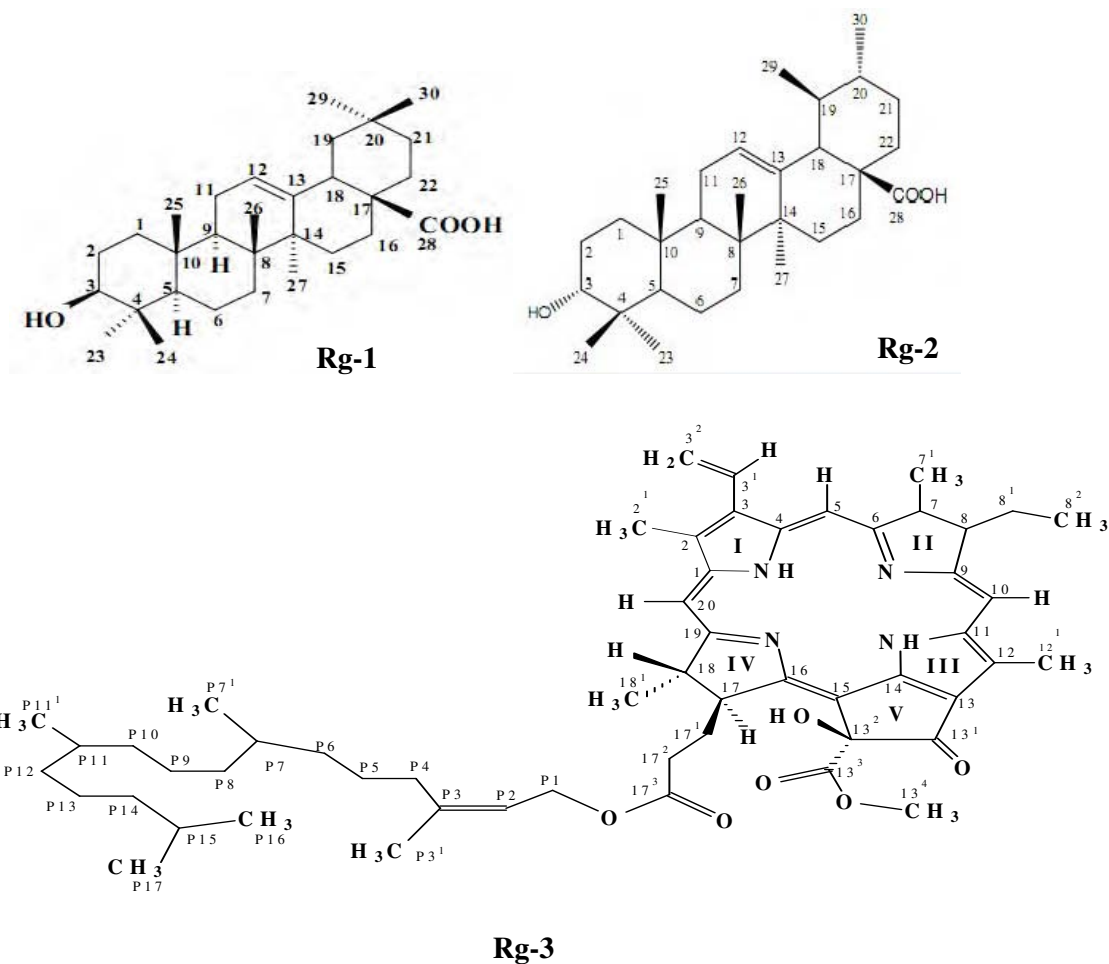
Eluentes	Frações obtidas	Frações reunidas
Hexano	-	01/03
Hexano: AcOEt (98:02)	-	04/09
Hexano: AcOEt (95:05)	-	10/11
Hexano: AcOEt (92:08)	-	12/15
Hexano: AcOEt (90:10)	-	16/27
Hexano: AcOEt (85:15)	01-04	28/36
Hexano: AcOEt (80:20)	05-08	37/49
Hexano: AcOEt (78:22)	09	
Hexano: AcOEt (75:25)	10	
Hexano: AcOEt (70:30)	11	
Hexano: AcOEt (65:35)	12-13	
Hexano: AcOEt (60:40)	14	
Hexano: AcOEt (55:45)	15-17	
Hexano: AcOEt (1:1)	18-19	
Hexano: AcOEt (45:55)	20-24	
Hexano: AcOEt (40:60)	25-28	
Hexano: AcOEt (35:65)	29-31	
Hexano: AcOEt (30:70)	32	
Hexano: AcOEt (25:75)	33	
Hexano: AcOEt (20:80)	34-35	
Hexano: AcOEt (15:85)	36	
Hexano: AcOEt (10:90)	37-38	
Hexano: AcOEt (05:95)	39-40	
AcOEt	41	
AcOEt: MeOH (95:05)	42-43	
AcOEt: MeOH (90:10)	44	
AcOEt: MeOH (85:15)	45	
AcOEt: MeOH (80:20)	46-47	
AcOEt: MeOH (75:25)	48	
AcOEt: MeOH (70:30)	49	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Substâncias isoladas de *Richardia grandiflora*

O estudo fitoquímico da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto da espécie *Richardia grandiflora* resultou no isolamento de cinco substâncias codificadas com as iniciais da planta (Rg) seguidas da numeração de 1 a 5 de acordo com a ordem em que foram isoladas. Na caracterização estrutural das substâncias Rg-1; Rg-2 e Rg-3 foram utilizadas técnicas espectroscópicas de Infravermelho (IV) e de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono 13 (RMN ^{13}C), cujos resultados foram comparados com dados da literatura.



5.2 Caracterização estrutural de Rg-1

A substância codificada como Rg-1 foi isolada na forma de pó branco, solúvel em clorofórmio, com rendimento 0,29%.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 9, p. 60), obtido em pastilhas de KBr, revelou uma absorção intensa em 3433 cm^{-1} característica de deformação axial de hidroxila de álcool (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1996). Tal absorção foi corroborada pela banda de absorção em 1029 cm^{-1} , atribuída a estiramento C-O de álcool. Uma outra absorção em 1695 cm^{-1} indicativa de deformação axial C=O abre a possibilidade da existência de um grupo ácido na molécula. Também foram observadas absorções em 1458 e 1386 cm^{-1} , atribuída à deformação axial C=C de alceno, e uma banda entre $2939\text{-}2870\text{ cm}^{-1}$, que trata-se de estiramento de C-H de grupos metínicos, metilênicos e/ou metílicos (SILVERSTEIN, 2005). A ausência de absorções para núcleo aromático no espectro (Figura 9, p. 60) leva a sugerir que Rg-1 pode tratar-se de uma substância com esqueleto esteroidal ou triterpênico.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (FIGURAS 10, 11 e 12, p. 61 e 62) de **Rg-1** evidenciou um envelope de sinais na região entre δ_{H} 1,8 e 0,7, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de triterpenos tetracíclico ou pentacíclicos como também de núcleo esteroidal, levando a propor que Rg-1 possui um dos referidos núcleos. A presença de um singlete largo em δ_{H} 5,25, atribuído a um hidrogênio olefínico, leva a propor que a molécula em análise possui esqueleto triterpênico com dupla ligação entre os carbonos C-12 e C-13. Esta proposta foi corroborada pelo sinal em δ_{H} 2,81 (m) referente ao H-18 de esqueleto de triterpeno. (PINTO et al., 2008). A presença da hidroxila de álcool, sugerida pelo IV (Figura 9, p. 60) é aqui corroborada pelo multipeto em δ_{H} 3,18 atribuído a

um hidrogênio ligado a carbono oximetínico, caracterizando o H-3 do anel A do núcleo triterpênico ou esteroidal.

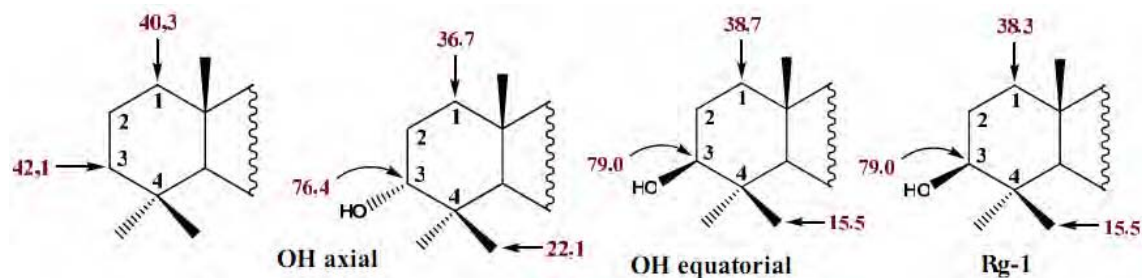
O espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3), (Figuras 13, 14 e 15, p. 62 e 63) revelou a presença de trinta sinais, dos quais um referente a um carbono carbonílico, sete a carbonos não hidrogenados, cinco a carbonos metínicos, dez a carbonos metilênicos e sete a carbonos metílicos (Tabela 1, p. 58), sugerindo tratar-se de um esqueleto triterpênico tetracíclico ou pentacíclico (MAHATO; KUNDU, 1994).

Observou-se na figura 15 (p. 63) sinais em δ_{C} 122,5 e δ_{C} 143,5 os quais fortalecem a presença de uma dupla ligação entre os carbonos C-12 e C-13, referente a um triterpeno pentacíclico $^{12}\Delta$ oleanano, descartando a sugestão de triterpeno tetracíclico feita pelo RMN de ^1H , corroborando assim com a literatura (MAHATO; KUNDU, 1994), a qual relata que a maioria dos oleananos são mono-olefínicos com uma insaturação entre o C-12 e C-13 ou C-18 e C-13, entretanto, por possuírem diferentes deslocamentos químicos, a posição da dupla ligação é de fácil identificação. Quando esta se encontra entre C-12 e C-13, o carbono monohidrogenado C-12 absorve entre δ_{C} 121,0-125,5 e o carbono não hidrogenado C-13 absorve em δ_{C} 143,0-145,2, enquanto que, quando a insaturação encontra-se entre os carbonos C-13 e C-18, os mesmos absorvem em δ_{C} 129,4-130,4 e δ_{C} 139,8-142,8 respectivamente. Quando há ausência da dupla olefinica em C-12, C-13 e C18, estes absorvem em δ_{C} 30,0-36,5; δ_{C} 37,7-39,7 e δ_{C} 42,8-48,6 respectivamente (MAHATO; KUNDU, 1994).

Dentre os carbonos mono-hidrogenados observou-se um sinal em δ_{C} 79,0 que confirma a presença de carbono oximetínico (Figura 15, p. 63), reforçando a sugestão feita pelo RMN de ^1H quando da presença do H-3. A inserção da hidroxila no carbono C-3 foi realizada com base em informações da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994) de que em triterpenos onde a hidroxila está ausente nessa posição, o C-3 absorve em δ_{C} 42,1 e o carbono

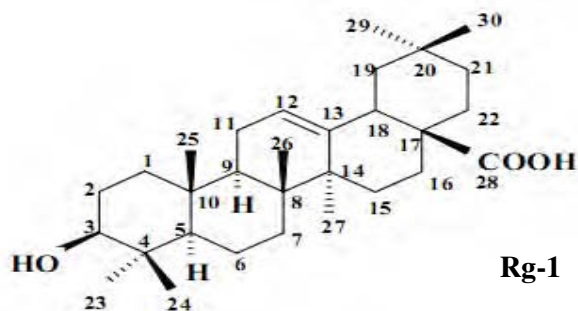
C-1 em δ_C 40,3, no entanto, quando o C-3 encontra-se hidroxilado, sua absorção ocorre entre δ_C 79,0-76,0 enquanto o carbono C-1 absorve entre δ_C 39,0-37,0.

Para a definição da estereoquímica da hidroxila no carbono C-3 novamente recorreu-se à literatura anteriormente citada (MAHATO; KUNDU, 1994). Esta relata que, quando a hidroxila do carbono C-3 está em posição equatorial, este carbono fica menos blindado que o carbono C-3 com hidroxila axial e, ainda, a metila axial ligada ao carbono C-4 é blindada em cerca de $\delta 6,5$ e o grupo metileno na posição 1 é desblindado em $\delta 2,0$ em comparação com o isômero axial devido ao efeito γ -gauche. Frente a estes dados, sugere-se que o composto possui uma hidroxila equatorial no carbono C-3.



Os dados espectrais de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) de Rg-1 estão descritos na Tabela 1 (p. 58).

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de **Rg-1** juntamente com comparações realizadas entre estes últimos com modelo da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) (Tabela 2, p. 59) tornaram possível identificar a substância como sendo o ácido 3- β -hidroxiolean-12-en-28-óico, conhecido como ácido oleanólico, cuja presença já foi observada no gênero (PINTO et al., 2008) sendo, no entanto, descritas pela primeira vez na espécie *Richardia grandiflora*.



3-β-hidroxiolean-12-en-28-óico

Tabela 1 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz, respectivamente) da substância Rg-1.

Rg-1		
	δ_{C}	δ_{H}
C	-	-
4	38,7	-
8	39,2	-
10	37,0	-
13	143,5	-
14	41,5	-
17	46,4	-
20	30,6	-
28	183,0	-
CH		
3	79,0	3,18 (m)
5	55,1	-
9	47,5	-
12	122,5	5,25 (sl)
18	40,9	2,81 (m)
CH₂		
1	38,3	-
2	27,1	-
6	18,2	-
7	32,5	-
11	22,9	-
15	27,6	-
16	23,3	-
19	45,8	-
21	33,7	-
22	32,4	-
CH₃		
23	28,0	1,10 (s)
24	15,5	0,74 (s)
25	15,3	0,88 (s)
26	17,0	0,72 (s)
27	25,9	1,22 (sl)
29	33,0	0,90 (s)
30	23,5	0,95 (s)

Tabela 2 – Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C de Rg-1 (δ , CDCl_3 , 50MHz) com dados de Mo-1 (δ , CDCl_3 , 50MHz) da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994).

	Rg-1	Mo-1
	δ_{C}	δ_{C}
C		
4	38,7	38,7
8	39,2	39,3
10	37,0	37,0
13	143,5	143,4
14	41,5	41,6
17	46,4	46,6
20	30,6	30,6
28	183,0	181,0
CH		
3	79,0	78,7
5	55,1	55,2
9	47,5	47,6
12	122,5	122,1
18	40,9	41,3
CH₂		
1	38,3	38,5
2	27,1	27,4
6	18,2	18,3
7	32,5	32,6
11	22,9	23,1
15	27,6	27,7
16	23,3	23,4
19	45,8	45,8
21	33,7	33,8
22	32,4	32,3
CH₃		
23	28,0	28,1
24	15,5	15,6
25	15,3	15,3
26	17,0	16,8
27	25,9	26,0
29	33,0	33,1
30	23,5	23,6

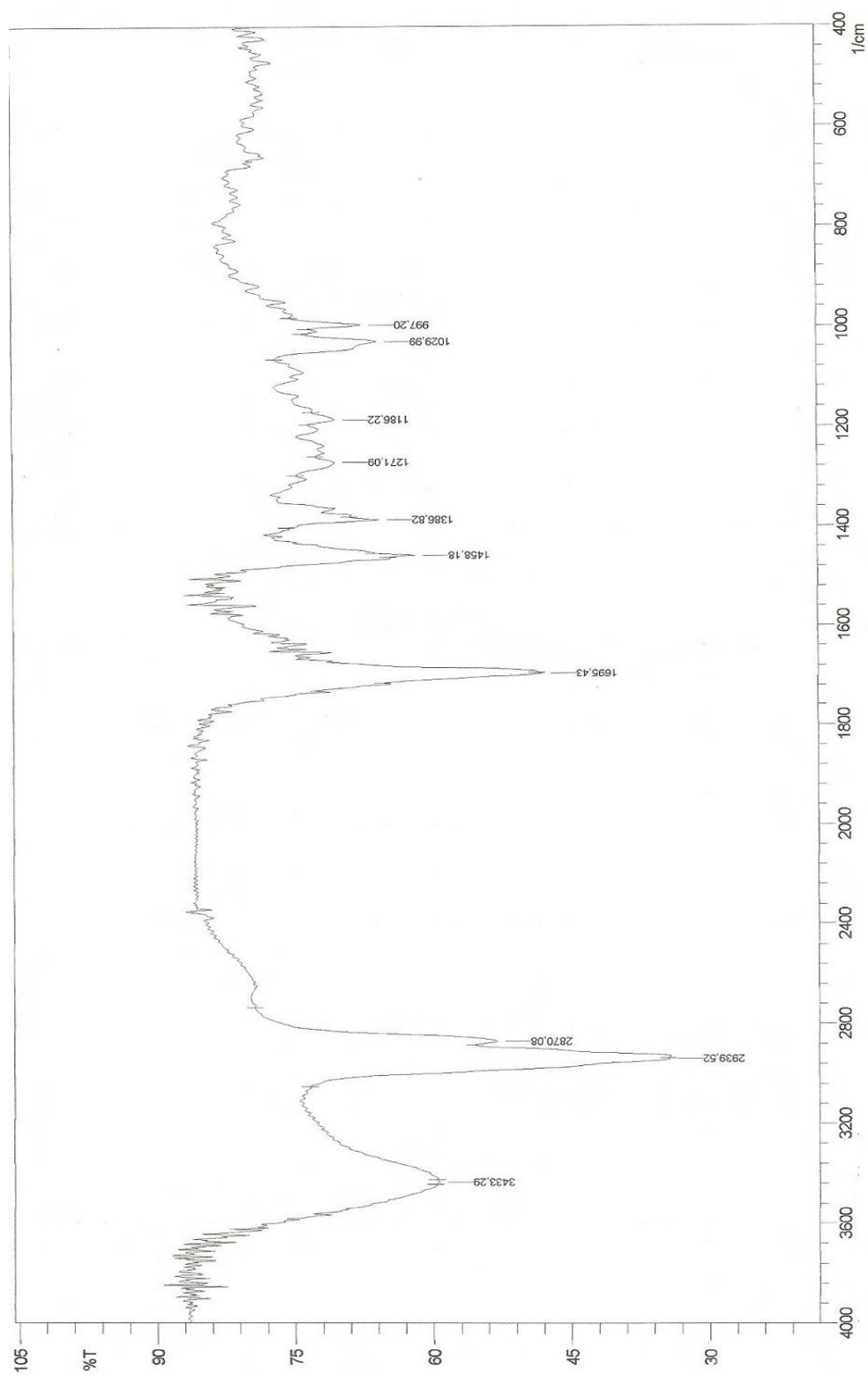


Figura 9 – Espectro de IV (KBr, cm⁻¹) de Rg-1

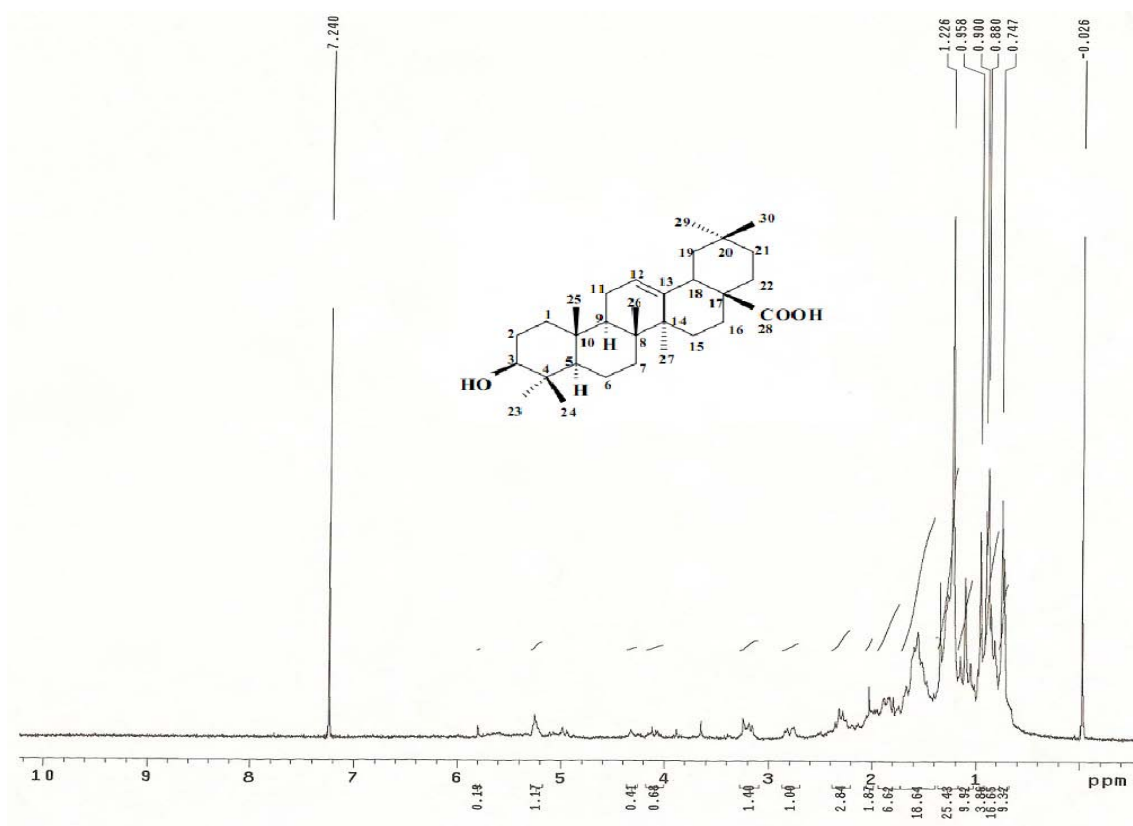


Figura 10 – Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200MHz) de Rg-1

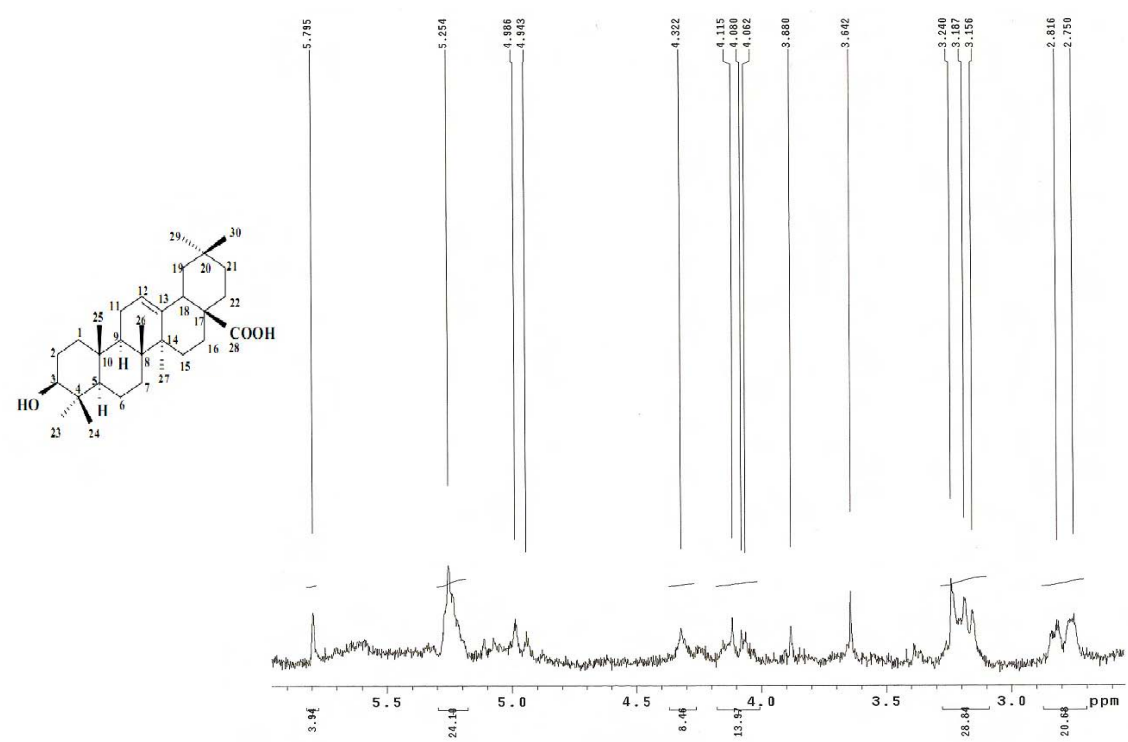


Figura 11 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200MHz) de Rg-1

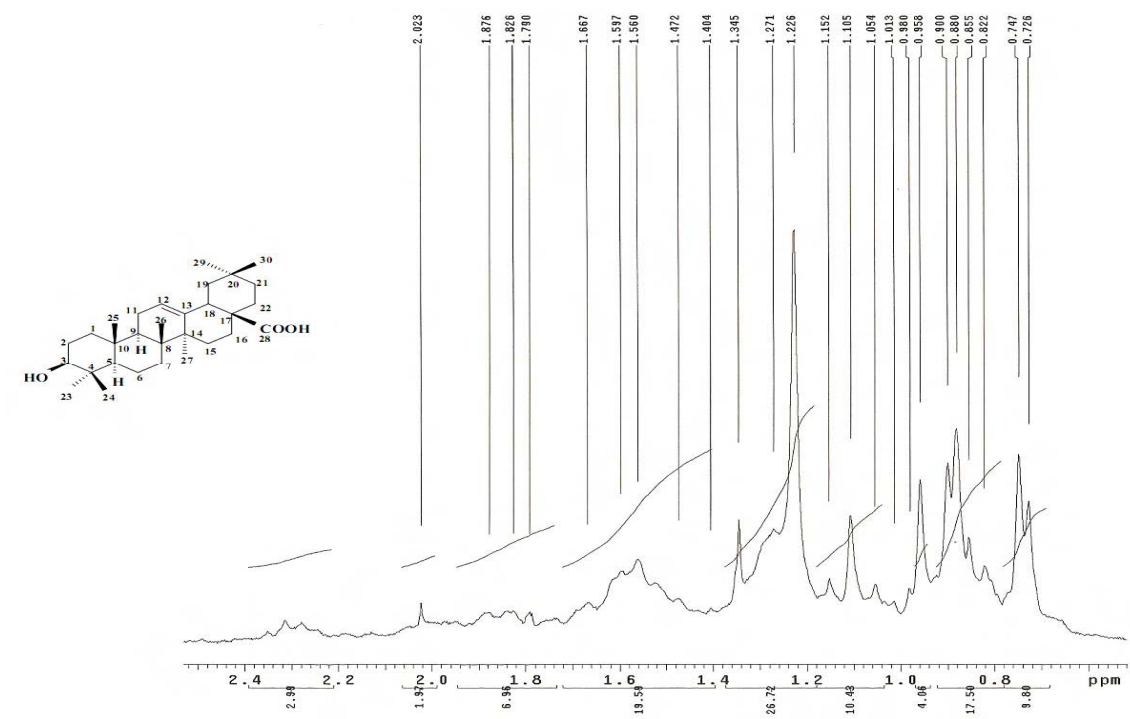


Figura 12 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200MHz) de Rg-1

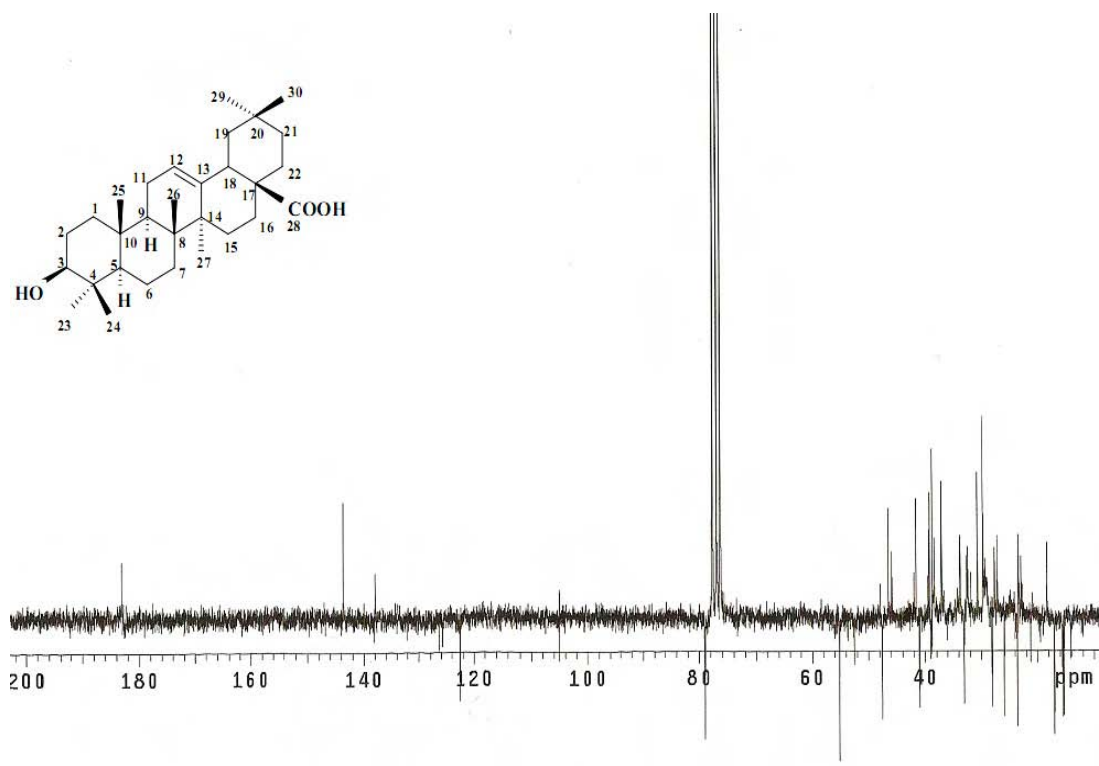


Figura 13 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50MHz) de Rg-1

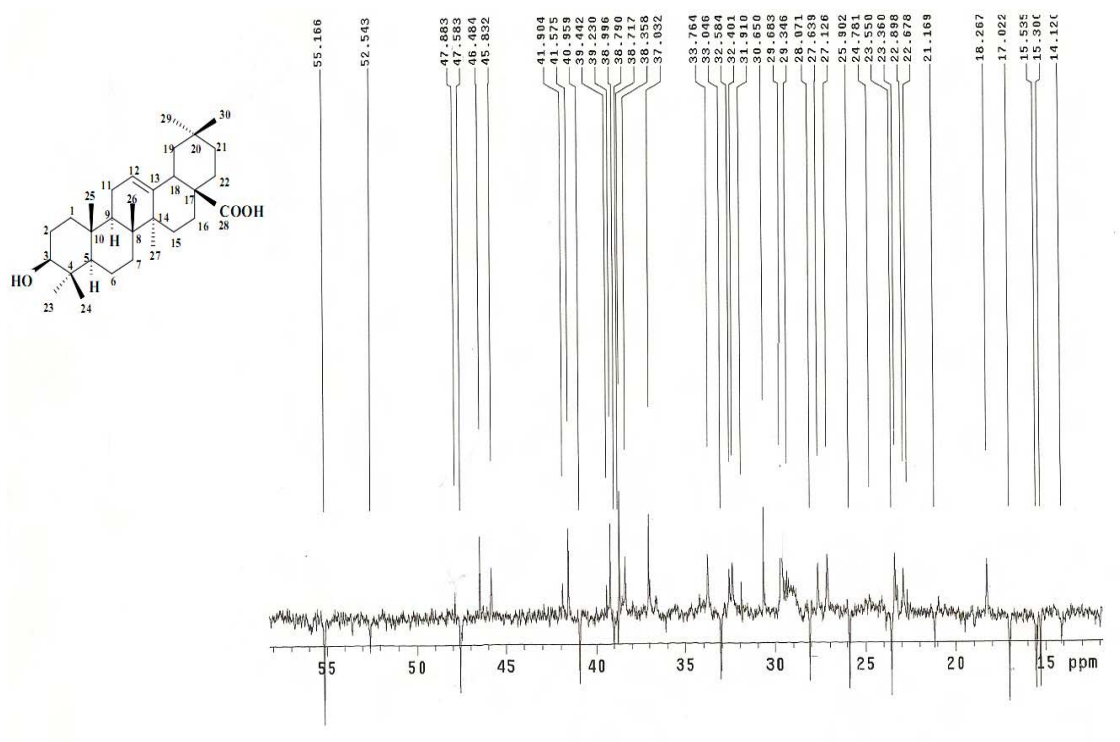


Figura 14 – Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50MHz) de Rg-1

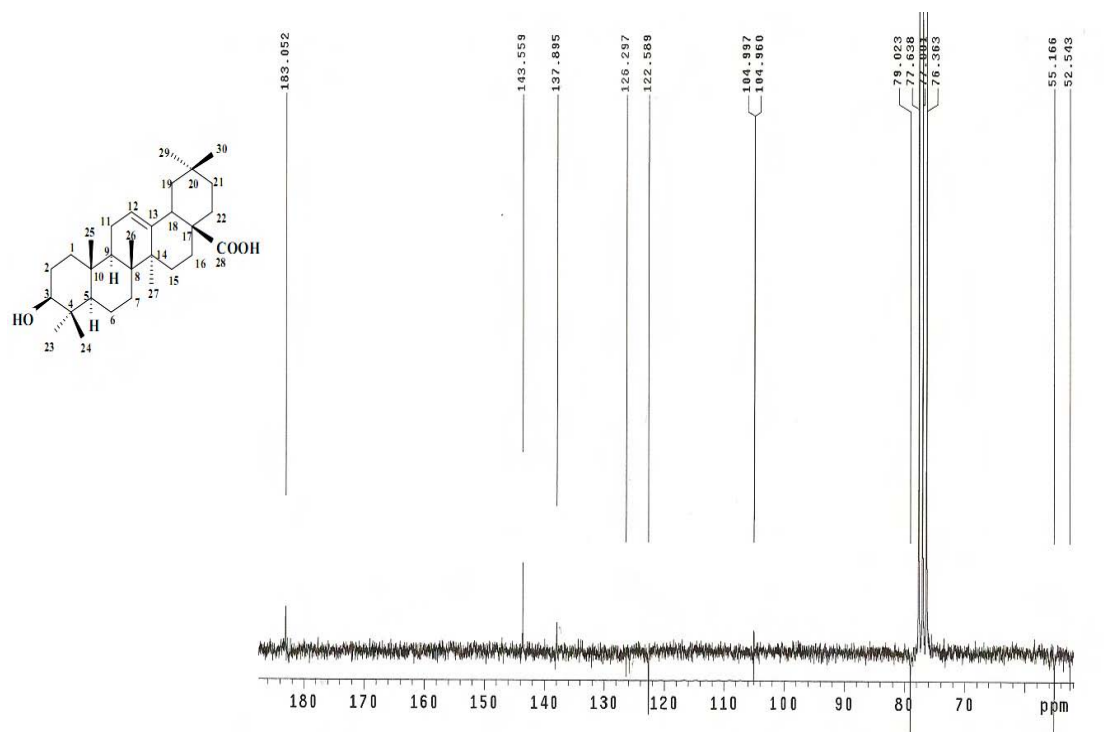


Figura 15 – Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50MHz) de Rg-1

5.3 Caracterização estrutural de Rg-2

O Rg-2 (98 mg) foi obtido como um sólido amorfo branco com rendimento de 0,98%.

O espectro no IV de Rg-2 (Figura 17, p. 68) indicou sua natureza alifática com absorções intensas em 2926, 2870 cm^{-1} e ausência de absorções nas regiões características de aromáticos. As bandas em 3446 e 1689 cm^{-1} sugerem a presença de hidroxila e carbonila de ácido carboxílico, para a molécula de Rg-2. A banda em torno de 1029 cm^{-1} , mesmo com o valor não assinalado, foi atribuída à deformação axial de C-O de álcool secundário (SILVERSTEIN, 2005). A semelhança da feição espectral entre o IV de Rg-1 (Figura 9, p. 60) com Rg-2 (Figura 17, p. 68) levou a pensar que esta poderia possuir um esqueleto triterpênico.

O espectro de RMN¹H de Rg-2 (Figura 18, p. 69), mostrou sinais idênticos a Rg-1, todavia um sinal em δ 2,22 (m) atribuído ao H-18 da série ursano (DAVID et al., 2001), quando comparada com H-18 de Rg-1 (δ 2,80), possibilitou propor que a substância em análise se trataria de uma molécula com esqueleto da referida série.

No espectro de RMN de ¹³C obtido para Rg-2 (Figuras 22, 23, 24 e 25; p. 71 e 72) foram identificados sinais referentes a trinta átomos de carbono, sendo sete carbonos metílicos, nove metilênicos, sete metínicos e sete carbonos não hidrogenados (Tabela 3, p. 67). Esses dados e os valores de deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos C-12 (δ 124,5) e C-13 (δ 137,2) quando comparados com os dados de Rg-1, fortaleceram a proposta de que Rg-2 é um triterpeno pentacíclico da série ursano (MAHATO; KUNDU, 1994). O espectro de RMN de ¹³C também permitiu identificar o carbono oximetínico C-3 (δ 79,0) e um sinal de carbonila de ácido carboxílico (δ 181,0).

O espectro de RMN de ^{13}C é uma ferramenta bastante útil para distinguir triterpenos das séries oleanano e ursano. Um dos fatores a ser considerado é o número de carbonos não hidrogenados, seis nos ursanos e sete nos oleananos. Nos triterpenos urs-12-enos o valor do deslocamento químico de C-12 encontra-se geralmente em campo mais baixo em torno de 2,0 ppm, e o de C-13 em campo mais alto cerca de 5 ppm, em comparação com os sinais correspondentes nos triterpenos do tipo olean-12-enos (MAHATO; KUNDU, 1994) (Figura 16).

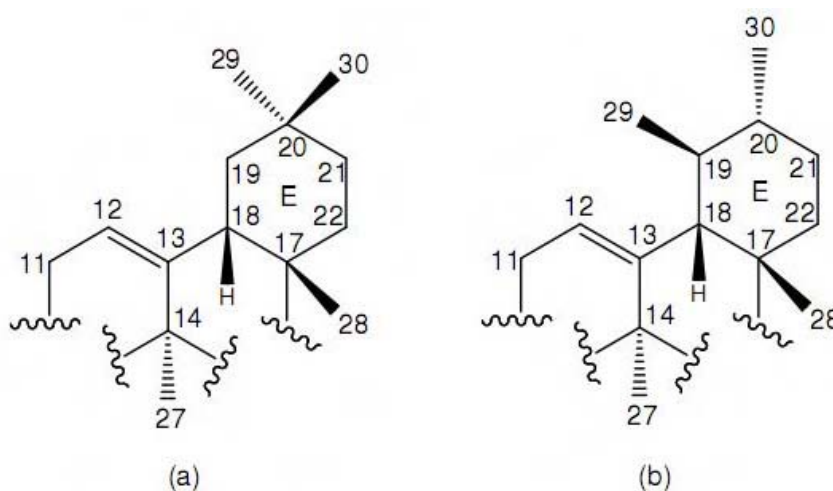


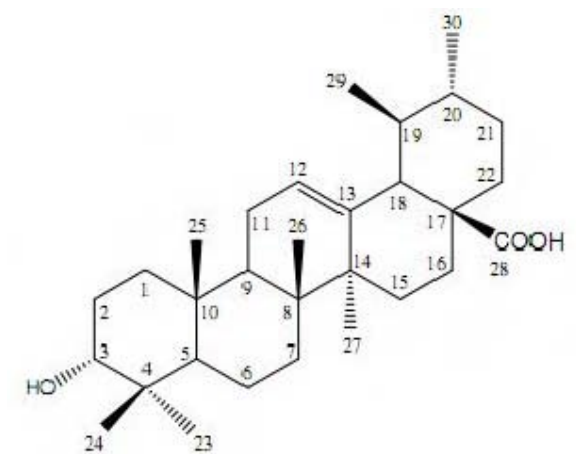
Figura 16 – Estruturas parciais de triterpenos das séries olean-12-enos (a) e urs-12-enos (b).

Portanto, enquanto nos urs-12-enos os deslocamentos químicos de C-12 e C-13 encontram-se em torno de δ 125,0 e δ 140,0; nos olean-12-enos, estes deslocamentos ocorrem aproximadamente em δ 123,0 e δ 145,0, respectivamente (MAHATO, 1997). Esta diferença se deve ao fato de que, na série ursano, o grupo metila em C-19 está espacialmente próximo à dupla ligação, o que afeta os deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos, em relação àqueles da série oleanano, que não apresentam o grupo metila em C-19 (Figura 16). Esta variação nos deslocamentos químicos aparece como uma proteção γ em C-13 e uma desproteção δ em C-12 (DODRELL et al., 1974).

Observa-se, também, uma variação nos deslocamentos químicos de C-11 e C-27 entre as duas séries. Na série ursano, esses sinais são, respectivamente, cerca de 6,0 e 3,0 ppm

mais protegidos que aqueles da série oleanano. Estas diferenças também podem ser explicadas pela mudança conformacional no anel E, causada pela proximidade espacial do grupo metila C-29 com C-12, C-13 e C-27 na série dos ursanos (Figura 16, p. 65). Outra diferença pode ser observada no deslocamento químico do sinal de C-18, na série oleanano, é a metila axial em C-20 que exerce efeito protetor sobre C-18 (interação γ gauche). Na série ursano, ocorre efeito de desproteção β do grupo metila equatorial do C-19 sobre C-18. Nos olean-12-enos, o sinal de C-18 encontra-se em torno de 11,5 ppm mais protegidos (valores em torno de δ 41,3 nos oleananos e δ 52,8 nos ursanos) (MAHATO; KUNDU, 1994).

Com base nas atribuições anteriormente discutidas, e comparação com dados RMN¹H e RMN¹³C da literatura Tabela 3, p. 67, Rg-2 foi identificado como sendo o ácido 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-óico (ácido ursólico), cuja presença já foi observada no gênero (ADOLPHO et al., 2008) sendo, no entanto, descrita pela primeira vez na espécie *Richardia grandiflora*.



Ácido Ursólico (Rg-2)

Tabela 3 – Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de Rg-2 (δ , CD_3OD , 200 e 50 MHz, respectivamente) com os modelos Mo-1 - ácido oleanólico - (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz; MAHATO & KUNDU, 1994) e Mo-2 - ácido ursólico (δ , CDCl_3 ; 300 e 75,5 MHz; FALCAO, 2003).

	Rg-2		Mo-1		Mo-2	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,44		38,5		38,8	
2	26,8		27,4		27,3	
3	77,28	3,16 (dd, $J=5,6$ Hz, 10,0 Hz)	78,7	3,20 (dd, $J=6,0$ Hz, 9,4 Hz)	78,8	3,20 (dd, $J=10,4$ Hz, 4,6 Hz)
4	37,59		38,7		38,8	
5	54,3		55,2		55,4	
6	17,1		18,3		18,4	
7	31,9		32,6		33,0	
8	38,37		39,2		39,6	
9	46,7		47,6		47,5	
10	35,7		37,0		37,0	
11	22,9		23,1		23,3	
12	124,5	5,22 (t, $J=3,2$ Hz)	122,1	5,20 (sl)	125,5	5,22 (t, $J=3,6$ Hz)
13	137,2		143,4		138,0	
14	40,8		41,6		42,0	
15	29,3		27,7		28,2	
16	25,5		23,4		24,3	
17	47,8		46,6		48,1	
18	51,9	2,22 (sl)	40,9	2,80 (dl, $J=8,6$ Hz)	52,8	2,20 (s)
19	38,0		45,8		39,1	
20	38,0		30,6		38,8	
21	31,9		33,8		30,7	
22	35,7		32,3		36,7	
23	26,3	0,97 (s)	28,1	0,90 (s)	28,2	0,97 (s)
24	13,6	0,78 (s)	15,6	0,7 (s)	15,5	0,78 (s)
25	14,0	0,84 (s)	15,3	0,8 (s)	15,7	0,85 (s)
26	15,4	1,12 (s)	16,8	0,7 (s)	16,9	1,12 (s)
27	21,7	0,94 (s)	26,0	1,1 (s)	23,6	0,94 (s)
28	179,2		181,0		180,0	
29	15,2	0,96 (sl)	33,1	0,8 (s)	16,9	0,96 (d, $J=6,5$ Hz)
30	19,2	1,12 (sl)	23,6	0,9 (s)	21,2	1,12 (d, $J=6,5$ Hz)

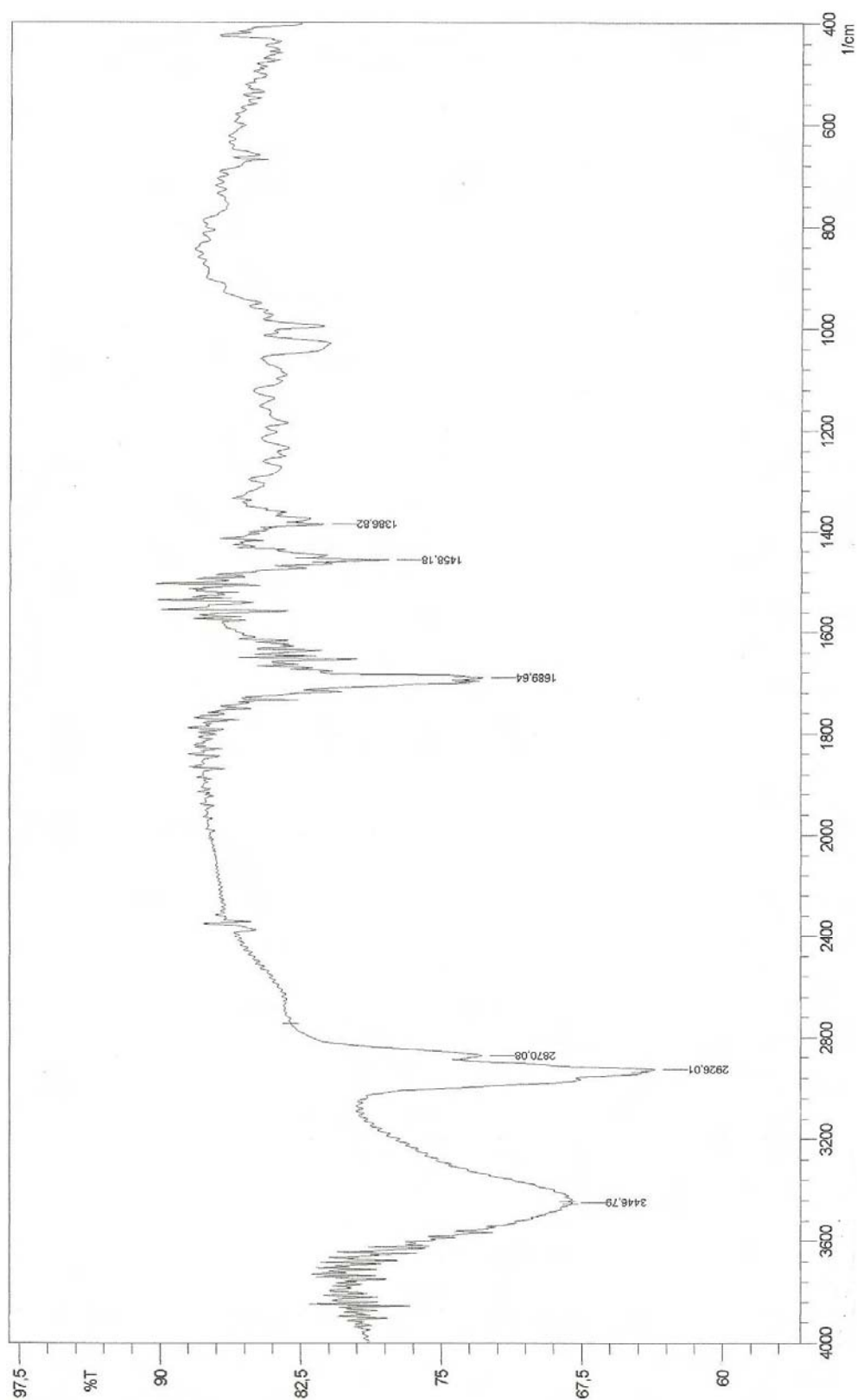


Figura 17 – Espectro de IV (KBr, cm⁻¹) de Rg-2

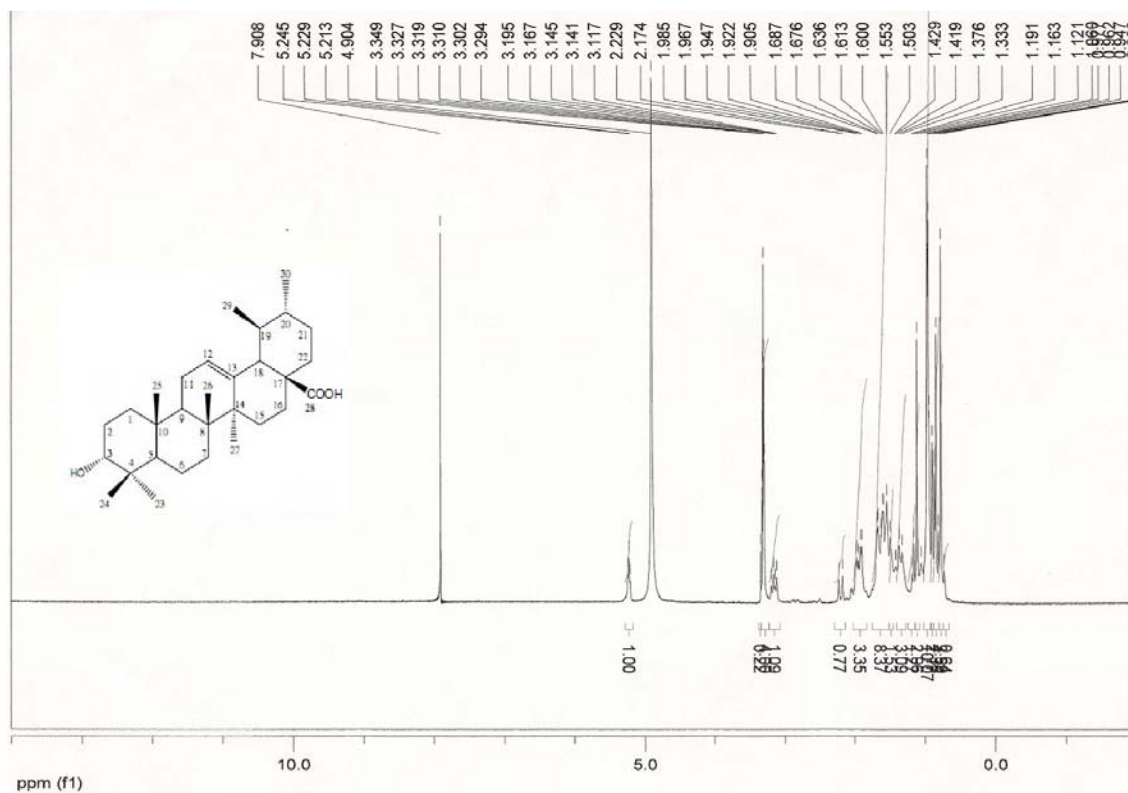


Figura 18– Espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 200 MHz) de Rg-2

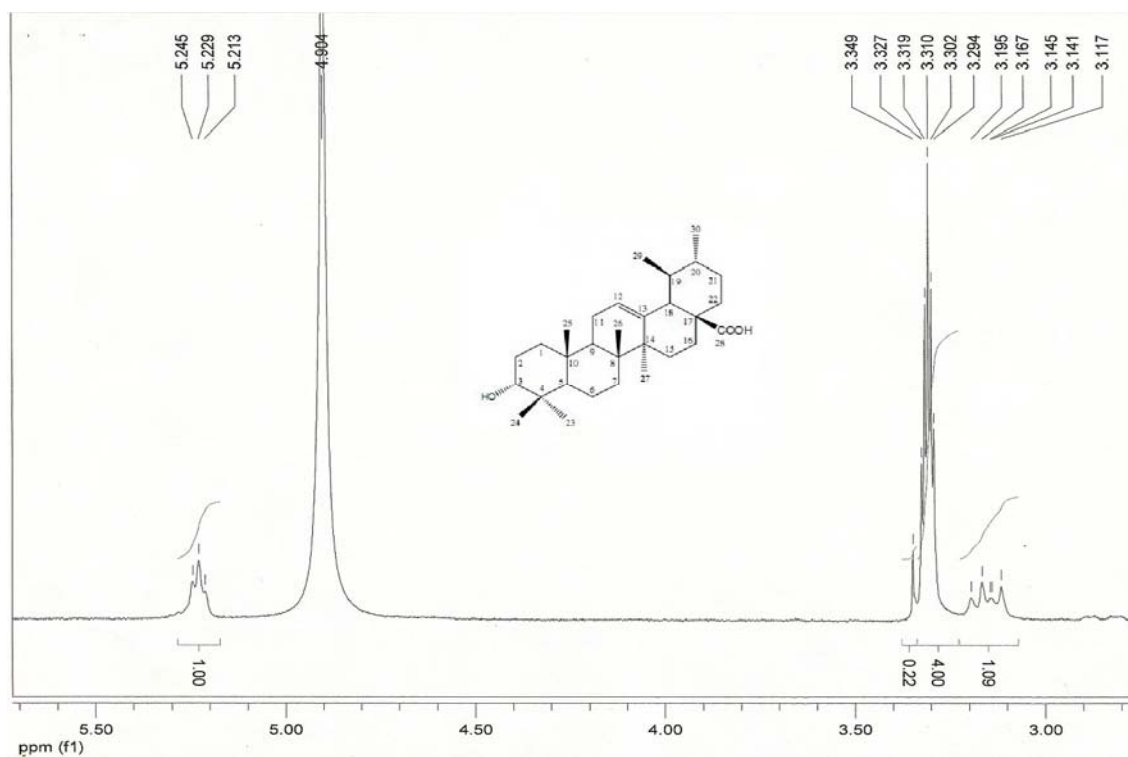


Figura 19 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 200 MHz) de Rg-2

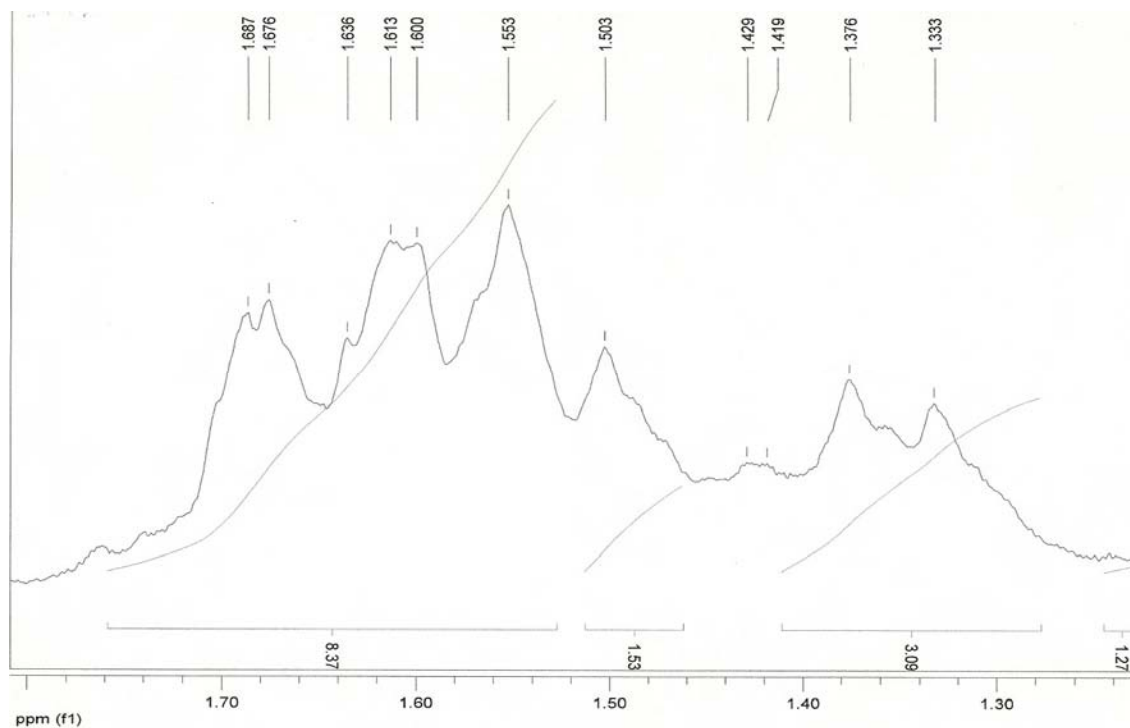


Figura 20 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 200 MHz) de Rg-2

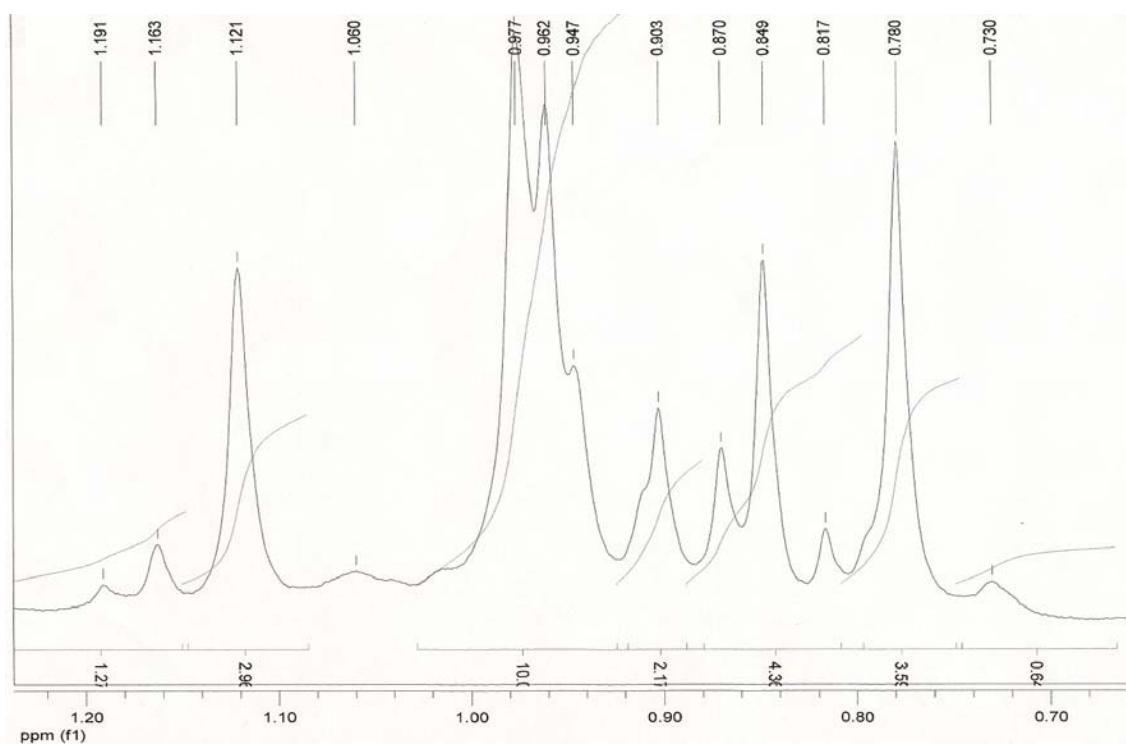


Figura 21 – Expansão 3 do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 200 MHz) de Rg-2

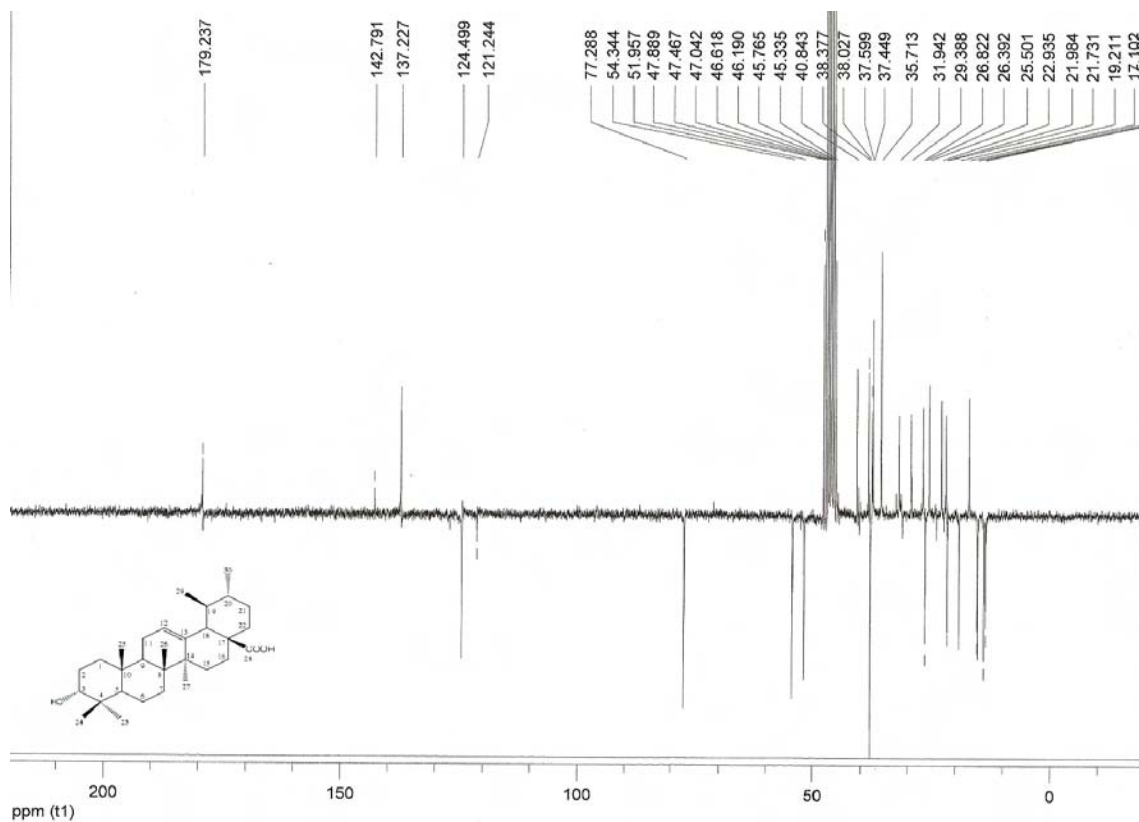


Figura 22 – Espectro de RMN ^{13}C - APT (δ , CD_3OD , 50 MHz) de Rg-2

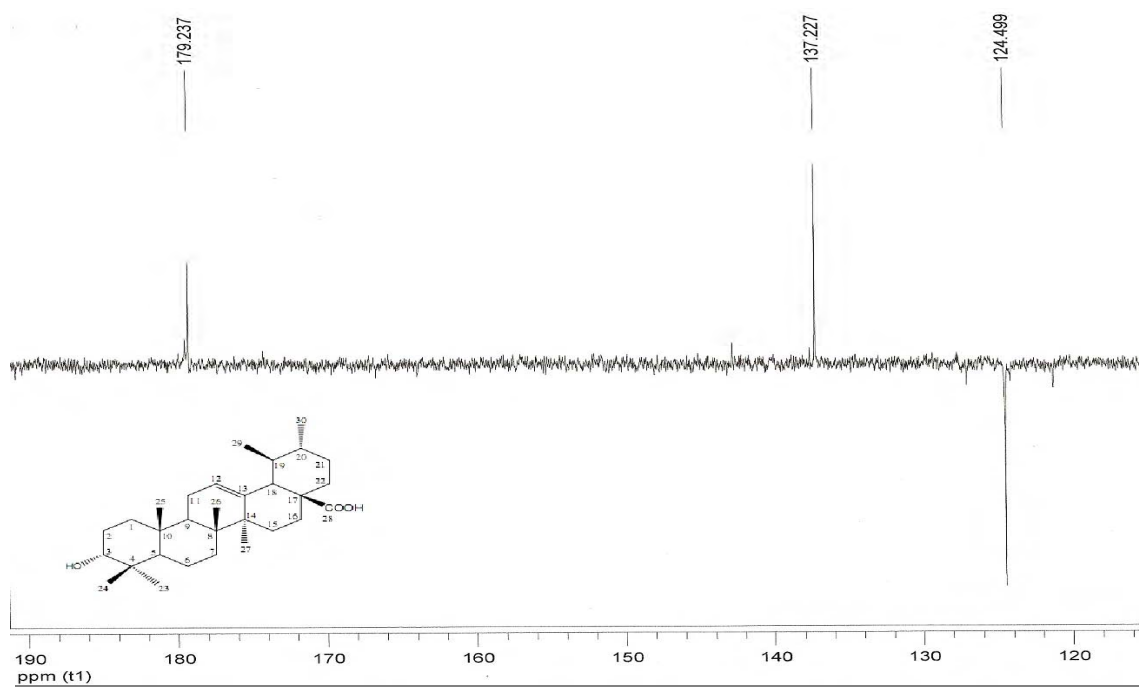


Figura 23 – Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C - APT (δ , CD_3OD , 50 MHz) de Rg-2

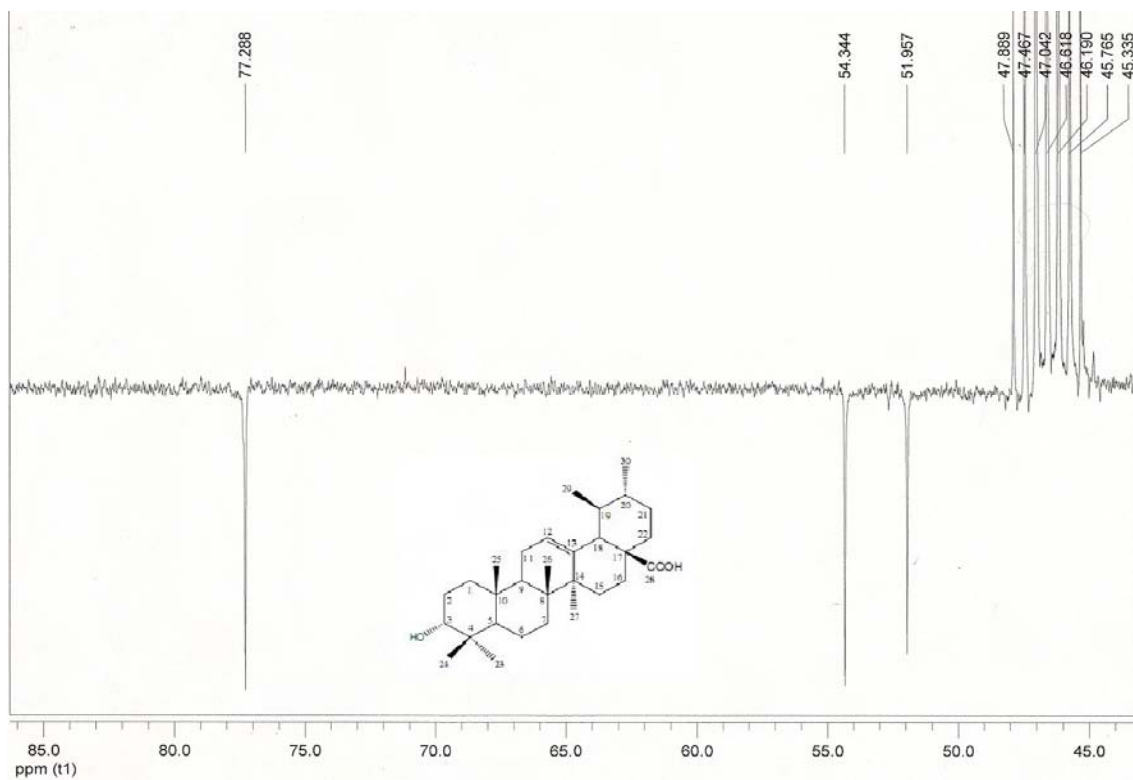


Figura 24 – Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C - APT (δ , CD_3OD , 50 MHz) de Rg-2

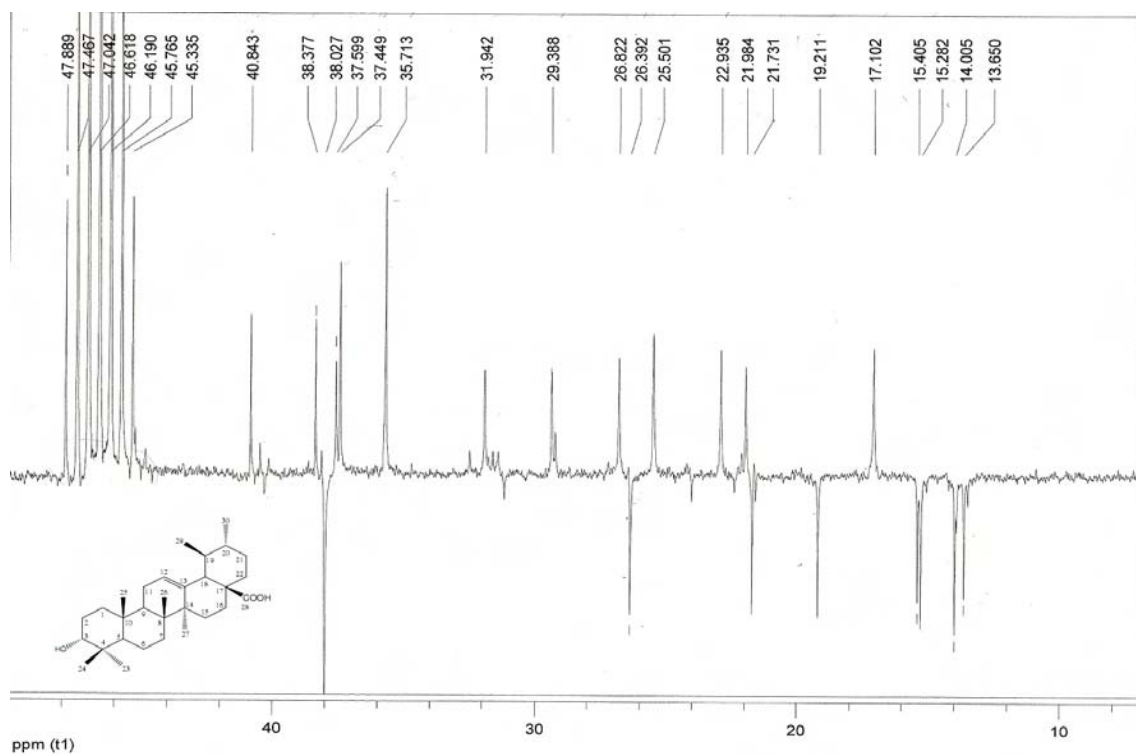


Figura 25 – Expansão 3 do espectro de RMN ^{13}C - APT (δ , CD_3OD , 50 MHz) de Rg-2

Os ácidos ursólico e oleanólico são isômeros constitucionais, distinguindo-se apenas quanto à localização de dois grupos metila no anel E: no ácido ursólico eles se localizam em C-20 e em C-19, enquanto no ácido oleanólico ambos estão em C-20. São triterpenos de ampla distribuição, sendo encontrados em espécies alimentícias, medicinais e outras, seja na sua forma livre (agliconas) ou como heterosídeos (saponinas). Durante as últimas décadas, diversos trabalhos relatando o isolamento, modificações estruturais, avaliação de atividades farmacológicas, toxicidade e ensaios clínicos foram publicados para estes dois triterpenos, refletindo o grande interesse científico e as potencialidades dessas substâncias na terapêutica (LIU; 1995; LIU, 2005; MA et al., 2005; SULTANA; ATA 2009).

Segundo Maia (2000), triterpenos são facilmente encontrados na natureza e quando se utilizam técnicas cromatográficas usuais, raramente consegue-se o isolamento destas moléculas puras, sendo estes quase sempre obtidos em misturas de difícil separação.

Entre as diversas atividades biológicas já relatadas para os ácidos ursólico e oleanólico destacam-se as ações hepatoprotetora (SARAVANAN et al., 2006), antiinflamatória (IKEDA ET al., 2008; SINGH et al., 1992), hipolipidêmica e antiaterosclerótica (MA, 1986; SARAVANAN et al., 2006; SOMOVA et al., 2003), hipocolesterolemiantes (LIN et al., 2009), tripanossomicida (CUNHA et al., 2003; LEITE et al., 2006), imunomoduladora (RAPHAEL; KUTTAN, 2003), antimicrobiana, (MALLAVADHANI et al., 2004), anti-HIV (KASHIWADA et al., 2000; LEE et al., 2008), antibacteriana (FONTANAY et al., 2008), antiúlcera gástrica e gastroprotetora (GOMES et al., 2009), hipoglicêmica (LIU et al., 1995), antiosteoporótica (LEE et al., 2008), antidiabética (JANG et al., 2009) e anticoncepcional (LIU, 1995).