ROSA MARIA MOREIRA SEABRA PINTO

Contribuição para o estudo de compostos Flavónicos em espécies de HYPERICUM da flora Portuguesa

PORTO 1987

ROSA MARIA MOREIRA SEABRA PINTO
Assistente da Faculdade de Farmácia
da Universidade do Porto

Contribuição para o estudo de compostos flavónicos em espécies de Hypericum da flora portuguesa.

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Porto, 1987

A

TODOS QUANTOS, MUITO OU POUCO,

CONTRIBUÍRAM PARA QUE ESTE

TRABALHO FOSSE POSSÍVEL

INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos que o estudo de muitos milhares de espécies vegetais que povoam a terra vem interessando o Homem pelos motivos mais diversos. É verdade, porém, que há bem poucos anos parecia que as plantas poucas mais novidades tinham para oferecer .

Contudo, a observação mais atenta que lhe tem sido dispensada nos últimos tempos, aliada aos recentes avanços científicos e tecnológicos, mostra-nos um mundo de novas possibilidades, a diversos níveis, algumas das quais já em franca exploração.

A nós, docentes de Farmacognosia, cabe-nos, por maioria de razão, o estudo dos vegetais nos seus aspectos químicos e farmacológicos.

Por motivos óbvios, limitamo-nos ao estudo de plantas da flora portuguesa, concretamente do género Hypericum, tanto mais que algumas das suas espécies são utilizadas em medicina popular, e uma delas, o Hipericão do Gerês (H. androsaemum) é mesmo largamente utilizada, sob a forma de infuso.

Por outro lado, os flavonóides são compostos amplamente conhecidos quer pelas funções que desempenham na fisiologia vegetal, nomeadamente como filtro de radiações solares e como participantes na coloração das flores, quer pelas suas acções farmacológicas. Dentre estas, várias poderíamos citar, mas sem dúvida a de maior utilização é a que apresentam a nível da resistência capilar. Neste âmbito, procuram-se hoje moléculas flavonóides com polaridade suficiente de modo a aumentar-lhe a hidrossolubilidade.

Foi por todas estas razões que de bom grado acolhemos a sugestão que nos foi apresentada de estudar flavonóides em espécies de Hypericum.

A contribuição aqui dada para o conhecimento da nossa flora é uma gota no oceano, mas é caso para se dizer que o oceano é constituído por muitos milheões de gotas, tal como acontece com a investigação científica, a qual se vai enriquecendo com todas as achegas, que cada um dos seus capítulos recebe dos milhares de trabalhadores que a ela se dedicam.

Porêm, não foi apenas esta convicção que nos fez mover, mas acima de tudo, preciosas ajudas que sempre recebemos e que agora queremos expressamente

AGRADECER:

- Em primeiro lugar, e de uma forma muito especial, ao Exmº. Senhor Prof. Doutor Antônio Correia Alves, pela mão amiga de quem iniciamos e prosseguimos a nossa vida profissional, pela orientação científica, mas acima de tudo, pela amizade com que sempre nos distinguiu e pelo incentivo nos momentos de desânimo.

- Às colegas de Laboratório, por terem partilhado comigo todos os bons e maus momentos que foi necessário atravessar.

- À Exmª. Senhora Prof. Doutora Margarida Alice Ferreira, pela facilidade concedida na utilização do espectrofotômetro de U.V.-visível e ainda pelos encorajamentos recebidos.

- Aos Exmºs. Senhores Prof. Doutores Victor Gil e Carlos Geraldes, bem como ao pessoal técnico do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra, pela realização dos espectros de RMN.

- Ao Exmº. Senhor Director do Instituto Botânico da Universidade do Porto, ao Exmº. Senhor Prof. Doutor Arnaldo Rozeira e ao Senhor André Serra, pela colheita e classificação do material botânico.

- À Exmª. Direcção do Parque Nacional da Peneda-Gerês, pelas facilidades concedidas para a colheita de material dentro do perímetro deste Parque.

- Ao Senhor Engº. Rui Pinto e à D. Maria do Céu pelo cuidado no arranjo e dactilografia deste trabalho.

- Ao Senhor Dr. Carlos Queirós de Oliveira pela realização dos espectros de massa.

- À Senhora Drª. Isabel Cardoso, pelos trabalhos de espectrofotometria de chama e de absorção atómica.

- Ao Instituto Nacional de Investigação Científica que, por intermédio do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia, pela sua linha 2, nos forneceu o apoio financeiro indispensável.

- A todos quantos, professores ou colegas, embora não expressamente referidos, de uma maneira ou de outra, deram o seu contributo amigo.

A TODOS

BEM HAJAM

ÍNDICE

CAPÍTULO I

NOÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO HYPERICUM L 1

1. - SISTEMÁTICA E CARACTERES BOTÂNICOS DO GÊNERO HYPERICUM L 2

1.1. - Bibliografia 5

2. - USOS NA MEDICINA POPULAR 6

2.1. - Bibliografia 7

3. - INVESTIGAÇÕES FITOQUÍMICAS ANTERIORMENTE REALIZADAS SOBRE O GÊNERO HYPERICUM 8

3.1. - Bibliografia 14

4. - INVESTIGAÇÕES FITOQUÍMICAS ANTERIORES SOBRE AS ESPÉCIES EM ESTUDO 18

4.1. - Bibliografia 20

CAPÍTULO II

GENERALIDADES SOBRE OS FLAVONÓIDES 21

1. - CONSTITUIÇÃO QUÍMICA 22

1.1. - Estrutura Geral 22

1.2. - O-Glicosilflavonóides 26

1.3. - Bibliografia 26

2. - MÉTODOS USADOS PARA A DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS FLAVONÓIDES 27

2.1. - Métodos cromatográficos 28

2.2. - Métodos espectrofotométricos 33

2.3. - Métodos espectrométricos 40

2.4. - Bibliografia 45

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL 47

1. - MATERIAL BOTÂNICO UTILIZADO 48

2. - MÉTODOS GERAIS E INSTRUMENTAIS USADOS 49

2.1. - Secagem e pulverização 49

2.2. - Reagentes 49

2.3. - Obtenção dos extractos 49

2.4. - Purificação dos extractos e isolamento das substâncias ... 49

2.5. - Cromatografia analítica 51

2.6. - Espectrofotometria no I.V. 57

2.7. - Espectrofotometria no U.V.-visível 57

2.8. - Espectrometria de massa 59

2.9. - Espectrometria de RMN 59

2.10.- Hidrólise ácida 60

2.11.- Hidrólise alcalina 60

2.12.- Bibliografia 61

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO 62

1. - ENSAIOS PRELIMINARES 63

2. - ESTUDO DE H. PULCHRUM L. 66

3. - ESTUDO DE H. LINARIFOLIUM VAHL 117

4. - ESTUDO DE H. UNDULATUM SCHOUT 123

5. - ESTUDO DE H. CALYCINUM L. 139

6. - ESTUDO DE H. ELODES L. 153

7. - ESTUDO DE H. ANDROSAEMUM L. 168

8. - ESTUDO DE H. HUMIFUSUM L. 182

9. - BIBLIOGRAFIA 189

CAPITULO V

CONCLUSÕES 191

CAPITULO I

Noções Gerais sobre o Gênero *hypericum* L.

1 Sistemática e caracteres botânicos

2. Usos na medicina popular

3. Investigações fitoquímicas anteriormente realizadas sobre o gênero *hypericum* L.

4. Investigações fitoquímicas anteriormente realizadas sobre as espécies em estudo

1. - SISTEMÁTICA E CARACTERES BOTÂNICOS DO GÉNERO *HYPERICUM* L.

O género *Hypericum* L. conta com numerosas espécies distribuídas pelas zonas temperadas do globo.

Quer a Nova Flora de Portugal de João Franco (1), quer a Flora Europaae (2), que utilizam o sistema de classificação de Engler (3), localizam este género da seguinte maneira:

Divisão: *Angiospermae*
Classe: *Dicotiledoneae*
Subclasse: *Archichlamydeae*
Ordem: *Guttiferales*
Família: *Guttiferae* (*Clusiaceae*)
Género: *Hypericum*

A ordem *Guttiferales* está representada na Europa apenas pela família *Guttiferae*. Este termo, como designação de família, é, no entanto, considerado incorrecto segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica de 1972, mas, apesar disso, o seu uso vem-se mantendo ainda, embora seja, muitas vezes, substituído pelo termo regular *Clusiaceae*.

Esta família é constituída por árvores ou arbustos, por vezes plantas herbáceas, apresentando glândulas translúcidas contendo óleos essenciais e, em alguns casos, glândulas vermelhas ou negras onde se localiza a hipericina. As folhas são simples, opostas ou, menos vezes, 3-4 nadas, frequentemente persistentes e sem estípulas. As flores são actinomórficas e as sépalas de estivação imbricativa. As pétalas são livres, de perfloração contorcida. Os estames são poliadelfos ou aparentemente indefenidos. O ovário é súpero, com placentação axial ou parietal. Os frutos são

cápsulas septicidas ou septífragas, bagas ou drupas. As sementes não apresentam albúmen.

A família das *Guttiferae* (*Clusiaceae*) conta com vários géneros, sendo um dos mais representativos e o único com representação no continente Europeu o género *Hypericum*.

Vários são, contudo, os autores que consideram o género *Hypericum* como pertencendo a uma outra família, a das *Hypericaceae*, como é o caso, por exemplo, de Gonçalo Sampaio (4) e Pereira Coutinho (5) e, mais recentemente, de Hutchinson (6). Este último autor justifica o seu critério com base nos seguintes caracteres botânicos: enquanto as *Clusiaceae* apresentam flores predominantemente unissexuais, sementes quase sempre ariladas e células secretoras vermiformes, nas *Hypericaceae* as flores são bissexuais, as sementes não são ariladas e as células secretoras apresentam-se normalmente sob a forma de pontuações translúcidas ou negras.

Das cerca de 400 espécies pertencentes a este género, apenas 61 delas estão representadas na Europa e 14 em Portugal, distribuídas por sete secções.

Pertencentes à secção *ANDROSAEMUM* Godron existem em Portugal 2 espécies: *H. foliosum* Aiton, localizada nos Açores e *H. androsaemum* Lin, conhecida por Hipericão-do-Gerês, Erva-do-Gerês e Erva-da-Pedra, localizada no Noroeste, Centro Norte e Serras de Montejunto, Sintra e Monchique.

À secção *TAENIOCARPIUM* Jaub e Spach pertence uma única espécie conhecida no nosso país, *H. pulchrum* Lin, encontrada no Noroeste, Centro-Norte e Centro-Este meridional.

A secção *ADENOSEPALUM* Spach está representada em Portugal por 3 espécies: *H. montanum* Lin, distribuída pelo Noroeste montanhoso e Centro--Norte, mas raro; *H. tomentosum* Lin, distribuída pelo Centro-Norte (vales), Centro-Oeste, Centro-Sul, Sudoeste meridional e Sudeste; *H. pubescens* Boiss, localizada no Sudoeste meridional, mas raro.

À secção *ELODES* Koch pertence a espécie *H. elodes* Lin, espalhada pelo Centro-Oeste, Sudoeste setentrional, Sudeste setentrional, Centro-Norte, Centro-Sul e, embora mais raramente, ainda no Nordeste setentrional. Encontra-se ainda no arquipélago dos Açores.

À seccção *DROSOCARPIUM* Spach pertence a espécie *H. perfoliatum* Lin, conhecida por Hipericão Celheado, localizada no Centro do País.

A secção *OLIGOSTEMA* Stefonov tem 2 espécies representadas entre nós: *H. linarifolium* Vahl conhecida no Continente por Pelicão, e *H. humifusum* Lin, a primeira distribuindo-se por todo o Norte e Centro do Continente e a segunda presente em quase todo o território, embora sendo mais rara no Sul.

A secção *HYPERICUM* tem 2 espécies representadas no Continente e Açores: *H. undulatum* Willd, distribuída pelos Açores e por quase todo o Continente, e *H. perforatum* Lin, também com ampla distribuição pelos Açores e Continente e conhecida por Milfurada, Erva-de-S.João, Hipérico, Hipericão, e, no arquipélago da Madeira, por Pelicão ou Flor-de-S.João.

Para além destas 12 espécies, João Franco (1) refere ainda mais duas, mas que considera, apenas, como espécies de jardim ou fugidas de cultura: *H. calycinum* Lin, conhecida por Raios-de-Sol, e *H. hircinum* Lin.

As espécies do género *Hypericum* caracterizam-se por possuírem flores hermafroditas, 4 a 5 sépalas, 4 a 5 pétalas amarelas, por vezes tintas de vermelho. Estames em 3 ou 5 fascículos de (1-) 3 a cerca de 125, por vezes alternando com fascículos estéreis, ou em 5 grupos irregulares; os fascículos, quando 5, são antepétalos e quando 3, um é antepétalo e dois (maiores) são antessépalos. Os ovários são (2-) 3-5 loculares, ou parcial ou completamente uniloculares; os óvulos são numerosos. Os estiletes (2) 3-5 são livres e finos. A cápsula é septicida, raramente carnuda e mais ou menos indeiscente.

1.1. - BIBLIOGRAFIA

(1) - FRANCO, J.A.: Nova Flora de Portugal (Continente e Açores), Vol I, Sociedade Astória, Ldª., Lisboa, 1971.

(2) - TUTIN, T.G. et al. (Eds): Flora Europaae, Vol II, Cambridge University Press, London, 1968.

(3) - ENGLER, A. (Melchior, H. e Werdermann, E.): Syllabus der Pflanzenfamilien, Vol I e II (12ª edição), Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1964.

(4) - SAMPAIO, G.: Flora Portuguesa, (2ª edição) de A. Pires de Lima, Imprensa Moderna, Ldª., Porto, 1947.

(5) - COUTINHO, A.X.P.: Flora de Portugal, (2ª edição) de R.T. Palhinha, Bertrand, Ldª., Lisboa, 1939.

(6) - HUTCHINSON, J.: The Families of Flowering Plants, (3ª edição), Academic Press, London, 1973, pág. 28.

2. - USOS NA MEDICINA POPULAR (1,2,3)

As plantas do género *Hypericum* eram usadas na antiguidade para serem colocadas sobre as imagens religiosas, com o fim de afugentar os espíritos malignos. Foi possivelmente nessa prática que teve origem a palavra hipérico, que, em grego, significa "em cima de um ícon".

Da idade média há também relatos de utilização de *H. perforatum* para ser queimado, com o fim de afugentar das casas os maus espíritos que aí se tivessem instalado (4).

Mas, para além desse emprego, várias espécies de *Hypericum*, principalmente *H. perforatum* e *H. androsaemum* têm sido usadas ao longo dos tempos com diversos fins medicinais.

Assim, quer uma quer outra destas espécies têm sido usadas sob a forma de infuso, no tratamento da asma, inflamações de traqueia, más digestões e intoxicações devidas ao mau funcionamento do fígado.

Têm sido usadas ainda sob a forma de decocto, como vermífugo; sob a forma de unguento, nas distorções e contusões; sob a forma de óleo, em fricção, no tratamento da gota, dor ciática, reumatismo, chagas, queimaduras e ulcerações e, ainda, sob a forma de licor, como digestivo e aperitivo.

No entanto, as suas principais utilizações, as quais se vêm mantendo até hoje, são as de diurético e desintoxicante do fígado.

Dado o grande uso empírico que estas espécies têm tido, surgiram alguns trabalhos relatando a acção farmacológica, dos seus extractos

alcoólicos e aquosos. Entre essas acções, são de evidenciar as acções analgésicas (5), bactericida (6), antiinflamatória e diurética (4).

2.1. - BIBLIOGRAFIA

(1) - CECCHINI, T.: Enciclopedia de las Hierbas y de las Plantas Medicinales, Editorial de Vecchi, S.A., Barcelona, 1980, pág. 239-42.

(2) - Segredos e Virtudes das Plantas Medicinais, Selecções do Reader's Digest, Lisboa, 1983, pág. 183.

(3) - COSTA, A.F.: Farmacognosia, II Vol. (2ª edição), Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1978, pág. 1021-1022.

(4) - CARDONA, M.L. e SEOANE, E.: An. Quim., 79 C, 144, (1983).

(5) - VASIL'CHENKO, E.A.; VASIL'EVA, L.N. e KOMISSARENKO, N.F.: Rastrit. Resur., 22(1), 12-21, (1986), (C.A. 104:142140).

(6) - BABAEVA, N.G.: Fiziol. Patol. Pishch. Sist., 251, 5, (1963), (C.A. 73:28861).

3. - INVESTIGAÇÕES FITOQUÍMICAS ANTERIORMENTE REALIZADAS SOBRE O GÉNERO *HYPERICUM* L.

Numerosas são as investigações fitoquímicas realizadas em plantas deste género, o que permitiu que nelas tenham sido identificadas diversas substâncias como: carotenoides (1,2), vanilina (3,4), vitaminas (1, 5,6), taninos (1,2,5,7-9), ácidos cafeico e clorogénico (10-13). Todavia, a maior parte das publicações neste domínio refere -se às hipericinas, ao óleo essencial, aos flavonóides e, mais recentemente, a um número crescente de xantonas.

A. - HIPERICINAS

As hipericinas foram, sem dúvida, as primeiras substâncias a chamar a atenção dos investigadores, devido aos efeitos provocados no gado após ingestão das espécies que as contêm.

Esses efeitos, no seu conjunto designados por hipericismo, variam com a quantidade de planta ingerida e com a espécie animal considerada, mas podemos dizer que, no seu conjunto, se traduzem pelos seguintes sintomas (14,15):

> queda de pelo, edema facial, irritação das zonas de pele não pigmentadas, perda de apetite, perturbação de visão, variação da temperatura, pulso rápido, respiração acelerada, diminuição de quantidade de leite produzida e aparecimento, neste, de aroma desagradável.

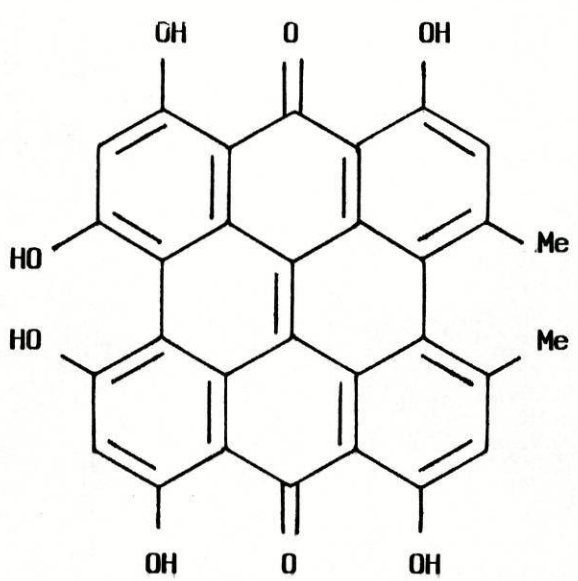
O registo mais antigo (1787) de hipericismo refere-se a carneiros brancos, mas posteriormente outros relatos surgiram relativos a este

fenómeno ocorrendo em cavalos, gado bovino e caprino.

A dose tóxica de planta varia com a espécie animal. Assim, nos bovinos, a ingestão de 1% de vegetal (peso de planta fresca / peso de animal) é tóxica, e a de 5% é já fatal, enquanto nos caprinos apenas surgem sintomas de hipericismo após ingestão de uma dose de 4%, reportando-se estes dados a *H. perforatum*, que é a espécie para o qual estes efeitos estão melhor estudados.

Os sintomas manifestam-se 2 a 21 dias depois da ingestão da dose tóxica, havendo dois factores essenciais para o aparecimento das mesmas: o animal deve estar exposto ao Sol após a ingestão da planta e a sua pele não deve ser pigmentada ou deve ter zonas não pigmentadas, o que fez supor a presença de um princípio fotossensibilizante no vegetal ingerido.

De facto, a responsabilidade desse efeito foi atribuída, de início, à hipericina (I) (4,5,7,4',5',7'-hexaidroxi-2,2'-dimetilnaftodiantrona), cuja estrutura foi estabelecida por Brockmann em 1957 (15).



I

Trata-se de uma substância que apresenta no seu espectro de absorção, na zona do visível, máximos de absorção em 508, 548 e 590 nm, e tem fluorescência vermelha quando observada à luz U.V. de 365 nm. É pouco solúvel na maioria dos solventes orgânicos, sendo, contudo, suficientemente solúvel em éter etílico e acetato de etilo para conferir a estes solventes fluorescência vermelho-sangue; é mais solúvel em etanol e metanol e solventes orgânicos básicos. Em ácido sulfúrico concentrado e em soluções aquosas alcalinas tem cor vermelha e fluorescência verde (365 nm).

Mais tarde foram identificadas outras substâncias de estrutura e propriedades físico-químicas muito semelhantes às da hipericina, tais como a pseudo-hipericina, a protohipericina e outras.

Normalmente, os trabalhos que se referem à existência destes pigmentos nos vegetais limitam-se a assinalar a sua presença ou a fazer o seu doseamento (16-21), sem, contudo, distinguirem os diferentes compostos acima referidos, designando-os, no seu conjunto, por hipericina. Uma excepção a este respeito é o trabalho de Brockmann e Sanne (22), no qual é estudada a distribuição da hipericina e da pseudo-hipericina num conjunto de 16 espécies de *Hypericum*.

Deve-se a Mathis e Ourisson (23) o trabalho mais completo no que diz respeito à distribuição destes pigmentos no género *Hypericum*, que regista a presença ou ausência de hipericina em 220 espécies deste género.

B. - ÓLEO ESSENCIAL

São numerosos os trabalhos relativos à presença e doseamento de óleo essencial em diversas espécies deste género (24-30). Aliás, o género

Hypericum é caracterizado pela presença de canais secretores nos caules e nas raízes, e de bolsas secretoras nas folhas e flores (27).

O trabalho mais antigo de que temos conhecimento acerca do aparelho secretor do género *Hypericum* data de 1903 em que G. Weill reconhece que dentro deste género a repartição dos órgãos secretores na planta é semelhante para a maioria das espécies, não tendo por isso grande utilidade taxonómica (27).

A quantidade de óleo essencial nestas plantas é sempre reduzida, raramente ultrapassando 0,1% do peso da planta fresca, o que tem dificultado o estudo da sua composição.

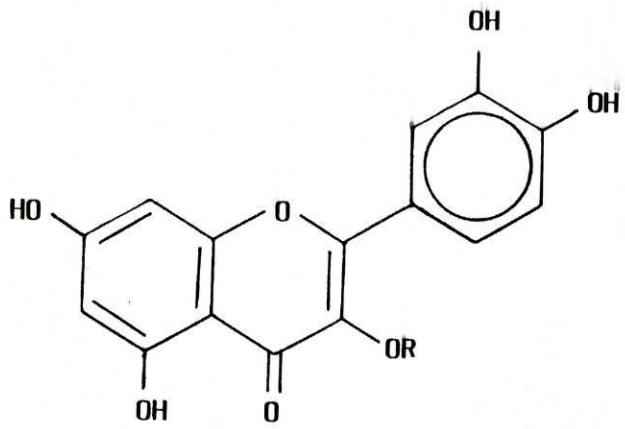
Os trabalhos mais completos acerca deste assunto são os de Mathis e Ourisson (27,28,29), distinguindo-se por:

- o grande número de espécies estudadas;
- o número de componentes isolados e identificados;
- o estudo da variação da abundância de óleo essencial relacionada com diversos factores (ecológicos, geográficos, etc.);
- as elações quimio-taxonómicas que tiram;
- a criação de métodos analíticos adequados.

Segundo esses trabalhos o óleo essencial de *Hypericum* contém como principais componentes as seguintes substâncias: 2-metiloctano, n-undecano, α e β-pinenos, n-nonano, limoneno, 2-metildecano, mirceno, cariofileno, α-terpineol, geraniol, aldeido caprílico e aldeido cáprico.

C. - FLAVONÓIDES

No decorrer das pesquisas bibliográficas efectuadas relativamente à presença destes compostos em espécies de *Hypericum* encontramos mais de 30 referências a flavonóides. Todavia, exceptuando alguns raros trabalhos que se referem à presença de leucoantociânicos e a antociânicos (3, 31,32), a grande maioria dos estudos realizados neste domínio relata a identificação, nestas espécies, do flavonol quercetina (II) e dos seus 3-O-heterósidos hiperósido (IIa), quercetrina (II,b), isoquercetrina (II c), e rutina (IId).



II

II - R = H : Quercetina

IIa - R = galactose: Hiperósido

IIb - R = ramnose : Quercetrina

IIc - R = glucose : Isoquercetrina

IId - R = ramnosilglucose: Rutina.

Apesar deste facto parecer indicar que o género *Hypericum* se caracteriza por uma grande uniformidade de composição quanto a flavonóides, há 3 excepções a assinalar relativamente a esta matéria. São elas as

seguintes:

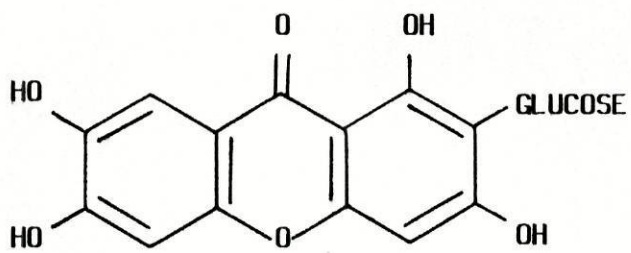
- *H. hirsutum*, que contém orientina (8-C-glucosil-5,7,3'-4'-tetraidroxiflavona), luteolina (5,7,3',4'-tetraidroxiflavona) e miricetina (3,5,7,2',3',4'- hexahidroxiflavona) (33);

- *H. rumeliacum*, no qual foi identificado o campferol (3,5,7,4-tetraidroxiflavona) e a miricetina, para além da quercetina (34);

- *H. ericoides*, no qual foi caracterizada a 5,4'-diidroxi-6-metil-4-metoxiflavona (35).

D. - XANTONAS

A primeira xantona descrita em espécies deste género, em 1967, foi a mangiferina (2-C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona) (36) (III).



III

Desde essa data, o número de xantonas assinaladas nestas plantas tem vindo a aumentar, sendo já de cerca de 20, o número destes compostos nelas descritos, umas com substituintes relativamente simples (hidroxil, meto

xil, prenil), enquanto outras revelaram possuir uma estrutura mais complexa, como a toxiloxantona B, a maculatoxantona e a kielcorina.

Este facto, tem sido utilizado por alguns autores (37,38) como argumento para justificar a inclusão do género *Hypericum* na família *Guttiferae*, uma vez que as xantonas, à excepção da mangiferina, aparecem num número muito restrito de famílias, sendo abundantes apenas nas *Guttiferae* e *Gentianaceae*.

3.1. - BIBLIOGRAFIA

(1) - CHAPLINSKAYA, M.G.: Sbornik, 269, 73 (1956); (C.A. : 52:2182).

(2) - POLEZHAEVA, N.S. e KANYUCHKOVA, G.K.: Rastit. Resur., 21(3), 340-3 (1985); (C.A.:104:106285).

(3) - RACZ, G. e FUZI, J.: Acta Pharm. Hung, 29, 64-70 (1959); (C.A.:57: :4757).

(4) - BURCHFIELD, H.P. e PRILL, E.A.: Contribs. Boyce Thompson Inst., 20, 251-63 (1959); (C.A.:54:15840).

(5) - VARLAKOV, M.N.: Farmatsiya, 9(5), 24-30 (1964); (C.A.:41:7673).

(6) - MAKHAMADZHANOV, I.: Uzbeksk. Biol. Zh., 10(3), 24-8 (1966); (C.A.:65: :14100).

(7) - COROVIC, M., NIKOLIC, R. e STJEPANOVIC, L.: Arh. Farm., 15(6), 439--51 (1965); (C.A.:66:26552).

(8) - MICHALUK, A., BRUNARSKA, Z. e BEDNARSKA, D.: Dissertationes Pharm., 8, 47-62 (1956); (C.A.:51:10679).

(9) - GRUNTOVÁ, Z., MESÁROSOVÁ L. e VANO, I.: Farmácia, 25, 327-34 (1956); (C.A.:51:8370).

(10) - BOLESLAW, B., JARONIEWSKI, W. e SWIATEK, L.: Acta Polon. Pharm., 17, 301-6 (1960); (C.A.: 55:3006).

(11) - KOLODZIEJSKI, J. e GILL, S.: Dissertationes Pharm., 12, 311-23 (1960); (C.A. :55:9793).

(12) - AKHTARDZHIEV, K. e NAKOV, N.: Farmatsiya, 23(3), 37-40 (1973); (C.A.: :80:1431).

(13) - AKHTARDZHIEV, K., NAVOK, N. e ANASTASOV, G.: Farmatsiya, 22(6), 35-9 (1972); (C.A. :79:2727).

(14) - WATT, J.M. e BREYER-BRANDWIJK, M.G.: Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa (2ª edição), E. e S. Livingston e Ltd, London, 1962, pág. 496-498.

(15) - THOMSON, R.H.: Naturally Occurring Quinones (2ª edição), Academic Press, London, 1971, pág. 586.

(16) - CERNY, C.: Z. Physiol. Chem., 73, 371-82 (1912); (C.A. :6:381).

(17) - KARIJONE, T. e KAWANO, N.: J. Pharm. Soc. Japan, 73, 205 (1953); (C. A. :47:11174).

(18) - HAGENSTRÖM, U.: Deut Apoth. - Ztg., 94, 1020-2 (1954); (C.A. :50:3714).

(19) - KUCERA, M.: Cescoslov. farm., 7, 381-3 (1958); (C.A. :53:7507).

(20) - CHAPLINSKAYA, M.G.: Trudy L'vov. Med. Inst., 12, 51-4 (1957); (C.A.: :55:907).

(21) - HERMAN, G., GHEORGHIU, A. e IONESCU-MATIU, E.: Farmácia, 9, 227-30 (1961); (C.A. :56:6091).

(22) - BROCKMANN, H. e SANNE, W.: Chem. Ber., 90, 2480 (1957).

(23) - MATHIS, C. e OURISSON, G.: Phytochemistry, 2, 157-171 (1963).

(24) - LUTZ, R.: Äther, Öle, Riechstoffe, Parfümer., Essenz. U. Aromen, 2, 137-9 (1952); (C.A.: 47:1267).

(25) - LUKIC, P., SAVIM, K. e GORUNOVIC, M.: Arhiv. Farm. 12(2), 69-70 (1962); (C.A. :58:12857).

(26) - BRUNARSKA, Z.: Dissertationes Pharm., 14(1), 89-96 (1962); (C.A. :60: :16209).

(27) - MATHIS, C. e OURISSON, G.: Phytochemistry, 3(1), 115 (1964).

(28) - MATHIS, C. e OURISSON, G.: Phytochemistry, 3(3), 377 (1964).

(29) - MATHIS, C. e OURISSON, G.: Phytochemistry, 3(1), 133 (1964).

(30) - STJEPANOVIC, L., COROVIC, M. e NIKOLIC, R.: Arh. Farm., 15(3), 177--88 (1965); (C.A. :66:26551).

(31) - NETIEN, G. e LEBRETON, Ph.: Ann. Pharm. Françaises, 22(1), 69-79 (1964).

(32) - MICHALUK, A.: Dissertationes Pharm., 13, 73-9 (1961); (C.A. :55: :15841.

(33) - KITANOV, G., BLINOVA, K.F. e AKHTARDZHIEV, Kh.: Khim. Prir. Soedin., 2, 231-2 (1979); (C.A. :91:171684).

(34) - KITANOV, G.: Khim. Prir. Soedin., 3, 407-8 (1979); (C.A.: 91:207408).

(35) - CARDONA, M.L. e SEOANE, E.: Phytochemistry, 21(11), 2759-60 (1982).

(36) - LEBRETON, Ph. e BOUCHEZ, M-P.: Plantes Médicinales et Phytothérapie, 1(4), 188-200 (1967).

(37) - CARDONA, M.L. e SEOANE, E.: Anales de Química, 79-C, 144-8 (1983).

(38) - GUNATILAKA, A.L., BALASUBRAMANIAM, S. e KUMAR, V.: Phytochemistry, 18, 182-3 (1979).

4. - INVESTIGAÇÕES FITOQUÍMICAS ANTERIORES SOBRE AS ESPÉCIES EM ESTUDO

No Quadro I referem-se os trabalhos já efectuados sobre as espécies de que agora nos ocupamos, indicando-se a parte da planta estudada e os compostos dela isolados.

QUADRO I

COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS ESPECIES DE *HYPERICUM* EM ESTUDO

Espécies	Compostos identificados	Referência
H. androsaemum L.		
sementes	ácido shiquímico	1
?	d-limoneno e álcool benzílico	2
folhas	hiperósido	3
frutos	nonacosano	3
cápsulas das sementes	α-terpineol e hidrocarbonetos de cadeia linear	4
raízes	xantonas	5
partes aéreas	óleo essencial	6
H. pulchrum L.		
partes aéreas	óleo essencial	6
?	ácido láurico e aldeido láurico	2
pétalas e sépalas	hipericina	7
planta inteira (?)	quercetina, isoquercetrina e avicularina (3-arabinosil quercetina).	8

QUADRO I (Continuação)

Espécies	Compostos identificados	Referência
H. elodes L.		
?	flavonóides sulfatados	9
H. linarifolium Vahl		
folhas, pétadas e sépalas	hipericina	7
H. humifusum L.		
partes aéreas	óleo essencial	6
folhas, pétalas e sépalas	hipericina	7
planta inteira	quercetina, hiperósido e mangiferina	8
H. undulatum Schout		
partes aéreas	óleo essencial	6
pétalas e sépalas	hipericina	7
H. calycinum L.		
frutos e folhas	óleo essencial	6
raízes	kielcorina	10

4.1. - BIBLIOGRAFIA

(1) - HARGREAVES, K.R.: Nature, 206, 830 (1965); (C.A. :63:4572).

(2) - SALGUES, R.: Qualitas Plantarum, 8, 38-64 (1961).

(3) - HARGREAVES, K.R.: Nature, 211, 417 (1966).

(4) - CARNDUFF, J., HARGREAVES, K.R. e NECHVATAL, A.: Phytochemistry, 5, 1029 (1966).

(5) - NIELSEN, H. e ARENDS, P.: J. Nat. Prod., 42, 301-4 (1979).

(6) - MATHIS, C. e OURISSON, G.: Phytochemistry, 3(1), 115 (1964).

(7) - MATHIS, C. e OURISSON, G.: Phytochemistry, 2, 157-171 (1963).

(8) - LEBRETON, P. e BOUCHEZ, M-P.: Plantes Médicinales et Phytothérapie, 1(4), 188-200 (1967).

(9) - HARBORNE, J.B.: Phytochemistry, 14, 1331-7 (1975).

(10) - NIELSEN, H. e ARENDS, P.: Phytochemistry, 17, 2040-1 (1978).

CAPITULO II

Generalidades sobre os flavonóides

1. Constituição química

2. Métodos usados para a determinação da sua estrutura

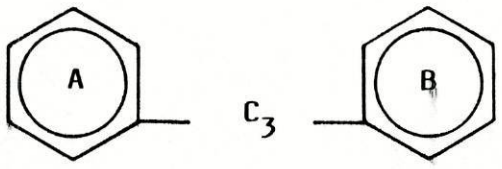
1. - CONSTITUIÇÃO QUÍMICA (1,2)

1.1. - ESTRUTURA GERAL

Nos vegetais são numerosas as substâncias de natureza fenólica e, dentre estas, as mais abundantes são:

- os ácidos-fenóis (ácidos benzóicos e cinâmicos e as cumarinas);
- os taninos;
- os flavonóides.

Os flavonóides são compostos caracterizados por uma estrutura comum $C_6 - C_3 - C_6$, isto é, apresentam dois núcleos benzénicos ligados por uma cadeia com três átomos de carbono. É comum designar-se o primeiro anel benzénico pela letra A e o segundo pela letra B (IV).

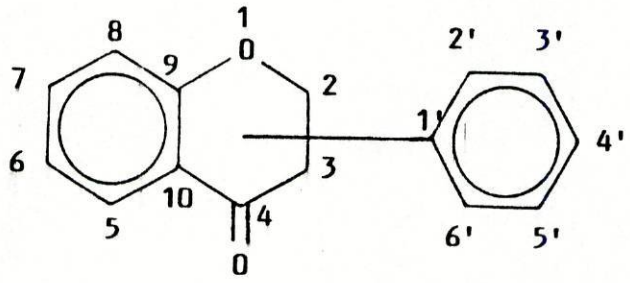


IV

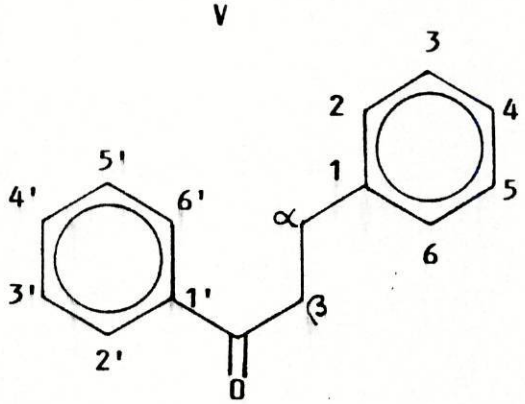
Conforme a natureza desta cadeia de ligação, assim surgem as diferentes classes de flavonóides, como se indica no Quadro II, em que estão representadas as principais classes destes compostos.

O sistema de numeração para a maioria dos flavonóides é o representado em (V), apresentando as chalconas (VI) e as auronas (VII) um esquema de

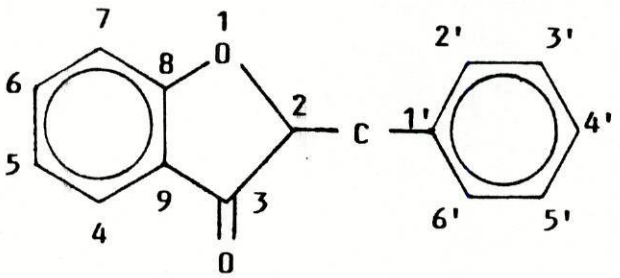
numeração próprio.



V



VI



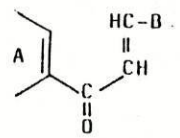
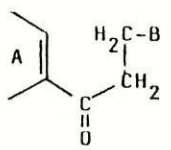
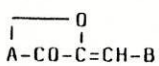
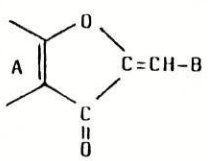
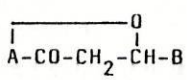
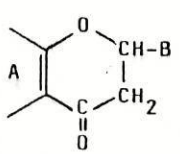
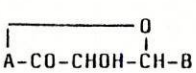
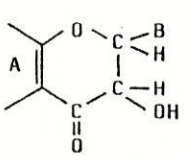
VII

Vários tipos de substituição ocorrem, normalmente, nestas estruturas: hidroxilação, metilação, metoxilação, glicosilação dos grupos hidroxilo (originando O-glicosilflavonóides), ou directamente do núcleo flavonóide (originando C-glicosilflavonóides), metilenação de grupos orto-diidroxilo, isoprenilação, acilação e dimerização (formação de biflavonóides).

Destas substituições as mais frequentes são a hidroxilação e a posterior glicosilação ou metilação desses hidroxilos.

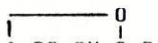
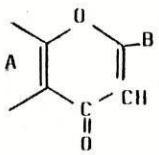
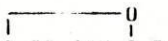
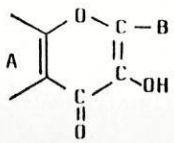
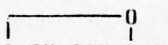
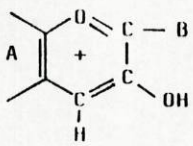
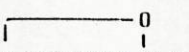
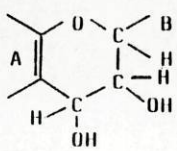
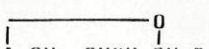
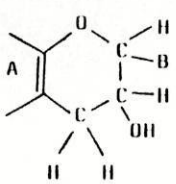
QUADRO II

PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES

ESTRUTURA DA CADEIA CENTRAL		CLASSE DE FLAVONOIDES
A-CO-CH=CH-B		CHALCONAS
A-CO-CH_2-CH_2-B		DIIDROCHALCONAS
		AURONAS
		FLAVANONAS
		FLAVANONOIS (diidroflavonois)

QUADRO II (Continuação)

PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES

ESTRUTURA DA CADEIA CENTRAL		CLASSE DE FLAVONOIDES
		FLAVONAS
		FLAVONOIS
		ANTOCIANIDINAS
		LEUCOANTOCIANIDINAS (flavanodiois)
		CATEQUINAS

1.2. - O-GLICOSILFLAVONÓIDES

Na natureza os flavonóides ocorrem preferentemente sob a forma heterosídica, em que um ou mais dos hidroxilos da molécula flavonóide está ligado a um açúcar por uma ligação hemiacetálica. Esta glicosilação tem por principal consequência tornar a molécula mais solúvel no suco vacuolar, onde se encontra, normalmente, armazenada.

As posições preferenciais para a glicosilação variam com a natureza da classe de flavonóide em questão, sendo as mais frequentes, no caso dos flavonóis, as posições 3 e 7.

Os açúcares mais frequentemente encontrados na constituição dos flavonóides são: a D-glucose, a D-galactose, a L-ramnose, a D-xilose, a L-arabinose e o ácido glucurónico. Mais raramente, podem aparecer associadas a flavonas e flavonóis, a manose, a alose e o ácido galacturónico. Com frequência estes açúcares encontram-se sob a forma de dissacarídos, sendo o mais frequente a rutinose (6-O-α-L-ramnosil-D-glucose) e, eventualmente, aparecem tri e mesmo tetrassacarídos, lineares ou ramificados.

Ocasionalmente, esta fracção glicídica da molécula pode ainda sofrer acilação com radicais vários: ácidos cinâmicos, ácido acético, ácido malónico e com hidrogenossulfatos.

1.3. - BIBLIOGRAFIA

1. - RIBÉREAU-GAYON, P.: Les Composés Phénoliques des Végéteaux, Dunod, Paris, 1968.

2. - MARKHAM, K.R.: Thecniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London, 1982.

2. - MÉTODOS USADOS PARA A DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS FLAVONÓIDES

Ao consultarmos a obra editada por Geissman em 1962 (1), encontramos todo um capítulo dedicado à determinação estrutural dos flavonóides. Entre os métodos aí descritos têm lugar de relevo:

a) - a obtenção de produtos corados por acção de diversos reagentes, colorações essas que têm, sobretudo, a finalidade de determinar a classe a que pertence a substância em estudo;

b) - métodos cromatográficos;

c) - métodos espectrofotométricos de I.V. e de U.V.-visível;

d) - métodos degradativos.

Entre estes últimos citam-se a hidrólise (ácida, alcalina ou enzimática) para promover a separação da parte glicosídica da genina, e processos de degradação desta última, seguidos do estudo dos produtos assim originados. Tal degradação é conseguida por fusão alcalina a 200-400^{o}C ou por processos mais suaves de ebulição com soluções aquosas alcalinas (hidróxidos de sódio, de potássio ou de bário), ou, ainda, por oxidação com reagentes diversos (peróxido de hidrogénio, permanganato de potássio, etc.).

Associado a estes processos degradativos usa-se, muitas vezes, a desmetilação ou a metilação do produto inicial, sendo este último processo usado sobretudo para a determinação da posição da ligação dos açúcares à genina.

Entretanto, outras técnicas surgiram, de mais fácil e rápida execução, as quais, além disso, exigem menor quantidade de produto para ensaio, factor que é sempre de ter em consideração em trabalhos desta natureza. Entre estas, citamos a espectrometria de massa e a ressonância magnética nu

clear, às quais vem sendo dada, nos últimos tempos, uma importância crescente no domínio da identificação de flavonóides.

Convém ainda referir que, sempre que possível, o processo de identificação é completado por uma síntese da molécula flavonóide, de modo a poder-se comparar o produto sintético como o natural .

De todos os métodos acabados de referir, utilizámos, para a identificação dos produtos por nós isolados, os seguintes:

a) - métodos cromatográficos;

b) - métodos espectrofotométricos (I.V. e de U.V. - visível);

c) - métodos espectrométricos (espectrometria de massa e de ressonância magnética nuclear).

Dado o grande volume de trabalho já realizado nestes domínios, é possível estabelecer, actualmente, relações entre os resultados obtidos por estes métodos e a estrutura química do composto em análise.

Apresentamos, de seguida, algumas dessas relações, restringindo-nos, contudo, à classe dos flavonóis, uma vez que no decurso do nosso trabalho apenas caracterizámos substâncias pertencentes a esta classe.

2.1. - MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

2.1.1. - Estrutura e valor de Rf (2,3)

Neste capítulo fixamos a nossa atenção, sobretudo, na relação existente entre o valor de Rf e a natureza dos heterósidos, e podemos dizer que esta relação será, logicamente, tanto mais perfeita quanto mais nos restringirmos a um determinado tipo de genina.

São ainda factores importantes a posição de glicosilação e natureza e número de açúcares presentes.

Dentro da classe dos flavonóis essas relações são as seguintes:

a) - no caso de monoglicósidos, os mais móveis em solventes aquosos são aqueles em que o açúcar se encontra na posição 3 da genina;

b) - os heterósidos contendo pentoses e metilpentoses apresentam, em butanol-acético, maior valor de Rf que os que contêm hexoses;

c) - os heterósidos contendo ácidos urónicos têm, em fenol aquoso, valor de Rf particularmente baixos, e valor alto em água (valor que é particularmente elevado se a posição ocupada na genina fôr em C-3);

d) - O aumento do número de moléculas de açúcar provoca, normalmente, um abaixamento dos valores de Rf em butanol-acético, associado a um aumento regular desses valores no caso dos desenvolventes serem aquosos.

Esta relação é particularmente notória se nos restringirmos apenas a uma posição de glicosilação, conforme se pode observar no QUADRO III, em que são referidos os valores de Rf em butanol-acético e em solução a 15% de ácido acético para os 3-O-heterósidos de Quercetina mais frequentemente encontrados na natureza.

e) - Os derivados acilados têm, relativamente aos correspondentes heterósidos não acilados, um menor valor de Rf para desenvolventes aquosos, mas maior mobilidade em fenol aquoso e em butanol-acético.

Importante excepção a esta regra são os derivados sulfatados, dado o facto de se apresentarem sob a forma de sais.

Q U A D R O III

VALORES DE Rf × 100 DE VÁRIOS DERIVADOS DA QUERCETINA EM B.A.A.(a) E EM HOAc 15% (b)

COMPOSTO	Rf × 100 (c)	
	B.A.A.	HOAc 15%
Monoglicosósidos:		
3-ramnosil	72	49
3-arabinosil	70	31
3-xilosil	65	32
3-glucosil	58	37
3-galactosil	55	35
Diglicósidos:		
3-neohesperidosil	49	-
3-rutinosil	45	51
3-soforosil	45	75
Triglicósidos:		
3-ramnodiglucosil	36	54
3-soforotriosil	36	70
3-(2-G-glucosilrutinosil)	36	71

(a) - butanol-ácido acético-água (6:1:2);

(b) - solução a 15% de ácido acético;

(c) - os valores registados dizem respeito a cromatografia em papel Whatman nº 1.

2.1.2. - Estrutura e revelação (4,5,6)

De um modo geral, podemos dizer que os reveladores usados para fenóis podem ser utilizados, igualmente, para os flavonóides, sendo de citar, entre eles, a amónia, o cloreto de alumínio, o cloreto férrico, o hidrogenocarbonato de sódio, o carbonato de sódio, etc..

É verdade porém, que a utilização destes reveladores não nos fornece informações acerca da estrutura das substâncias em análise, nem é essa a principal finalidade da revelação.

No entanto, a partir da utilização da luz U.V. (366 nm), antes e após a aplicação de certos reveladores químicos, é possível obter-se algumas informações acerca dessa estrutura.

No nosso trabalho, escolhemos como revelador a luz U.V. (366 nm) antes da aplicação de qualquer reagente e após a aplicação de:

a) - solução metanólica de cloreto de alumínio, que cora de amarelo fluorescente os 5-hidroxiflavonóides (7);

b) - solução metanólica de complexo ácido defenilbórico-etanolamina (N.A.), que cora de alaranjado todas as 3', 4'-diidroxiflavonas e flavonóis (7,8);

c) - vapores de uma solução concentrada de amónia, que reage com as flavonas e flavonóis originando as colorações indicadas no QUADRO IV.

Q U A D R O IV

COMPORTAMENTO DE FLAVONAS E FLAVONÓIS A LUZ U.V. DE 366 nm ANTES E APÓS A APLICAÇÃO DE NH_3

COMPOSTO		COLORAÇÃO DAS MANCHAS A LUZ U.V. DE 366 nm	
		S/NH_3	C/NH_3
FLAVONAS	C/OH em 5 e 4'	castanha	amarela
	S/OH em 5	azul fluorescente	amarela esverdeada ou azul esverdeada
FLAVONÓIS	C/3-OH livre	amarela (a,b)	amarela (a)
	C/3-OH ocupada	comportam-se como flavonas	

(a) - os tons de amarelo variam um pouco com o esquema geral de oxigenação do flavonol, o que pode dar indicações sobre o tipo de flavonol presente;

(b) - a esta regra conhecem-se duas importantes xecepções:

a quercetagetina (5,6,7,3',4'-pentaidroxiflavonol) e a gossipetina (5,7,8,3',4'-pentaidroxiflavonol), que se apresentam coradas de castanho escuro à luz U.V., apesar de serem flavonóis com 3-OH livre.

2.2. - MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

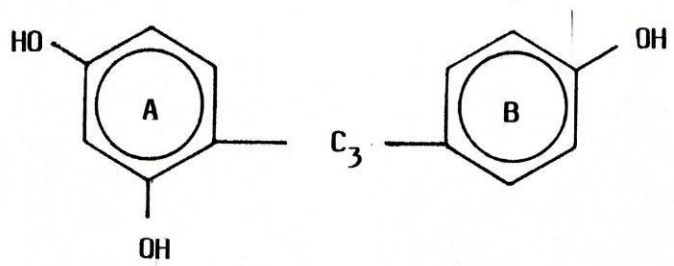
2.2.1. - Estrutura e espectrofotometria no ultravioleta-visível (9,10)

O espectro de U.V.-visível dos flavonóides, geralmente registado em solução metanólica, apresenta dois máximos de absorção nas zonas seguintes:

240-285 nm (banda II): reflecte, sobretudo, a substituição no anel A.

300-550 nm (banda I) : reflecte, sobretudo, a substituição nos aneis B e C (anel heterocíclico).

A localização e as intensidades relativas destas bandas fornecem uma valiosa informação acerca da natureza da classe do flavonóide presente, conforme pode ser apreciado na Figura 2.1.. Aí estão reproduzidos os espectros de diferentes classes de flavonóides contendo o esquema de oxigenação apresentado em (VIII), verificando-se que variações neste esquema provocam ligeiros deslocamentos nas posições destes máximos de absorção.



VIII

Assim, o aumento de hidroxilação provoca um deslocamento batocrómico na banda I se a hidroxilação diz respeito aos aneis B ou C, ou na banda II se esse aumento diz respeito ao anel A.

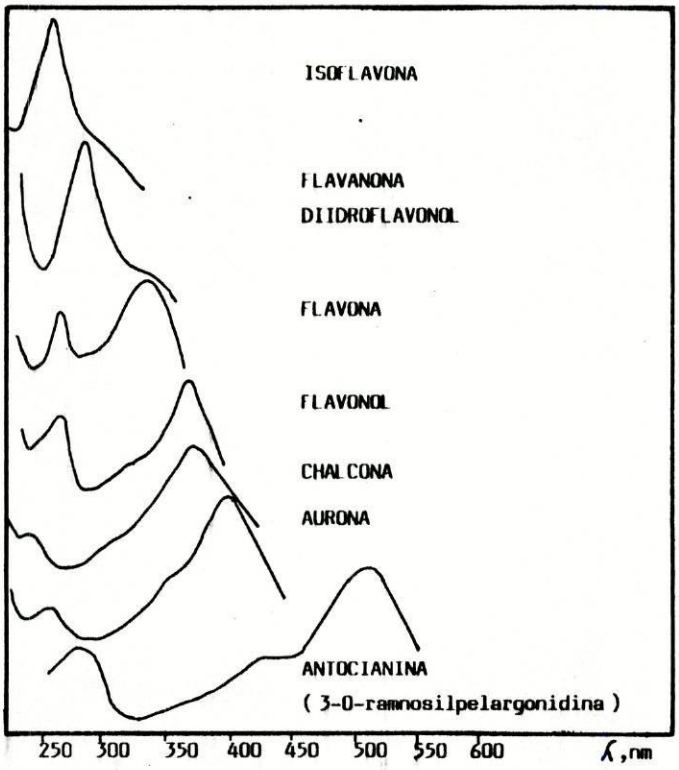


Fig. 2.1 : ESPECTRO DE ABSORÇÃO U.V.-VISIVEL DE DIFERENTES TIPOS DE FLAVONOIDES COM ESQUEMAS DE HIDROXILAÇÃO EQUIVALENTES.

Como ilustração do que acabou de ser referido, e restringindo-nos apenas a flavonas e flavonóis, registamos nos QUADROS V a VII os exemplos fornecidos por Mabry (11).

QUADRO V

INFLUÊNCIA DA HIDROXILAÇÃO DO ANEL A NA POSIÇÃO DA BANDA II

FLAVONA	POSIÇÃO DOS HIDROXILOS NO ANEL A	BANDA II (nm)
Flavona	-	250
7-Hidroxiflavona	7	252
5-Hidroxiflavona	5	268
5,7-Diidroxiflavona	5,7	268
5,6,7-Triidroxiflavona	5,6,7	274
5,7,8-Triidroxiflavona	5,7,8	281

QUADRO VI

INFLUÊNCIA DA HIDROXILAÇÃO DO ANEL B NA POSIÇÃO DA BANDA I

FLAVONOL	POSIÇÃO DOS HIDROXILOS NO ANEL A	POSIÇÃO DOS HIDROXILOS NO ANEL B	BANDA I (nm)
Galangina	5,7	-	359
Campferol	5,7	4'	367
Quercetina	5,7	3',4'	370
Miricetina	5,7	3',4',5'	374

Q U A D R O VII

INFLUÊNCIA DA HIDROXILAÇÃO DO ANEL C NA POSIÇÃO DA BANDA I

ANEL C	BANDA II (nm)	BANDA I (nm)
FLAVONAS	250-280	310-350
FLAVONÓIS c/3-OH ocupado	250-280	330-360
FLAVONÓIS c/3-OH livre	250-280	350-385

A metilação, glicosilação ou acilação dos hidroxilos tendem a abolir os efeitos, provocados pela presença daqueles.

Para além das informações que o espectro no U.V.-visível registado em metanol nos pode oferecer, outras ainda podem ser obtidas a partir da utilização de certos reagentes (metóxido de sódio, cloreto de alumínio, ácido clorídrico, acetato de sódio e ácido bórico), cujo modo de emprego está descrito na Parte Experimental, página 58.

Assim, após adição desses reagentes a uma solução metanólica do flavonóide, obtêm-se novos espectros cujos desvios, relativamente ao registado em solução metanólica simples, são de grande valor como informação estrutural.

No QUADRO VIII transcrevemos os valores fornecidos por Wollenweber (10) para os desvios obtidos na análise espectral de flavonas e flavonóis, utilizando esses reagentes.

Q U A D R O VIII

DESLOCAMENTOS OBSERVADOS NO ESPECTRO DE U.V.-VISIVEL DE FLAVONAS E FLAVONÓIS, RELATIVAMENTE AO REGISTADO EM METANOL, APÓS ADIÇÃO DE DIVERSOS REAGENTES

REAGENTE	EFEITO OBSERVADO	INDICAÇÃO
MeOH + NaOMe	(deslocamentos na banda I)	
	+ 45 a 65 nm; estável sem diminuição de intensidade.	OH em 4'
	+ 45 a 65 nm; estável com diminuição de intensidade.	OH em 3 c/OH em 4' ocupado
	decomposição	OH em 3 e 4'
	aparecimento de nova banda entre 320 e 355 nm.	OH em 7
MeOH + $AlCl_3$	(deslocamentos na banda I)	
	+ 60 nm	OH em 3
	+ 35 a 55 nm	OH em 5
	+ 50 a 60 nm	OH em 3 e 5
	+ 20 nm	OH em 5 e 6

Q U A D R O VIII (Continuação)

REAGENTE	EFEITO OBSERVADO	INDICAÇÃO
MeOH + $AlCl_3$ + HCl	(deslocamentos na banda I)	
	-30 a 40 nm (a)	o-hidroxilos no anel B
	- 20 nm (a)	Três hidroxilos no anel B
	+ 25 a 30 nm	OH em 5 e 6
	+ 20 nm	OH em 5 e OMe em 6
	+ 55 a 57 nm	OH em 5 e OMe em 8
MeOH + NaOAc	(deslocamentos na banda II)	
	+ 5 a 20 nm	OH em 7
	decomposição	OH em 5,6 e 7
		OH em 5,7 e 8
		OH em 3,3' e 4'
		OH em 3 e 4' e OMe em 3'
MeOH + NaOAc + H_3BO_3	(deslocamentos na banda I)	
	+ 12 a 30 nm	o-hidroxilos no anel B
		o-hidroxilos no anel A

(a) - desvio hipsocrómico relativamente ao espectro registado em MeOH + $AlCl_3$.

2.2.2. - Estrutura e espectrofotometria no infravermelho (12)

Num espectro de infravermelho, a posição das bandas de absorção fornece-nos indicações acerca da presença de determinados grupos químicos.

No QUADRO IX registamos os valores fornecidos por Ribéreau-Gayon (12), que relacionam vários grupos químicos dos flavonóides com os respectivos máximos de absorção, expressos em número de onda .

Q U A D R O IX

BANDAS DE ABSORÇÃO DE ALGUNS GRUPOS QUÍMICOS FREQUENTES NOS FLAVONÓIDES

GRUPO	NÚMERO DE ONDA (cm^{-1})
OH (alcoólico)	3100 - 3300
CH_3	2930
C = O	1685 (flavonas) (a)
	1650 (5-hidroxiflavonas) (a)
	1655 (5,7-diidroxiflavonas (a)
	1630 (7-hidroxiflavonas) (a)
Duplas ligações aromáticas conjugadas	1500 - 1610
Dupla ligação do anel pirónico	1585
OH (fenólico)	1360
H (benzénico)	800
Anel aromático meta substituído	1165

(a) - Abaixamento de 30 cm^{-1} para os respectivos flavonóis.

2.3. - MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

2.3.1. - Estrutura e espectrometria de R.M.N (13,14,15)

A RMN de ^{1}H e de ^{13}C têm aplicações que se completam, fornecendo, no seu conjunto, um grande número de informações estruturais.

2.3.1.1. - RMN de ^{1}H

A partir da utilização do valor dos desvios químicos, da integração dos sinais obtidos e do valor das constantes de acopolamento, a RMN protónica fornece-nos valiosas informações, entre as quais citamos, como princípais, as seguintes:

a) - Definição do esquema de oxigenação da genina, o qual é indicado pelo número e posição dos protões

b) - Determinação do número e posição dos metoxilos.

c) - Determinação do número de açúcares presentes, da posição da sua ligação à genina e da forma anomérica em que se encontram.

d) - Pesquisa e análise de cadeias hidrocarbonadas, cujos sinais aparecem numa zona do espectro distinta da dos restantes protões da molécula flavónica.

Os valores de δ em que se situam os sinais fornecidos por um glicosilflavonol e que utilizámos na determinação da estrutura das substâncias isoladas no decorrer do nosso trabalho, são indicados no QUADRO X.

Q U A D R O X

VALORES DO DESVIO QUIMICO, RELATIVAMENTE AO TMS, OBSERVADOS EM RMN ^{1}H DE GLICOSILFLAVONÓIS

TIPO DE PROTÃO	DESVIO QUÍMICO (δ)
Protões do anel B	6,5 - 8
Protões do anel A	6 - 7
Maioria dos protões dos açúcares	3,5 - 4
Protão 1 do açćuar (1")	
- ligado à posição 3 da genina	5,5 - 6
- ligado à posição 7 ou 4' da genina	4,5 - 5,5
Metoxilos	3,5 - 4
Metilos alifáticos	cerca de 1
Metilos aromáticos	cerca de 2

2.3.1. - RMN de ^{13}C

A RMN de carbono tem como principais aplicações as seguintes:

a) - Determinação de número e natureza dos carbonos da molécula;

b) - Identificação dos açúcares e determinação da natureza e local de sua ligação à genina;

c) - Determinação dos locais de ligação interglicosídica;

d) - Identificação e localização de substituintes ácidos.

Os valores de δ em que se situam os sinais originados por glicosil flavonóis são indicados no QUADRO XI.

QUADRO XI

VALORES DE DESVIO QUÍMICO, RELATIVAMENTE AO TMS, OBSERVADOS EM RMN ^{13}C DE GLICOSILFLAVONÓIS

TIPO DE CARBONO	DESVIO QUÍMICO (δ)
Carbonílico	170 - 200
Aromáticos e Olefínicos	
- Oxigenados	130 - 165
- Não oxigenados	90 - 135
Glicídicos	69 - 83
C_1 de um O-glicósido	cerca de 100
C_1 de um C-glicósido	cerca de 61
Metoxilos aromáticos	55 - 63
Metilos aromáticos	cerca de 20
Metilos alifáticos	cerca de 17

2.3.2. - Estrutura e espectrometria de massa (16,17)

A principal aplicação da espectrometria de massa é, sem dúvida, a determinação da massa molecular de um composto. Se se dispõe de um espectrómetro de alta resolução é possível ainda, através da análise do sinal fornecido pelo ião molecular, a determinação da composição elementar da substância em análise.

Para além desta informação, o estudo dos diversos sinais registados no espectro pode fornecer-nos ainda importantes dados acerca da estrutura do composto.

A: - Geninas Flavonólicas

Nos flavonóis não glicosilados o sinal fornecido pelo ião molecular é, normalmente, o de maior intensidade. Para além deste, encontramos quase sempre o sinal M-1 devido à perda de hidrogénio, o sinal M-18 devido à perda de água, e os sinais M-28 e M-29 originados respectivamente, pela perda de CO e de CHO a partir da função carbonílica.

Se o flavonol apresentar radicais metilo, metoxilo ou isopentenilo aparecem, também, no espectro os sinais correspondentes à massa molecular subtraída da massa desses mesmos radicais.

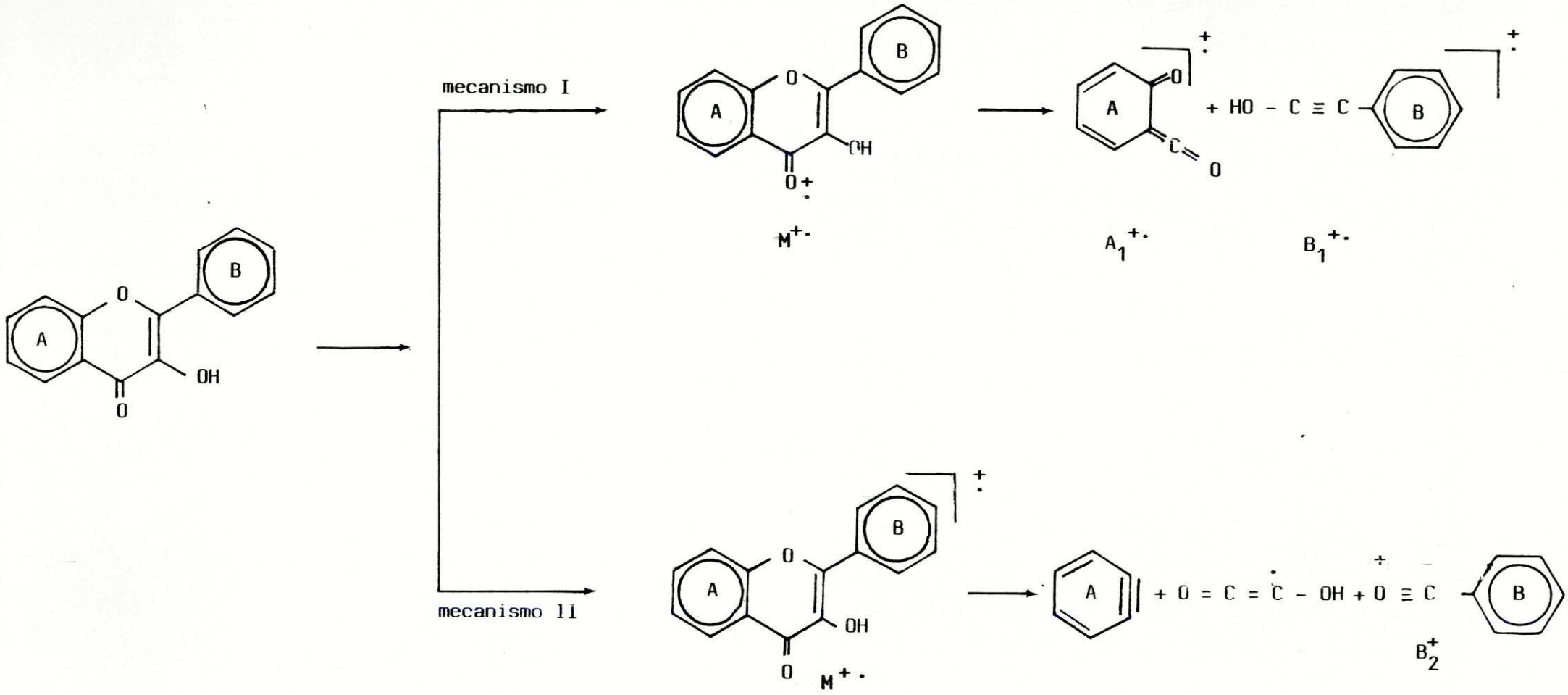
Outro grupo de sinais que nos fornecem valiosas informações são os originados pela rotura do anel heterocíclico do flavonol. Esta rotura pode ocorrer por um dos dois mecanismos apresentados no ESQUEMA I e que são competitivos entre si.

Através do estudo dos sinais produzidos pelos iões $A_1^{+\cdot}$, $B_1^{+\cdot}$ e B_2^{+} é possível determinar a localização dos eventuais substituintes nos aneis A e B.

B: - Heterósidos

Os heterósidos dos flavonóides não apresentam a volatilidade necessária à obtenção de um espectro por impacto electrónico, sendo, portanto, necessário preparar derivados (permetilados, perdeuterometilados ou trimetilsililados), de modo a que tal propriedade seja conseguida.

Mesmo quando sob a forma de derivados, os glicósidos apresentam muitas vezes um ião molecular de fraca intensidade. Contudo, a partir da natureza



E S Q U E M A I : Fragmentação de um flavonol

dos fragmentos detectados é possível determinar a sequência de ligação de açúcares, posição de ligação interglicosídica e a natureza pirânica ou furânica dos mesmos.

2.4. - BIBLIOGRAFIA

1. - VENKATARAMAN, K.: The Chemistry of Flavonoid Compounds, (Editado por Geisman), Pergamon Press, Oxford, 1962, Cap. IV.

2. - RIBÉREAU-GAYON, P.: Les Composés Phénoliques des Végéteaux, Dunod, Paris, 1968, pág. 75-9 e 124-7.

3. - HARBORNE, J.B. e WILLIAMS, C.: The Flavonoids, (Editado por Harbone, J.B., Mabry, T.J. e Mabry, H.), Chapman and Hall, London, 1975, pág. 384-7.

4. - RIBÉREAU-GAYON, P., op. cit., pág. 71 e 122-3.

5. - MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. e THOMAS, M.B.: The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin, 1970, pág. 12-3.

6. - MARKHAM, K.R.: Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London, 1982, pág. 24.

7. - WAGNER, H., BLADT, S. e ZGAINSKI, E.M.: Plant Drug Analysis, Springer-Verlag, Berlin, 1984, pág. 164-5.

8. - MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 36-45.

9. - WOLLENWEBER, E.: The Flavonoids - Advances in Research, (Editado por Harborne, J.B. e Mabry, T.J.), Chapman and Hall, London, 1982, pág. 240-2.

10. - MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. e THOMAS, M.B., op. cit., pág. 44-5.

11. - RIBÉREAU-GAYON, P., op. cit., pág. 139-41.

12. - MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. e THOMAS, M.B., op. cit., Cap. VIII.

13. - MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 72-85.

14. - MARKHAM, K.R. e CHARI, M.: The Flavonoids - Advances in Research, (Editado por Harborne, J.B. e Mabry, T.J.), Chapman and HAAL, London, 1982, pág. 240-2.

15. - MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R.: The Flavonoids, (Editado por Harborne, J.B., Mabry, T.J. e Mabry, H.), Chapman and Hall, London, 1975, Cap. III.

CAPITULO III

Parte experimental

1. Material botánico utilizado

2. Métodos gerais e instrumentos usados

1. - MATERIAL BOTÂNICO UTILIZADO

Para o estudo que nos propusemos realizar utilizamos a parte aérea de sete espécies de *Hypericum* da nossa flora continental, indicando-se o local e a data da colheita do material usado no QUADRO XII.

Os exemplares de herbário encontram-se depositados no Instituto Botânico Dr. Gonçalo Sampaio e a classificação botânica foi feita pelo Exmº. Senhor Professor Doutor Arnaldo Roseira.

QUADRO XII

LOCAL E DATA DA COLHEITA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

ESPÉCIE	LOCAL	DATA
H. linarifolium Vahl	Gerês	Agosto 1978
H. pulchrum Lin	Gerês	Agosto 1978
H. calycinum Lin	Gerês	Agosto 1978
H. androsaemum Lin	Terras de Bouro	Agosto 1978
H. humifusum Lin	Porto	Agosto 1982
H. elodes Lin	Montalegre	Julho 1979
H. undulatum Schout	Serra de Monchique	Outubro 1978

2. - MÉTODOS GERAIS E INSTRUMENTOS USADOS

2.1. - SECAGEM E PULVERIZAÇÃO

O material vegetal foi seco em estufa a 30-40°C e, seguidamente, reduzido a pó grosso.

2.2. - REAGENTES

Os reagentes usados eram das firmas Merck e Carlo Erba, de qualidade "pró-análise".

2.3. - OBTENÇÃO DOS EXTRACTOS

O material vegetal foi sujeito a extracção, por éter de petróleo, P.E. 40-60°C, utilizando um aparelho de Soxhlet. Esta extracção com éter de petróleo teve por fim desengordurar o material e, por isso, o extracto etéreo foi rejeitado.

Seguidamente, o pó foi macerado em metanol, durante 3 dias, com renovação de solvente de 12 em 12 horas. É de notar, porém, que o material proveniente de *H. humifusum*, foi macerado em acetato de etilo, embora utilizando as mesmas condições.

Os líquidos extractivos foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo BÜCHI R 110, sob pressão reduzida e à temperatura de 30-40° C, até à consistência desejada.

2.4. - PURIFICAÇÃO DOS EXTRACTOS E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

O método por nós escolhido para o isolamento das substâncias a estudar, foi a cromatografia preparativa em placa de celulose. Porém, como os

extractos apresentavam uma composição muito complexa, tornou-se necessário fazer um primeiro fraccionamento que tinha por fim, essencialmente, a simplificação da composição de cada fracção e a eliminação de gorduras e clorofilas não completamente eliminadas na extracção da planta com éter de petróleo.

Com este fim, utilizamos a cromatografia em coluna de celulose microcristalina, artº. 2331 da Merck, e os extractos foram eluídos sucessivamente com: éter de petróleo, éter de petróleo-benzeno (1:1), benzeno, benzeno--clorofórmio (1:1), clorofórmio, clorofórmio-éter etílico (1:1), éter etílico, éter etílico-acetato de etilo (1:1), acetato de etilo, acetato de etilo-metanol (1:1) e metanol. A eluição era considerada terminada quando o eluente deixava de dar coloração amarela por adição de algumas gotas de solução a 20% de hidróxido de sódio.

As fracções recolhidas, de cerca de 100 ml cada, foram depois concentradas e analisadas por cromatografia em camada delgada (pág. 51) e, todas as que mostravam conter flavonóis foram, então, sujeitas a cromatografia preparativa, a fim de se completar o isolamento das substâncias.

Para esta cromatografia utilizamos as seguintes condições:

a) - 60 g de celulose microcristalina Avicel artº. 2330 da Merck foram agitadas com 180 ml de água destilada até se obter suspensão homogénea. Com esta suspensão preparamos placas de 0,30 mm de espessura que eram, depois, secas à temperatura ambiente;

b) - as câmaras utilizadas tinham 23×23×7 cm e eram previamente saturadas durante 24 horas com os desenvolventes;

c) - os desenvolventes utilizados no isolamento das substânicas foram:

- Butanol-ácido acético-água (6:1:2) (que designamos pelas iniciais B.A.A.).

- Solução a 60% de ácido acético.
- Solução a 15% de ácido acético.
- Água destilada.

Após o desenvolvimento, as placas eram colocadas em local bem ventilado e ao abrigo da luz, até completa eliminação dos desenvolventes.

As placas eram depois expostas à luz U.V. de 366 nm e as zonas que revelavam fluorescência eram destacadas. A celulose destacada era transferida para um funil onde se tinha colocado, previamente, um pouco de celulose própria para cromatografia em coluna e, depois, lavada com metanol, até que o filtrado desse reacção negativa com solução de hidróxido de sódio.

Esta solução metanólica era, de seguida, sujeita a cromatografia analítica e no caso de revelar ainda mais que uma mancha era sujeita a nova cromatografia preparativa, no mesmo ou noutro desenvolvente, tantas vezes quantas as necessárias até obtermos um produto perfeitamente isolado.

2.5. - CROMATOGRAFIA ANALÍTICA

A cromatografia analítica foi executada nas condições abaixo descritas e utilizada para:

a) - verificar o estado de pureza das substâncias provenientes da cromatografia preparativa;

b) - fazer o ensaio das substâncias isoladas, em prova cruzada, com substâncias padrão;

c) - fazer a determinação dos valores de Rf das substâncias já isoladas, em diversos desenvolventes.

2.5.1. - Cromatografia de Flavonóides (1,2)

SUPORTES:

a) - Placas de celulose com 0,1 mm de espessura, artº. 5552 da Merck.

b) - Placas de poliamida com 0,15 mm de espessura, artº. 5555 da Merck.

DESENVOLVENTES:

a) - Água destilada.

b) - Butanol-ácido acético-água (6:1:2).

c) - Solução de ácido acético a 15%.

d) - Solução de ácido acético a 60%.

e) - Fenol-água (3:1).

f) - Ácido acético-água-ácido clorídrico (30:10:3). (desenvolvente de Forestal)

g) - Benzeno-etilmetilcetona-metanol (4:3:3).

h) - Água-etanol-acetilacetona (4:2:1) (desenvolvente de Egger)

REVELADORES:

Para a visualização das manchas dos flavonóides utilizamos a observação à luz U.V. de 366 nm antes e após a aplicação de:

a) - Vapores de uma solução concentrada de amónia.

b) - Solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%.

c) - Solução metanólica de etanolamina-ácido difenilbórico a 1%, indicada pela abreviatura N.A (Naturstoffreagenz A).

PADRÕES UTILIZADOS:

- Isoquercetrina (3-glucosilquercetina) - artº. 1119 S.
- 3-Arabinosilquercetina - artº. 1072 .
- Hiperósido (3-galactosilquercetina) - artº. 1027 S.
- Quercetrina (3-ramnosilquercetina) - artº. 1031.
- Rutina (3-ramnoglucosilquercetina) - artº. 0080.
- Quercetina - artº. 0060.

(padrões fornecidos pela firma Sarsynthese).

2.5.2. - CROMATOGRAFIA DE AÇÚCARES (3)

SUPORTES:

a) - Placas de celulose com 0,1 mm de espessura, artº. 5552 da Merck.

b) - Placas de sílica com 0,2 mm de espessura, artº. 5553 da Merck.

c) - Placas de sílica com 0,2 mm de espessura, artº. 5553 da Merck, mergulhadas durante 3 minutos numa solução 0,02M de acetato de sódio e secas, seguidamente, em estufa a 50°C durante 1 hora.

DESENVOLVENTES:

I - Acetona-água (9:1)
(para placas de sílica impregnadas de acetato de sódio).

II - Piridina-acetato de etilo-ácido acético-água (36:36:7:2)
(para placas de celulose).

III - Acetona-água-clorofórmio-metanol (75:5:10:10)
(para placas de sílica impregnadas de acetato de sódio).

IV - Acetato de etilo - [isopropanol-água (2:1)] (65:35)
(para placas de sílica).

V - Butanol-ácido acético-água (3:1:1)
(para placas de celulose).

VI - Butanol-ácido acético-água (2:1:1)
(para placas de sílica).

REVELADORES:

a) - Ftalato de p-anisidina:

- solução 0,1M de p-anisidina e de ácido ftálico preparada em etanol a 96°.
(Revelador usado para placas de celulose).

b) - Anisaldeido-ácido sulfúrico:

- 50 ml de ácido acético foram adicionados de 0,5 ml de anisaldeido e, seguidamente, de 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Esta mistura foi preparada no momento do emprego.
(Revelador usado para placas de sílica).

c) - Naftoresorcinol-ácido sulfúrico:

- o reagente é constituído pela mistura, preparada no momento do emprego, de partes iguais das seguintes soluções:

- solução etanólica de naftoresorcinol a 2% e ácido sulfúrico a 20%.
(Revelador usado para placas de sílica impregnadas de acetato de sódio).

Em todos os casos os cromatogramas, após terem sido aspergidos com os reveladores, foram aquecidos na estufa a cerca de 100°C, durante 5-10 minutos.

A vantagem da utilização destes reveladores reside no facto de provocarem o aparecimento de cores diferentes conforme o tamanho de cadeia do açúcar presente.

As cores por nós obtidas com estes reagentes para os diferentes tipos de açúcares foram as registadas no QUADRO XIII.

Q U A D R O XIII

COLORAÇÕES OBSERVADAS COM OS DIVERSOS AÇÚCARES, APÓS UTILIZAÇÃO DOS REVELADORES INDICADOS

REVELADOR	CLASSE DE AÇÚCAR			
	RAMNOSE	PENTOSES	HEXOSES	AC.URÓNICOS
Ftalato de p-anisidina	amarelo esverdeado	vermelho violáceo	verde amarelado	castanho
Anisaldeido-ác. sulfúrico	verde escuro	castanho violáceo	azul escuro	castanho claro
Naftoresorcinol-ác. sulfúrico	verde amarelado	azul acinzentado	castanho violáceto (a) castanho claro (b)	azul escuro

(a) - coloração obtida para a glucose.

(b) - coloração obtida para a galactose.

PADRÕES:

L - (+) - Ramnose, artº. 4736 da Merck

D - (+) - Xilose, artº. 8692 da Merck

D - (-) - Arabinose, artº.1494 da Merck

D - (+) - Glucose, artº. 8342 da Merck

D - (+) - Galactose, artº. 4052 da Mreck

Ácido D-galacturónico, artº. G - 2125 da Sigma

D - Glucuronolactona, artº. G - 8875 da Sigma.

O ácido glucurónico, que não foi possível obter no mercado, foi preparado aquecendo uma solução aquosa de glucuronolactona, a 100°C, durante duas horas (4). Resultou assim uma solução que continha, em equilíbrio, as duas formas, ácida e lactónica, solução essa que foi utilizada como padrão.

No QUADRO XIV estão inscritos os valores de Rf obtidos com os açúcares-padrão desenvolvidos nas condições experimentais atrás indicadas.

Q U A D R O XIV

VALORES DE Rf × 100 OBTIDOS PARA OS AÇÚCARES-PADRÃO EM DIFERENTES DESENVOLVENTES

Desenvolventes (a)	Ramnose	Xilose	Arabinose	Glucose	Galactose	Ác.galacturónico	Ac.glucurónico	Glucurono lactona
I	77	65	53	48	38	05	15	87
II	64	52	45	41	35	13	16	79
III	62	40	27	13	12	02	03	78
IV	46	32	20	14	13	01	05	67
V	45	32	28	24	20	18	20	39
VI	58	52	46	45	43	35	34	58

(a) - Composição dos desenvolventes foi indicada nas páginas 53-54.

Conforme se pode apreciar neste quadro, o desenvolvente que melhores resultados ofereceu para a separação dos pares de isómeros glucose/galactose e ácido glucurónico/ácido galacturónico foi o desenvolvente I [acetona-água (9:1)] , com o qual foi possível obter duas manchas perfeitamente distintas para cada par daqueles isómeros.

Para a resolução do par ácido glucurónico/ácido galacturónico conseguimos ainda melhores resultados com o desenvolvente acetona-água (8:2) onde obtivemos os seguintes valores de Rf :

ácido glucurónico: 0,56

ácido galacturónico: 0,23

Neste desenvolvente a forma lactónica situa-se a Rf = 0,91.

2.6. - ESPECTROFOTOMETRIA NO I.V.

Os espectros na região de U.V. foram registados com as substâncias dispersas em brometo de potássio na concentração de 1% e utilizando um aparelho PERKIN-ELMER, modelo 257.

2.7. - ESPECTROFOTOMETRIA NO U.V.-VISÍVEL

Para a obtenção dos espectros de U.V.-visível utilizamos um aparelho VARIAN, série 634, ou HITACHI 150-20, munidos de tinas de quartzo com 1 cm de espessura.

Os espectros foram obtidos a partir de soluções feitas em metanol para espectroscopia, artº. 6002 da Merck, e os reagentes de deslocamento foram preparados conforme indicação de Mabry e Markham (5):

- Solução de metóxido de sódio: solução a 2,5% de sódio metálico, recentemente cortado, em metanol espectroscópico;

- Solução de cloreto de alumínio: solução a 5% de cloreto de alumínio anidro, em metanol espectroscópico;

- Ácido clorídrico: solução de 50 ml de ácido clorídrico concentrado em 100 ml de água destilada;

- Acetato de sódio: foi usado o acetato de sódio anidro suprapur, artº. 6264 da Merck;

- Ácido bórico: foi usado ácido bórico suprapur, artº. 765 da Merck.

A utilização destes reagentes foi feita, segundo as indicações dos mesmos autores (5):

- Espectro em MeOH + NaOMe:

Foi registado imediatamente após a adição de III gotas da solução de metóxido de sódio à solução contida na tina, e que serviu para o registo de espectro em metanol. Decorridos 5 minutos, o espectro era registado novamente, para apreciar qualquer alteração havida.

- Espectro em MeOH + $AlCl_3$:

Foi registado imediatamente após a adição de VI gotas da solução de cloreto de alumínio à solução metanólica de flavonóide já contida na tina.

- Espectro em MeOH + $AlCl_3$ + HCl:

Foi registado imediatamente após a adição de III gotas da solução de ácido clorídrico à solução contida na tina e que serviu para fazer o registo de espectro em presença de cloreto de alumínio.

- Espectro de MeOH + NaOAC:

A solução metanólica do flavonóide, colocada na tina, era saturada com acetato de sódio anidro. A esta solução era adicionado um pouco mais de acetato de sódio, de modo que se depositasse no fundo da tina uma camada de cerca de 2 mm. O espectro era registado de seguida.

- Espectro em MeOH + NaOAc + H_3BO_3

À solução que serviu para a obtenção do espectro anterior, adicionou-se ácido bórico, até que este começasse a depositaa e o espectro era registado de seguida.

2.8. - ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os espectros de massa foram obtidos pela técnica de impacto electrónico com um espectrómetro HITACHI PERKIN-ELMER, modelo RMU-6M.

2.9. - ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrómetro VARIAN XL-200, de 200 MHz, para os de ressonância protónica, e de 50,3 MHz para os de ressonância de ^{13}C.

Para a obtenção dos espectros usou-se o tetrametilsilano como padrão interno; os deslocamentos químicos foram registados em p.p.m.(δ) e as constantes de acopolamento em Hz.

Para a obtenção do espectro da substância P_4 , reproduzido na figura 2.6 , procedeu-se à obtenção do respectivo derivado sililado, segundo a técnica descrita por Mabry e Markham (6), e o solvente foi, neste caso, o clorofórmio deuterado. Em todos os outros casos, os espectros foram registados

utilizando as substâncias sem qualquer transformação, e dissolvidas em dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d6 para espectroscopia, artº. 2913 da Merck).

2.10. - HIDRÓLISE ALCALINA

A hidrólise alcalina foi realizada segundo a técnica indicada por Ribéreau-Gayon (7), a qual consiste no seguinte:

- o flavonóide é dissolvido em solução de hidróxido de sódio 2N, deixando-se em contacto durante 4 horas em atmosfera de azoto; ao fim desse tempo a solução é acidificada e agitada com um solvente orgânico, o qual é, depois, separado para ser analisado.

2.11. - HIDRÓLISE ÁCIDA

O processo usado para a hidrólise ácida foi o indicado por Harborne (8), o qual consiste em aquecer a substância, dissolvida numa mistura, em partes iguais, de etanol e HCl 2N, a banho de água, e à temperatura de 100°C.

O decorrer da reacção era controlado por cromatografia analítica, terminando-se o aquecimento quando o produto inicial estivesse completamente hidrolisado, o que demorava cerca de 10-15 minutos.

Após ter-se conseguido a hidrólise total, a solução era arrefecida e agitada com éter etílico, separando-se a fase orgânica para nela se proceder à identificação da genina libertada.

A fase aquosa era, seguidamente, lavada com uma solução clorofórmica a 10% de dimetil-n-octilamina, até eliminação da maior parte do ácido clorídrico, aí se procedendo, depois, à caracterização dos açúcares.

3. - BIBLIOGRAFIA

1. - RIBÉREAU-GAYON, P.: Lés Composés Phénoliques des Végéteaux, Dunod, Paris, 1968, pág. 120-1.

2. - HARBORNE, J.B. e WILLIAMS, C.A.: The Flavonoids, (Editado por Harborne, J.B., Mabry, T.J. e Mabry, H.), Chapman and Hall, London, 1975, pág. 384-7.

3. - LEWIS, B.A. e SMITH, F.: Thin-Layer Chromatography (2ª edição), (Editado por Stahl, E.), Springer-Verlag, Berlin, 1969, pág. 807-34.

4. - The Merck Index, (10ª edição), Merck and Co. Inc., Rahway-U.S.A., 1983, nº 4 329.

5. - MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R.: The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin, 1970, pág. 35-8.

6. - MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 255.

7. - RIBÉREAU-GAYON, P., op. cit., pág. 66.

8. - HARBORNE, J.B.: Phytochemistry, 4, 107-20 (1965).

CAPITULO IV

Resultados e discussão

1 Ensaios preliminares

2 H pulchrum L.

3 H linarifolium Vahl

4 H undulatum Shout

5 H calycinum L.

6 H elodes L.

7 H androsaemum L.

8 H humifusum L.

1. - ENSAIOS PRELIMINARES

Utilizando 2 g de cada uma das espécies em estudo (parte aérea reduzida a pó), fizemos extractos usando, sucessivamente, os seguintes solventes: éter de petróleo, clorofórmio, éter etílico, acetato de etilo e metanol. Foram usados 15 ml de cada solvente e o tempo de maceração em cada um foi de 24 horas.

Como o nosso objectivo era o estudo de flavonóides, ensaiámos a reacção da cianidina sobre cada um dos extractos obtidos, a qual foi executada do seguinte modo:

- os extractos foram levados à secura e o resíduo dissolvido em 5 ml de metanol. Esta solução foi adicionada de 2 ml de água e posta no frigorífico durante 24 horas, ao fim das quais se filtrou, eliminando-se, deste modo, uma grande parte dos corpos gordos e da clorofila. Ao filtrado adicionámos, depois, 1 ml de ácido clorídrico concentrado e 0,1 g de fita de magnésio. Caso se registasse o aparecimento de coloração vermelha, concluía-se que o extracto ensaiado continha flavonóides.

No QUADRO XV apresentamos, para cada solvente utilizado, a côr de extracto obtido, o peso do resíduo desse extracto e o resultado da reacção da cianidina.

Perante estes resultados, escolhemos o metanol como solvente para a extracção subsequente dos flavonóides deste material, excepto no caso de *H. humifusum*, em que utilizamos o acetato de etilo.

QUADRO XV

CARACTERISTICAS DOS EXTRACTOS DE *HYPERICUM* SPS (Ensaios preliminares)

SOLVENTE / ESPÉCIE	ÉTER DE PETRÓLEO			CLOROFÓRMIO			ÉTER ETÍLICO		
	Côr	Peso(mg)	Reacção da Cianidina	Côr	Peso(mg)	Reacção da Cianidina	Côr	Peso(mg)	Reacção da Cianidina
H. androsaemum L.	Verde Amarelado	17,7	Negativa	Verde Escuro	61,9	Negativa	Verde Escuro	73,0	Negativa
H. calycinum L.	Amarela Claro	0,5	Negativa	Verde Acastanhada	61,5	Negativa	Verde Amarelada	20,6	Positiva Fraca
H. elodes L.	Amarela Claro	3,1	Negativa	Castanha Escura	38,0	Negativa	Amarela Acastanhada	29,7	Positiva Fraca
H. undulatum schaut	Amarela Claro	2,3	Negativa	Castanha Esverdeada	41,6	Negativa	Castanha Esverdeada	14,5	Positiva Fraca
H. pulchrum L.	Amarela Claro	2,1	Negativa	Amarela Esverdeada	7,0	Negativa	Amarela Esverdeada	5,0	Negativa
H. linarifolium Vahl	Incolor	0,4	Negativa	Amarela Claro	1,0	Negativa	Amarela Claro	12,0	Negativa
H. humifusum L.	Amarela Esverdeada	5,1	Negativa	Castanha Esverdeada	35,8	Negativa	Verde Acastanhada	18,5	Negativa

.../...

Q U A D R O XV (Continuação)

SOLVENTE / ESPÉCIE	ACETATO DE ETILO			METANOL		
	Côr	Peso(mg)	Reacção da Cianidina	Côr	Peso(mg)	Reacção da Cianidina
H. androsaemum L.	Verde	25,4	Positiva	Verde	71,0	Positiva
H. Calycinum L.	Verde Amarelada	19,7	Positiva	Castanha	79,1	Positiva
H. elodes L.	Amarela Acastanhada	21,2	Positiva Fraca	Amarela Claro	23,9	Positiva
H. undulatum schout	Castanha Esverdeada	16,0	Positiva	Vermelha	37,6	Não Efectuada
H. pulchrum L.	Amarela Esverdeada	10,3	Positiva Fraca	Castanha Avermelhada	25,1	Positiva
H. linarifolium Vahl	Amarela Claro	8,0	Positiva Fraca	Amarela Avermelhada	12,5	Positiva
H. humifusum L.	Verde Acastanhada	18,5	Positiva	Vermelha Forte	93,0	Não Efectuada

2. Estudo de H. pulchrum L.

2. - ESTUDO DE *H. PULCHRUM* L.

2.1. - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

Partindo de 250 g de planta obtivemos um extracto de côr castanha avermelhada preparado pela técnica descrita na pág. 49.

2.2. - CROMATOGRAFIA ANALÍTICA DO EXTRACTO

O extracto obtido foi analisado por cromatografia analítica bidimensional em placa de celulose, utilizando, como primeiro desenvolvente, butanol--ácido acético-água (6:1;2) (B.A.A.) e como segundo desenvolvente uma solução a 15% de ácido acético. Este ensaio foi feito em duplicado.

Depois de secas, as placas foram observadas à luz U.V. de 366 nm e registamos os resultados obtidos; seguidamente, uma das placas foi exposta aos vapores de uma solução concentrada de amónia e registámos as alterações de côr observadas. Após completa eliminação da amónia, por exposição ao ar, uma das placas foi pulverizada com uma solução a 5% de cloreto de alumínio e a outra com uma solução de N.A..

Na Fig. 2.1. está reproduzido o cromatograma obtido e no QUADRO XVI as características das manchas observadas.

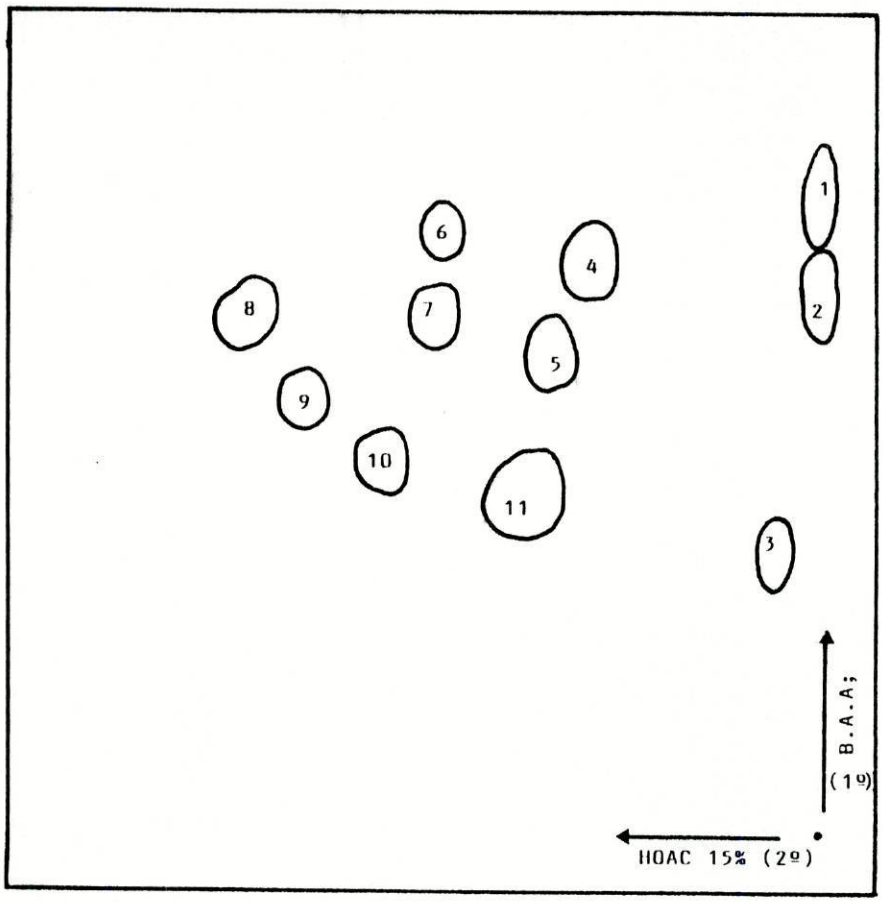


Fig.2.1 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE *H. pulchrum* L.

(B.A.A./HOAc 15 %)

Q U A D R O XVI

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DAS MANCHAS OBSERVADAS NA FIG. 2.1.

MANCHA Nº	COLORAÇÃO					Valor de Rf × 100		Intensidade Relativa
	Luz Visível	Luz U.V. de 366 nm				B.A.A.	HOAC 15%	
	C/NH_3	S/NH_3	C/NH_3	$AlCl_3$	N.A.			
P 1	-	Vermelha	Vermelha	Vermelha	Vermelha	76	0	+
P 2	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	64	0	++
P 3	-	Azul Violeta	Azul Violeta	Azul Violeta	Azul Violeta	33	6	+
P 4	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	70	30	+++
P 5	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	56	34	+++
P 6	-	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	72	48	++
P 7	-	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	63	48	+
P 8	Amarela	Azul Lilás	Verde Amarelada	Amarela Esverdeada	Amarela Esverdeada	63	72	++
P 9	-	Castanha	Castanha	Amarela Fluoresc.	Amarela Esverdeada	53	64	+
P 10	-	Amarela Azulada	Amarela Azulada	Amarela Azulada	Azul Esverdeada	45	36	+
P 11	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Azul Fluoresc.	Amarela Esverdeada	42	36	+++

2.3. - ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

Por aplicação das técnicas descritas no Capº. III, foi possível isolar as substâncias correspondentes às manchas P1, P2, P4, P5, P6, P7, P8 e P11 assinaladas na Fig. 2.1..

2.4. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA P1.

Por evaporação da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa obtivemos uma substância com o aspecto de pó solto, de côr vermelha muito escura, quase negra.

A substância era solúvel em álcool, originando uma solução de côr e fluorescência vermelhas; era muito pouco solúvel em éter etílico e em acetato de etilo, conferindo-lhe, contudo, fluorescência vermelha. Em solução aquosa alcalina tinha côr vermelha e fluorescência verde, o mesmo acontecendo às suas soluções em ácido sulfúrico concentrado.

Estas características, já descritas na pág. 10 , juntamente com o comportamento cromatográfico registado no QUADRO XVI, levaram-nos a pensar que a substância P1 é uma HIPERICINA, substância já anteriormente descrita nesta espécie por Mathis e Ourisson (1).

2.5. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA P2.

Esta substância apresentava-se, após cristalização do metanol, sob a forma de cristais aciculares amarelo esverdeados.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr amarela

com NH_3: côr amarela viva

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr de laranja

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,66
Sol. a 60% de ácido acético	0,33
Ác. acético-água-ác. clorídrico (30:10:3)	0,41

(placa de poliamida)

Benzeno-etilmetilcetona-metanol (4:3:3)	0,20

A substância apresentava as mesmas colorações e valores de Rf que uma amostra de Quercetina padrão e em cromatografia cruzada com aquele composto, nos quatro desenvolventes referidos, originou sempre uma única mancha.

b) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇAO (nm)			
MeOH	255	270 inf	300 inf	370
MeOH+NaOMe	245	302 (dec) (*)		
MeOH+$AlCl_3$	270	302 inf	332	460
MeOH+$AlCl_3$+HCl	265	300 inf	360	428
MeOH+NaOAC	275	330	385	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	260	300	389	

(*) - O espectro apresenta aspecto diferente decorridos 5 minutos após a adição de NaOMe.

Os valores obtidos estão de acordo com os referidos na literatura para a Quercetina (2).

c) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO I.V.

O espectro de I.V. da substância é perfeitamente coincidente com o publicado para a Quercetina (3).

d) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE MASSA

O espectro de massa desta substância foi registado nas seguintes condições:

intensidade de fluxo electrónico: 70 eV.

sensibilidade do detector: 1200 V.

gama de massas: 100

temperatura da câmara de ionização: 180°C

temperatura de aquecimento da amostra: 200°C

velocidade de varrimento: 2 × 3.

filtro: posição 3.

O esquema do espectro obtido está reproduzido na Fig. 2.2. onde foram representados apenas os sinais de intensidade superior a 5% da intensidade do pico base: no QUADRO XVII estão registados os valores de m/e dos sinais obtidos e respectivas intensidades relativas.

Os resultados obtidos estão de acordo com os previstos para a Quercetina, indicando-se no ESQUEMA II a interpretação dos principais picos obtidos.

Q U A D R O XVII

CARACTERÍSTICAS DOS PRINCIPAIS SINAIS OBTIDOS NA FRAGMENTAÇÃO DA SUBSTÂNCIA P2 POR IMPACTO ELECTRÓNICO

VALOR DE m/e	INTENSIDADE RELATIVA	INTERPRETAÇÃO
302	100	M
301	12,6	M-H
286	6,4	
273	6,9	M-CHO
153	10,4	A_1+H
142	6,9	
137	14,7	B_2
128	10,7	
109	5,2	B_2-CO
69	16,4	
63	5,7	
55	6,4	
53	5,9	
51	6,4	
44	9,0	

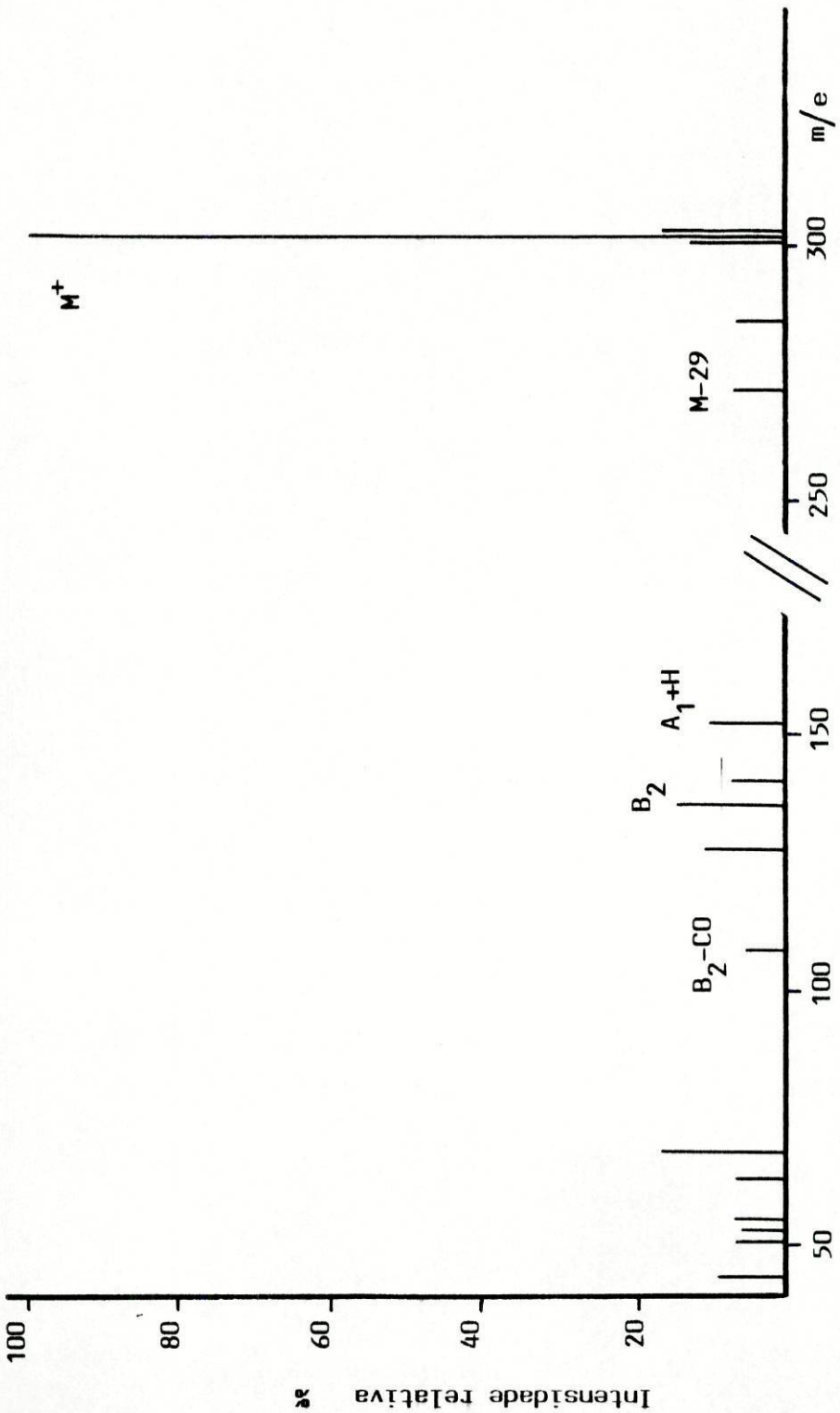
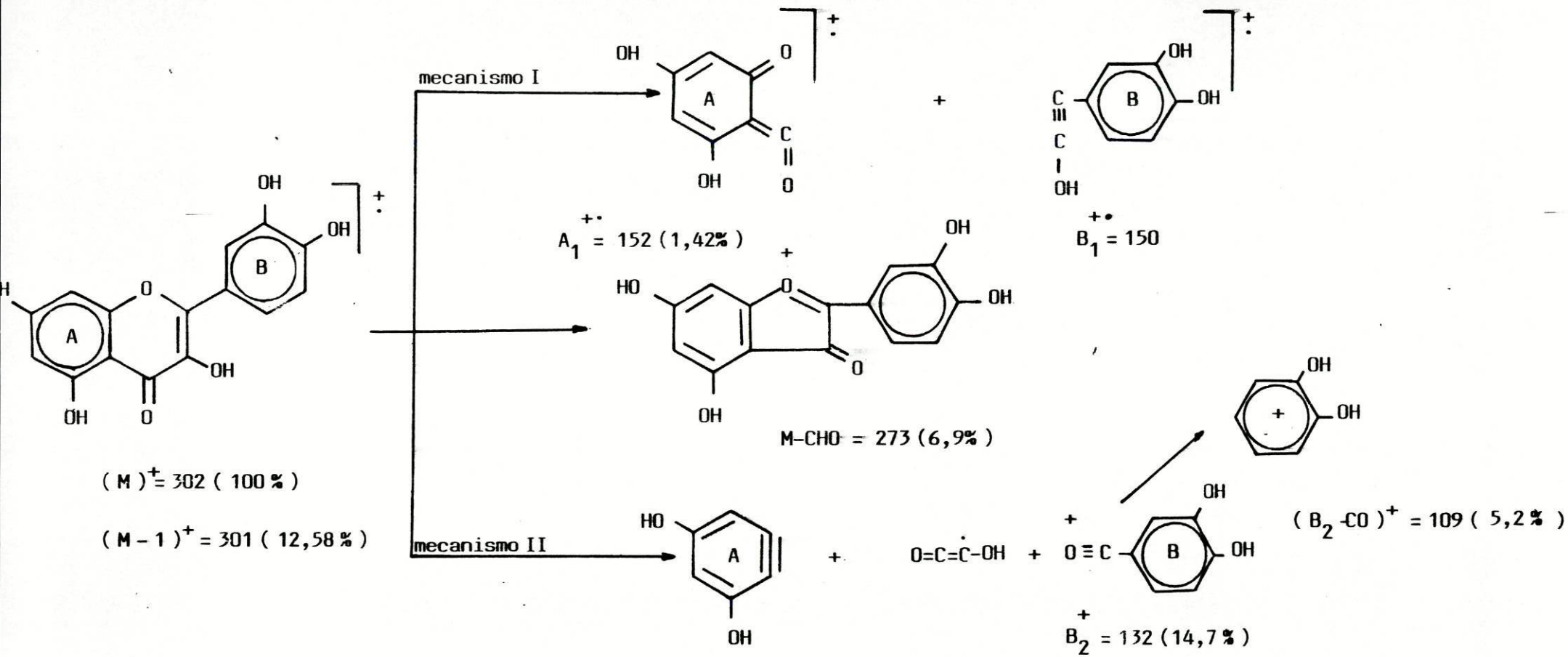


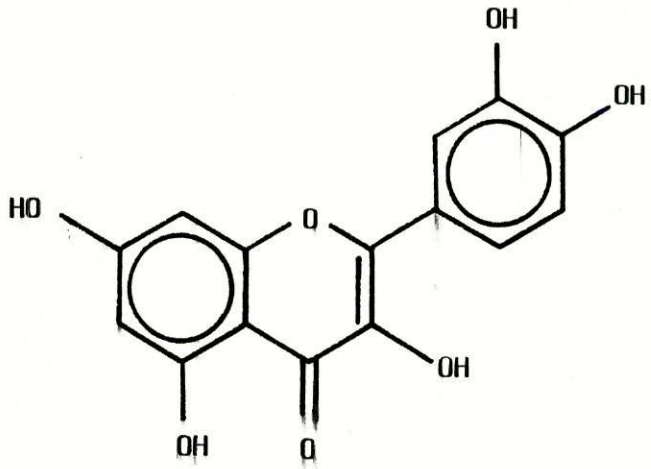
Fig. 2.2 : ESPECTRO DE MASSA DA SUBSTÂNCIA P_2



E S Q U E M A II: Interpretação dos principais sinais obtidos na fragmentação da substância P2

e) - CONCLUSÃO

Em função dos resultados descritos, consideramos que a substância correspondente à mancha P2 originada pelo extracto de *H. pulchrum* é a QUERCETINA (5,7,3',4'-tetraidroxiflavonol):



4.6. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA P4.

Esta substância, após cristalização do metanol apresentava-se sob a forma de cristais de côr amarelo dourado.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A.: côr de laranja

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

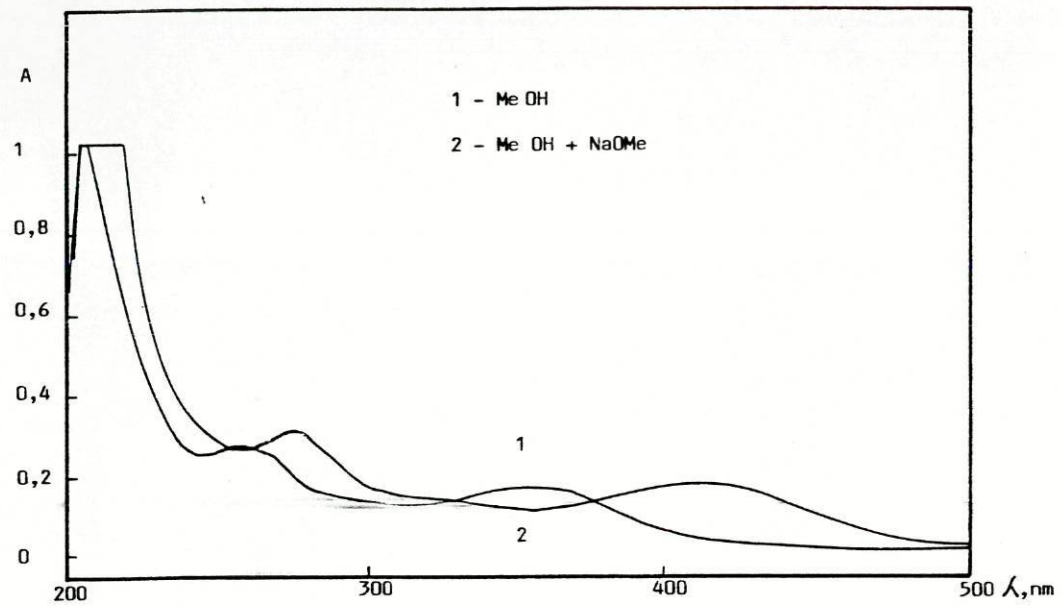
Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,70
Solução a 15% de ácido acético	0,32
Água destilada	0,07
Fenol-água (3:1)	0,60

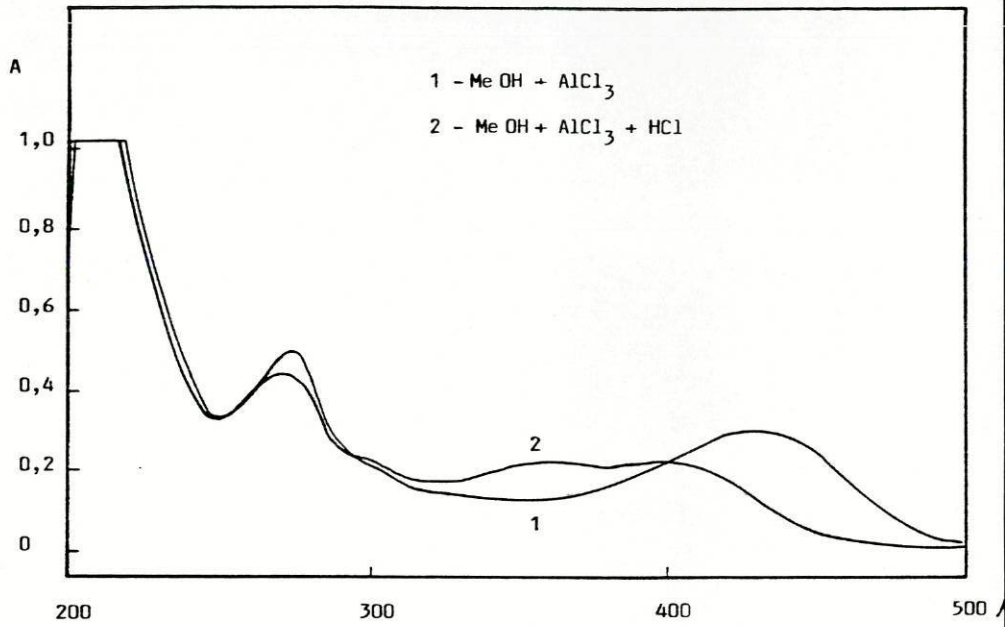
b) CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 2.3. e apresenta as seguintes características:

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	257	267 inf	355	
MeOH+NaOMe	275	320	410 (não dec) (*)	
MeOH+$AlCl_3$	273	300 inf	430	
MeOH+$AlCl_3$+HCl	270	300 inf	360	400
MeOH+NaOAC	273	315	385	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	262	295 inf	375	

(*) - O espectro mantém o mesmo aspecto decorridos 5 minutos após adição do metóxido de sódio.





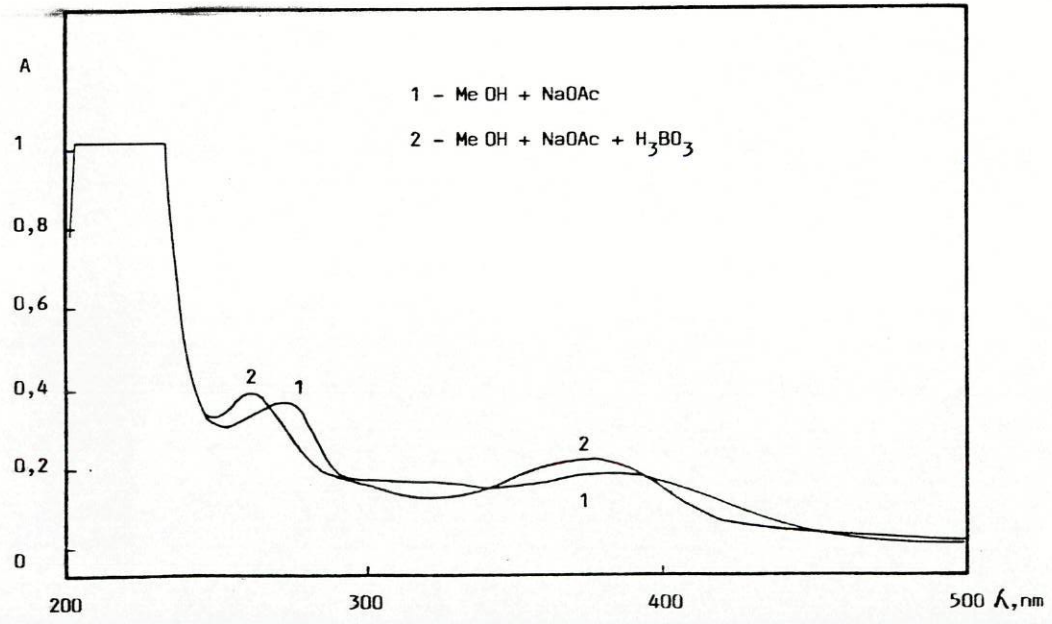


Fig. 2.3 - Espectro U.V.-visível da substância P 4.

c) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO I.V.

O espectro I.V. obtido encontra-se reproduzido na Fig. 2.4..

d) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

Após hidrólise ácida realizada segundo a técnica descrita na pág. 60, a fase orgânica foi analisada, tendo-se detectado uma substância que apresenta todas as características analíticas já descritas para a Quercetina e originando uma única mancha quando submetida à cromatografia cruzada com uma amostra de quercetina padrão.

A fase aquosa, após eliminação do ácido clorídrico, foi concentrada e analisada segundo a técnica indicada na pág. 53. Em todos os desenvolventes formou-se uma única mancha que, após revelação, apresentava as colorações de uma pentose e em cromatografia cruzada com uma amostra de xilose padrão, nos diversos desenvolventes, originava uma única mancha.

e) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE RMN ^1H

O espectro obtido está reproduzido na Fig. 2.5. e confirma estarmos em presença de um derivado da quercetina, uma vez que apresenta na zona aromática os seguintes sinais:

δ = 7,52, dupleto, J = 2, atribuído ao protão em 2'.

δ = 7,48, dupleto de dupletos, J = 2,2 e 7,3, atribuído ao protão em 6'.

δ = 6,82, dupleto, J = 7,4, atribuído ao protão em 5'.

δ = 6,40, dupleto, J = 2,0, atribuído ao protão em 6.

δ = 6,17, dupleto, J = 2,2, atribuído ao protão em 8.

Para além destes sinais, observamos ainda um sinal em δ = 5,53, atri

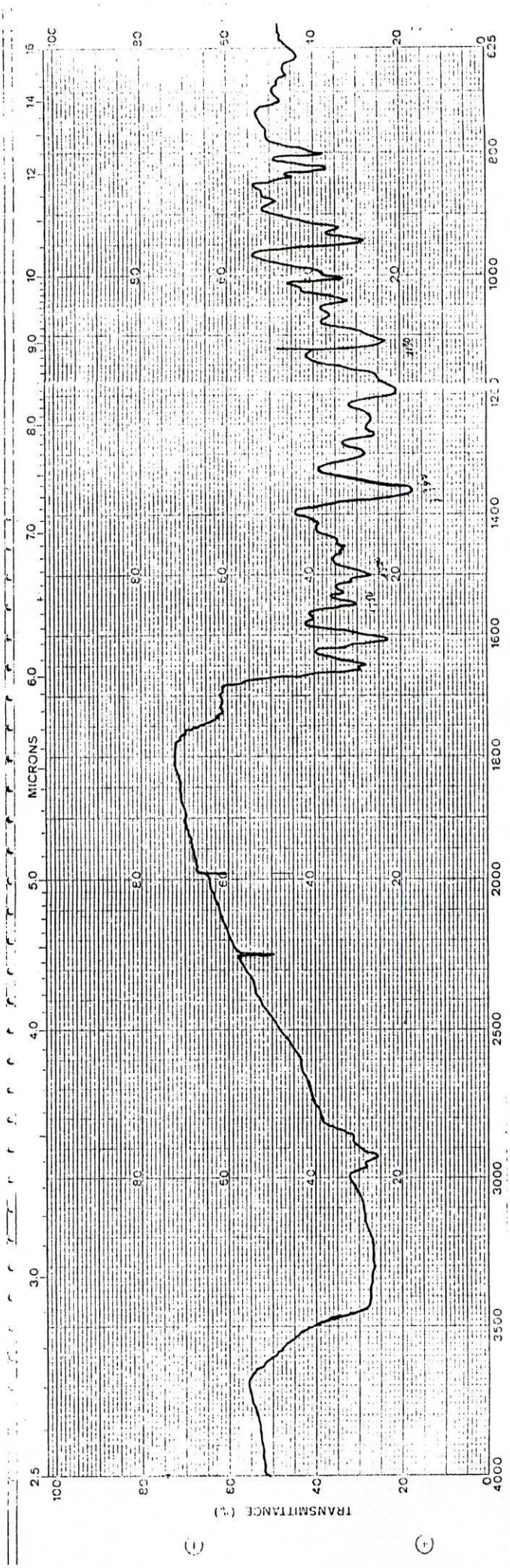


Fig. 2.4 - Espectro I.V. da substância P 4.

buída ao protão 1" (protão do carbono 1 do açúcar) e, depois, um conjunto de sinais entre δ = 3 e δ = 4,5 e que são atribuídos aos restantes protões do resíduo glicídico.

Em ordem a uma melhor apreciação da zona do espectro originado por esta fracção glicídica, foi também realizado um espectro da substância após sililação pela técnica descrita por Mabry (4) e dissolução do derivado obtido em deuteroclorofórmio. Na Fig. 2.6. é reproduzida a zona entre δ = 3 e δ = 5 do espectro obtido, onde se podem observar os cinco sinais atribuídos aos cinco protões da xilose.

f) DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A substância em análise é, pois, uma xilosilquercetina e a análise dos diversos resultados revela que se encontram livres os hidroxilos da quercetina nas seguintes posições:

7-OH - revelado pelo desvio batocrómico provocado na banda II do espectro de U.V., de 257 para 273 nm, quando ao metanol se adiciona NaOAC; revelado, ainda, pelo aparecimento de uma banda em 320 nm (embora de fraca intensidade) no espectro de U.V. realizado em presença de NaOHe.

5-OH - revelado pelo desvio batocrómico na banda I do espectro de U.V.-visível, de 355 para 400 nm, quando ao metanol se adiciona AlCl3+HCl; revelado ainda pela coloração amarela fluorescente à luz U.V. de 366 nm, formada nos cromatogramas em placa de celulose e pulverizadas com solução de $AlCl_3$ (pág. 31).

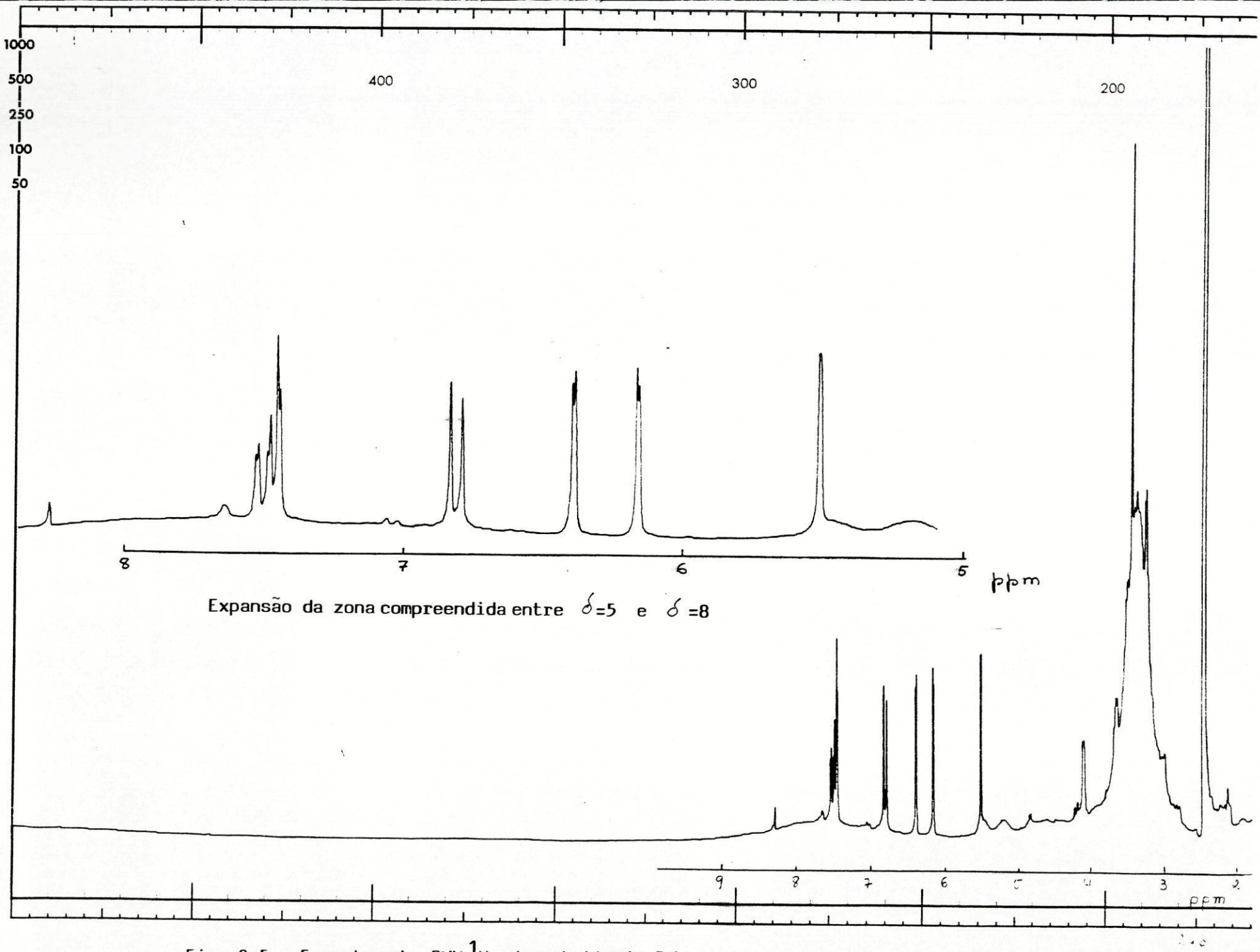


Fig. 2.5 - Espectro de RMN ^{1}H da substância P 4

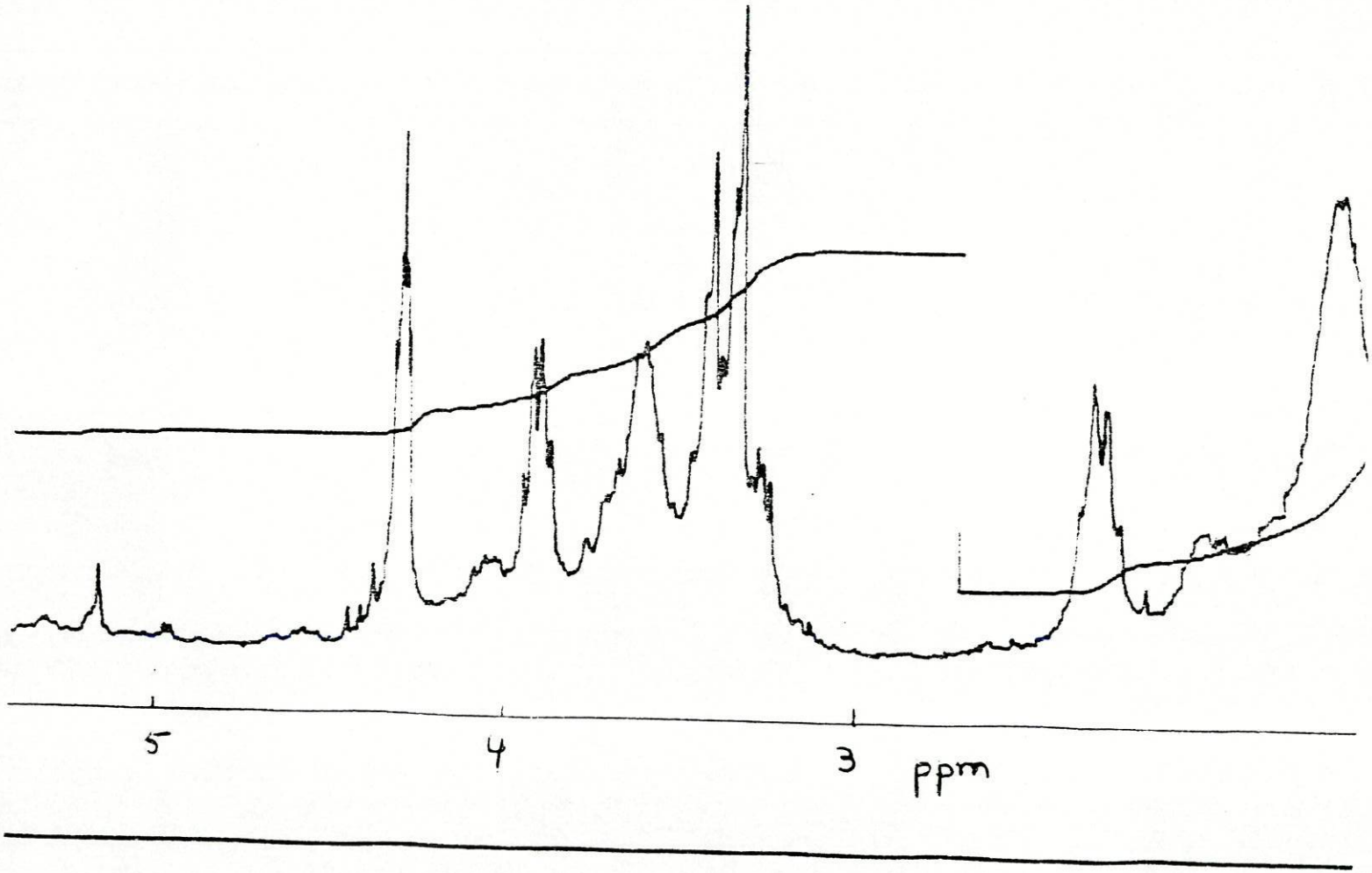


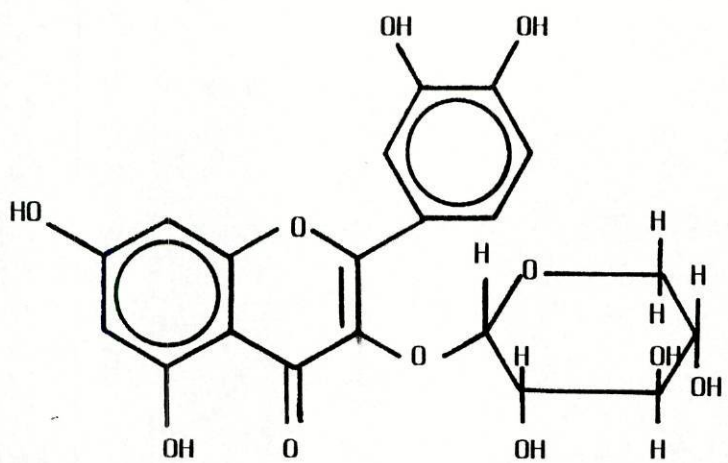
Fig. 2.6 - Espectro de RMN ^{1}H da substância P 4 após sililação
(zona entre $\delta = 3$ e $\delta = 5$)

Orto-hidroxilos no anel B - revelados pelo deslocamento obtido na banda I, de 430 para 400 nm, quando à solução contendo $AlCl_3$ se adiciona HCl (pág. 38); revelados pelo deslocamento da banda I, de 355 para 375 nm, quando à solução metanólica se adiciona $NaOAC+H_3BO_3$, e, ainda, pela coloração laranja obtida à luz U.V. quando os cromatogramas em placa de celulose são pulverizados com solução de N.A. (pág. 31).

A única posição ocupada é a posição 3 da quercetina, o que é revelado pela coloração castanha que passa para amarelo após exposição ao NH_3 (observação à luz U.V. de 366 nm) (pág. 32) e ainda pela localização da banda I em 355 nm quando o espectro de U.V. é registado em metanol (pág. 36).

A análise do espectro de RMN ^1H revela o sinal atribuído ao protão 1 da xilose pouco desdobrado, o que leva a concluir que o açúcar se encontra na forma α(5).

Em face destes resultados, concluímos que a substância P4 é a 3-α-XILOSILQUERCETINA.



4.7. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA P5.

A substância cristalizou após concentração da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa, e apresentava côr amarela.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr de laranja.

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1;2)	0,57
Solução a 15% de ácido acético	0,35
Água destilada	0,09
Fenol-água (3:1)	0,55

A substância apresentava as mesmas colorações e valores de Rf que as de uma amostra de Isoquercetrina padrão (3-glucosilquercetina) e em cromatografia cruzada com esta, nos quatro desenvolventes referidos, originou uma única mancha.

b) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

Os comprimentos de onda dos máximos de absorção do espectro, registado nas condições habituais, são os seguintes:

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	256	270 inf	300 inf	365
MeOH+NaOMe	270	330	412 (não dec)	
MeOH+$AlCl_3$	275	305 inf	330 inf	440
MeOH+$AlCl_3$+HCl	270	300 inf	370	405
MeOH+NaOAC	275	325	380	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	265	300 inf	380	

c) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO I.V.

O espectro obtido é sobreponível ao de uma amostra de Isoquercetrina padrão e está reproduzido na Fig. 2.7..

d) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

Após hidrólise ácida realizada segundo a técnica descrita na pág. 60, a fase orgânica foi levada à secura e o resíduo analisado. A substância obtida apresentava todas as características analíticas já descritas para Quercetina.

A fase aquosa, após eliminação do ácido clorídrico, foi concentrada e submetida a análise cromatográfica segundo técnica descrita nas págs. . Em todas as circunstâncias encontrou-se uma única mancha com os valores de Rf e colorações características da glucose. Em cromatografia cruzada com glucose padrão, continuou a obter-se uma única mancha.

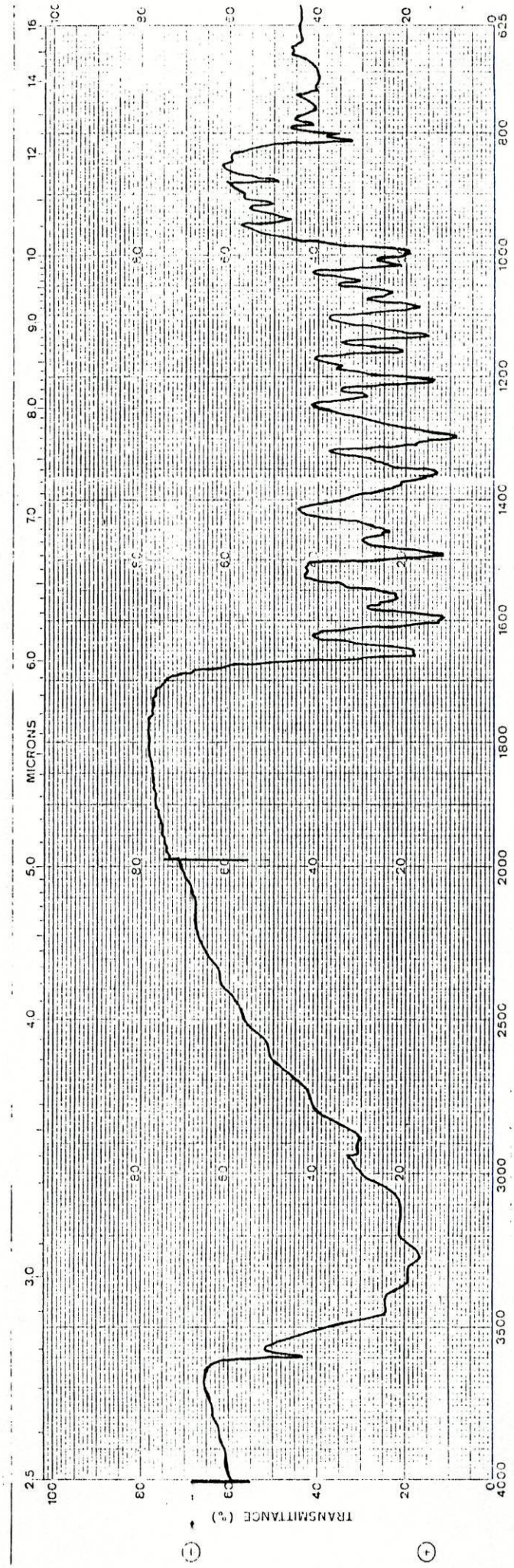
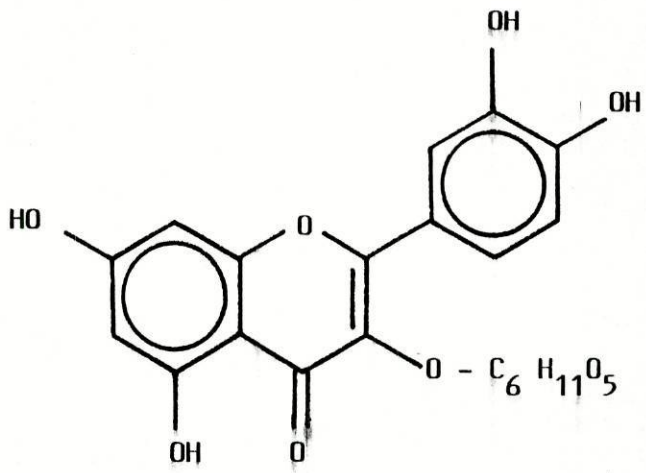


Fig. 2.7 - Espectro I.V. da substância P 5.

e) - CONCLUSÃO

Em face dos resultados obtidos torna-se evidente que a substância P5 é a ISOQUERCETRINA, (3-Glucosil-5,7,3'-4'-tetraidroxiflavonol), composto já descrito para esta espécie (6):



4.8. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA P6.

A substância cristalizou após concentração da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa e apresentava côr amarela.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr de laranja

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,72
Solução a 15% de ácido acético	0,48
Água destilada	0,23
Fenol-água (3:1)	0,60

A substância apresentava as mesmas colorações e valores de Rf que uma amostra de Quercetrina padrão (3-ramnosilquercetina) e em cromatografia cruzada com esta, nos quatro desenvolventes referidos, originou uma única mancha.

b) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

Os comprimentos de onda dos máximos de absorção do espectro registado nas condições habituais são os seguintes:

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	255	265 inf	300 inf	350
MeOH+NaOMe	270	325	392 (não dec)	
MeOH+$AlCl_3$	275	300 inf	330	430
MeOH+$AlCl_3$+HCl	272	300 inf	352	400
MeOH+NaOAC	272	320 inf	370	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	258	300 inf	368	

O espectro obtido é idêntico ao publicado para a Quercetrina (7).

c) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO I.V.

O espectro de I.V. obtido é sobreponível ao publicado na literatura para a Quercetrina (8).

d) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

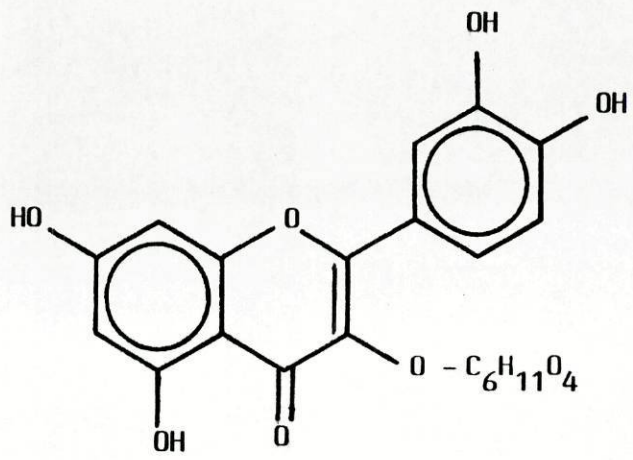
Após hidrólise realizada segundo a técnica descrita na pág. 60 , a fase orgânica foi levada à secura. A substância residual apresentava as características cromatográficas e espectrais de I.V. e U.V.-visível da Quercetina (descritos nas págs. 71-72).

A fase aquosa, após eliminação do ácido clorídrico, foi concentrada e sujeita a análise cromatográfica segundo a técnica descrita nas págs. 53-56 . Em todas as circunstâncias encontrou-se uma única mancha com os valores de Rf e colorações características da Ramnose. Em cromatografia cruzada com ramnose pa

drão continuou a obter-se uma única mancha.

e) - CONCLUSÃO

Em face dos resultados obtidos torna-se evidente que a substância P6 é a QUERCETRINA (3-Ramnosilquercetina):



4.9. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA P7.

Foram feitas diversas tentativas de cristalização, mas sem qualquer resultado. Assim, a solução metanólica foi levada à secura e o resíduo dissolvido em acetato de etilo. Esta solução foi lavada com água destilada, que se regeitou. A solução de acetato de etilo foi levada à secura e o resíduo, dissolvido em metanol. A partir desta solução metanólica foram executados os ensaios cromatográficos, a determinação do espectro de U.V.-visível e o estudo dos produtos de hidrólise.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr de laranja

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1;2)	0,64
Solução a 15% de ácido acético	0,50
Água destilada	0,80

(placa de poliamida)

Água-etanol-acetilacetona (4:2:1)	0,10

b) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 2.8. e as suas características são as seguintes:

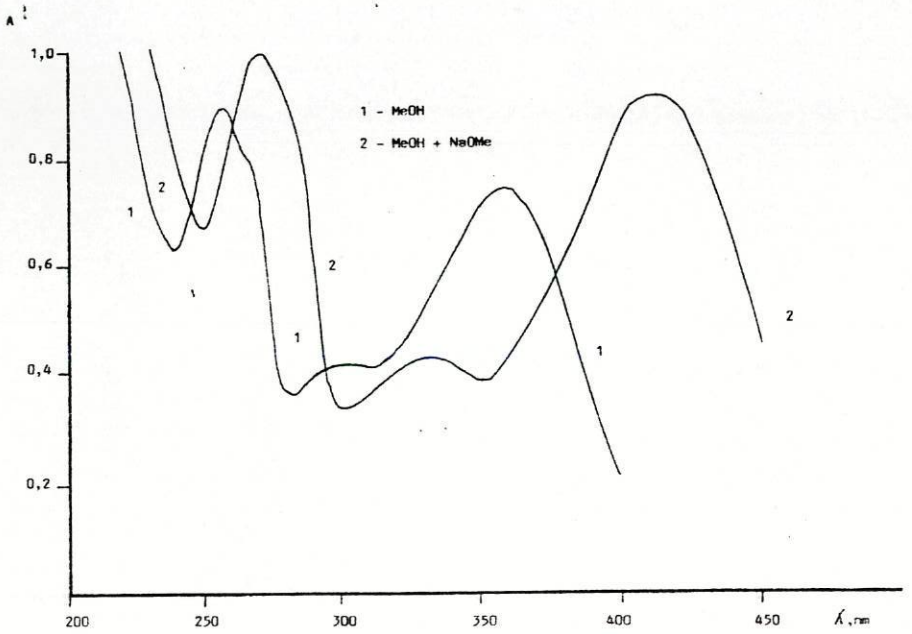
SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)		
MeOH	258	282 inf	350
MeOH+NaOMe	275	330	420 (não dec.)
MeOH+$AlCl_3$	275	300 inf	425
MeOH+$AlCl_3$+HCl	270	360	400
MeOH+NaOAC	273	310 inf	385
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	263	290 inf	380

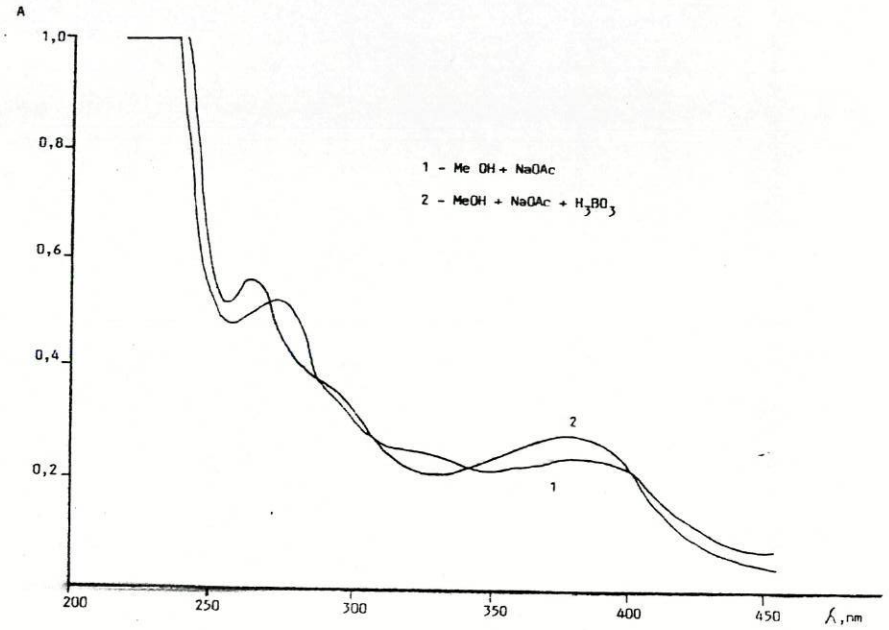
c) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

Após hidrólise ácida efectuada nos moldes habituais, a fase orgânica foi analisada em cromatografia por camada delgada nos desenvolventes citados na pág. 71. Em todas as circunstâncias detectou-se apenas uma mancha com as características de coloração e Rf da Quercetina. A cromatografia cruzada do produto em análise com uma amostra de Quercetina padrão, nos quatro desenvolventes referidos, continuava a apresentar apenas uma mancha.

A fase aquosa, após eliminação do ácido clorídrico, foi concentrada e sujeita a análise cromatográfica nas condições descritas nas págs. 53-56. Em todas as condições encontrou-se uma única mancha que, após revelação, apresentava as características de coloração e Rf descritas para a Glucose. A cromatografia cruzada do produto em análise com uma amostra de glucose padrão continuou a apresentar uma única mancha.

Na fase aquosa fez-se ainda uma pesquisa de ião sulfato, por adição de solução de cloreto bário, que resultou negativa.





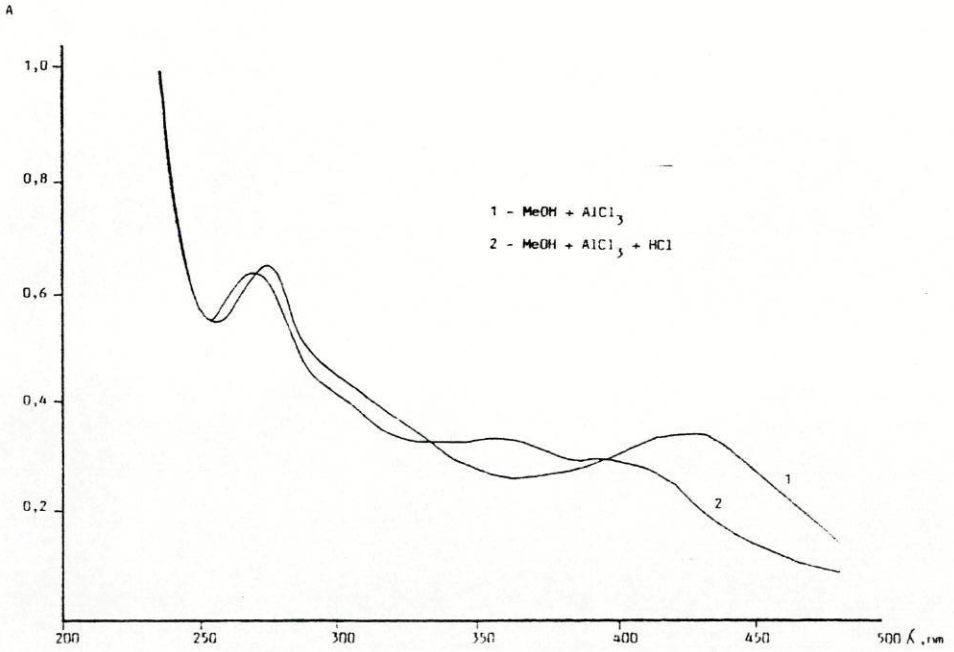


Fig. 2.8 - Espectro de U.V.-visível da substância P 7

d) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ALCALINA

Após hidrólise alcalina realizada segundo a técnica descrita na pág. 60, a solução foi acidificada e agitada com acetato de etilo. O acetato de etilo foi separado e analisado por cromatografia em camada delgada nos desenvolventes citados na pág. 85. Em todas as circunstâncias formou-se uma única mancha que apresentava as características de coloração e valores de Rf de 3-Glucosilquercetina. A cromatografia cruzada do produto em análise com uma amostra de 3-glucosilquercetina padrão, nos desenvolventes referidos, apresentava, ainda, uma única mancha.

e) - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Perante os resultados da hidrólise em meio ácido e alcalino podemos afirmar que a substância P7 é um derivado da Isoquercetrina (3-Glucosilquercetina).

Contudo, a análise do espectro de U.V.-visível da substância revela, que se encontram livres todos os hidróxilos da molécula da quercetina, à excepção do situado em 3, que já determinámos estar ocupado pela glucose. Esta conclusão acenta nos seguintes dados:

7-OH livre: - revelado pela existência de um desvio batocrómico da banda II de 258 para 273 nm, quando à solução metanólica se adiciona acetato de sódio; revelado ainda pela acentuação de uma banda em 330 nm no espectro registado em presença de metóxido de sódio (pág. 37).

5-OH livre: - revelado pelo desvio batocrómico da banda I, de 350 para 400 nm, quando à solução metanólica se adiciona $AlCl_3$ + +HCl; revelado ainda pela coloração amarela fluorescente à luz U.V. de 366 nm quando em placa de cromatografia é pulverizado com solução de $AlCl_3$ (pág. 31).

orto-hidroxilo no anel B: - revelados pelo deslocamento hipsocrómico da banda I, de 425 para 400 nm, quando à solução metanólica contendo $AlCl_3$ se adiciona HCl e se regista de novo o espectro; revelado ainda pelo deslocamento batocrómico da banda I, de 350 para 380 nm quando à solução metanólica se adiciona $NaOAC+H_3BO_3$; e ainda revelado pela coloração laranja à luz U.V. de 366 nm quando em placa de cromatografia é pulverizada com solução de N.A. (pág. 31).

Em face destes resultados podemos concluir que o substituinte que exista na molécula deste composto se lhe encontra ligado através da glucose, possivelmente numa ligação de tipo éster, uma vez que é facilmente hidrolisável em meio alcalino.

Os substituintes que mais frequentemente aparecem ligados às moléculas de flavonóides são os ácidos fenóis, mas esta hipótese é pouco provável, dado que, após hidrólise tanto ácida como alcalina, não detectamos nenhuma mancha de fluorescência azul, característica frequente dos ácidos fenóis; por outro lado, um flavonóide esterificado com um ácido-fenol apresenta em água um valor de Rf normalmente mais baixo do que o respectivo flavonóide não esterificado, o que não é o caso da substância P7, que tem, em água, um valor Rf = 0,80.

A hipótese de presença de um radical sulfato parece-nos também de excluir, dado que a sua pesquisa foi negativa e que a substância P7 apresenta em B.A.A. um valor de Rf bastante mais alto do que seria de esperar para um composto sulfatado.

A reduzida quantidade de substância disponível impediu-nos, no entanto, de levar mais adiante a sua análise, pelo que a substância ficou incompletamente identificada.

4.10. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA P8.

Após concentração da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa a substância cristalizou com aspecto de agulhas brancas.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr azul-lilás

com NH_3: côr verde amarelada

com $AlCl_3$: côr azul-lilás

com N.A. : côr amarela esverdeada

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,64
Solução a 15% de ácido acético	0,72
Água destilada	0,90
Ácido acético – ácido fórmico-água (10:2:5)	0,70
Fenol saturado de água	0,85

A substância apresentava as mesmas características cromatográficas de uma amostra de Ácido clorogénico padrão, e em cromatografia cruzada com aquele composto originava uma única mancha.

b) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)				
MeOH	219	236	243	303	322
MeOH+NaOMe	260	310	375		
MeOH+$AlCl_3$	226	261	314	361	
MeOH+$AlCl_3$+HCl	219	237	245	305	330

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 2.9. e é idêntico ao obtido com uma amostra de Ácido clorogénico padrão.

c) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO I.V.

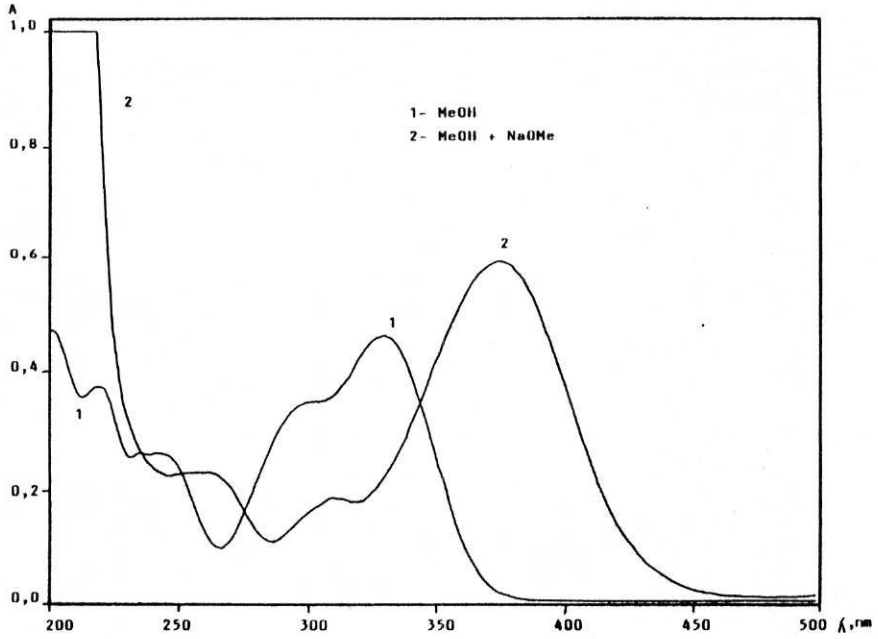
O espectro obtido está reproduzido na Fig. 2.10 e é sobreponível ao obtido com uma amostra de Ácido clorogénico padrão.

d) - COMPORTAMENTO DA SUBSTÂNCIA EM SOLUÇÃO.

A substância P8, quando em solução e exposta à luz, sofre isomerização, facto já referido por Ribéreau (9), para o ácido cinâmico e seus derivados, e que é devida à existência, em equilíbrio, de duas formas, cis e trans.

e) - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Em face dos resultados referidos consideramos a substância P8 identificada como sendo o Ácido 3-cafeilquínico ou ÁCIDO CLOROGÉNICO (IX) substância já diversas vezes identificada em espécies de *Hypericum* (pág. 8).



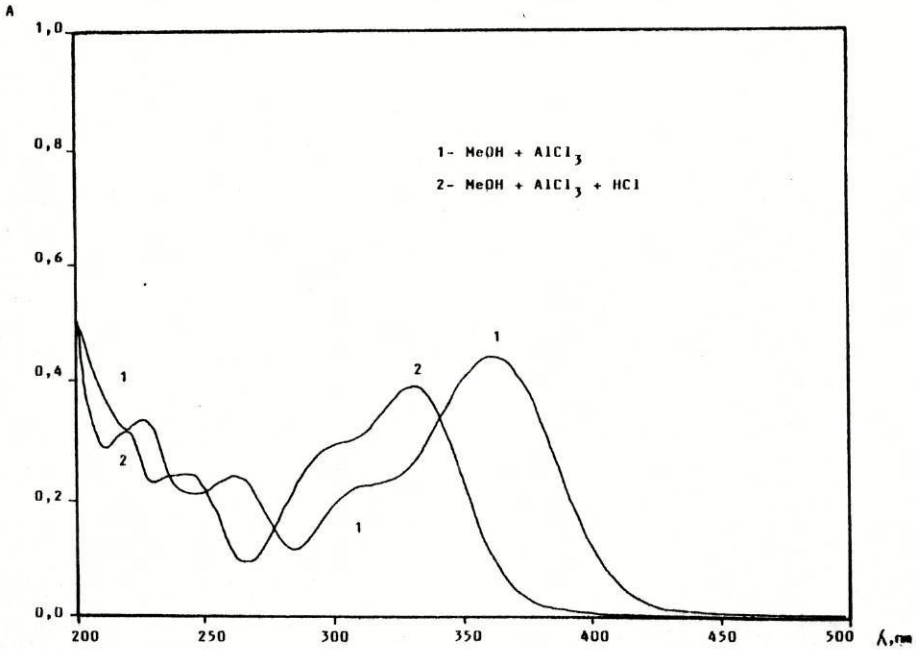


Fig. 2.9 - Espectro de U.V.-visível da substância P 8

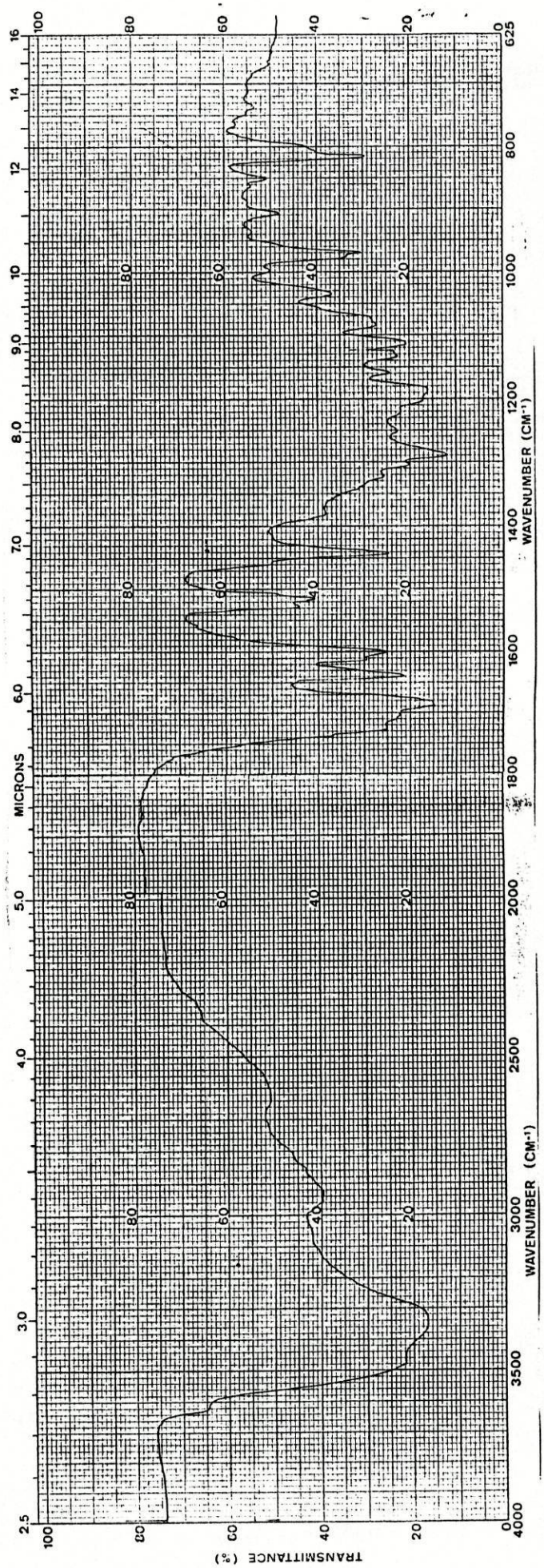
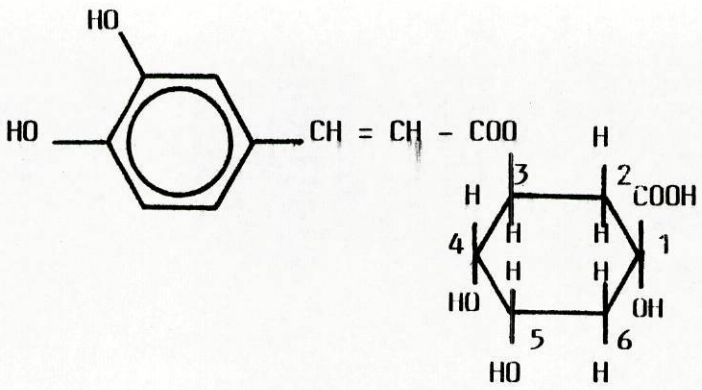


Fig. 2.10 - Espectro de I.V. da substância P 8



(IX)

É de notar que embora existam na natureza outros derivados do ácido quínico, em que o ácido cafeico se encontra ligado às posições 1, 4 ou 5 daquele, todos estes compostos são perfeitamente distinguíveis pelos valores de Rf que apresentam nos desenvolventes usados, conforme refere Scarpatti (10).

4.11. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA P11.

Após concentração da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa, a substância precipitou. Por decantação do sobrenadante obtivemos um pó destacável de coloração amarela avermelhada.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr amarela

com NH_3: côr amarela fluorescente

com $AlCl_3$: côr azul fluorescente

com N.A. : côr amarela esverdeada

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,42
Solução a 15% de ácido acético	0,36
Solução a 60% de ácido acético	0,67
Água destilada	0,14
Ácido acético-água-ácido clorídrico (30:10:3)	0,45

(placa de poliamida)

Água-etanol-acetilacetona (4:2:1)	0,77

b) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

O espectro encontra-se reproduzido na Fig. 2.11. e apresenta as seguintes características:

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	240	257	316	364
MeOH+NaOMe	270	300 inf	390	
MeOH+$AlCl_3$	233	267	354	400
MeOH+$AlCl_3$+HCl	232	266	340	403
MeOH+NaOAC	270	300 inf	388	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	265	320	360	414

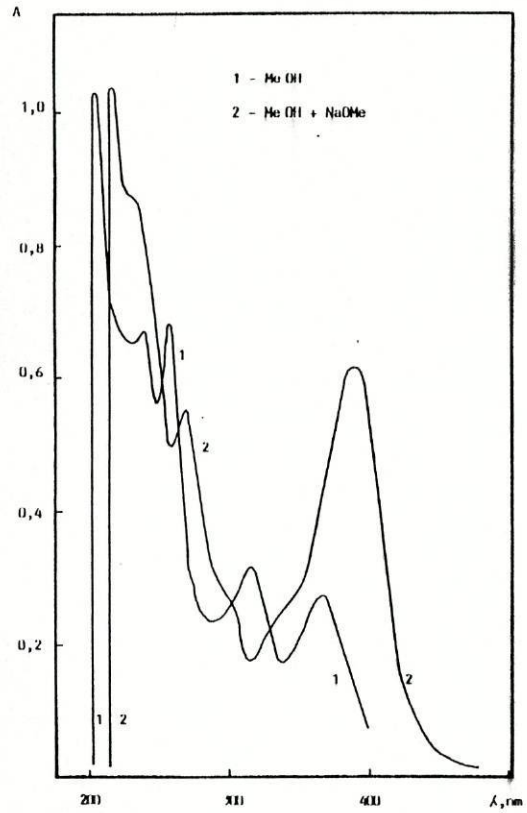
c) - HIDRÓLISE ÁCIDA

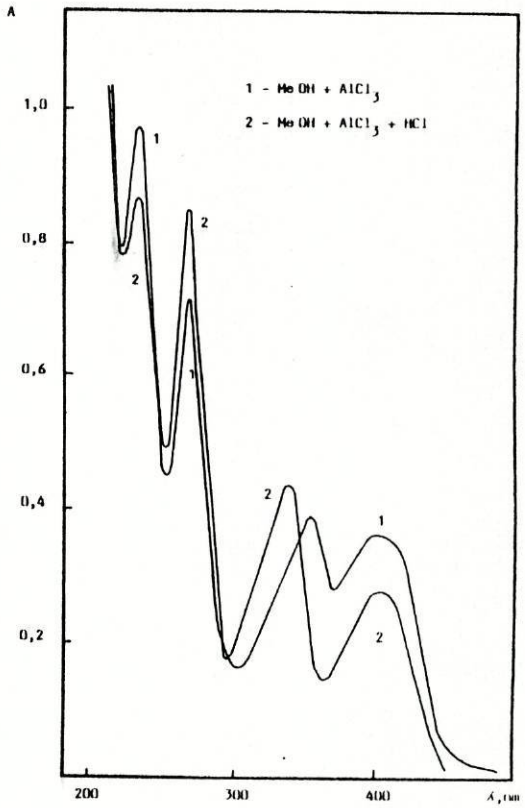
A substância não é hidrolisável nas condições habituais.

d) - CARACTERISTICAS ESPECTRAIS DE RMN ^1H

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 2.12. e apresenta as seguintes características:

- um singleto em δ = 13,66, atribuído a um hidroxilo em posição *peri* relativamente a um carbonilo;
- uma elevação na linha de base entre δ = 9 e δ = 11 e que na integração nos indica a presença de dois hidroxilos;
- três singletos em δ = 7,33, 6,83 e 6,33, que nos indicam a presença de três protões aromáticos não acopolados entre si;
- uma série de sinais entre δ = 2,5 e δ = 5,5 zona onde normalmente aparecem os protões glicídicos, que, no seu conjunto, nos indica a presença de 12 protões.





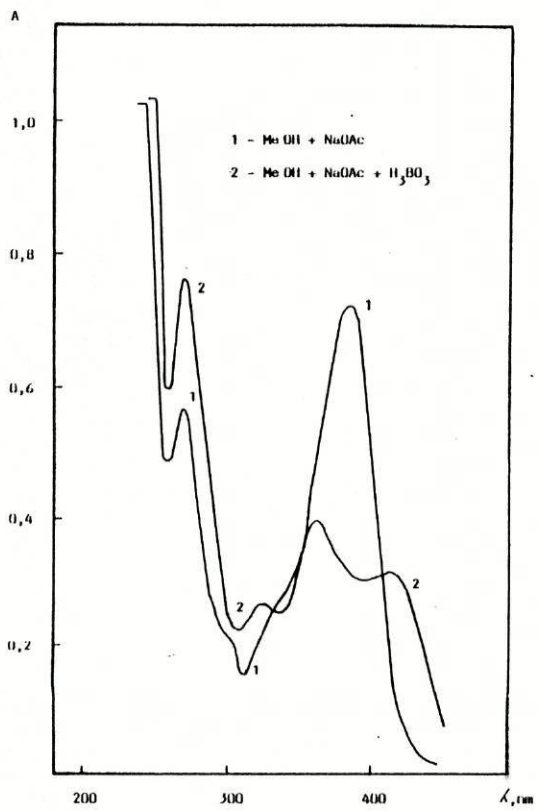
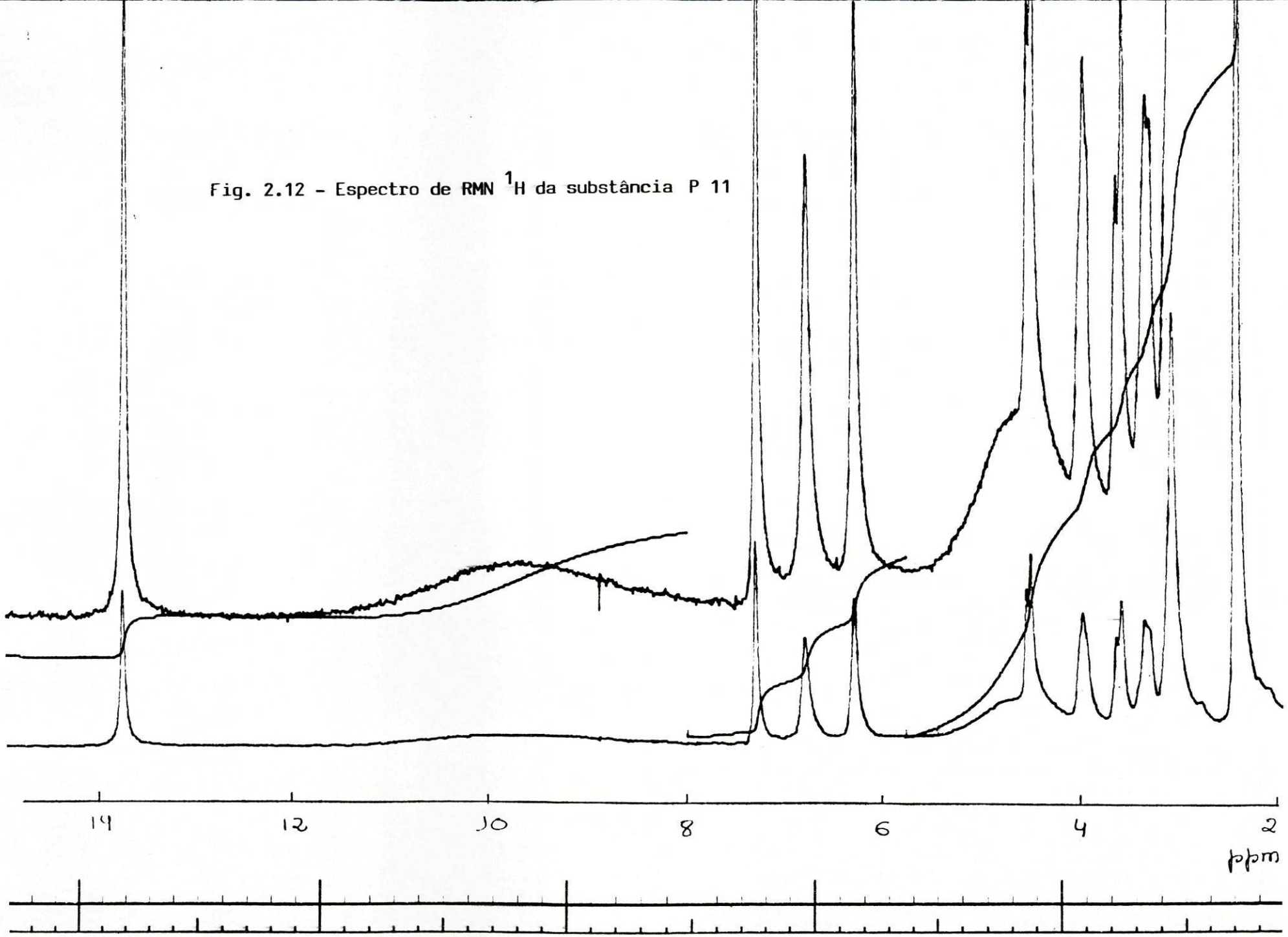


Fig. 2.11 - Espectro de U.V.-visível da substância P 11

Fig. 2.12 - Espectro de RMN ^{1}H da substância P 11



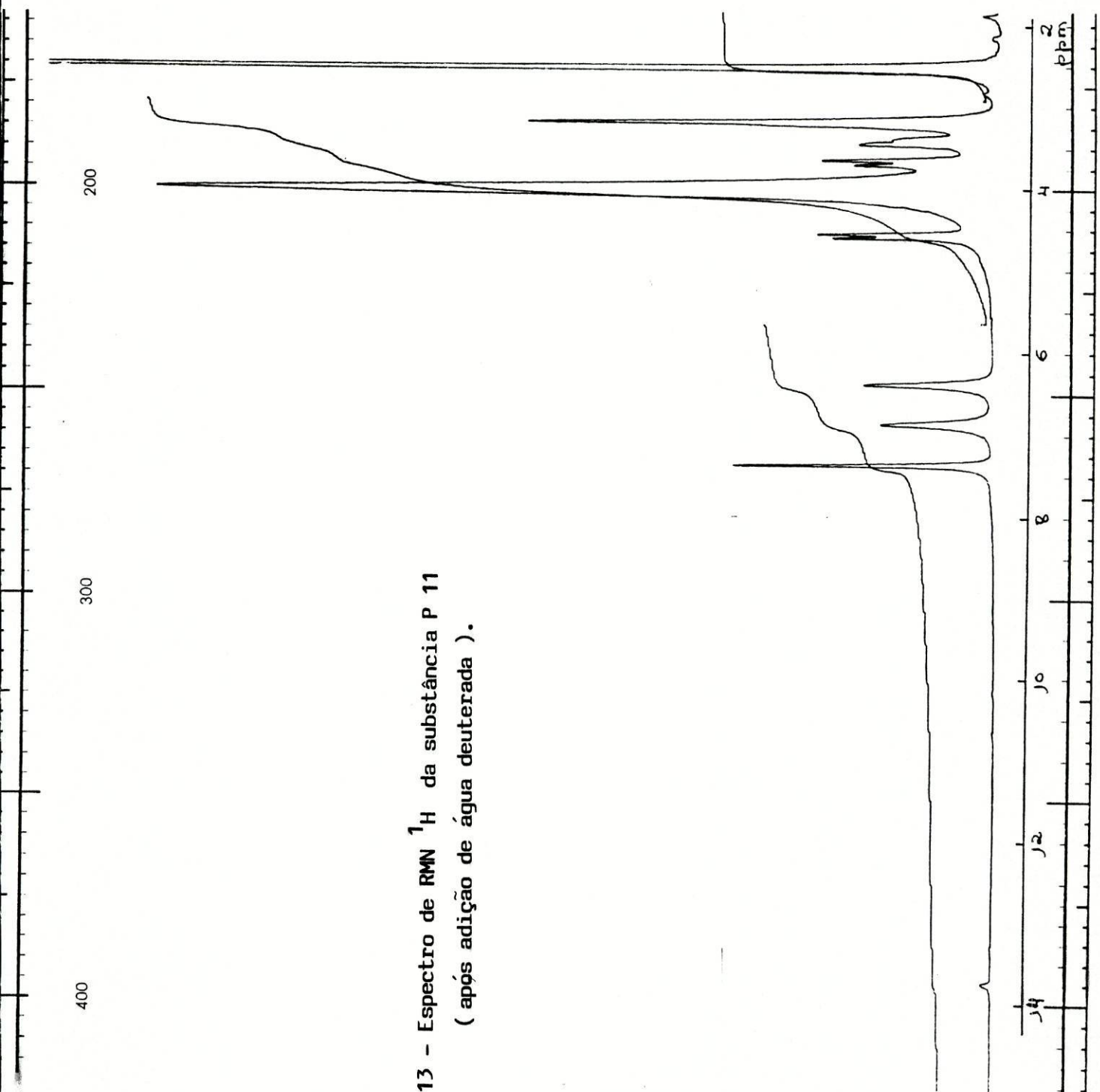


Fig. 2.13 - Espectro de RMN ^{1}H da substância P 11
(após adição de água deuterada).

Por adição de água deuterada à solução da substância em estudo obteve-se um novo espectro, que se encontra reproduzido na Fig. 2.13. Relativamente ao primeiro espectro, nota-se a confluência dos sinais devidos aos hidroxilos num único sinal, mais largo, em δ = 3,94, mantendo-se em evidência os restantes sinais devidos a protões não hidroxílicos.

e) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 2.14 e indica-nos a presença de 19 carbonos na molécula.

O valor dos desvios químicos dos sinais obtidos encontra-se registado no QUADRO XVIII.

Q U A D R O XVIII

VALORES DE δ DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA P11

Valores característicos de carbonos aromáticos oxigenados	Valores característicos de carbonos aromáticos não oxigenados	Valores característicos de carbonos alifáticos oxigenados
163,75	112,35	81,94
161,68	108,56	79,19
156,57	107,77	73,50
154,12	103,15	70,96
151,12	101,94	70,69
144,19	94,00	61,89

Valor característico de um carbono carbonílico; 179,30

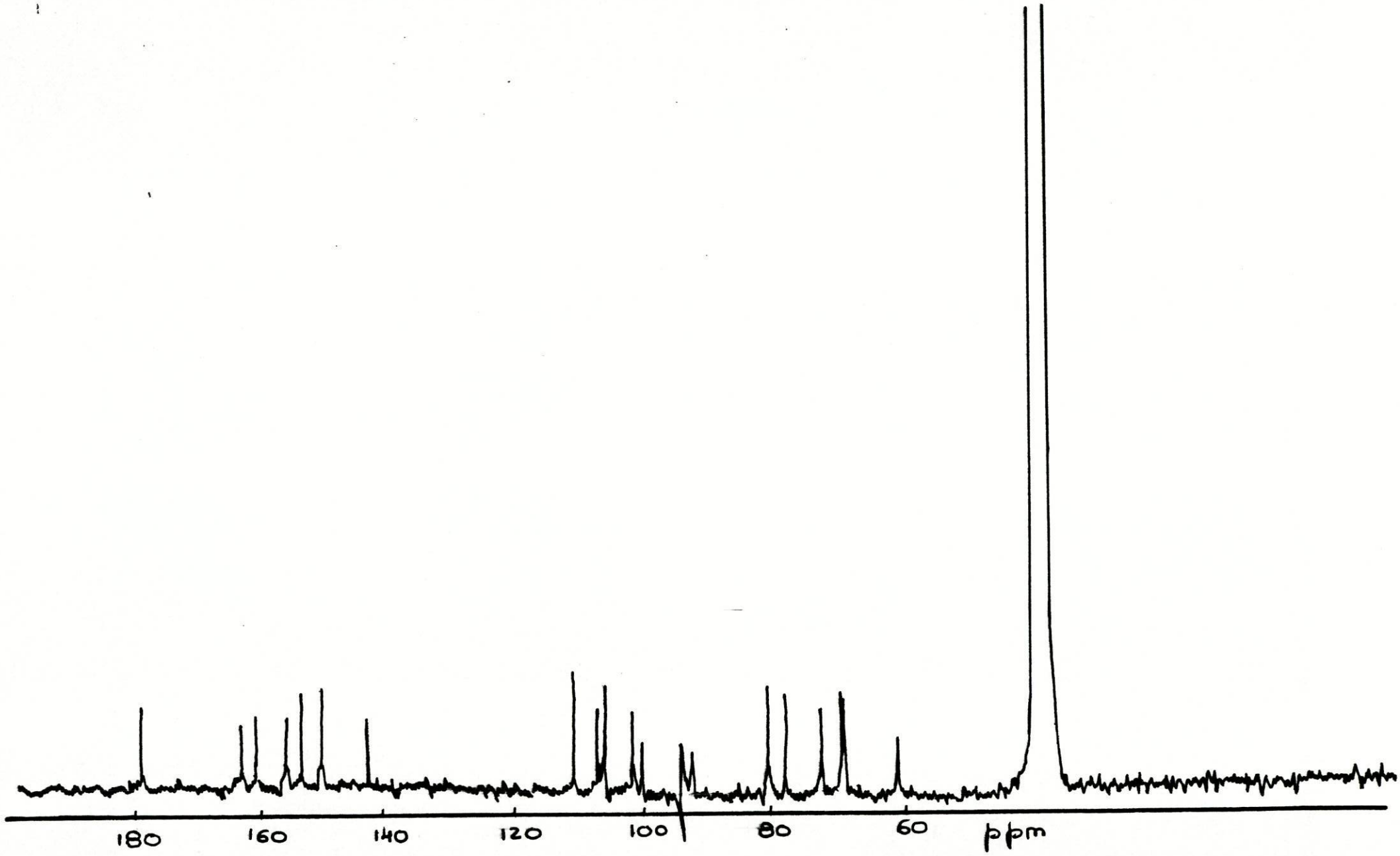


Fig. 2.14 - Espectro de RMN ^{13}C da substância P 11

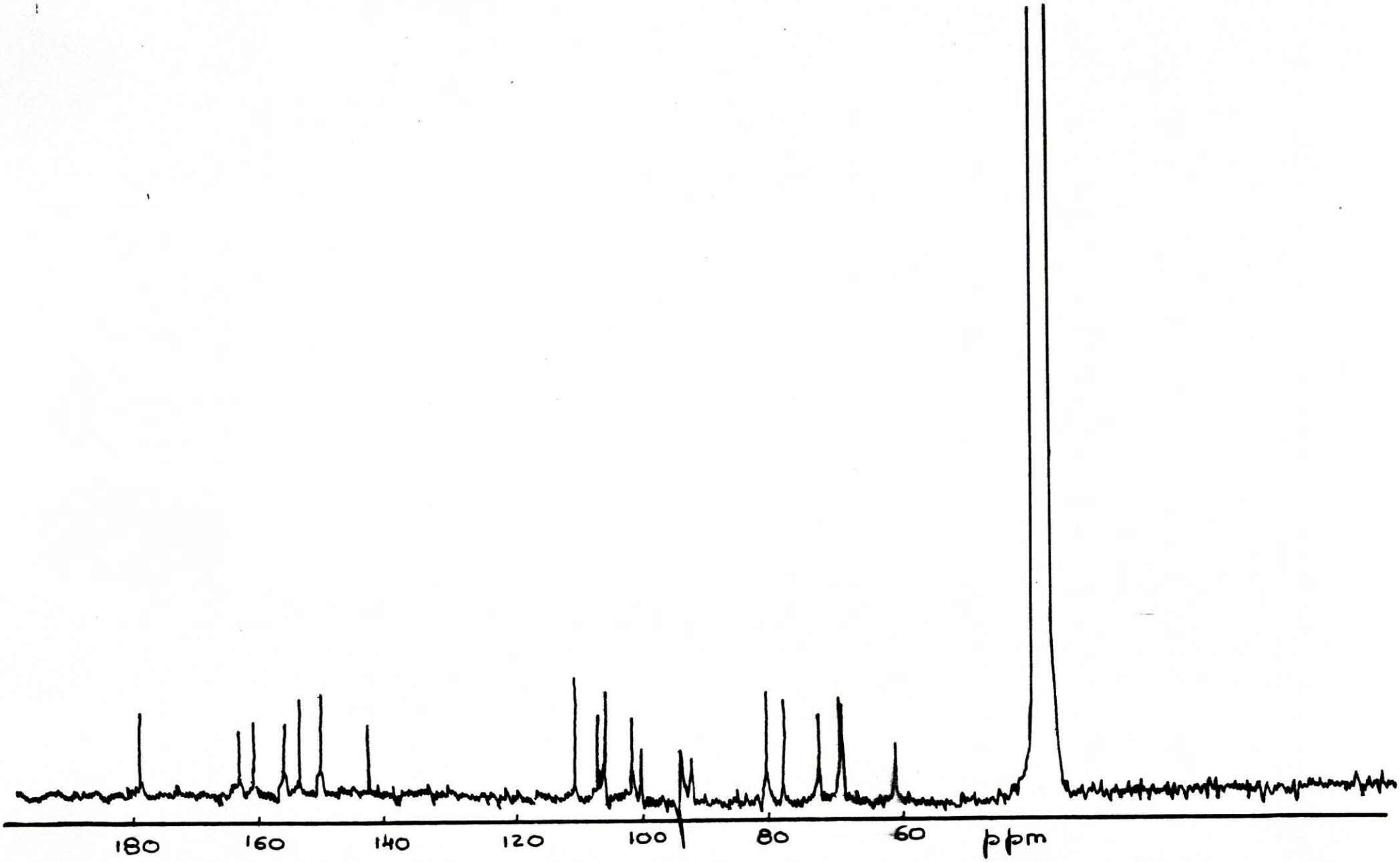


Fig. 2.14 - Espectro de RMN ^{13}C da substância P 11

f) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE MASSA

O espectro de massa da substância em análise foi registado nas seguintes condições:

- intensidade de fluxo electrónico: 70 eV
- sensibilidade do detector: 1200V
- gama de massas: 1000
- temperatura da câmara de ionização: 180°C
- temperatura de aquecimento da amostra: 220°C
- velocidade de varrimento: 2 × 3
- filtro: posição 3.

O espectro obtido está registado na Fig. 2.15. onde constam apenas os sinais de intensidade superior a 15% da intensidade do pico-base, que surge em m/e 368. O ião molecular corresponde a m/e 422 e tem uma intensidade relativa de 5,6%.

g) - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O espectro de U.V. da substância dissolvida em metanol fez-nos admitir a hipótese de estarmos perante uma xantona, dada a existência de 4 máximos de absorção (11). A análise do espectro de U.V. (Fig. 2.11.) em diversos reagentes revela-nos a presença de: (12)

- <u>um hidroxilo em posição 1 ou 8:</u>

  revelado pelo deslocamento batocrómico da banda de 364 nm para 403 nm, quando ao metanol se adiciona $AlCl_3$ + HCl;

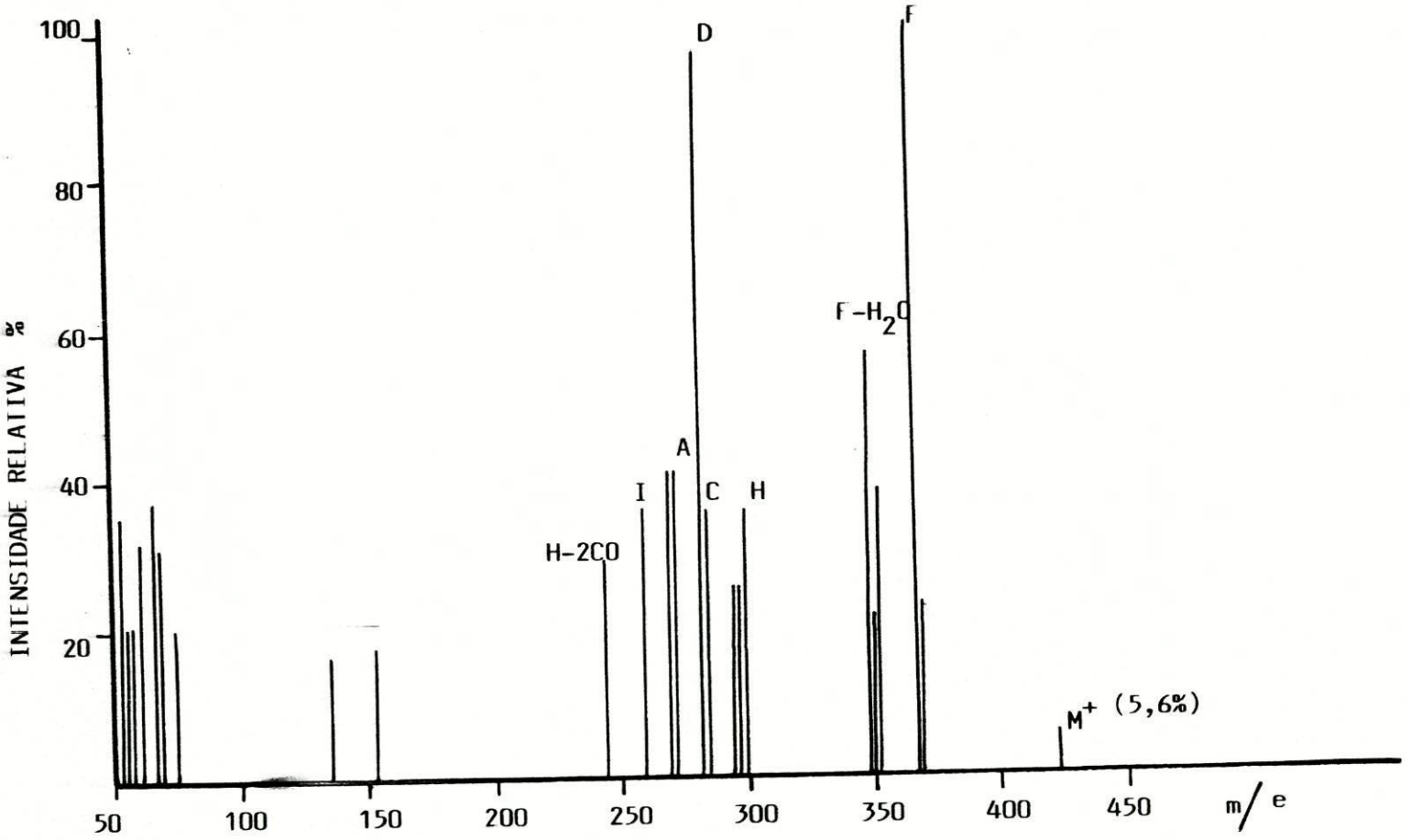


Fig.2.15 : ESPECTRO DE MASSA DA SUBSTÂNCIA P 11

- orto-hidroxilos:

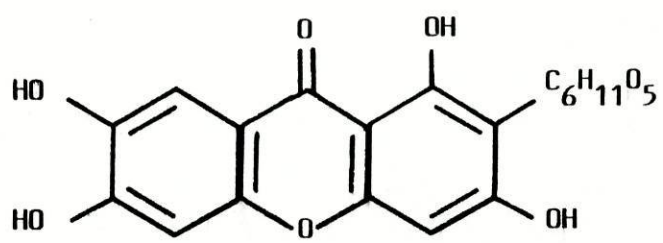
revelados pelo deslocamento da banda de 354 nm para 340 nm, quando à solução que continha $AlCl_3$ se adiciona HCl (pág. 38);

- hidroxilo em posição C_3:

revelado pelo deslocamento da banda de 257 para 270 nm, quando à solução metanólica se adiciona acetato de sódio, uma vez que um hidroxilo na posição C-3 de uma xantona tem comportamento semelhante ao hidroxilo da posição C-7 de um flavonóide (pág. 38)

Os dados analíticos fornecidos pela RMN de protão (Fig. 2.12) confirmam a existência de um hidroxilo em C-1 ou C-8 (δ = 13,66) e revelam a existência de 3 protões aromáticos não acopolados entre si (δ = 7,33, 6,83 e 6,33).

Todos estes dados se coadunam com a estrutura da Mangiferina (X), uma xantona já descrita em espécies deste género (6), (pág. 13).



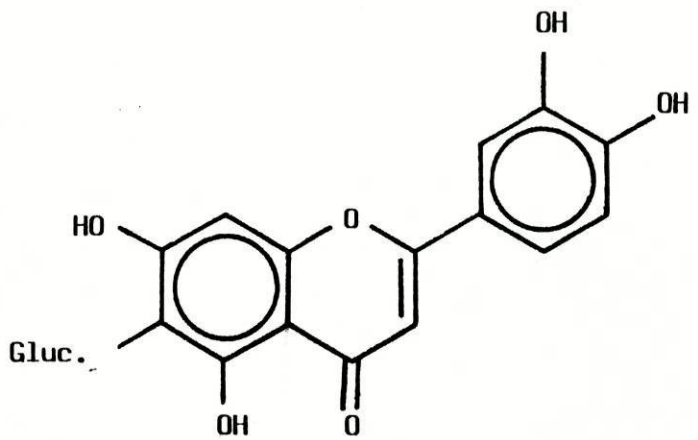
(X)

A RMN de carbono (Fig. 2.15 e QUADRO XVIII) confirmam a existência de um carbono carbonílico (δ = 179,30), 12 carbonos com carácter aromático e 6 com características de carbonos alifáticos oxigenados (parte glucosídica da molécula).

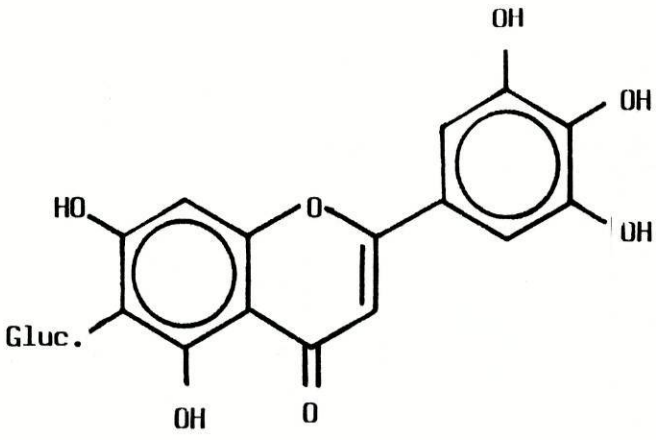
Uma vez que não é do nosso conhecimento qualquer publicação do espectro de RMN ^{13}C desta substância, foi nossa preocupação fazer a distribuição dos valores de desvio químico por nós obtidos (QUADRO XVIII), pelos diferentes carbonos da molécula. Partindo dos valores de RMN de carbono publicados para a xantona (13) e sabendo que que a introdução de um hidroxilo ou de um radical alquilo provocam os seguintes desvios (14):

	Carbono C-1	Carbonos em orto	Carbonos em meta	Carbono em para
OH	+ 27	- 12,7	+ 1,4	+ 7,3
CH_3	+ 9	+ 0,7	-	- 3

foi possível chegar a valores teóricos para a Mangiferina que seriam os indicados no QUADRO XIX (2ª coluna). Com base nestes valores e nos publicados para a Isorientina (XI) e Isoafinetina (XII) (15), dois C-glucosilflavonóides



XI



XII

que no seu anel A têm uma estrutura idêntica à do anel A da Mangiferina, foi possível chegar à distribuição de valores apresentados na última coluna do QUADRO XIX.

A distribuição dos valores de obtidos para os carbonos da parte glucídica foi feita de acordo com os que estão descritos para a glucose da Isoorientina (15), e é a seguinte:

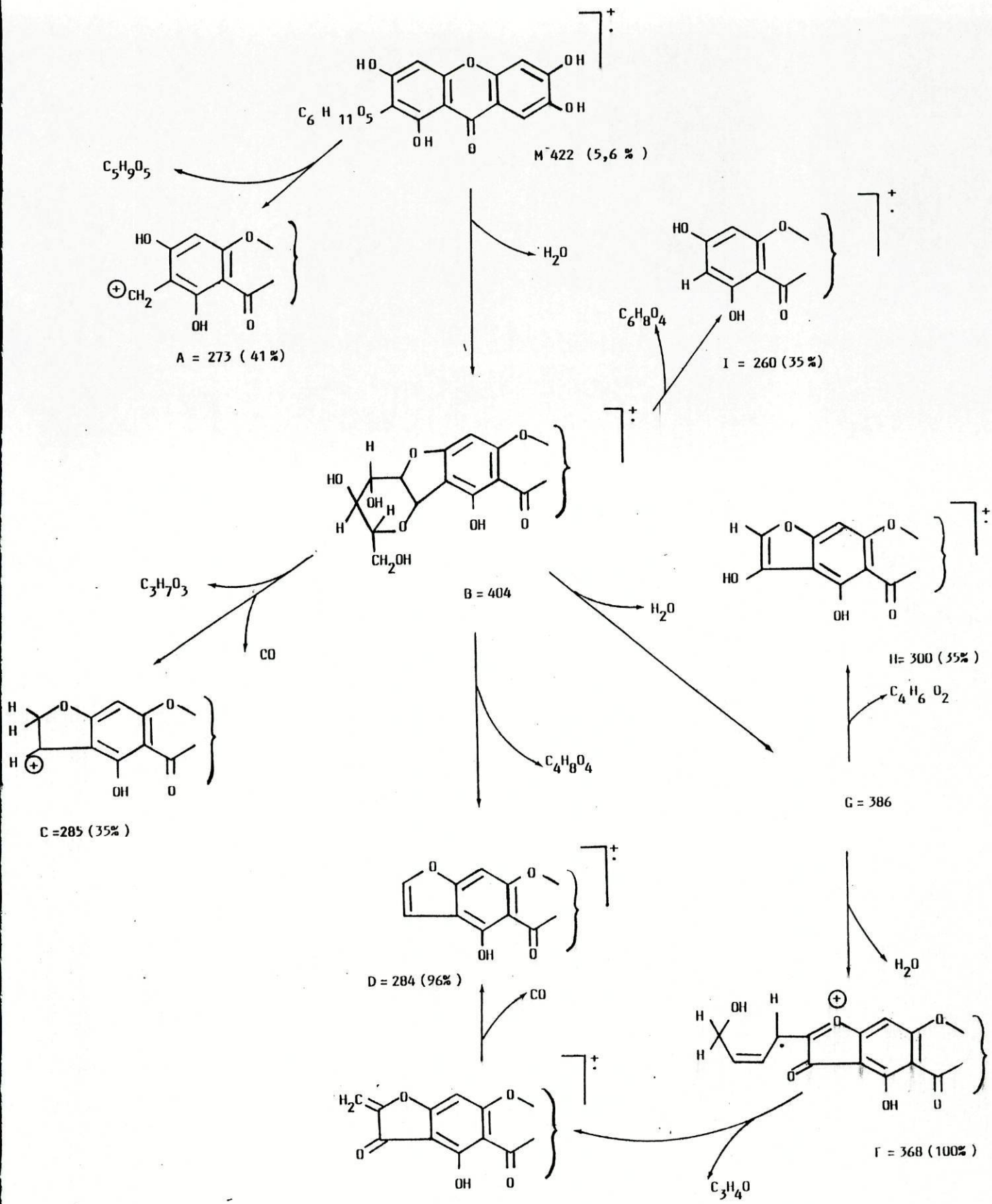
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
Valores de δ para a glu se da Isoorientina	72,9	70,4	78,8	70,1	81,3	61,3
Valores de δ para a glu cose da Mangiferina	73,50	70,96	79,19	70,69	81,94	61,89

O espectro de massa obtido (Fig. 2.15) está de acordo com o publicado por A. Prox (16) para a Mangiferina, registando-se, no entanto, algumas diferenças no que diz respeito à intensidade relativa dos sinais.

A interpretação de Prox para os principais sinais obtidos no espectro é a indicada no ESQUEMA III.

Em face destes resultados, concluímos que a substância correspondente à mancha P11 é a MANGIFERINA (2-C-β-D-Glucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona) (X).

ESQUEMA III: Interpretação do espectro de massa da substância P_{11}



Q U A D R O XIX

DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE δ OBTIDOS NO ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA MANGIFERINA PELOS DIFERENTES CARBONOS DA MOLÉCULA

Carbono nº	Valores de δ para a xantona (13)	Valores de δ calculados teoricamente para a Mangiferina	Valores de δ publicados para a Isoorientina (Isoafinetina) (15)	Distribuição dos valores de δ obtidos pelos carbonos da molécula
1	126,4	155,5	160,5 (160,9)	161
2	123,5	107,1	108,7 (109,0)	107 (a)
3	134,1	163,2	163,0 (163)	163
4	117,2	97,3	93,4 (93,7)	94
4a	155,3	155,1	156,0 (157)	157
4b	155,3	149,4	-	154
5	117,2	105,7	-	103 (b)
6	134,1	148,3	-	151
7	123,5	137,8	-	144
8	126,4	115,1	-	108 (a)
8a	121,5	115,6	-	112
8b	121,5	101,5	103,3 (103,0)	101 (b)

NOTA: a, b: valores permutáveis.

3 Estudo de *H. linarifolium* Vahl

3. - ESTUDO DE *H. LINARIFOLIUM* VAHL

3.1. - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

Partindo de 100 g de planta obtivemos um extracto de côr amarela avermelhada preparado pela técnica descrita na pág. 49.

3.2. - CROMATOGRAFIA ANALÍTICA DO EXTRACTO

O extracto foi sujeito a análise cromatográfica bidimensional em placa de celulose, utilizando como primeiro desenvolvente B.A.A. e como segundo desenvolvente a solução HOAC 15%.

O esquema do cromatograma obtido está reproduzido na Fig. 3.1. e no QUADRO XX estão registadas as características das manchas observadas após aplicação dos reveladores já utilizados para *H, pulchrum* (pág. 67).

3.3. - ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

Por aplicação das técnicas de purificação e isolamento descritas no Cap. III, foi possível isolar as substâncias correspondentes às manchas L1, L3, L4, L5 e L7.

3.4. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE A MANCHA L1

A substância correspondente à mancha L1 apresentava o mesmo comportamento cromatográfico que a substância P1 isolada de *H. pulchrum* e, rpós isolamento pelos processos habituais, as suas soluções apresentavam as características de fluorescência já descritas para as soluções de hipericina (pág. 10).

Em face destes resultados, considerámos a substância correspondente à mancha L1 identificada como uma HIPERICINA, substância, aliás, já descrita nesta espécie botânica (pág. 10).

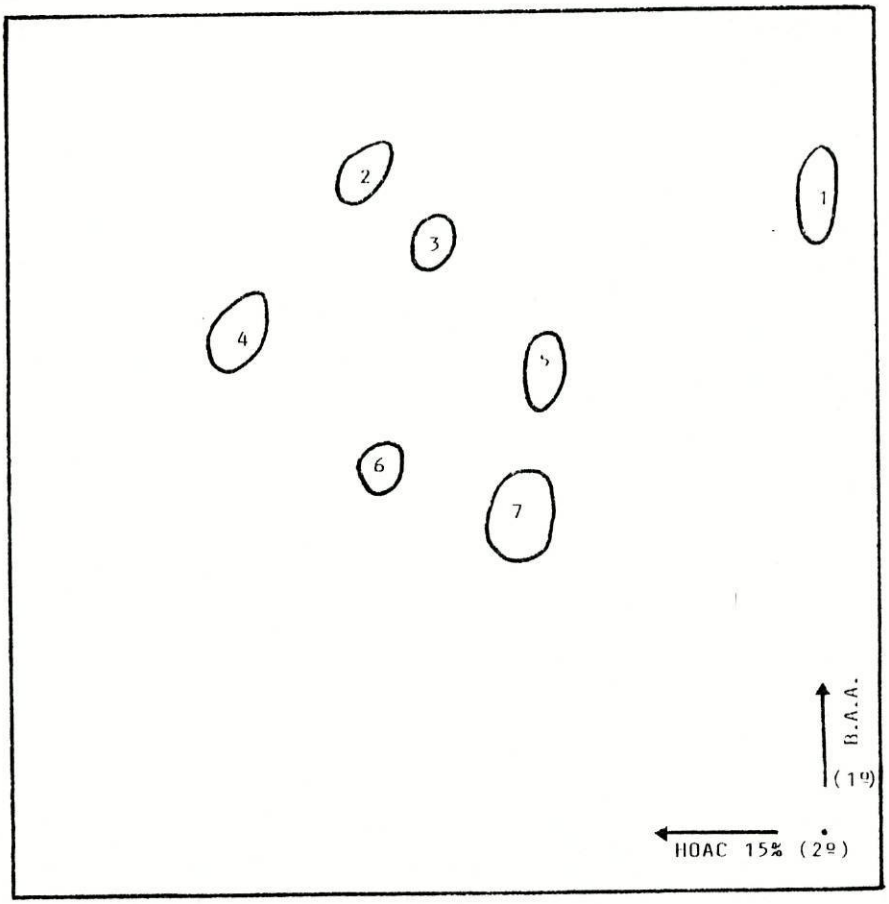


Fig. 3.1 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE *H. linarifolium* Vahl

(B.A.A./HOAc 15 %)

Q U A D R O XX

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DAS MANCHAS OBSERVADAS NA FIG. 3.1.

MANCHA Nº	COLORAÇÃO					Valor de Rf × 100		Intensidade Relativa
	Luz visível	Luz U.V. de 366 nm				B.A.A.	HOAC 15%	
	C/NH_3	S/NH_3	C/NH_3	$AlCl_3$	N.A.			
L 1	-	Vermelha	Vermelha	Vermelha	Vermelha	76	0	++
L 2	Amarela	Azul	Azul Esverdeada	Azul Esverdeada	Azul Esverdeada	80	57	++
L 3	-	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	72	48	++
L 4	Amarela	Azul Lilás	Verde Amarelada	Amarela Esverdeada	Amarela Esverdeada	63	72	++
L 5	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	56	34	+++
L 6	-	Amarela Azulada	Amarela Azulada	Amarela Azulada	Azul Esverdeada	45	36	+
L 7	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Azul Fluoresc.	Amarela Esverdeada	42	36	+++

3.5. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA L3

Após isolamento e cristalização a partir da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa, a substância em estudo apresentava-se sob a forma de cristais corados de amarelo dourado.

O seu comportamento cromatográfico, registado no QUADRO XX, fez-nos pôr a hipótese de estarmos em presença de Quercetrina (3-Ramnosilquercetina) e, assim, procedemos à cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, da substância em estudo com uma amostra de quercetrina padrão. Em todas as circunstâncias ensaiadas obtivemos uma única mancha.

Por outro lado, os seus espectros de U.V.-visível e I.V. são coincidentes com os obtidos a partir do padrão de quercetrina.

Em face dos resultados obtidos considerámos a substância identificada como sendo a QUERCETRINA.

3.6. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTANCIA CORRESPONDENTE A MANCHA L4

A substância cristalizou da sua solução metanólica sob a forma de cristais brancos.

As suas características analíticas (comportamento cromatográfico, espectrofotometria de U.V.-visível e I.V.) são em tudo perfeitamente coincidentes com as já descritas para o Ácido clorogénico isolado de *H. pulchrum* págs. 98-99.

A cromatografia cruzada da substância em análise com uma amostra de Ácido clorogénico padrão, em diversos desenvolventes, forneceu sempre uma única mancha.

Perante os resultados descritos, concluímos que a substância correspondente à mancha L4 é o ÁCIDO CLOROGÉNICO (Ác.-3-cafeilquínico).

3.7. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA L5

A substância em análise apresentava-se sob a forma de pó amarelo dourado.

O seu comportamento cromatográfico, registado no QUADRO XX, é característico de um monoglicósido e, assim, o primeiro ensaio executado foi o de hidrólise ácida. Neste ensaio obtivemos Quercetina e Glucose.

O espectro de U.V.-visível é idêntico ao obtido com a Isoquercetrina (3-Glucosilquercetina) revelando, claramente, que a glucose se encontra ligada à quercetina através do hidroxilo na sua posição 3.

Os ensaios de identificação foram completados com a cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, da substância em estudo com uma amostra de Isoquercetrina padrão, cromatografias essas em que obtivemos sempre uma única mancha para as duas substâncias.

Em face destes resultados concluímos que a substância em estudo é a ISOQUERCETRINA.

3.8. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA L7

A substância tem as características cromatográficas (QUADRO XX) já descritas para a Mangiferina (pág.103) e, após isolamento apresenta-se sob a forma de pó amarelo avermelhado.

A substância não é hidrolisável nas condições habituais e o espectro de U.V.-visível registado é idêntico ao fornecido pela Mangiferina isolado de *H. pulchrum*.

A cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, da substância em estudo e da Mangiferina acima referida, forneceu sempre uma única mancha.

Perante estes resultados considerámos que a substância correspondente à mancha L7 é a xantona MANGIFERINA.

4. Estudo de H. undulatum Schout

4. - ESTUDO DE *H. UNDULATUM* SCHOUT

4.1. - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

Partindo de 80 g de planta e utilizando a técnica descrita na pág. 49, obtivemos um extracto de côr vermelha acastanhada.

4.2. - CROMATOGRAFIA ANALITICA DO EXTRACTO

O extracto obtido foi sujeito a cromatografia analítica bidimensional em placa de celulose, utilizando o par de desenvolventes B.A.A./HOAC 15%. Na Fig. 4.1. está reproduzido o cromatograma obtido.

O mesmo extracto foi ainda sujeito a nova cromatografia bidimensional, utilizando agora o par B.A.A./H_2O, reproduzindo-se na Fig. 4.2. o cromatograma então obtido.

No QUADRO XXI estão reproduzidas as características cromatográficas das manchas observadas após aplicação dos reveladores, conforme descrito para *H. pulchrum*.

4.3. - ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

Por aplicação das técnicas de isolamento e purificação descritas no Cap. III foi possível isolar as substâncias correspondentes às manchas U1, U2, U3, U7, U8 e U10.

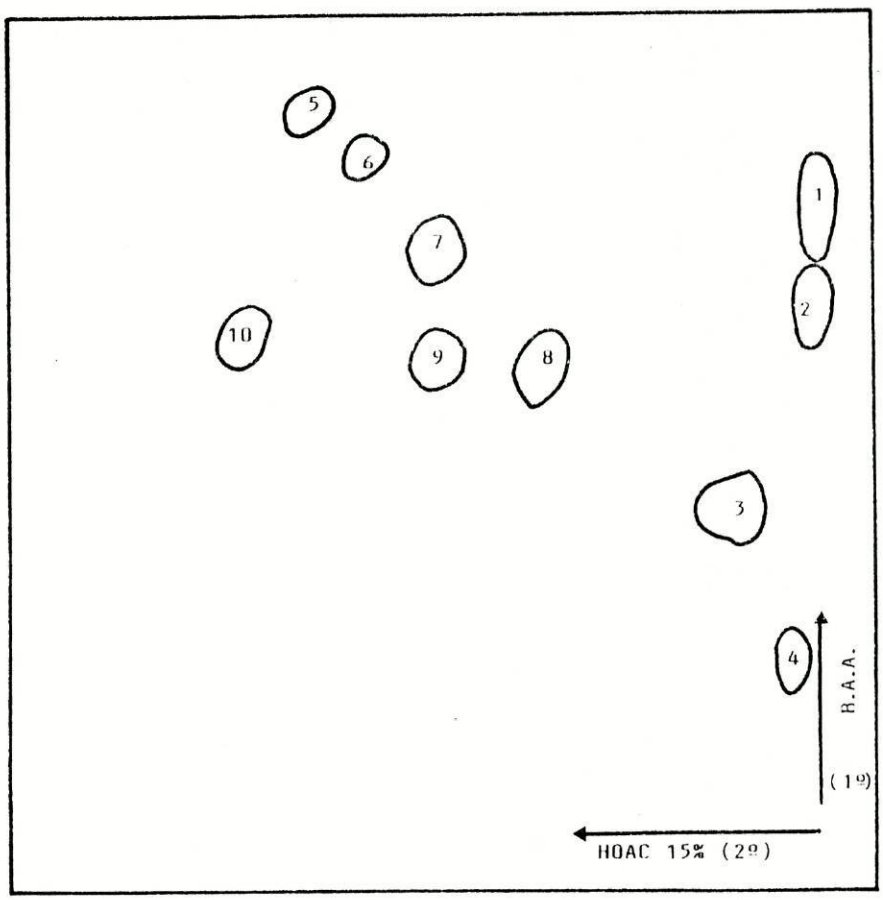


Fig.4 .1 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE *H. undulatum* Schout

(B.A.A./ HOAc 15 %)

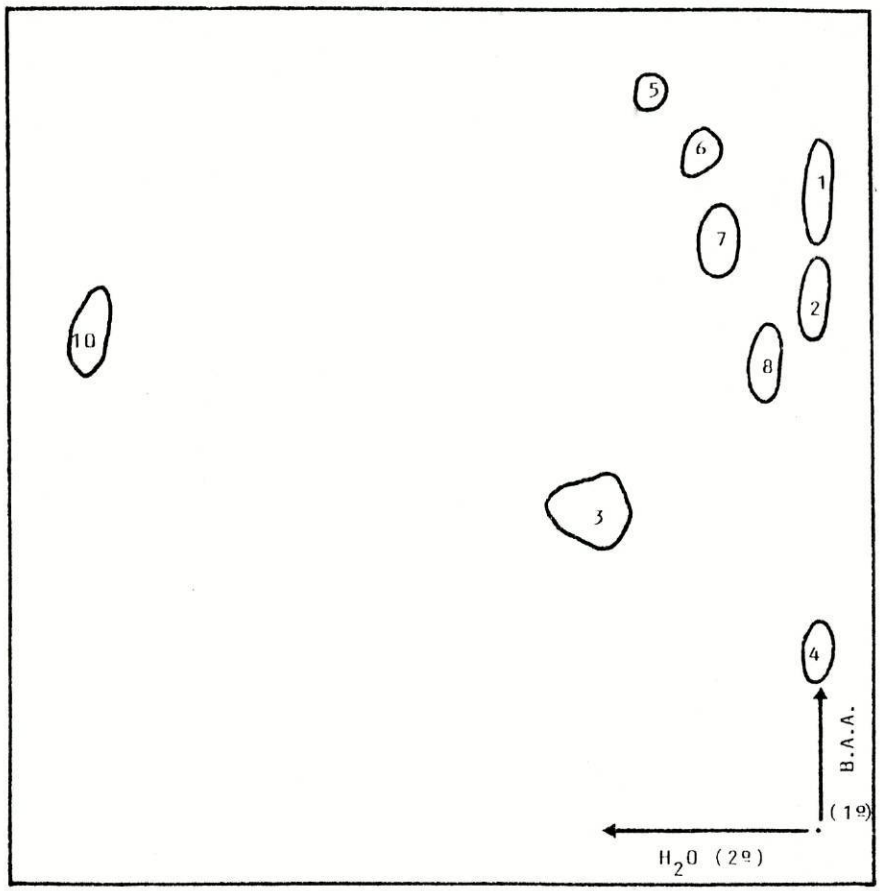


Fig. 4.2 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO ESTRACTO METANÓLICO DE *H. undulatum* Schout

(B.A.A./H_2O)

Q U A D R O XXI

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DAS MANCHAS OBSERVADAS NAS FIGS. 4.1. e 4.2.

MANCHA Nº	COLORAÇÃO					Valor de Rf × 100			Intensidade Relativa
	Luz visível	Luz U.V. de 366 nm				B.A.A.	HOAC 15%	H_2O	
	C/NH_3	S/NH_3	C/NH_3	$AlCl_3$	N.A.				
U 1	-	Vermelha	Vermelha	Vermelha	Vermelha	76	0	0	+
U 2	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	65	0	0	++
U 3	-	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Amarela Esverdeada	39	14	34	++
U 4	-	Amarela	Amarela	Amarela	Laranja	22	4	2	+
U 5	-	Azul	Azul	Azul	Azul Esverdeada	89	64	22	+
U 6	-	Azul	Azul	Azul	Azul Esverdeada	83	56	15	+
U 7	-	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	72	49	14	+
U 8	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	57	35	7	+++
U 9	-	-	-	Amarela Fluoresc.	Laranja	59	48	-	+
U 10	Amarela	Azul Lílás	Verde Amarelada	Amarela Esverdeada	Amarela Esverdeada	63	72	90	++

4.4. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA U1

A substância em estudo apresentava as características cromatográficas (QUADRO XXI) já descritas para a Hipericina isolada de *H. pulchrum* e *H. linarifolium*.

Após isolamento foram analisadas as características de fluorescência em diversas soluções (metanólica, aquosa alcalina e sulfúrica) encontrando sempre as características previstas para a HIPERICINA.

Deste modo considerámos confirmada a presença daquele composto nesta espécie, presença essa, aliás, já anteriormente referida (pág. 19).

4.5. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA U3

A substância em análise não cristalizou, apresentando-se sob a forma de pó destacável, amarelo, após evaporação da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr amarela fluorescente

com NH_3: côr amarela

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr amarela esverdeada.

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Água destilada	0,35
Butanol - ácido acético - água (6:1:2)	0,40
Solução a 15% de ácido acético	0,15
Solução a 60% de ácido acético	0,50
Ácido acético-água-ácido clorídrico (30:10:3)	0,60

(placa de sílica)

Acetato de etilo - ácido fórmico-ácido acético: água (100:11:11:22)	0,65

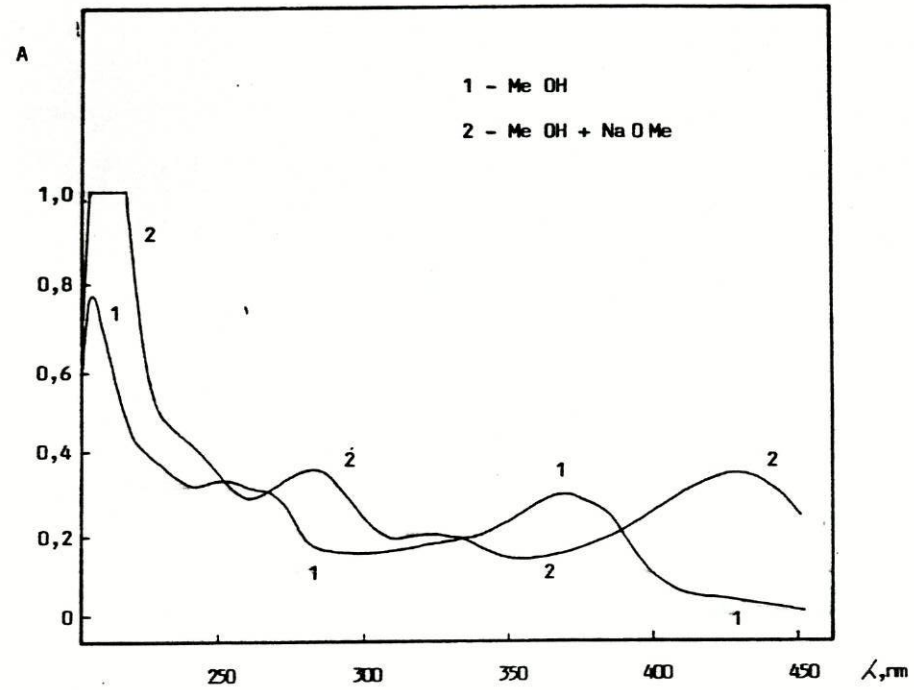
b) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

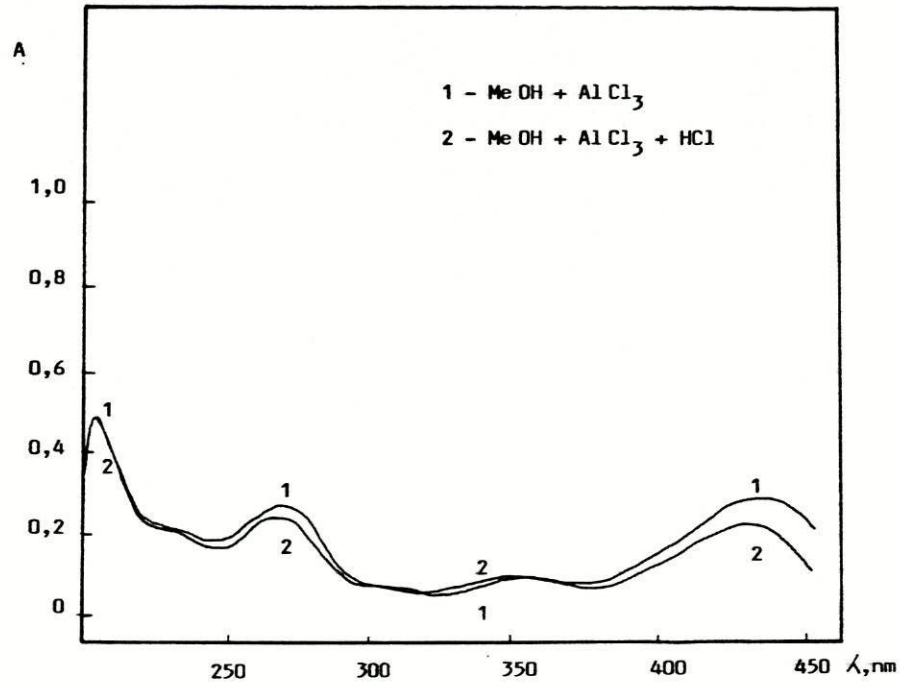
SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm				
MeOH	248	260	325 inf	365	
MeOH+NaOMe	280	323		425	(decompõe)
MeOH+$AlCl_3$	230 inf	267	350	432	
MeOH+$AlCl_3$+HCl	270	310	350	430	
MeOH+NaOAC	275	315	395		
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	267	325 inf	363		

O espectro obtido está reproduzido na Fig. 4.3.

c) - CARACTERISTICAS DO ESPECTRO DE I.V.

O espectro de I.V. obtido está reproduzido na Fig. 4.4.





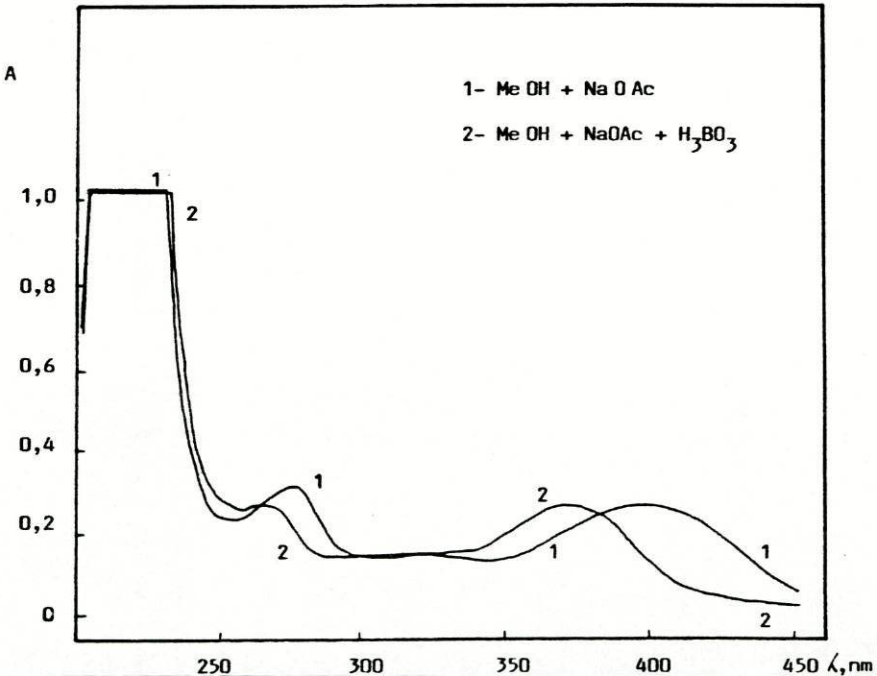


Fig. 4.3 - Espectro de U.V.-visível da substância U3

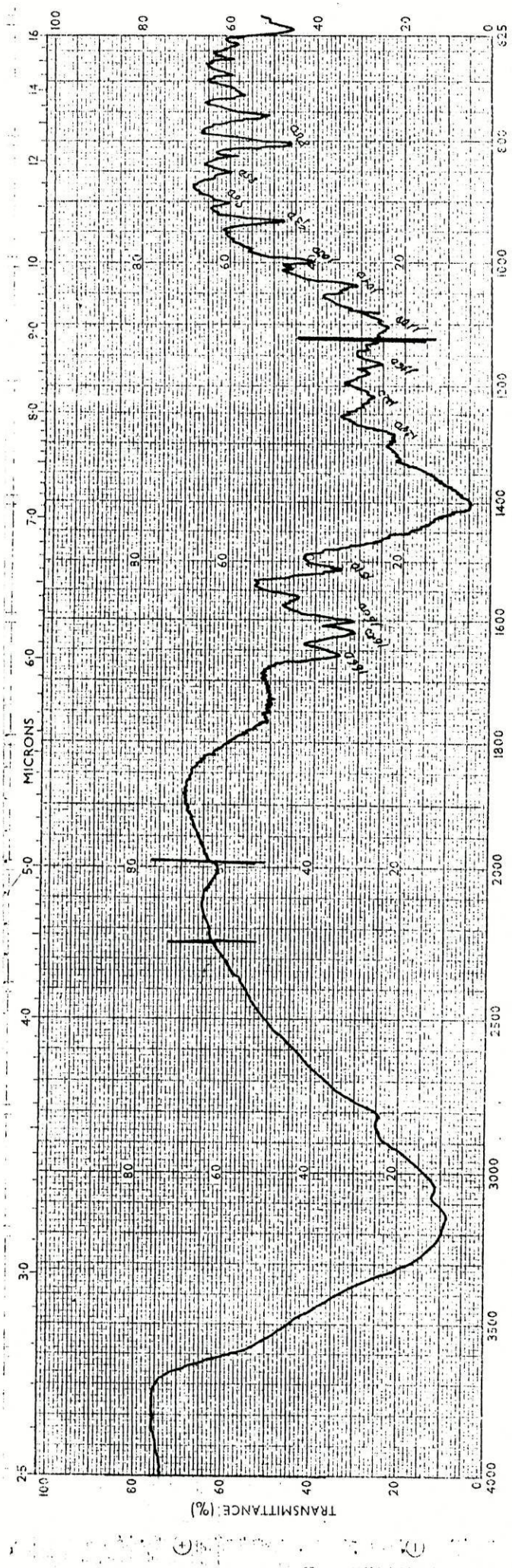


Fig. 4.4 - Espectro de I. V. da substância U 3

d) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

Após hidrólise ácida efectuada nos moldes habituais, a fase orgânica obtida foi analisada, tendo-se, isolado uma substância que apresenta as características analíticas da Quercetina.

A análise cromatográfica da fase aquosa não revela a existência de açúcares. Porém, quando adicionada de solução a 10% de $BaCl_2$, obtêve-se um precipitado que atribuímos à presença de ião sulfato em solução e resultante da substância em análise.

e) - **CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE RMN ^1H**

O espectro de RMN protónico, reproduzido na Fig. 4.5., confirma-nos estarmos em presença de um derivado da Quercetina, uma vez que apresenta na zona dos protões aromáticos os seguintes sinais:

δ = 7,99: um dupleto com J = 2,4Hz, atribuído ao protão em 2'.

δ = 7,80: um dupleto de dupletos em J = 2,4Hz e J = 7,6Hz, atribuído ao protão em 6'.

δ = 6,93: um dupleto com J = 7,5Hz, atribuído ao protão em 5'.

δ = 6,39: um dupleto com J = 1,4Hz, atribuído ao protão em 8.

δ = 6,14: um dupleto com J = 1,8Hz, atribuído ao protão em 6.

Não são observados quaisquer sinais que possam ser atribuídos a um radical glicídico, o que confirma os resultados de hidrólise, observando-se, contudo, um singleto em δ = 3,51 que possivelmente será originado por um metóxilo.

f) - **DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

A substância em análise é, portanto, um derivado da quercetina, mas de natureza não glicídica.

A análise dos diversos resultados obtidos revela que se encontram livres os hidróxilos das seguintes posições:

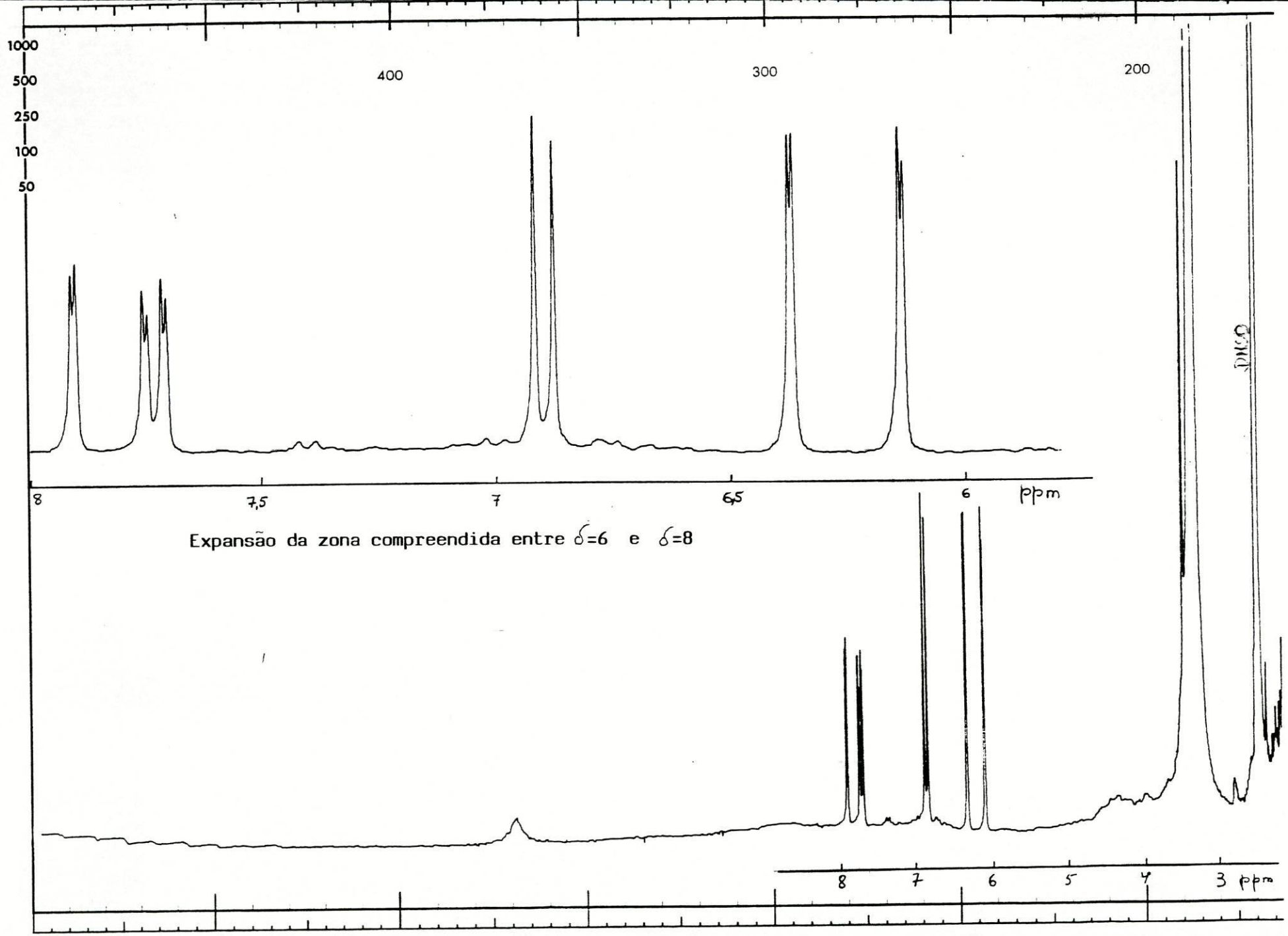


Fig. 4.5 - Espectro de RMN ^{1}H da substância U3

7-OH: revelado pelo desvio batocrómico provocado na banda II do espectro de U.V. de 248 para 275 nm, quando ao metanol se adiciona NaOAC; revelado ainda pelo aparecimento de uma banda em 323 nm no espectro de U.V. realizado em presença de NaOMe.

5-OH: revelado pelo desvio batocrómico na banda I do espectro de U.V.-visível de 365 para 430 nm, quando ao metanol se adiciona $AlCl_3$ + HCl; revelado ainda pela coloração amarela fluorescente à luz U.V. de 366 nm, formada nos cromatogramas em placa de celulose pulverizadas com solução de $AlCl_3$ (pág. 38).

3-OH: revelado pela posição da banda I em 365 nm quando o espectro de U.V. é registado em metanol (pág. 36); revelado ainda pela coloração amarela à luz U.V. de 366 nm observada nos cromatogramas (pág. 32).

4'-OH: revelado pelo desvio batocrómico na banda I do espectro de U.V., de 365 para 425 nm, seguida de decomposição, quando à solução metanólica da substância se adiciona NaOMe (pág. 37).

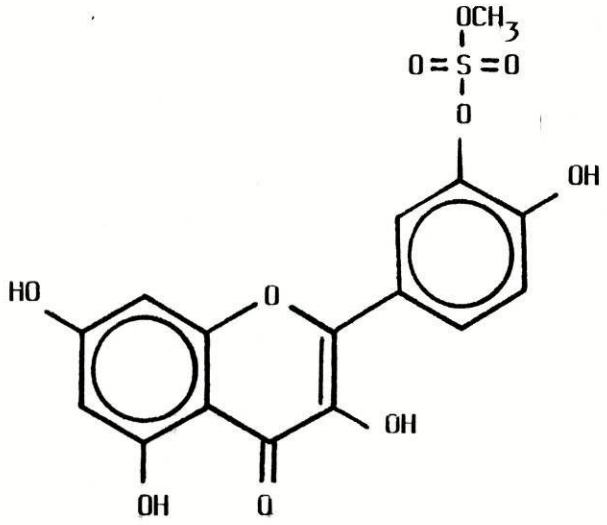
Encontra-se ocupado, por exclusão de partes, o hidróxilo da posição 3', ocupação essa que é ainda demonstrada por:

- ausência de coloração laranja à luz U.V. de 366 nm quando o cromatograma em placa de celulose é pulverizada com solução de N.A. (pág. 31).
- sobreposição, na zona de maiores comprimentos de onda, dos espectros realizados em presença de $AlCl_3$ e de $AlCl_3$ + HCl (pág. 38).
- ausência de desvio significativo na banda I do espectro de U.V.-visível, quando à solução metanólica da substância se adiciona NaOAC + H_3BO_3 (pág. 38).

Uma vez que foi revelada a presença de ião sulfato, após hidrólise, facto que é confirmado pela presença de uma banda em 1040 cm^{-1} no espectro de I.V., admitimos que a substância em análise terá um radical sulfato na posição 3'.

A existência de um sinal em δ = 3,51 no espectro de RMN de protão levou-nos a pôr a hipótese da existência de um metóxilo na molécula que, pelas razões atrás expostas, só poderá estar ligado ao radical sulfato.

Em face disto, admitimos como provável, para este composto, a seguinte estrutura :



No entanto, a impossibilidade de dispôr de quantidade suficiente de substância que permitisse a realização de um espectro de RMN de carbono, leva-nos a pôr alguma reserva quanto à estrutura acima proposta.

4.7. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA U7

Após cristalização do metanol, a substância apresentava-se sob a forma de cristais amarelo-dourados.

O seu comportamento cromatográfico (QUADRO XXI) é idêntico ao da Quercetrina (3-Ramnosilquercetina) e a cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, com uma amostra de Quercetrina padrão, forneceu sempre uma única mancha.

Os espectros de U.V.-visível e I.V. registados são em tudo semelhantes aos obtidos com a Quercetrina pardão.

Por hidrólise ácida, realizada nos moldes habituais, obteve-se Quercetina e Ramnose.

Em face dos resultados descritos considerámos a substância em análise identificada como sendo a QUERCETRINA.

4.8. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA U8

A substância em questão apresentava-se sob a forma de pó amarelo-dourado.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr de laranja

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,57
Solução a 15% de ácido acético	0,35
Água destilada	0,09
Fenol-água (3:1)	0,55

b) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS NO U.V.-VISÍVEL

Os comprimentos de onda dos máximos de absorção do espectro registado nas condições habituais são os seguintes:

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	256	270 inf	300 inf	365
MeOH+NaOH	270	330	412	(não dec.)
MeOH+$AlCl_3$	274	305 inf	330 inf	440
MeOH+$AlCl_3$+HCl	271	300 inf	370	405
MeOH+NaOAC	276	325	381	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	264	300 inf	380	

c) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

Após hidrólise ácida, efectuada nos moldes habituais, a fase orgânica obtida foi analisada, tendo-se encontrado uma substância com as características analíticas da Quercetina.

A análise cromatográfica da fase aquosa revelou a presença de Glucose e de Galactose em quantidades que, a avaliar pela área das manchas fornecidas, parecem aproximadamente iguais.

d) - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Perante os resultados da hidrólise ácida concluímos estar em presença de um heterósido da Quercetina.

O aspecto das manchas originadas pela substância após revelação dos cromatogramas é característico dos derivados da Quercetina substituída no seu hidroxilo em posição 3 (págs. 31-32) e o espectro de U.V.-visível obtido revela que é unicamente essa a posição ocupada na molécula da genina.

Por outro lado, os valores de Rf encontrados nos diversos desenvolventes são próprios de um monoglicósido (pág. 30) e a cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, do produto em estudo com uma amostra de Isoquercetrina (3-Glucosilquercetina) ou de Hiperósido padrão (3-Galactosilquerceti na) forneceu sempre uma única mancha.

Como, porém, após hidrólise ácida são detectadas claramente duas manchas correspondentes a dois açúcares, glucose e galactose, concluímos que a mancha U8 é devida não a uma, mas a duas substâncias que não conseguimos separar, a ISOQUERCETRINA e o HIPERÓSIDO, e que parecem existir em quantidades muito semelhantes na espécie em estudo.

4.9. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA U10

A substância apresenta-se sob a forma de cristais brancos.

O seu comportamento cromatográfico, registado no QUADRO XXI, é semelhante ao do Ácido clorogénico já isolado das duas espécies estudadas anteriormente (págs. 98 e 121) e a cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, com uma amostra daquele ácido forneceu sempre uma única mancha.

Os espectros de U.V. e I.V. obtidos são sobreponíveis aos fornecidos pelo Ácido clorogénico padrão.

Em face destes resultados, concluímos que a substância em análise é o ÁCIDO CLOROGÉNICO (Ác. 3-Cafeilquínico).

4.10. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA U2

A substância correspondente a esta mancha apresentava as características cromatográficas e espectrais de U.V.-visível e de I.V. da QUERCETINA. A cromatografia cruzada com Quercetina padrão confirmou a identidade das substâncias.

5. Estudo de *H. calycinum* L.

5. - ESTUDO DE *H. CALYCINUM* L.

5.1. - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

O extracto foi preparado nos moldes habituais, a partir de 120 g de planta, e a sua côr era castanha.

5.2. - CROMATOGRAFIA ANALÍTICA DO EXTRACTO

O extracto obtido foi sujeito a duas cromatografias analíticas bidimensionais utilizando os pares de desenvolventes B.A.A./HOAC 15% e B.A.A./H_2O, nas condições experimentais já descritas para *H. undulatum* (pág. 124).

Nas Figs. 5.1. e 5.2. estão representados os cromatogramas obtidos e no QUADRO XXII estão registadas as características cromatográficas das manchas observadas.

5.3. - ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

A partir do extracto referido em 5.1., e por aplicação das técnicas já descritas, isolamos as substâncias correspondentes às manchas C1, C2, C3, C4, C5 e C6.

5.4. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA C1

Após cristalização a partir da sua solução metanólica, obtivemos a substância sob a forma de cristais amarelos.

O comportamento cromatográfico registado no QUADRO XXII para esta substância fez-nos pensar estarmos em presença de Quercetina. Esta hipótese foi confirmada por cromatografia cruzada com quercetina padrão, em diversos desenvolventes, e ainda pela sobreponibilidade dos espectros de I.V. obtidos com a substância em estudo e com uma amostra de Quercetina padrão.

Conclusão: a substância correspondente à mancha C1 é a QUERCETINA.

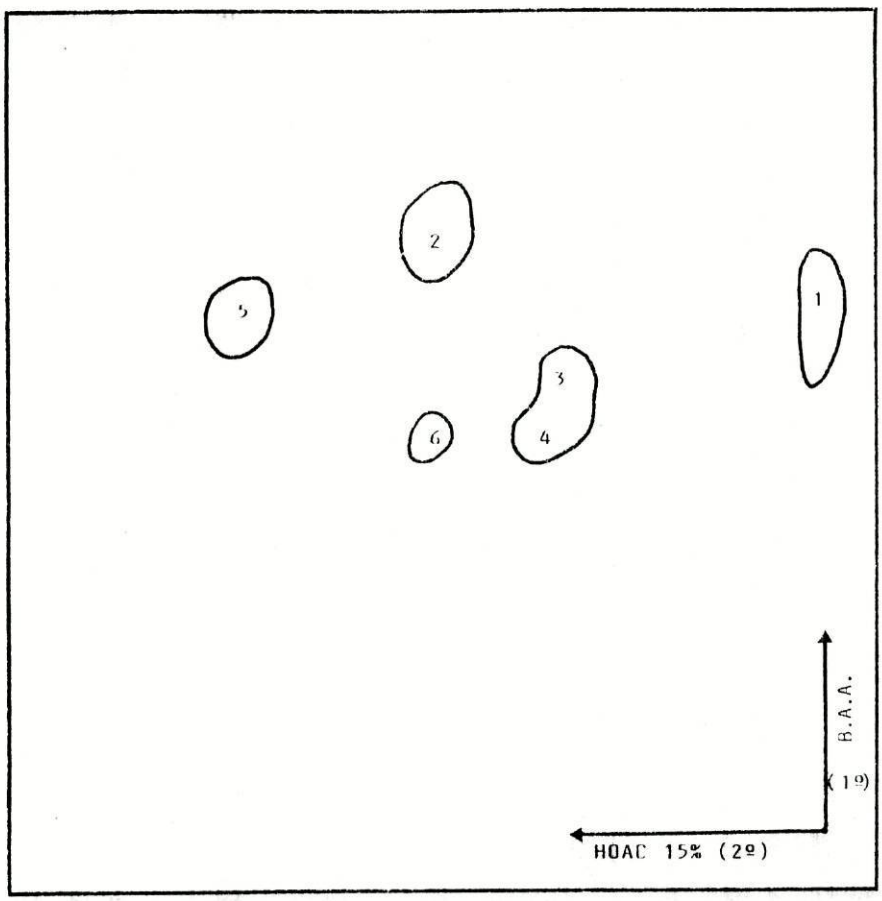


Fig. 5.1 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE

H. calycinum L.

(B.A.A./ HOAc 15 %)

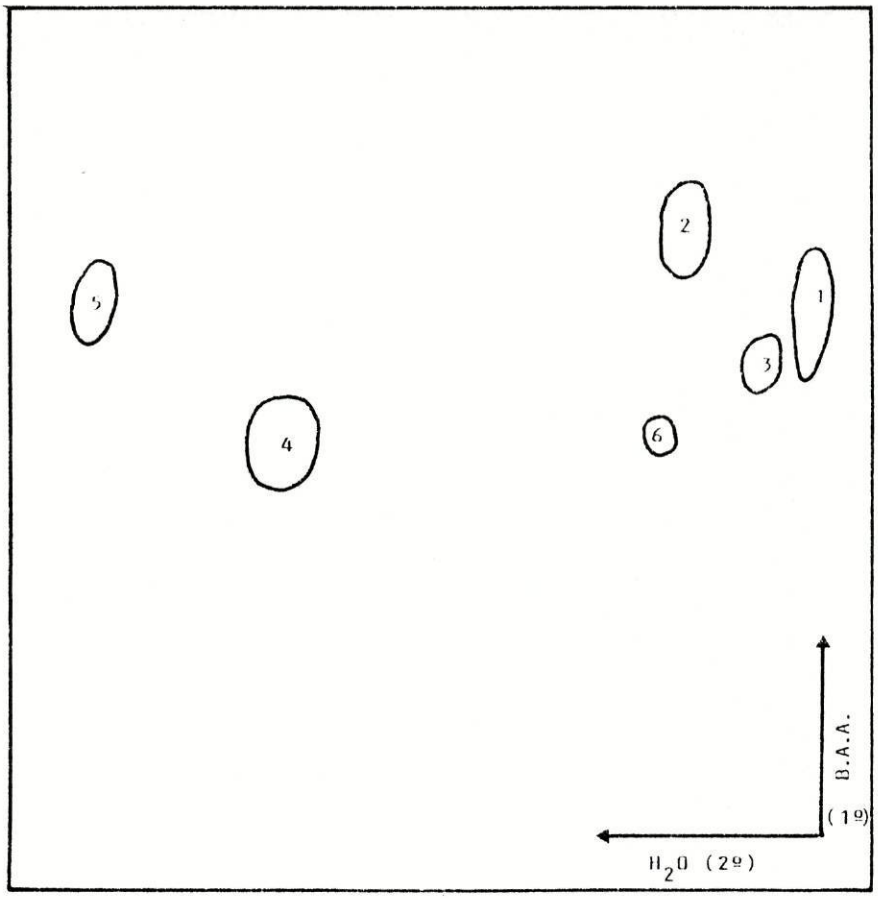


Fig. 5.2 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DO *H. calycinum* L.
(B.A.A./H_2O)

Q U A D R O XXII

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DAS MANCHAS OBSERVADAS NAS FIGS. 5.1. e 5.2.

MANCHA Nº	COLORAÇÃO					Valor de Rf × 100			Intensidade Relativa
	Luz visível	Luz U.V. de 366 nm				B.A.A.	HOAC 15%	H_2O	
	C/NH_3	S/NH_3	C/NH_3	$AlCl_3$	N.A.				
C 1	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	64	0	0	++
C 2	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	72	48	15	++
C 3	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	56	34	7	++
C 4	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	48	35	66	+++
C 5	Amarela	Azul Lilás	Verde Amarelado	Amarela Esverdeada	Amarela Esverdeada	63	72	90	++
C 6	-	-	-	Amarela Fluoresc.	Laranja	47	49	20	+

5.5. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA C2

A substância em questão, após cristalização a partir da sua solução metanólica, apresentava-se sob a forma de cristais amarelo-dourados.

As suas características cromatográficas, registadas no QUADRO XXII, são idênticas às já registadas para a Quercetrina isolada das três espécies anteriormente estudadas, e a cromatografia cruzada com uma amostra de quercetrina padrão, apresentou sempre uma única mancha.

Após hidrólise ácida, a substância libertou Quercetina e Ramnose e o seu espectro de U.V.-visível é característico de um derivado de Quercetina em posição 3.

Em face destes resultados, considerámos a substância em análise identificada como sendo a QUERCETRINA (3-Ramnosilquercetina).

5.6. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA C3

Após hidrólise ácida, realizada nas condições habituais, detectámos, na fase orgânica, Quercetina. A fase aquosa do ensaio, em análise cromatográfica, revela duas manchas correspondentes à Glucose e Galactose, sendo a mancha fornecida pela glucose de maiores dimensões e mais intensa que a fornecida pela galactose.

O espectro de U.V.-visível da substância é característico dos derivados da Quercetina na sua posição 3, sendo idêntico aos obtidos quer a partir da Isoquercetrina (3-Glucosilquercetina), quer a partir do Hiperósido (3-Galactosilquercetina).

As características cromatográficas da substância (QUADRO XXII) são idênticas quer às da Isoquercetrina quer às do Hiperósido, sendo impossível distingui-las por cromatografia cruzada em qualquer dos desenvolventes já citados.

Em face destes resultados concluímos que o produto em análise, à semelhança do que já aconteceu em *H. undulatum* corresponde a uma mistura de duas substâncias, ISOQUERCETRINA e HIPERÓSIDO, existindo a primeira numa proporção maior do que a segunda.

5.7. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA C4

A substância cristalizou a partir da sua solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa e apresentava côr amarela acastanhada.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr de laranja

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1;2)	0,49
Solução a 15% de ácido acético	0,35
Solução a 60% de ácido acético	0,69
Água destilada	0,66

(placa de poliamida)

Água-etanol-acetilacetona (4:2:1)	0,00

b) - CARACTERISTICAS DO ESPECTRO NO U.V.-VISIVEL

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	257	300 inf	358	
MeOH+NaOMe	270	325	402	(não dec.)
MeOH+$AlCl_3$	272	305 inf	410	
MeOH+$AlCl_3$+HCl	270	300 inf	362	400
MeOH+NaOAC	270	320 inf	382	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	265	300 inf	378	

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 5.3.

c) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

Após hidrólise ácida efectuada nos moldes habituais, a fase orgânica obtida foi analisada, revelando conter Quercetina.

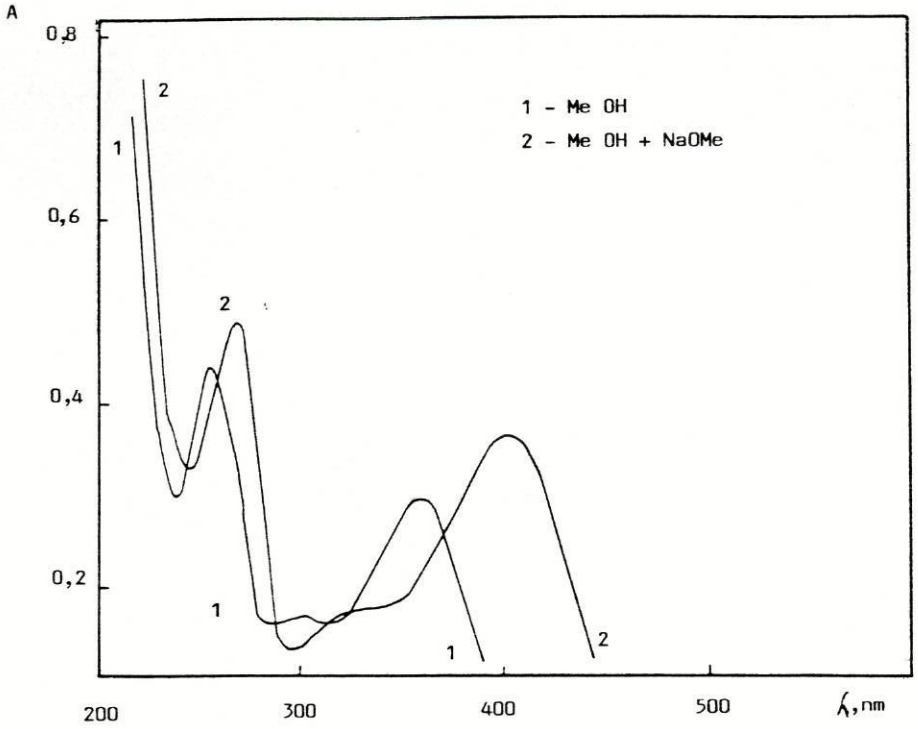
A fase aquosa, após os tratamentos indicados na pág. 60, foi analisada por cromatografia e originou duas manchas que em qualquer dos desenvolventes apresentavam as características de coloração e de Rf do ácido glucurónico e da sua lactona (pág. 56). A cromatografia cruzada da solução em análise com a solução de ácido glucurónico referido na mesma página confirma a identidade dos produtos.

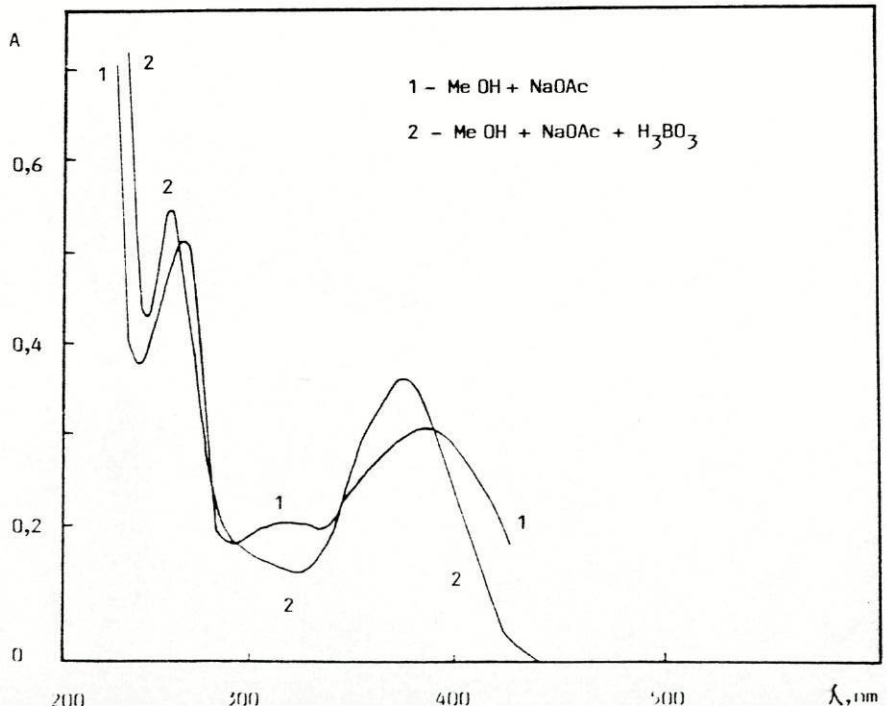
d) - COMPORTAMENTO DA SUBSTÂNCIA EM MEIO ÁCIDO

Preparámos uma solução da substância nas seguintes condições:

2 mg de substância + 2 ml de metanol + VI gotas de HCl 0,05N.

Ao fim de cerca de uma hora, a análise cromatográfica da solução revelou a existência de duas substâncias, pelo que a solução foi, depois, sujeita a cromatografia preparativa com vista à sua separação.





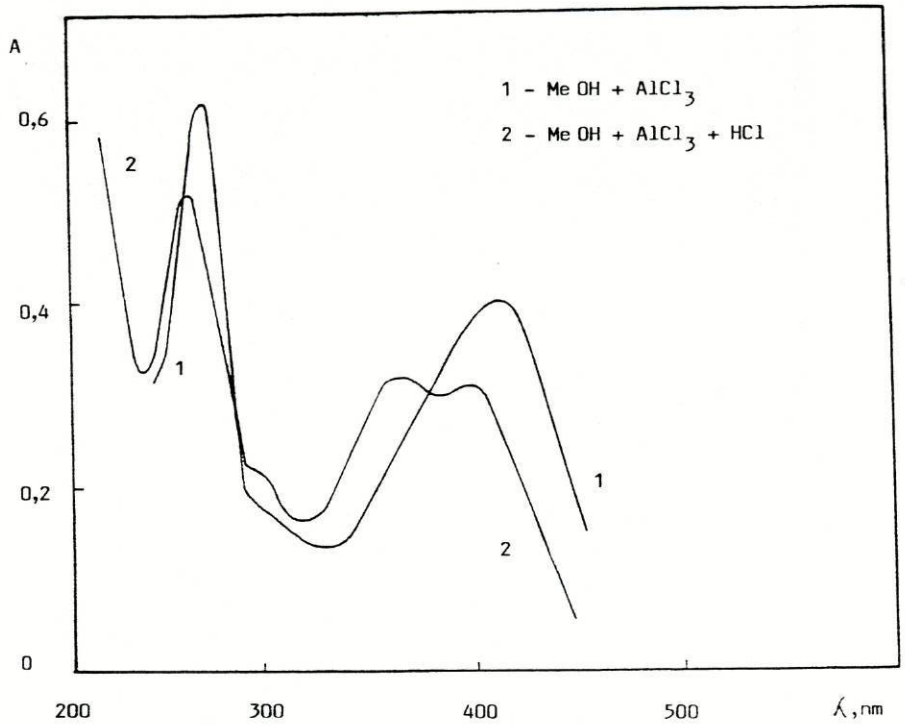


Fig. 5.3 - Espectro de U.V.-visível da substância C 4

A análise destas duas substâncias mostrou que uma delas é aquela de que partimos, apresentando a outra as seguintes características:

1. - Características cromatográficas:

Observou-se o mesmo comportamento face aos reveladores, mas apresentava diferentes valores de Rf nos desenvolventes referidos na pág. 145 e aqui indicados pela mesma ordem:

0,72; 0,40, 0,81; 0,05; 0,20.

2. - Características do espectro no U.V.-visível:

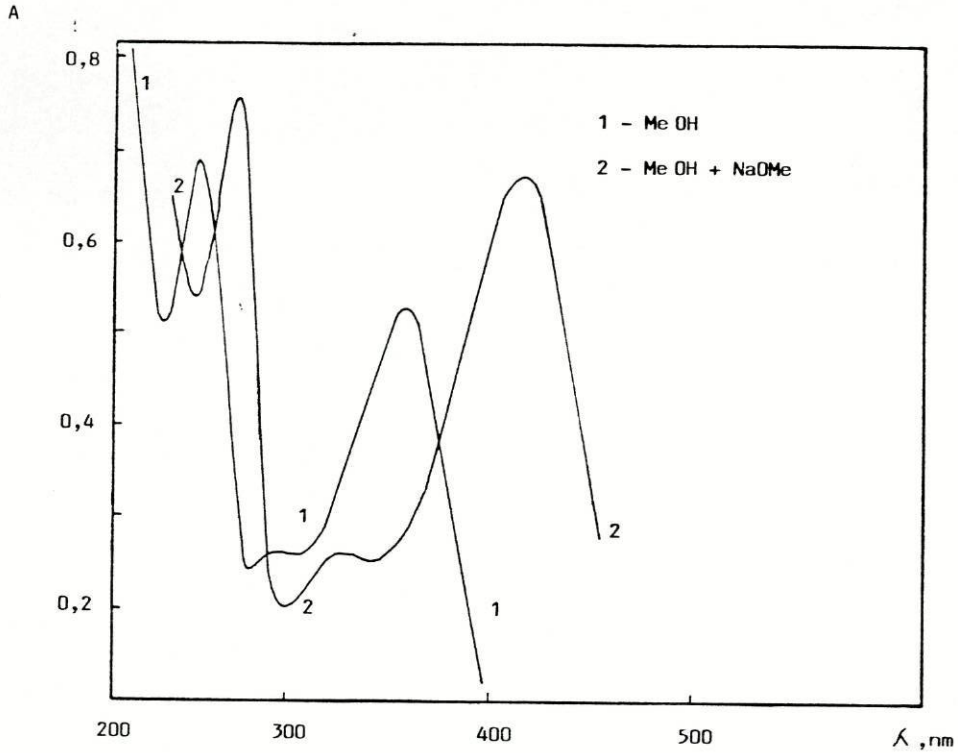
SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MAXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	258	300 inf	360	
MeOH+NaOMe	276	325	412 (não dec.)	
MeOH+$AlCl_3$	276	300 inf	340 inf	422
MeOH+$AlCl_3$+HCl	270	300 inf	365	402
MeOH+NaOAC	274	322	395	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	260	300 inf	380	

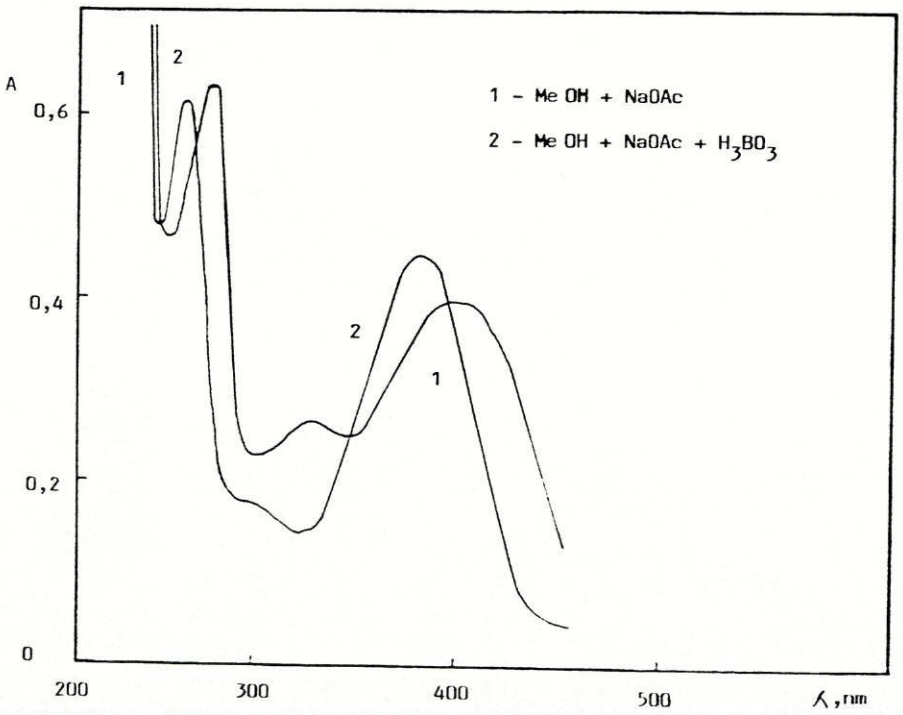
O espectro obtido está reproduzido na Fig. 5.4., sendo em tudo semelhante ao obtido para a substância inicial, residindo a única diferença significativa nas intensidades relativas das duas bandas de maior comprimento de onda do espectro registado em presença de $AlCl_3$+HCl:

Substância original: ε em 362 nm > ε em 400 nm

Substância originada: ε em 365 nm < ε em 402 nm

Cada uma das substâncias agora isoladas, quando postas novamente nas condições de meio ácido descritas, volta a desdobrar-se, indicando a existência de duas substâncias em equilíbrio.





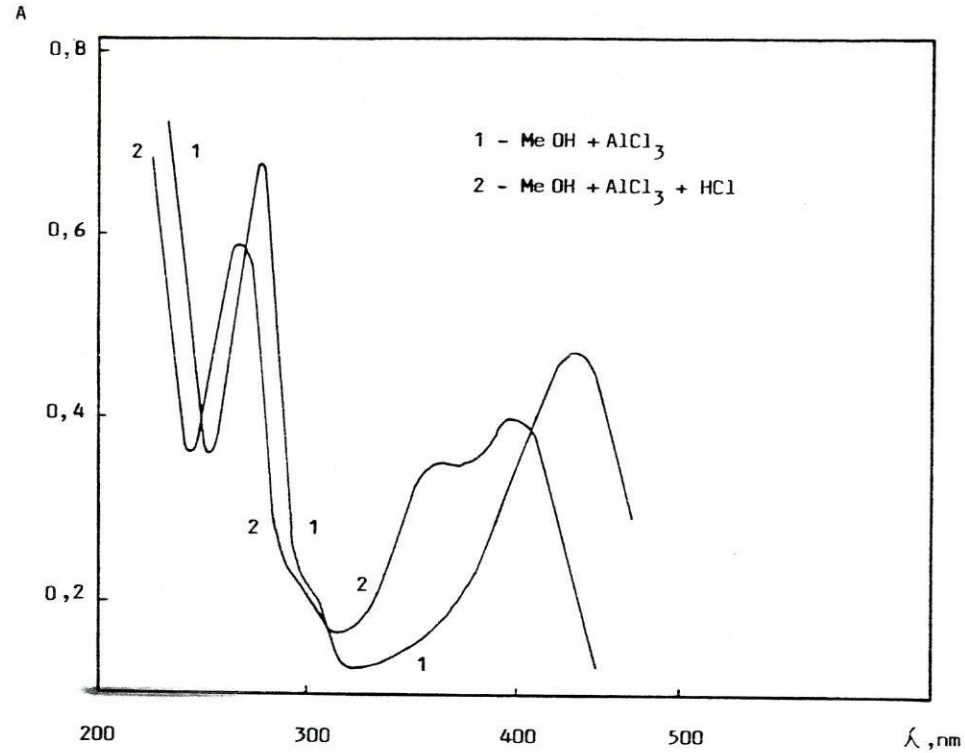


Fig. 5.4 - Espectro de U.V.-visível da substância C 4

(após isomerização)

DISCUSSÃO

Perante os resultados obtidos na hidrólise e dos altos valores de Rf em água, concluímos estar perante uma quercetina ligada ao ácido glucurónico. O facto de, após hidrólise, encontrarmos duas manchas na cromatografia de resíduo glucídico, deve-se à lactonização parcial provocada pelo aquecimento em meio ácido.

É também esta lactonização do ácido glucurónico o fenómeno responsável pelo desdobramento da substância em estudo, quando em meio ácido, facto, aliás, já descrito na literatura (17).

A posição de ligação da molécula osídica à genina é-nos indicada quer pelo comportamento da substância face à revelação (págs. 31-32), quer pela análise do espectro de U.V.-visível. Este espectro mostra-nos, conforme págs. 37-38, que se encontram livres os hidroxilos do anel B da Quercetina e ainda os das posições 5 e 7, encontrando-se ocupado apenas o da posição 3.

Perante estes resultados concluímos que a substância em estudo é a 3-GLUCURONILQUERCETINA.

5.8. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA C5

A substância apresenta as características cromatográficas (QUADRO XXII) de Ácido clorogénico já identificado nas espécies botânicas anteriormente estudadas e após cristalização do metanol, forneceu cristais brancos.

A cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, da substância em estudo com uma amostra de Ácido clorogénico padrão, forneceu sempre uma única mancha.

O espectro de U.V. da substância em estudo é também sobreponível ao obtido com o padrão.

Em face destes resultados, considerámos a substância em análise identificada como sendo o ÁCIDO CLOROGÊNICO ou Ácido 3-cafeilquínico.

5.9. - ESTUDO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA C6

Após cristalização do metanol a substância apresenta-se sob a forma de cristais amarelo-dourados.

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr de laranja

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,40
Solução a 15% de ácido acético	0,50
Água destilada	0,27
Fenol-água (3:1)	0,45

A substância apresentava as mesmas cores e valores de Rf que uma amostra de Rutina padrão e em cromatografia cruzada com esta originou uma única mancha.

b) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE U.V.-VISÍVEL

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MAXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	265	302 inf		360
MeOH+NaOMe	272	330		420 (não dec.)
MeOH+$AlCl_3$	278	305 inf		435
MeOH+$AlCl_3$+HCl	273	300 inf	370	405
MeOH+NaOAC	273	325	400	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	262	300	385	

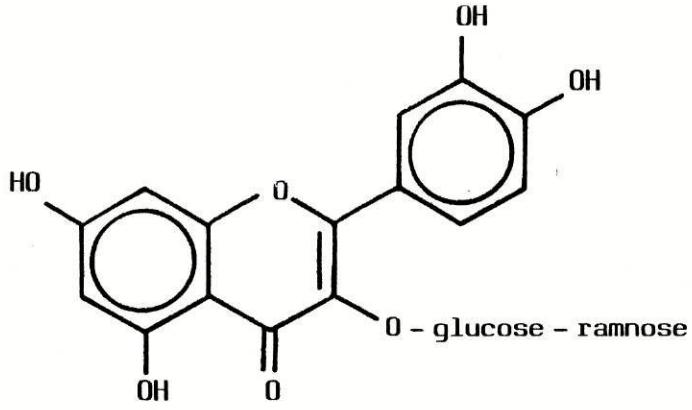
Os valores obtidos são idênticos aos publicados para a Rutina (18).

c) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE I.V.

O espectro obtido é idêntico ao publicado para a Rutina (19).

DISCUSSÃO

Em face dos resultados obtidos considerámos a substância em análise identificada como sendo a RUTINA ou 3-Ramnoglucosilquercetina.



6 Estudo de *H. elodes* L.

6. - ESTUDO DE *H. ELODES* L.

6.1. - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

A partir de 200 g de planta e pela aplicação da técnica já descrita, obtivemos um extracto de côr amarela acastanhada.

6.2. - CROMATOGRAFIA ANALITICA DO EXTRACTO

O extracto obtido foi sujeito a duas cromatografias analíticas bidimensionais utilizando os pares de desenvolventes B.A.A./HOAC 15% e B.A.A./H_2O, nas condições experimentais habituais.

Nas Figs. 6.1. e 6.2. estão representados os esquemas dos cromatogramas obtidos e no QUADRO XXIII estão registadas as características das manchas observadas.

6.3. - ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

A partir do extracto obtido, e por aplicação das técnicas habituais, isolámos as substâncias correspondentes às manchas E1, E2, E3, E4, E5 e E6.

6.4. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA E1

A substância apresenta-se sob a forma de cristais de côr amarela esverdeada.

O seu comportamento cromatográfico, registado no QUADRO XXIII, fez-nos pôr a hipótese de estarmos em presença de Quercetina e, assim, procedemos a cromatografia cruzada da substância em análise com uma amostra de Quercetina padrão. Em todos os desenvolventes ensaiados obtivemos sempre uma única mancha.

Por outro lado, os seus espectros de U.V.-visível e I.V. são sobreponíveis aos obtidos a partir do padrão.

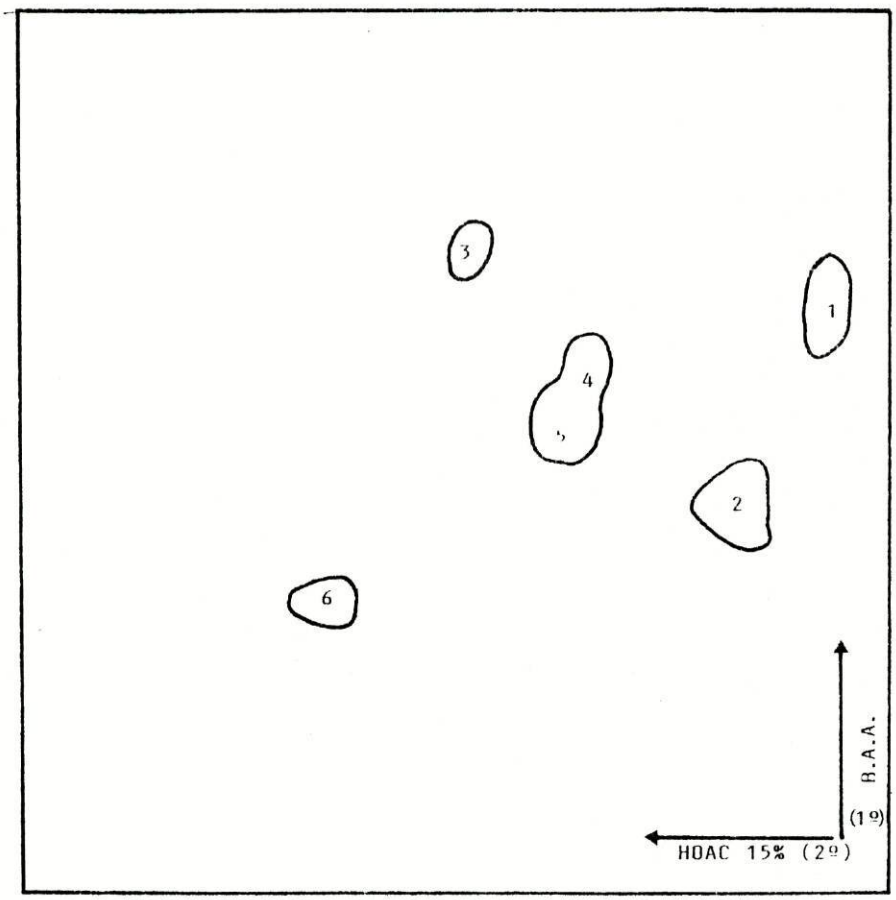


Fig. 6.1 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE

H. elodes L.

(B.A.A./HOAc 15 %)

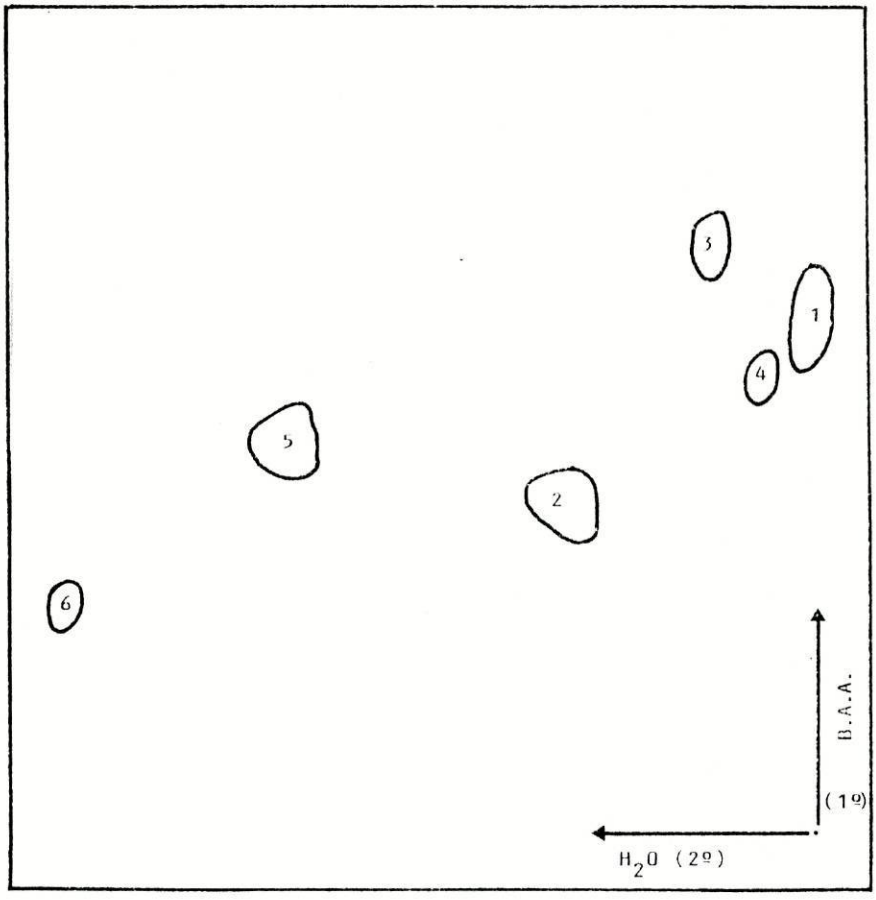


Fig. 6 .2 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE *H. elodes* L.

(B.A.A. / H_2O)

Q U A D R O XXIII

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DAS MANCHAS OBSERVADAS NAS FIGS. 6.1. e 6.2.

MANCHA Nº	COLORAÇÃO					Valor de Rf × 100			Intensidade Relativa
	Luz visível	Luz U.V. de 366 nm				B.A.A.	HOAC 15%	H_2O	
	C/NH_3	S/NH_3	C/NH_3	$AlCl_3$	N.A.				
E 1	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	64	0	0	++
E 2	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Amarela Esverdeada	40	15	35	+
E 3	-	-	-	Amarela Fluoresc.	Laranja	72	46	13	+
E 4	-	-	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	54	33	7	+
E 5	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	50	35	67	++
E 6	-	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Amarela Esverdeada	28	65	90	++

Perante os resultados referidos, considerámos a substância identificada como sendo a QUERCETINA.

6.5. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA E2

A substância em questão foi obtida em quantidades reduzidas não sendo possível cristalizá-la. Foi, portanto, a partir da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa que executamos os diversos ensaios.

A substância apresentava um comportamento cromatográfico (QUADRO XXIII) que fazia lembrar o da substância U3 isolada de *H. undulatum* (págs.128-9) e, assim, dada a exiguidade de substância disponível, orientámos os nossos ensaios no sentido de confirmar a identidade das duas substâncias.

A cromatografia cruzada da substância em análise com a substância U3, nos desenvolventes referidos na pág. 129, forneceu sempre uma única mancha e o espectro de U.V.-visível agora obtido é sobreponível ao publicado na Fig. 4.3..

Foi ainda possível fazer um ensaio de hidrólise em que foi detectado quercetina e ião sulfato, conforme está referido na pág. 132.

Em face destes resultados, considerámos a substância em análise idêntica à Quercetina sulfatada já isolada de *H. undulatum*, mas na impossibilidade de levar os ensaios mais adiante, a sua completa identificação ficou ainda por fazer.

6.6. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA E3

A substância cristalizou a partir da sua solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa sob a forma de cristais amarelos.

As características cromatográficas, registadas no QUADRO XXIII são idênticas às de Quercetrina já caracterizada em todas as espécies anteriormente referidas e a cromatografia cruzada com uma amostra de Quercetrina padrão

forneceu sempre uma única mancha.

O espectro de U.V.-visível obtido com a substância em análise é sobreponível ao obtido a partir da do padrão e quando sujeita a hidrólise ácida a substância origina Quercetina e Ramnose.

Em face dos resultados acabados de referir, considerámos a substância em questão identificada como sendo a QUERCETRINA (3-Ramnosilquercetina).

6.7. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA E4

A substância em análise, quando sujeita a hidrólise ácida liberta Quercetina e Glucose e as suas características cromatográficas são idênticas às da Isoquercetrina (Quadro XXIII).

A cromatografia cruzada da substância em questão com uma amostra de Isoquercetrina padrão, forneceu sempre uma única mancha.

A identidade das duas substâncias foi ainda confirmada pela sobreponibilidade do espectro de I.V. obtidos com as duas substâncias em questão.

Em face dos resultados, considerámos a substância em estudo identificada como sendo a ISOQUERCETRINA (3-Glucosilquercetina).

6.8. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTANCIA CORRESPONDENTE A MANCHA E5

A substância cristalizou a partir da solução metanólica proveniente da cromatografia preparativa, sob a forma de cristais amarelo-acastanhados.

Quando sujeita a hidrólise ácida, a substância liberta Quercetina e Ácido glucurónico; por outro lado as suas características cromatográficas são idênticas às da 3-Glucuronilquercetina isolada de *H. calycinum*.

Assim, ensaiámos a cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, de produto em análise com aquele heterósido isolado de *H. calycinum* e

obtivemos, em todas as circunstâncias, uma única mancha.

A identidade das duas substâncias foi ainda confirmada pela sobreponibilidade dos espectros de U.V.-visível registados para cada uma delas.

Perante estes resultados analíticos, considerámos a substância correspondente à mancha E5 identificada como sendo a 3-GLUCURONILQUERCETINA

6.9. - ESTUDO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA E6

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr amarela esverdeada

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,28
Solução a 15% de ácido acético	0,65
Solução a 60% de ácido acético	0,77
Água destilada	0,89

b) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO NO U.V.-VISÍVEL

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	268	283 inf	350	
MeOH+NaOMe	275	325	400	(não dec.)
MeOH+$AlCl_3$	276	295 inf	350	400
MeOH+$AlCl_3$+HCl	276	295 inf	350	400
MeOH+NaOAC	275	310	390	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	268	295	352	

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 6.3.

c) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO NO I.V.

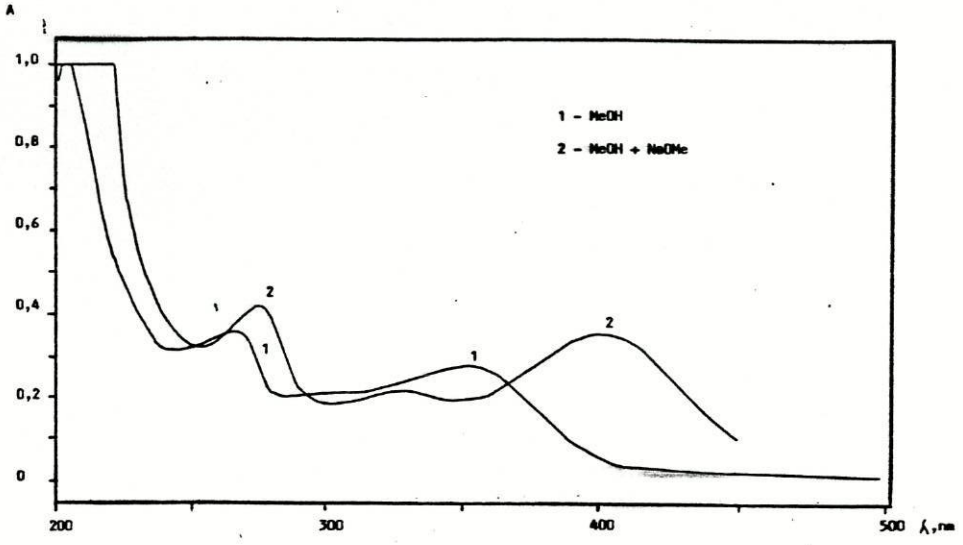
O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 6.4.

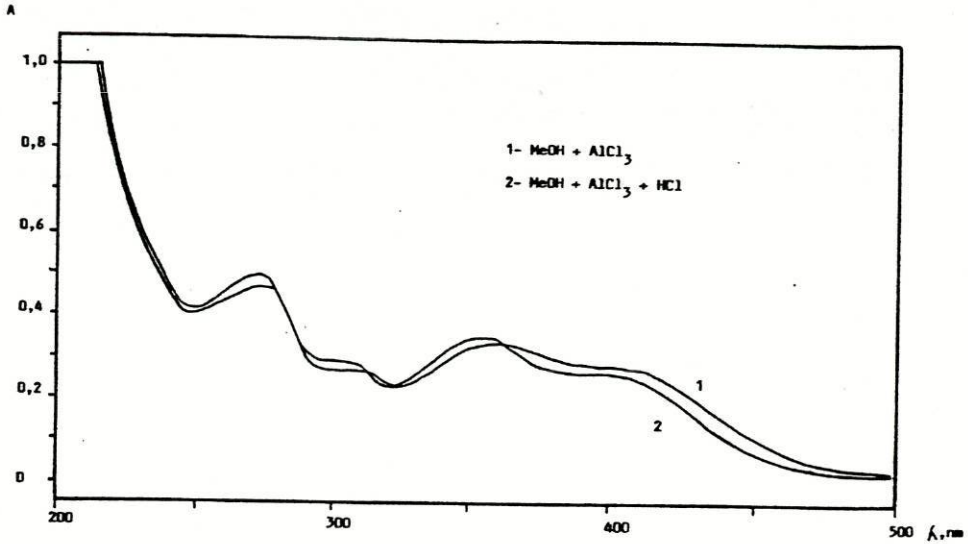
d) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

Após hidrólise ácida efectuada nos moldes descritos na pág. 60 , a fase orgânica obtida foi analisada, tendo-se encontrado uma substância que apresentava as características analíticas já descritas para a Quercetina.

Uma fracção da fase aquosa foi analisada por cromatografia em diversos desenvolventes, tendo-se encontrado, após revelação, duas manchas que apresentavam as colorações e valores de Rf característicos io ácido glucorónico e sua lactona.

A outra fracção da fase aquosa resultante da hidrólise, foi adicionada solução a 10% de $BaCl_2$, tendo-se formado um precipitado que atribuímos à presença, de ião sulfato na solução.





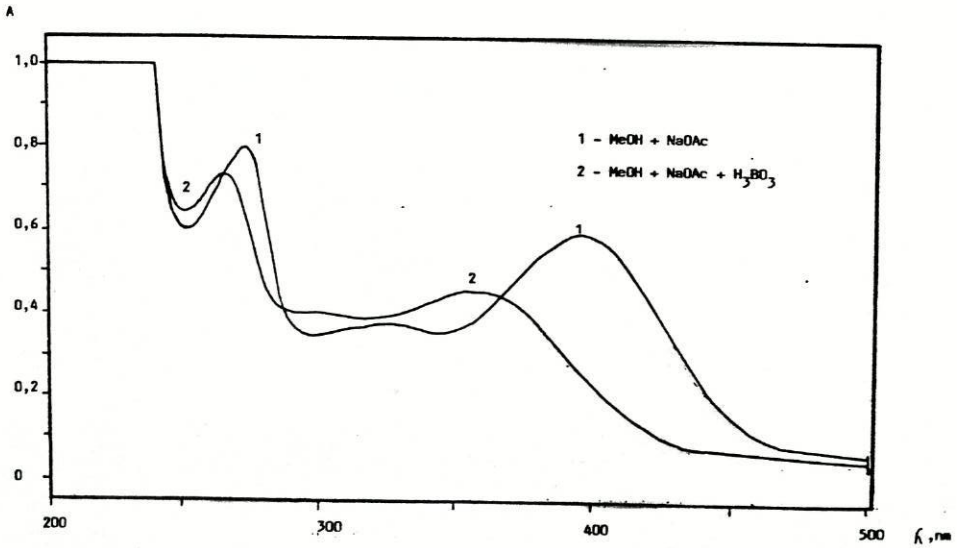


Fig. 6.3 - Espectro de U.V.-visível da substância E 6

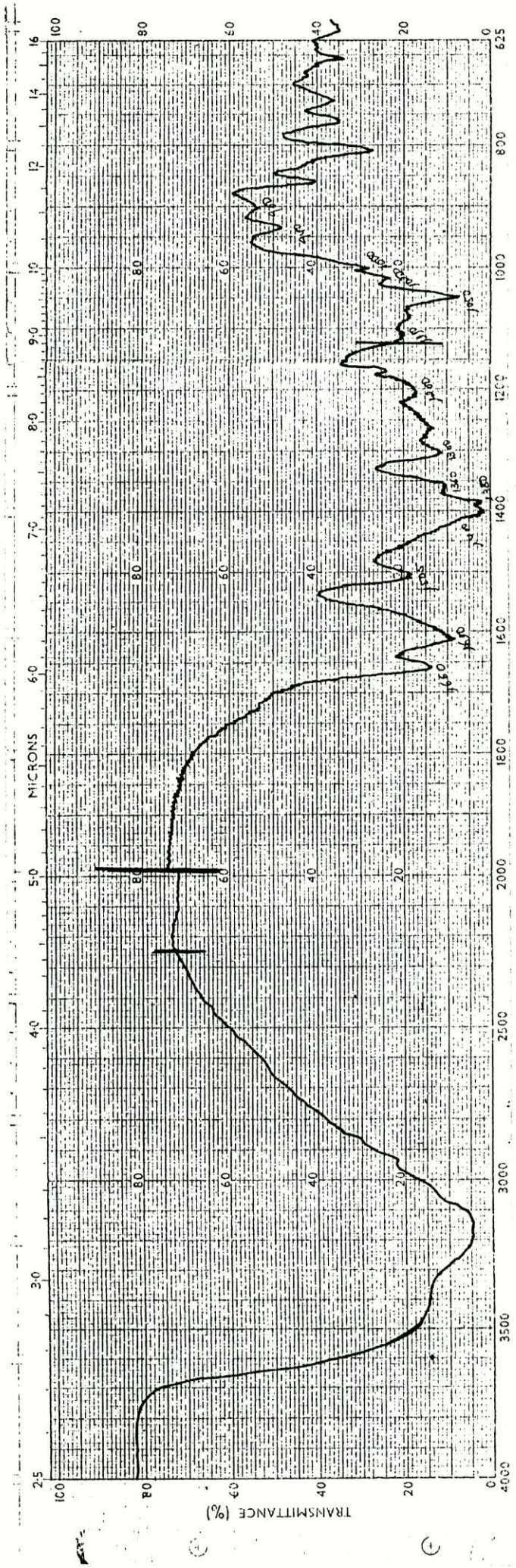


Fig. 6.4 - Espectro de I.V. da substância E 6.

e) - COMPORTAMENTO DA SUBSTÂNCIA EM SOLUÇÃO METANÓLICA

A substância correspondente à mancha E6, quando em solução metanólica, decompõe-se expontâneamente, ao fim de algum tempo, originando outra com todas as características analíticas da 3-Glucuronilquercetina, já descritas nas págs. 145-150.

Este comportamento é favorecido pela presença de meio ácido.

f) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 6.5. indicando a presença de uma substância com 21 carbonos, 15 dos quais com desvios químicos próprios de um flavonóide e 6 com características de um glícido.

g) - DISCUSSÃO

A substância em estudo é, pois, um derivado sulfatado da 3-Glucuronilquercetina uma vez que o espectro de I.V. apresenta uma banda em 1040 cm^{-1}, característico da presença de sulfato e que o ião sulfato foi também detectado na precipitação com solução de $BaCl_2$.

A análise do espectro de U.V. da substância, revela que se encontram livres os hidroxilos das posições 5, 7 e 4' da quercetina, daí que o radical sulfato só possa encontrar-se ligado na posição 3'. Este facto é também indicado pela ausência de coloração laranja nos cromatogramas revelados com N.A..

A análise do espectro de RMN ^{13}C comprova-nos esta estrutura, uma vez que apresenta apenas os 19 carbonos exigidos para a molécula da 3-Glucuronilquercetina, indicando, contudo, que a quercetina se encontra substituída em duas posições. No QUADRO XXIV estão registados os valores de RMN carbónico dos aneis A e C da substância em análise e da Quercetina, onde é possíl

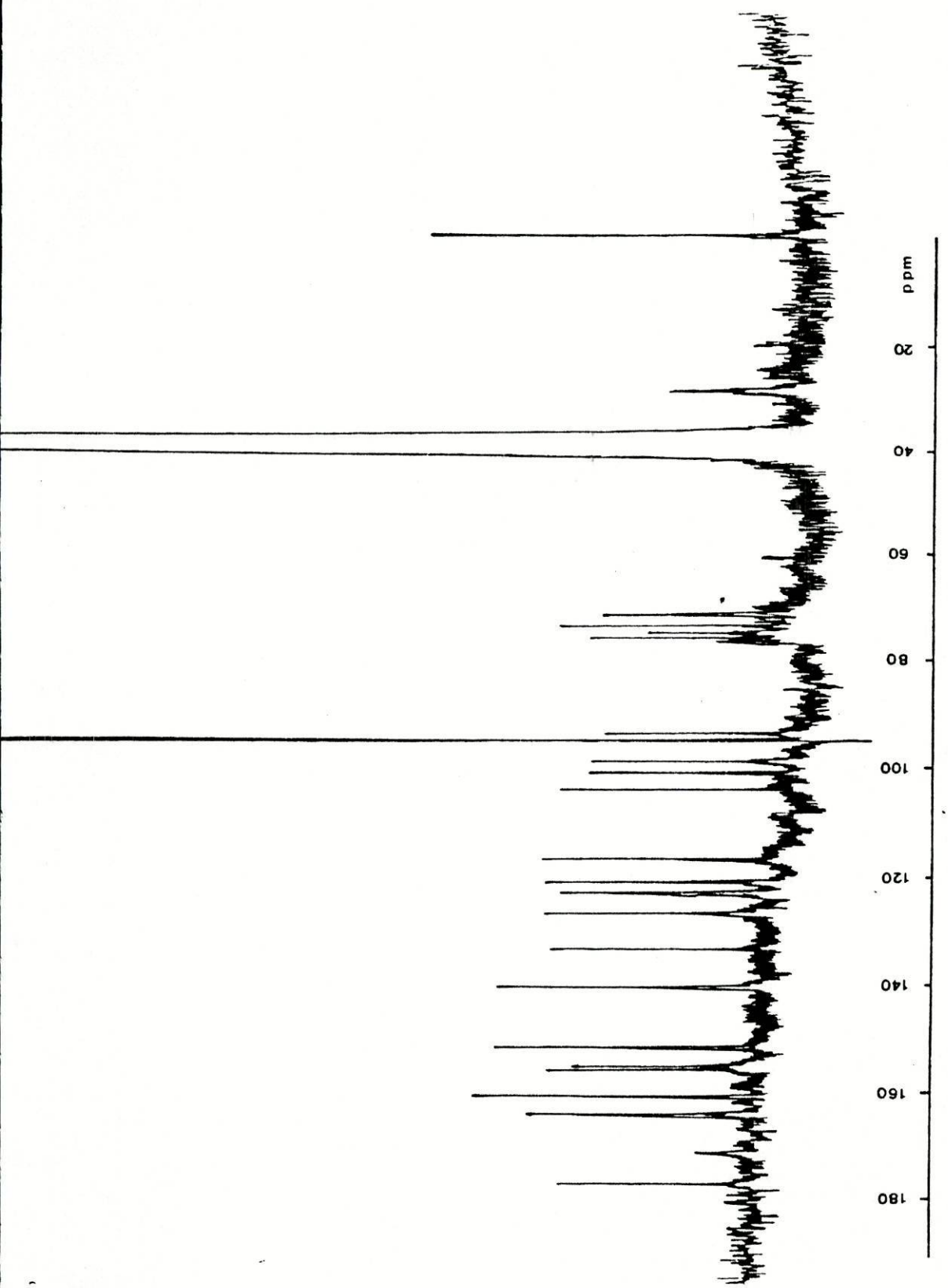


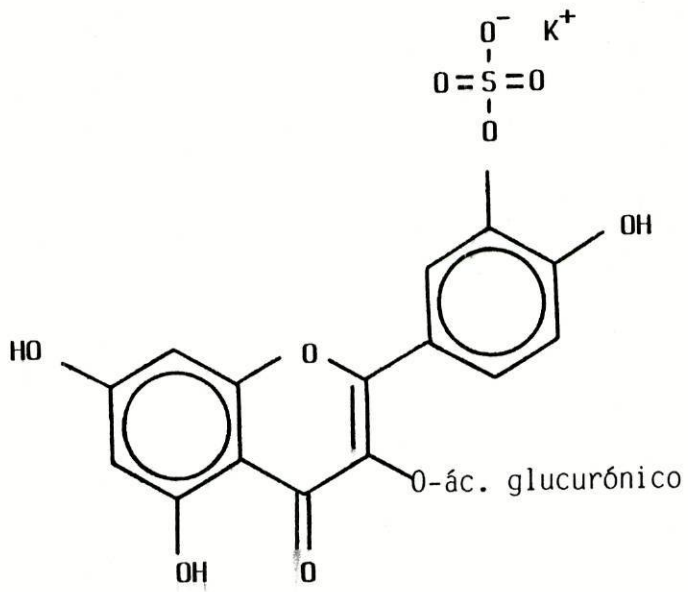
Fig. 6.5 - Espectro RMN ^{13}C da substância E 6

vel apreciar que o carbono 3 da substância em análise sofreu uma substituição, uma vez que foi deslocado para valores de campo mais altos.

De modo idêntico, podemos concluir que a posição 3' do anel B está ocupada, ao compararmos os valores obtidos para a RMN de carbono do anel B da substância em análise e da Quercetina, colocados no QUADRO XXV.

Os seis sinais que restam são os atribuídos à parte glucídica da molécula, observando-se em δ = 100,6 o sinal do carbono 1", característico de um O-glucósido, e em δ = 171 o sinal de carbono carbonílico*.

Em face destes resultados, considerámos a substância identificada como sendo o 3'-Sulfato de 3-Glucuronilquercetina e potássio



NOTA: - Por lapso não foi referida a identificação do ião potássio. Esta identificação foi executada de modo análogo à referida na pág.176 para a substância A8.

* - Os restantes sinais localizam-se em δ = 71,4; 73,35; 74,7 e 75,8.

Q U A D R O XXIV

VALORES DE RMN ^{13}C DOS CARBONOS DOS ANEIS A E C DA QUERCETINA E DA SUBSTÂNCIA E6

C Nº	Quercetina (20)	Substância em Análise
2	146,9	155,1
3	135,6	133,0
4	175,7	176,9
5	160,7	160,9
6	98,2	98,5
7	163,9	163,9
8	93,4	93,4
9	156,2	155,7
10	103,0	103,6

Q U A D R O XXV

VALORES DE RMN ^{13}C DOS CARBONOS DO ANEL B DA QUERCETINA E DA SUBSTÂNCIA E6

C Nº	Quercetina (20)	Substância em Análise
1'	122,0	122,7
2'	115,3	120,8
3'	145,0	140,1
4'	147,6	151,5
5'	115,6	116,5
6'	120,0	126,3

7 Estudo *H. androsaemum* L.

7. - ESTUDO DE *H. ANDROSAEMUM* L.

7.1. - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

A partir de 200 g de planta, e utilizando a técnica habitual, obtivemos um extracto de côr verde escura.

7.2. - CROMATOGRAFIA ANALÍTICA DO EXTRACTO

O extracto obtido foi analisado em cromatografia analítica bidimensional em dois pares de desenvolventes, B.A.A./HOAC 15% e B.A.A./H_2O, nas condições experimentais habituais.

Nas Figs. 7.1. e 7.2. estão representados os esquemas dos cromatogramas obtidos e no QUADRO XXVI estão registadas as características cromatográficas das manchas observadas.

7.3. - ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

A partir do extracto obtido, e por aplicação das técnicas de isolamento e purificação já referidas, isolámos as substâncias correspondentes às manchas A1, A3, A4, A5, A6, A7 e A8.

7.4. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA A1

A substância correspondente à mancha A1 apresentava as colorações e valores de Rf (QUADRO XXVI) características de Quercetina e, após isolamento e cristalização a partir da sua solução metanólica, apresentava-se sob a forma de cristais amarelo esverdeados.

Os espectros de I.V. e de U.V.-visível obtidos com esta substância são coincidentes com os obtidos a partir de uma amostra de Quercetina padrão.

A identificação foi ainda completada pela cromatografia cruzada, em

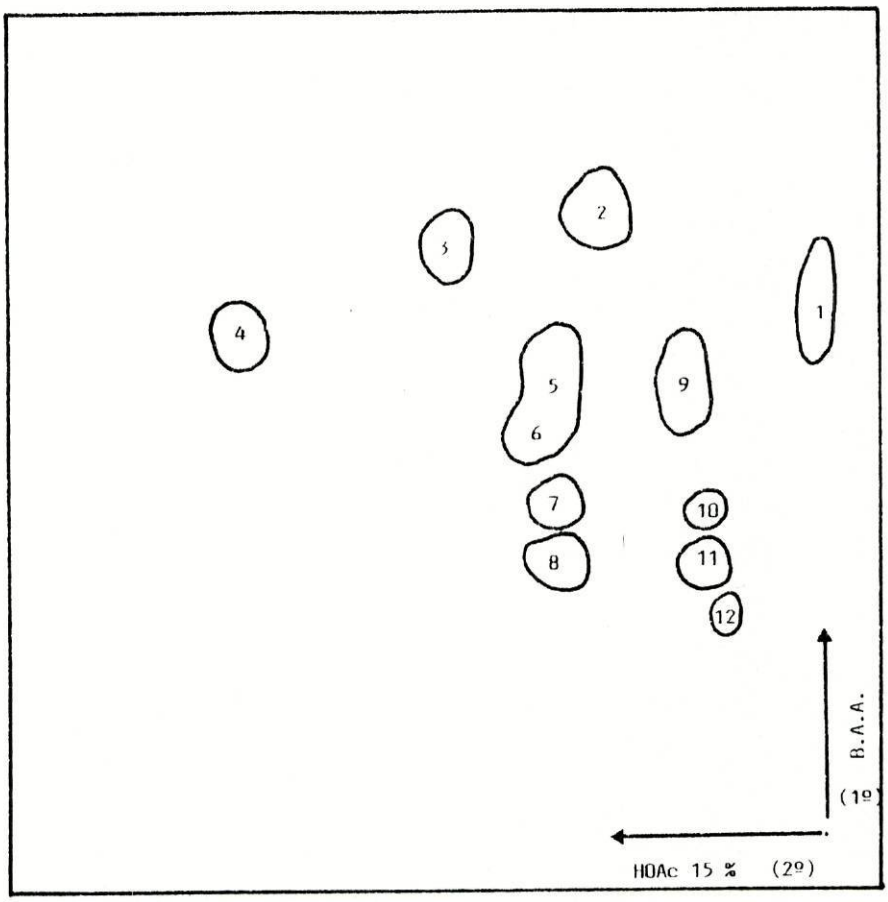


Fig. 7.1 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE *H. androsaemum* L.

(B.A.A./ HOAc 15 %)

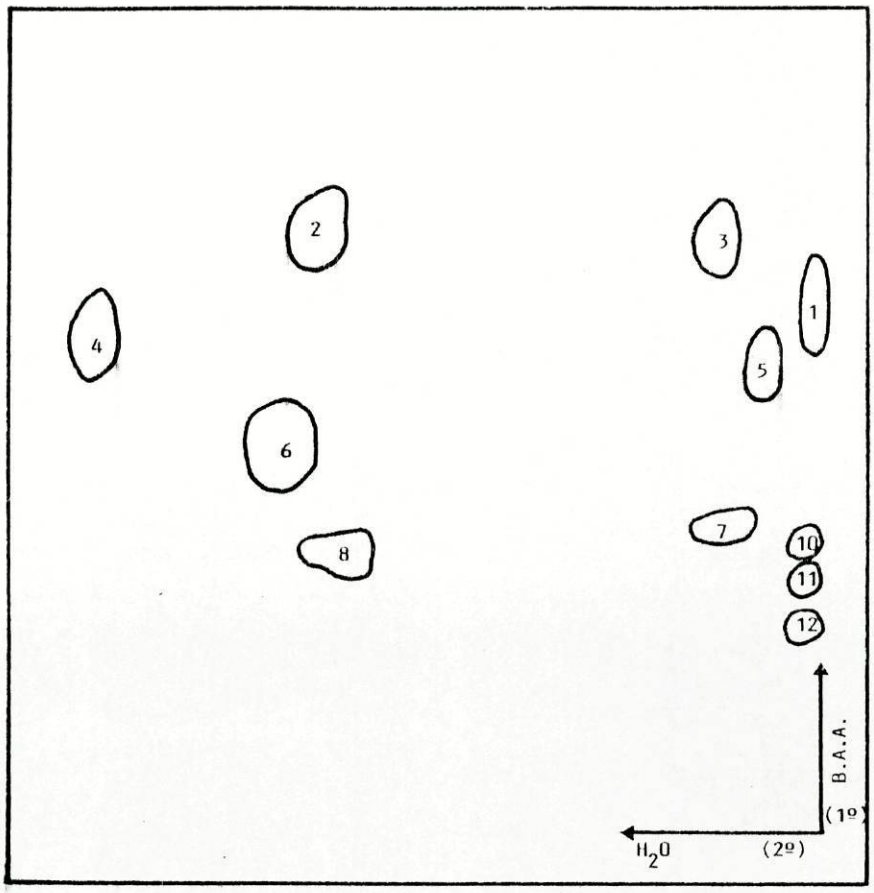


Fig 7.2 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE *H. androsaemum* L.

(B.A.A./H_2O)

Q U A D R O XXVI

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DAS MANCHAS OBSERVADAS NAS FIGS. 7.1. e 7.2.

MANCHA Nº	COLORAÇÃO					Valor de Rf × 100			Intensidade Relativa
	Luz visível	Luz U.V. de 366 nm				B.A.A.	HOAC 15%	H_2O	
	C/NH_3	S/NH_3	C/NH_3	$AlCl_3$	N.A.				
A 1	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	65	0	0	++
A 2	-	-	Azul	Azul	Azul	76	28	62	+
A 3	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	72	47	14	++
A 4	Amarela	Azul Lilás	Verde Amarelada	Amarela Esverdeada	Amarela Esverdeada	62	72	90	++
A 5	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	56	34	8	+++
A 6	-	-	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	50	35	67	+
A 7	-	Amarela	Amarela Fluoresc.	Azul Fluoresc.	Amarela Esverdeada	41	35	13	++
A 8	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	33	35	62	+++
A 9	-	-	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	55	17	-	+
A 10	-	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela Esverdeada	39	14	2	+
A 11	-	Laranja	Laranja	Laranja	Laranja	32	16	2	+
A 12	-	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela Esverdeada	26	12	3	+

diversos desenvolventes, obtendo-se em todas as circunstâncias, uma única mancha.

Perante os resultados descritos considerámos que a substância correspondente à mancha A1 é a QUERCETINA.

7.5. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA A3

Ao observarmos as Figs. 7.1. e 7.2. e o QUADRO XXVI, podemos notar que a mancha A3 apresenta todas as características da Quercetrina e, assim, após isolamento, o primeiro ensaio de identificação que executámos foi a cromatografia cruzada, em diversos desenvolventes, com uma amostra de Quercetrina padrão, obtendo-se, em todos os casos, uma única mancha.

A identificação da substância em análise foi completada pelo ensaio de hidrólise ácida, em que encontrámos, conforme previámos, quercetina e ramnose.

Perante estes resultados, considerámos a substância identificada como sendo a QUERCETRINA (3-Ramnosilquercetina).

7.6. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA A4

A substância em questão apresenta as características cromatográficas (QUADRO XXVI) do Ácido clorogénico já identificado ao longo deste trabalho em diversas espécies. Após isolamento, foi ensaiada a cromatografia cruzada com o padrão de Ácido clorogénico, encontrando-se, em todos os desenvolventes, uma única mancha.

A identificação da substância em estudo, como sendo a ÁCIDO CLOROGÉNICO, foi completada pela sobreponibilidade dos espectros de I.V. obtidos a partir do padrão e da substância em análise.

7.7. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA A5

As características cromatográficas descritas no QUADRO XXVI para esta mancha fizeram-nos pôr a hipótese de estarmos perante um monoglicósido da Quercetina em C3, mais concretamente, perante a Isoquercetrina (3-Glucosilquercetina) ou Hiperósido (3-Galactosilquercetina).

Qualquer tentativa de identificação a partir da cromatografia cruzada com aquelas substâncias padrão resultou infrutífera, uma vez que elas têm exactamente o mesmo comportamento cromatográfico, o mesmo acontecendo com a análise do espectro de U.V.-visível obtido.

O único ensaio elucidativo neste caso é o estudo dos produtos fornecidos pela hidrólise ácida. O ensaio foi executado, tendo nós detectado Quercetina como único produto na fase orgânica, e Glucose e Galactose como açúcares presentes na fase aquosa, existindo estes dois açúcares em proporções muito semelhantes.

Perante estes resultados, considerámos que o produto em análise é formado pela mistura, em partes aproximadamente iguais, de ISOQUERCETRINA e de HIPERÓSIDO.

7.8. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA A6

A substância correspondente a esta mancha liberta, por hidrólise, Quercetina e Ácido glucurónico.

Quer as características cromatográficas da substância quer as do seu espectro de U.V.-visível revelam que o ácido glucurónico se encontra ligado à genina através do hidroxilo em posição 3 desta última.

A cromatografia cruzada da substância em análise com a 3-Glucuronilquercetina isolada de *H. calycinum*, em diversos desenvolventes, originou sempre uma única mancha.

Em face dos resultados obtidos considerámos a substância identificada como sendo a 3-GLUCURONILQUERCETINA.

7.9. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA A7

A substância em análise apresenta as características cromatográficas da Mangiferina e em cromatografia cruzada com esta xantona, em diversos desenvolventes, originou sempre uma única mancha.

O espectro de U.V.-visível obtido com a substância em análise tem as características do espectro de uma xantona e é sobreponível ao obtido com a Mangiferina isolada de *H. pulchrum*.

Em face destes resultados considerámos a substância em estudo identificada como sendo MANGIFERINA.

7.10. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA A8

a) - CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Revelação à luz U.V. de 366 nm:

sem NH_3: côr castanha escura

com NH_3: côr amarela escura

com $AlCl_3$: côr amarela fluorescente

com N.A. : côr de laranja

Determinação dos valores de Rf:

(placa de celulose)

Butanol-ácido acético-água (6:1:2)	0,33
Solução a 15% de ácido acético	0,36
Solução a 60% de ácido acético	0,63
Água destilada	0,62

(placa de poliamida)

Água-etanol-acetilacetona(4:2:1)	0,0

b) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE U.V.-VISÍVEL

SOLVENTE	COMPRIMENTO DE ONDA DOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO (nm)			
MeOH	255	265 inf	295 inf	350
MeOH+NaOMe	270	325	405 (não dec.)	
MeOH+$AlCl_3$	275	340	435	
MeOH+$AlCl_3$+HCl	270	300	360	395
MeOH+NaOAC	273	325	400	
MeOH+NaOAC+H_3BO_3	260	300	380	

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 7.3.. Quando registado em metanol os valores de log ε são os seguintes: log $\varepsilon_{(255)}$ = 4,217 e log $\varepsilon_{(350)}$ = 4,176.

c) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE I.V.

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 7.4..

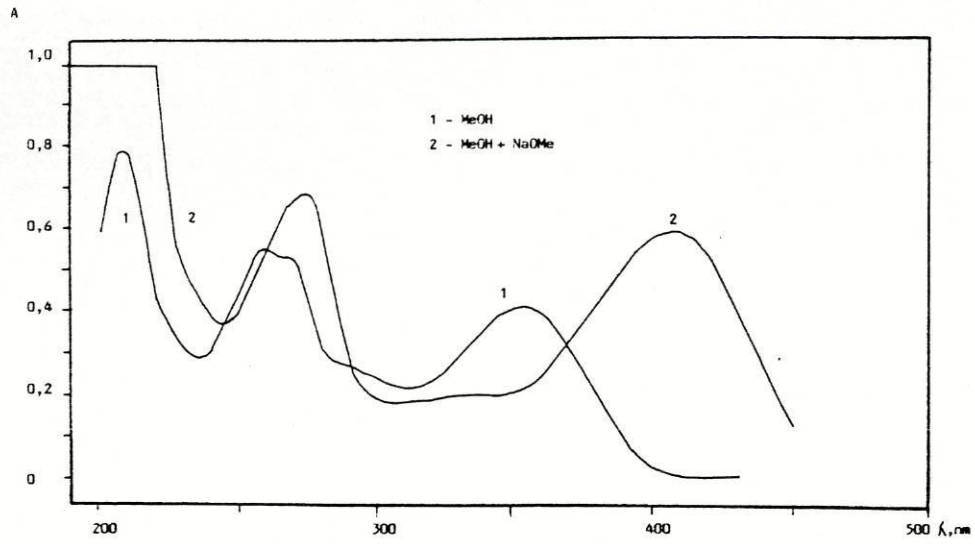
d) - PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA

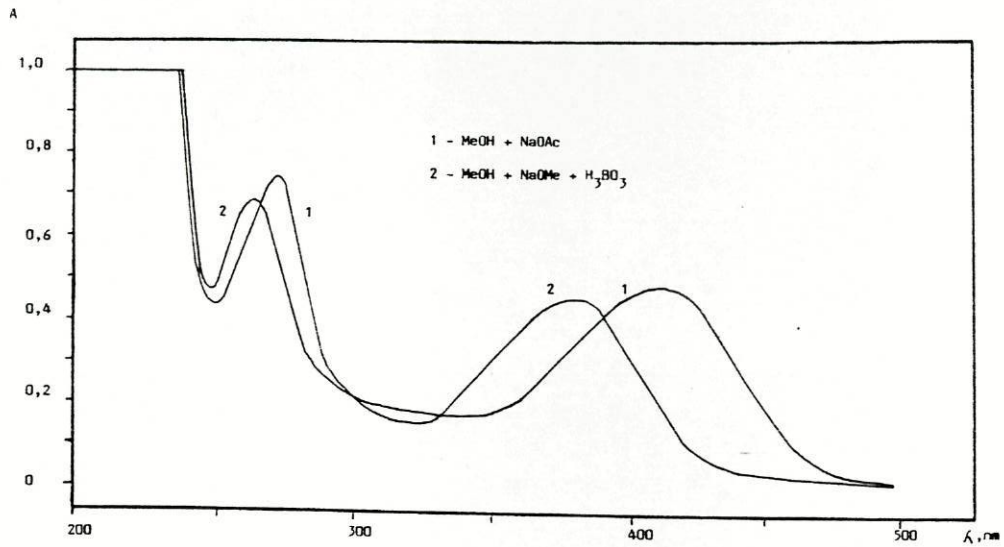
Após hidrólise ácida, efectuada nos moldes já descritos, a fase orgânica foi analisada, tendo-se detectado uma substância que apresenta as características analíticas já descritas para a quercetina

A análise cromatográfica da fase aquosa não revelou existência de açúcares.

Porém, quando uma parte dessa solução aquosa foi adicionada de solução a 10% de $BaCl_2$, obteve-se um precipitado que atribuímos à presença em solução de ião sulfato resultante da hidrólise da substância em análise.

Numa outra fracção da solução aquosa resultante do ensaio de hidrólise, foram doseados por espectrofotometria de chama o potássio e o sódio,





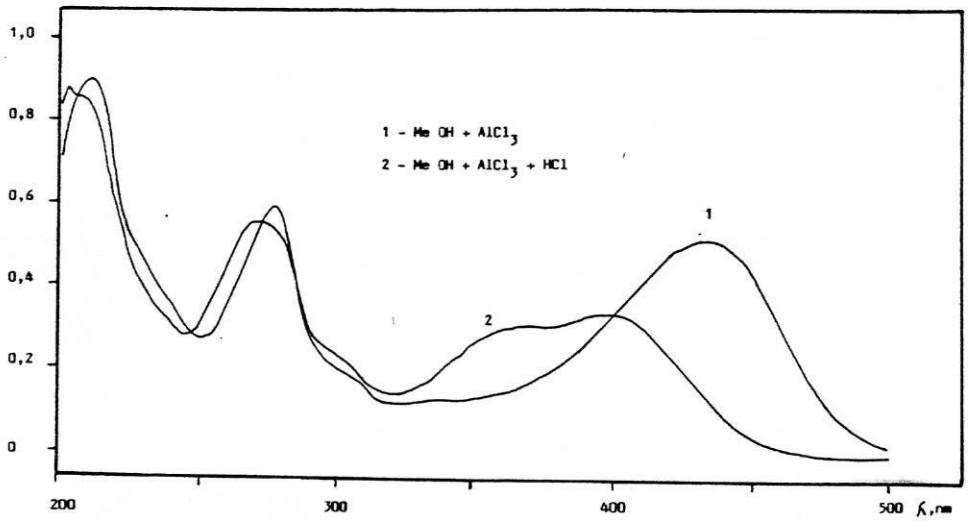


Fig. 7.3 - Espectro de U.V.-visível da substância A 8

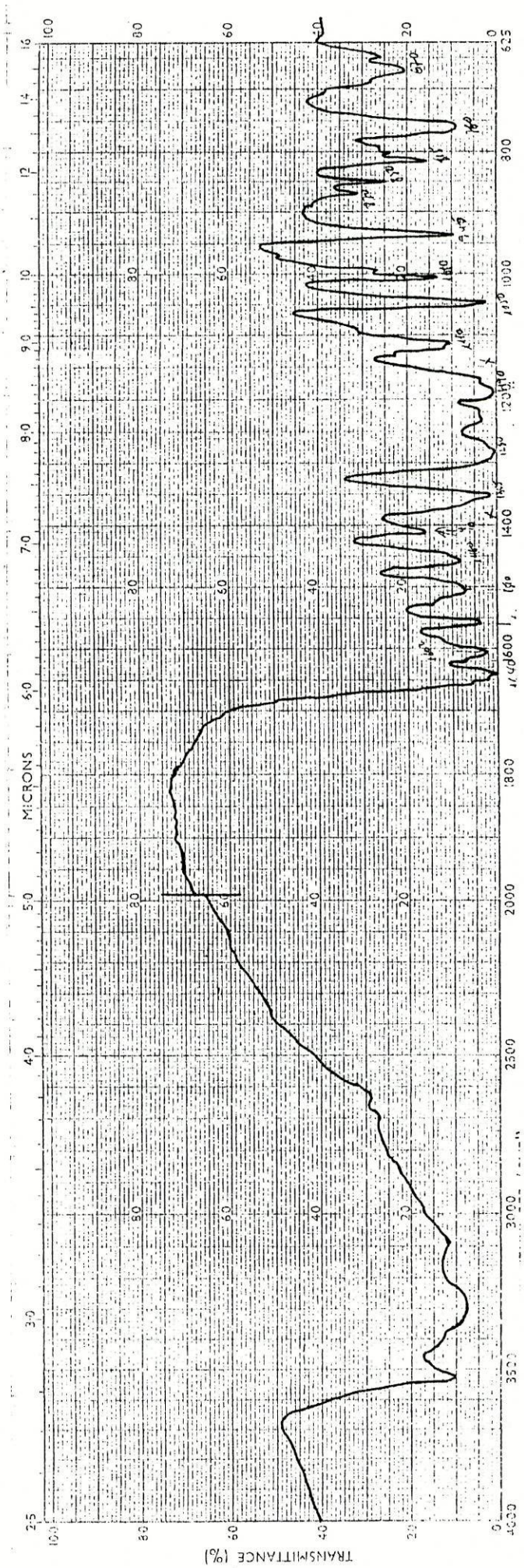


Fig. 7.4 - Espectro de I.V. da substância A 8.

e, por espectrofotometria de absorção atómica o cálcio, obtendo-se valores insignificantes para os dois últimos elementos relativamente aos valores obtidos para o potássio.

e) - CARACTERÍSTICAS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C

O espectro obtido encontra-se reproduzido na Fig. 7.5. e revela-nos a presença de 15 carbonos na molécula.

f) - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A substância em análise é, pois, um derivado da quercetina, não apresentando contudo mais carbonos que os exigidos por esta substância. Tal facto, aliado à presença de sulfato, revelado quer pela precipitação com solução de $BaCl_2$, quer pela presença, no espectro de I.V., de uma banda em 1040 cm^{-1}, leva-nos a concluir estarmos em presença de quercetina sulfatada.

O local de ligação do radical sulfato à molécula de quercetina é-nos indicada pela análise dos espectros de U.V.-visível e de RMN carbónica. Assim:

1. - O espectro de U.V.-visível revela que a quercetina apresenta todos os hidroxilos livres à excepção do hidroxilo em posição 3. (O espectro apresenta as características de todos os derivados 3-glucosilados já aqui referidos).

2. - O espectro de RMN ^{13}C é idêntico ao publicado anteriormente para a 3-sulfato de quercetina (21), cujos valores estão inscritos no QUADRO XXVII, os quais, conforme se pode apreciar no mesmo quadro, são semelhantes aos de um derivado glucosilado.

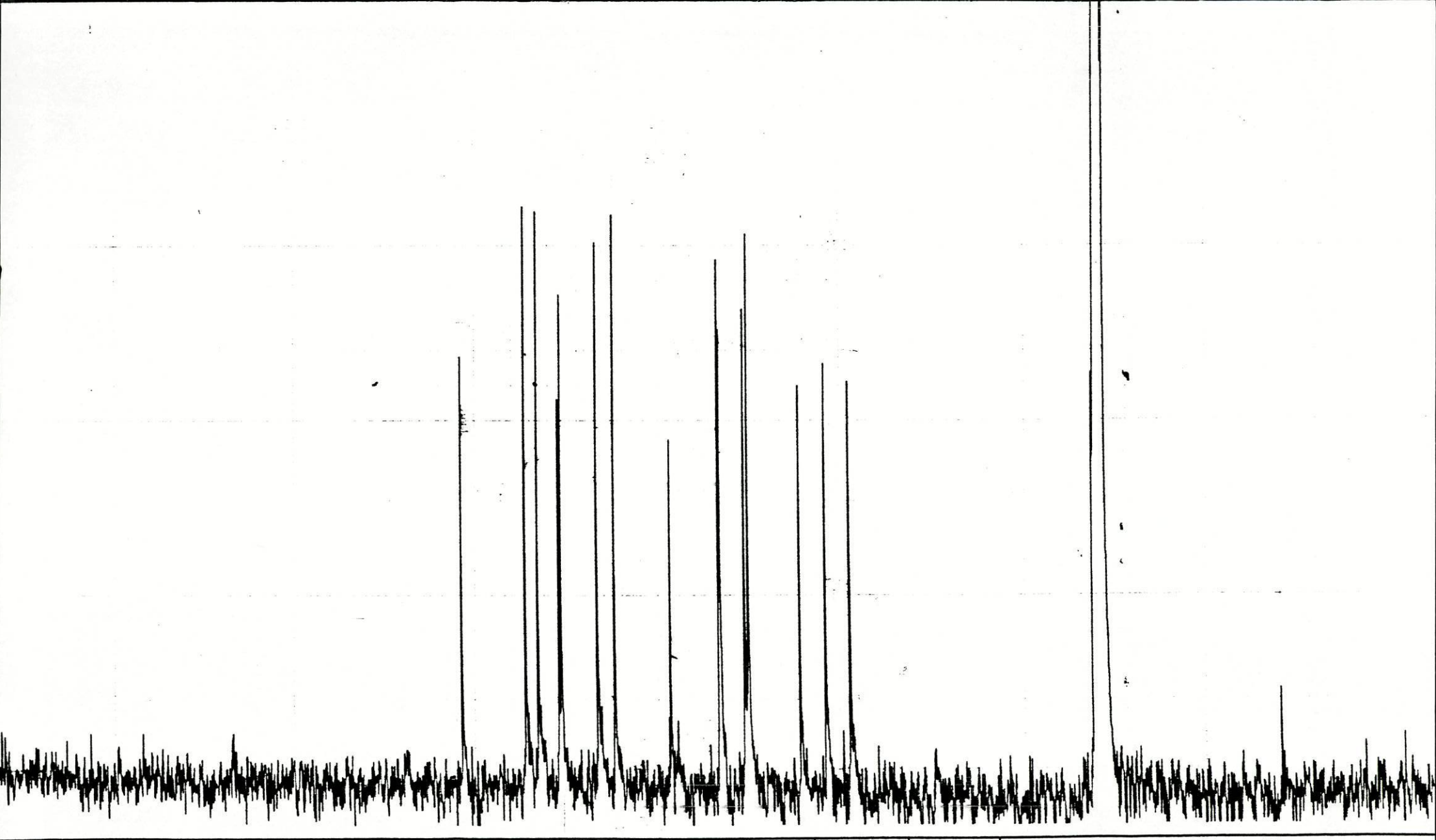


Fig. 7.5 - Espectro de RMN ^{13}C da substância A 8

Q U A D R O XXVII

COMPARAÇÃO DOS VALORES DE δ RELATIVAMENTE AO TMS, PARA A QUERCETINA E DOIS DOS SEUS DERIVADOS EM POSIÇÃO 3

Carbono Nº	Quercetina (20)	3-Glucosil quercetina (20)	3-Sulfato de quercetina (21)	Substância em Análise
2	146,9	156,5	156,6	156,2
3	135,6	133,7	132,3	132,2
4	175,7	177,6	177,7	177,7
5	160,7	161,3	161,3	161,2
6	98,2	98,8	98,4	98,5
7	163,9	164,2	163,9	164,0
8	93,4	93,6	93,3	93,4
9	156,2	156,5	156,1	156,9
10	103,0	104,2	104,1	104,5
1'	122,0	121,6	121,6	121,7
2'	115,3	115,3	115,1	115,2
3'	145,0	144,8	144,7	144,8
4'	147,6	148,5	148,3	148,5
5'	115,6	116,3	115,9	116,1
6'	120,0	121,6	121,6	121,4

Em face destes resultados considerámos a substância correspondente à mancha A7 identificada como sendo o 3-SULFATO DE QUERCETINA e POTÁSSIO.

8. Estudo de *H. humifusum* L.

8. - ESTUDO DE *H. HUMIFUSUM* L.

8.1. - PREPARAÇÃO E ANÁLISE DO EXTRACTO

A partir de 2 g de planta, previamente desengordurada, preparámos um extracto metanólico. Este extracto apresentava-se fortemente corado de vermelho e, quando analisado em cromatografia bidimensional no par de desenvolventes B.A.A./HOAC 15%, forneceu um cromatograma cujo esquema está reproduzido na Fig. 8.1.. As características das manchas aí observadas estão registadas no QUADRO XXVIII.

Uma análise desse QUADRO mostra que as manchas H5, H9 e H10 têm características de compostos antociânicos.

Como de momento não era nosso objectivo o estudo de compostos desse tipo, ensaiámos, com nova porção de 2 g de planta, a extracção com acetato de etilo. Este extracto apresentava-se corado de verde acastanhado e a sua análise cromatográfica, executada nas condições acima referidas, revelou, como únicas diferenças relativamente à anterior, a ausência das manchas H5, H9 e H10 e um enfraquecimento relativo das manchas H1 e H2.

Perante estes factos decidimos utilizar o acetato de etilo como líquido extractivo para os 100 g de planta de que dispúnhamos, uma vez que se tornava mais fácil trabalhar com este extracto do que com o extracto metanólico.

8.2. - ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

A partir do extracto acetato de etilo, e utilizando as técnicas de isolamento descritas no Capº. III, isolámos as substâncias correspondentes às manchas H 1-2, H3, H4, H6 e H8.

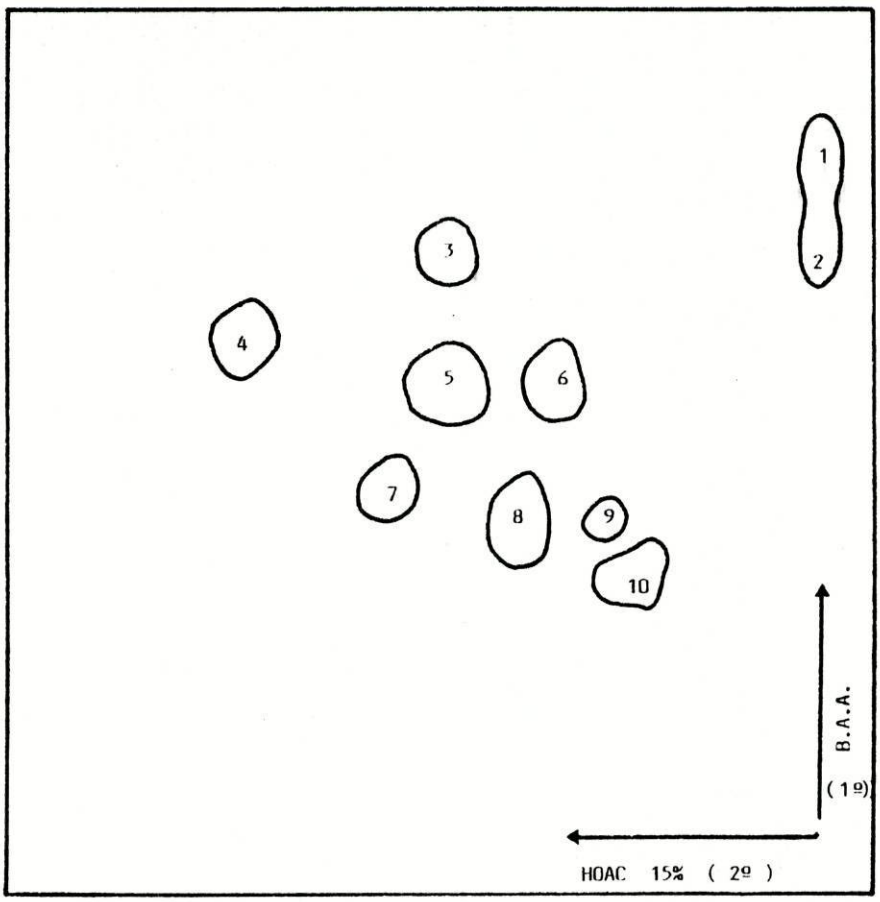


Fig. 8.1 : CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DO EXTRACTO METANÓLICO DE *H. humifusum* L.
(B.A.A./HOAc 15 %)

Q U A D R O XXVIII

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DAS MANCHAS OBSERVADAS NA FIG. 8.1.

MANCHA Nº	COLORAÇÃO						Valor de Rf × 100		Intensidade Relativa
	Luz visível		Luz U.V. de 366 nm				B.A.A.	HOAC 15%	
	S/NH_3	C/NH_3	S/NH_3	C/NH_3	$AlCl_3$	N.A.			
H 1	-	-	Vermelha	Vermelha	Vermelha	Vermelha	83	0	+
H 2	-	-	Vermelha	Vermelha	Vermelha	Vermelha	73	0	+
H 3	-	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	72	48	+++
H 4	-	Amarela	Azul Lilás	Verde Amarelada	Amarela Esverdeada	Amarela Esverdeada	63	72	++
H 5	Vermelha	Azul	Violeta	Violeta Escuro	Violeta	Violeta	56	48	++
H 6	-	Amarela	Castanha	Amarela	Amarela Fluoresc.	Laranja	56	34	+++
H 7	-	-	Amarela Azulada	Amarela Azulada	Amarela Azulada	Azul Esverdeada	45	54	+
H 8	-	Amarela	Amarela	Amarela Fluoresc.	Azul Fluoresc.	Amarela Esverdeada	42	36	+++
H 9	Vermelha	Azul	Violeta	Violeta Escuro	Violeta	Violeta	39	27	+
H 10	Vermelha	Azul	Violeta	Violeta Escuro	Violeta	Violeta	32	25	++

8.3. - CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS CORRESPONDENTES ÀS MANCHAS H1-2

Conforme se pode apreciar na Fig. 8.1. a mancha H1-2 parece corresponder não a uma, mas a duas substâncias, de comportamento cromatográfico muito semelhante, embora de Rf ligeiramente diferente no desenvolvente B.A.A..

As substâncias foram isoladas em conjunto e em quantidade muito reduzida, dada a sua fraca solubilidade em acetato de etilo.

As suas características de fluorescência em presença de ácido sulfúrico concentrado, solução aquosa alcalina e solventes orgânicos são as já descritas para as HIPERICINAS (pág. 10).

Em face destes resultados limitamo-nos a confirmar a presença de dois compostos deste tipo nesta espécie.

8.4. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA H3

A substância em análise apresentava as características cromatográficas de Quercetrina e, efectivamente, liberta, por hidrólise ácida, Quercetina e Ramnose.

As colorações da substância após aplicação dos diversos reveladores, bem como o espectro de U.V.-visível com ela obtido, revelam que a Ramnose se encontra ligada à Quercetina na sua posição 3.

As características de Rf encontradas (QUADRO XXVIII) são as de um 3-monoglicósido da quercetina e a cromatografia cruzada com Quercetrina padrão, em diversos desenvolventes, originou sempre uma única mancha.

Perante estes resultados considerámos a substância em análise identificada como sendo a QUERCETRINA.

8.5. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA H4

As características cromatográficas da substância em análise, registadas no QUADRO XXVIII, são idênticas às do Ácido clorogénico já caracterizado em diversas espécies aqui referidas, e a cromatografia cruzada com Ácido clorogénico padrão, forneceu, em diversas condições experimentais, uma única mancha.

O espectro de I.V. obtido para a substância em estudo é sobreponível com o obtido a partir de Ácido clorogénico padrão.

Em face destes resultados, concluímos que a substância em estudo é o ÁCIDO CLOROGÉNICO ou Acido 3-cafeilquínico.

8.6. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA H6

A substância apresentava-se sob a forma de cristais amarelo-dourados após cristalização a partir do metanol.

A hidrólise ácida liberta Quercetina e Galactose e, quer as características cromatográficas quer as características espectrais de U.V.-visível, revelam que a Galactose se encontra ligada à Quercetina através do seu hidroxilo em 3.

Os valores de Rf obtidos indicam tratar-se de um monoglucósido, sendo portanto a estrutura prevista a 3-Galactosilquercetina. Efectivamente, a cromatografia cruzada com padrão de Hiperósido (3-Galactosilquercetina) originou, em todas as circunstâncias ensaiadas, uma única mancha.

Perante os resultados obtidos, considerámos a substância em estudo caracterizada como sendo o HIPERÓSIDO (3-Galactosilquercetina), substância aliás, já descrita nesta espécie botânica (6).

8.7. - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CORRESPONDENTE À MANCHA H8

A substância, de aspecto amarelo avermelhado, tem o comportamento cromatográfico da Mangiferina, xantona já isolada nesta espécie botânica (6) e também por nós identificada no decorrer do nosso trabalho em *H. pulchrum*, *H. androsaemum* e *H. linorifolium*.

A cromatografia cruzada do produto agora obtido, com o isolado de *H. pulchrum*, originou, em diversos desenvolventes, sempre uma única mancha.

O espectro de U.V.-visível é característico de uma xantona e sobreponível ao registado na Fig. 2.11 para a Mangiferina.

Perante os resultados descritos, considerámos confirmada a presença de MANGIFERINA em *H. humifusum* L.

9. - BIBLIOGRAFIA

1. - MATHIS, C. e OURISSON, G.; Phytochemistry, 2, 157-71, (1963).

2. - MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R.: The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin, 1970, pág. 126.

3. - "SADTLER-Midget Edition", Sadtler Research Laboratories, U.S.A., 1966, espectro nº 1009.

4. - MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 255.

5. - MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 268.

6. - LEBRETON, P. e BOUCHEZ, M-P.: Plantes Médicinales et Phytotherapie, 1(4), 188-200 (1967).

7. - MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 129.

8. - "SADTLER-Midget Edition", op. cit., espectro nº 809.

9. - RIBÉREAU-GAYON, P.: Lés Composés Phénoliques des Végéteaux, Dunod, Paris, 1968, pág. 91.

10. - SCARPATI, M.L. e ESPOSITO, P.: Tetrahedron Letters, 18, 1147-50 (1963).

11. - ROBERTS, J.C.; Chemical Reviews, 4, 591-605 (1961).

12. - HOSTETTMANN, K. e WAGNER, H.: Phytochemistry, 16, 821-9 (1977).

13. - CASTELÃO, J.F., GOTTLIEB, O.R. et al.: Phytochemistry, 16, 735-40 (1977).

14. - LEVY, G.C. e NELSON, G.L.: Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists, Wiley-Interscience, New York, 1972, pág. 81.

15. - MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. e CHARI, V.M.: The Flavonoids - Advances in Research, (editado por Harborne, J.B. e Mabry, T.J.), Chapman and Hall, London, 1982, pág. 74 e 80.

16. - PROX, A.: Tetrahedron, 24, 3697-3715 (1968).

17. - RIBÉREAU-GAYON, P., op. cit., pág. 129.

18. - MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 130.

19. - "SADTLER-Midget Edition", op. cit., espectro nº 11 488

20. - MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. e CHARI, V.M., op. cit., pág. 90.

21. - BARRON, D., COLEBROOK, L.D. e IBRAHIM, R.K., Phytochemistry, 25, 1719-21 (1986).

CAPITULO V

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. - No presente trabalho foram estudadas sete das catorze espécies de Hypericum da flora portuguesa, estudo esse que se restringiu aos compostos fenólicos dos respectivos extractos polares.

2. - Foram identificados um ácido fenólico (Ácido clorogénico), uma xantona (Mangiferina) e diversos compostos flavónicos.

3. - Todos os compostos flavónicos identificados são derivados da QUERCETINA.

4. - Todos os heterósidos caracterizados apresentam o açúcar ligado ao hidroxilo do carbono 3 da Quercetina.

5. - A 3-Xilosilquercetina e a 3-Glucuronilquercetina são compostos descritos pela primeira vez como constituintes de espécies deste género.

6. - Três dos compostos flavónicos isolados neste trabalho apresentam um radical sulfato na sua molécula, mas só dois deles ficaram completamente caracterizados: o 3-Sulfato de quercetina e o 3'-Sulfato de 3-glucuronilquercetina.

7. - Estes dois compostos só agora foram reconhecidos como constituintes de espécies do género Hypericum, e o último deles é descritro pela primeira vez.

8. - O presente trabalho vem confirmar os resultados obtidos para outras espécies de Hypericum (pág. 12), os quais mostram que estas plantas, salvo raríssimas excepções apenas biossintetizam flavonóides derivados da quercetina.

Tal homogeneidade de composição das espécies de Hypericum quanto aos flavonóides que elaboram poderá, provavelmente, ser uma característica a atender na quimiotaxonomia deste género.

9. - O resumo dos compostos isolados encontra-se no QUADRO XXIX.

QUADRO XXIX

Espécie / Substância	H. pulchrum L	H. androsaemum L	H. elodes L	H. undulatum Schaut	H. calycinum L	H. linarifolium Vahl	H. humifusium L
3-Ramnosilquercetina	+	+	+	+	+	+	+
3-Glucosilquercetina	+(a)	+	+	+	+	+	-
3-Galactosilquercetina	-	+(a)	-	+	+	-	+(a)
3-Xilosilquercetina	+	-	-	-	-	-	-
3-Glucuronilquercetina	-	+	+	-	+	-	-
3-Rutinosilquercetina	-	-	-	-	+	-	-
3-Sulfato da Quercetina	-	+	-	-	-	-	-
3'-Sulfato de 3-Glucuronil-quercetina	-	-	+	-	-	-	-
Ácido clorogênico	+	+	-	+	+	+	+
Mangiferina	+	+	-	-	-	+	+(a)

(a) - compostos já descritos na espécie citada.