

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Mestrado em análise, síntese e controle de medicamentos

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO
FITOQUÍMICO DE Euphorbia
prostrata AIT.

Trabalho realizado sob a orientação do
Prof. Dr. KLAUS HENNING KAHR S
do "Institut für Pharmazeutische Chemie
der Westfälischen Wilhelm-Universität"
Münster

PEDRO ROS PETROVICK
BOLSISTA CAPES

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	1
1. Generalidades e objetivos	1
2. Classificação e características botânicas	2
II - REVISÃO DA LITERATURA	4
III- MATERIAL E MÉTODOS	6
1. Material empregado	6
1.1 Aparelhagem	6
1.2 Análise cromatográfica	6
2. Reagentes empregados nos testes preliminares	8
3. Reagentes utilizados na análise espectroscópica	9
4. Técnicas empregadas	9
4.1 Material vegetal	9
4.2 Ensaio preliminares	10
4.3 Preparação dos extratos	12
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
1. Ensaio preliminares	14
2. Pesquisa de flavonóides	17
2.1 Introdução	17
2.2 Ação farmacológica de flavonóides	17
2.3 Distribuição de flavonóides em Euphorbiaceae	19
2.4 Pesquisa de flavonóides em <u>Euphorbia prostrata</u> Ait.	20
2.5 Isolamento dos compostos flavonóidicos através de cromatografia em papel	21
2.6 Espectroscopia ultravioleta de flavonóides	24
2.7 Análise da fração F1	30
2.8 Análise da fração F2	38
2.9 Análise da fração F3	50
3. Pesquisa de antocianinas	57
3.1 Introdução	57
3.2 Distribuição de antocianinas em Euphorbiaceae	59
3.3 Métodos de pesquisa de antocianinas	59

3.4 Pesquisa de antocianinas em <u>Euphorbia prostrata</u> Ait.	61
3.5 Conclusões	66
4. Pesquisa cromatográfica de ácido gálico	66
4.1 Introdução	66
4.2 Pesquisa de ácido gálico em <u>Euphorbia prostrata</u> Ait.	67
4.3 Conclusão	69
V - SINOPSE	69
VI - BIBLIOGRAFIA	71

oo0oo

I- INTRODUÇÃO

1. Generalidades e objetivos

Uma das metas fundamentais da pesquisa no campo farmacêutico é a da substituição de matérias primas medicamentosas importadas por drogas de origem nacional, quer pela síntese, quer pela extração de vegetais, sendo que a fonte principal dos objetos da análise fitoquímica encontra-se na medicina popular.

Nosso estudo versa sobre uma planta utilizada na região sul do Brasil por suas propriedades diuréticas e de ação sobre as inflamações renais. Este vegetal é comumente chamado QUEBRAPEDRA. (1)

Sob este nome são conhecidos diversos vegetais da família Euphorbiaceae, do gênero Phyllanthus e Euphorbia. (16,26,66)

O vegetal em pesquisa foi classificado entre os representantes do gênero Euphorbia, como sendo Euphorbia prostrata Ait. *

Causou profunda estranheza a inexistência de qualquer referência quanto à composição química deste vegetal, na bibliografia consultada, pois o mesmo é encontrado e utilizado em toda a região compreendida entre os estados da Guanabara e Rio Grande do Sul. (1,12,41,61)

As únicas citações encontradas referem-se à ação do látex sobre excrescências da pele e são provindas do século passado. (23,39,68)

Baseados na quimiotaxonomia de Euphorbiaceae, realizamos tes

* Agradecemos aos Profs. Neyte Sieczkowski e Antônio C. Allem, do Departamento de Botânica da UFRGS, pela classificação botânica.

tes preliminares a fim de constatarmos a presença de compostos característicos a esta família. Após efetuamos a pesquisa, através de processos cromatográficos e por espectroscopia ultravioleta, de flavonóides, antocianinas e ácido gálico.

2. Classificação e características botânicas

Euphorbia prostrata Ait. é uma planta originária da América tropical e introduzida no Velho Mundo, de distribuição pantropical. (1, 2, 14, 31, 99)

Apresenta-se com poucos ou muitos caules, prostrados ou decumbentes, filiformes, com 10 a 20 cm de comprimento, revestidos ao menos nos ápices. Os entrenós encontram-se a cerca de 1 cm no caule, mas às vezes só a 2 mm nos ramos.

As folhas são todas opostas, com estípulas triangulares assoveladas, de 0,5 - 1 mm, livres ou soldadas. A lâmina é largamente elíptica até obovadas ou ovadas, em regra assimétrica pela base, de dimensões 3-11 mm de comprimento, às vezes serrilhada, em regra glabras na face antero-superior.

Os ciátios são únicos, nos nós, mas usualmente encontrados nos raminhos laterais de nós curtos. Invólucro abscônico, de 0,6 a 0,9 mm de diâmetro. Os lóbulos são triangular-obtusos, igualando as glândulas, que se mostram transverso-elípticas ou oblongas, com apêndices brancos glabros.

Em cada ciátio encontramos quatro flores masculinas; cápsulas com dimensões de 1 a 1,4 mm, altas e agudo-triangulares, com pelos persistentes sobre os ângulos.

As sementes são leve e grosseiramente arrugadas. É uma erva anual, que floresce de novembro a março. (1, 2, 61, 84)

fig. 1 (pág. 3) - Euphorbia prostrata Ait. - A - Vista parcial do vegetal; B - Folha; C - Semente (vista de frente); D - Semente (vista de trás); E - Fruto; (Seg. Allem (1))

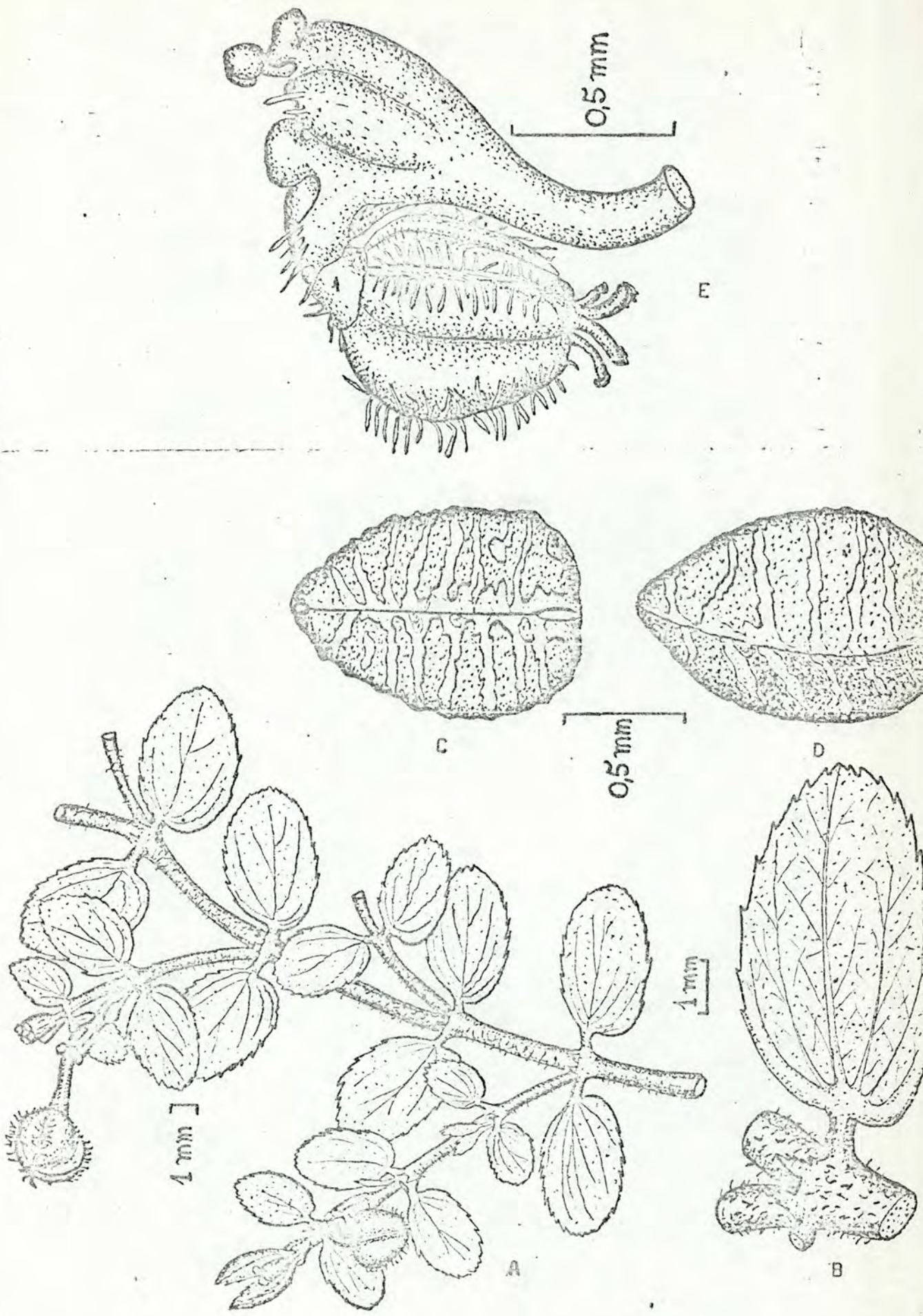


Fig 1- Euphorbia prostrata Ait. , segundo Allem

É interessante notar que na bibliografia não há referências à coloração avermelhada dos caules e ramos, apesar de ser uma característica, para o gênero Euphorbia, a presença desta coloração tanto nas partes vegetativas como florais. (2)

II- REVISÃO DA LITERATURA

Vegetais da família Euphorbiaceae, devido a sua importância econômica e de utilidade na área de medicina e alimentação, tem sido objeto de inúmeros estudos quanto a sua composição química.

Salientamos como representantes da importância desta família: a seringueira (Hevea brasiliensis Müll.-Arg.), a mamoeira (Ricinus communis L) e a mandioca (Manihot esculenta Crants).

A existência de compostos terpênicos está relacionada com a presença do látex, característica desta família.

Nesta classe de compostos encontramos principalmente diterpenos, triterpenos tetracíclicos e triterpenos pentacíclicos. Entre os triterpenos mais comumente encontrados temos eufol, betasitosterol e germanicol, pertencentes aos tetracíclicos, enquanto que euforbol, obtusifoliol e cicloartenol aos terpenos pentacíclicos. (5,38)

Foram constatadas propriedades tóxicas e cocarcinogênicas em diversas plantas do gênero Euphorbia, relacionadas com a presença de ésteres de álcoois diterpênicos polifuncionais com estrutura do eufol : Ingenol e derivados. (24,36,37,65,94,95)

Entre os compostos polifenólicos existentes em Euphorbiaceae, citamos a presença de:

- Rotlerina (floroglucídio), encontrado em Mallotus philippinensis Müll.-Arg., com propriedades vermífugas. (51)

-Cumarinas: Esculetina, que tem sido encontrada em Euphorbia lathyris; dafnetina (7,8-dihidroxycumarina) e seu 7-glicosídeo, daf

nina, que é restrito a Thymelaceae e algumas espécies de Euphorbiaceae (E.lathyris). (50,92)

-Derivados do ácido cinâmico: Relata-se a presença de ácido caféico, ferúlico e elágico. (38) Interessante notar que a presença de ácido ferúlico é predominante em plantas herbáceas, enquanto que o ácido elágico distribui-se com maior frequência entre as espécies lenhosas. (92)

-Compostos flavonóidicos: Além de flavonas e flavonóis, cuja presença será discutida posteriormente, há ainda referências sobre a ocorrência de leucoantocianidinas, catequinas e isoflavonas. (10)

A distribuição de alcalóides é restrita à subfamília Phyllanthoideae. (38) Esta afirmação foi comprovada através de estudos preliminares em 21 espécies de Euphorbiaceae demonstrando a presença de alcalóides em 10 espécies. (25,85)

Como uma característica marcante salientamos ainda a existência de compostos cianogenéticos, como a amigdalina, tóxicos por liberarem ácido cianídrico.

Determinou-se a presença glicosídeos cardiotônicos em Mallo tus philippinensis MULL.-Arg.. (93)

Há ainda ocorrência de ácido gálico e ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, em espécies suculentas, o ácido málico em Euphorbia caeruleus How., E.resinifera Berg. e E.caput-medusae L. De Euphorbia palustris L foi isolado o ácido ferbínico e sua dilactona. (38)

Starrat estudando vegetais do gênero Euphorbia determinou a presença de I-octacosanol (álcool cerílico) como um dos componentes mais comum neste gênero. (89)

A respeito da composição química de E. prostrata Ait. não foi encontrada nenhuma referência.

III- MATERIAL E MÉTODOS

1. Material empregado

1.1. Aparelhagem

- Espectrofotômetro ultravioleta Perkin-Elmer, mod. 124 , com registrador mod. 56.
- A detecção das manchas cromatográficas sob luz ultravioleta foi realizada através de lâmpada universal de quartzo, "Fluog test" Hanau, a 256 e 366 nm.
- Para a extração por turbolização empregou-se o aparelho "Ultraturrax", tipo 18/10 (Fa. Janke & Kunkel-IKA Werk) , a 10.000 rpm .
- As operações de concentração efetuaram-se em evaporador rotatório à vácuo, tipo rV2 (Fa. E. Bühler-Tübingen).
- Para a redução do material vegetal foi utilizado o moinho Condux-Werk, tipo LV-15M .

1.2. Análise cromatográfica

1.2.1. Cromatografia em camada delgada

a. Adsorventes

Silicagel GF₂₅₄ Merck (espessura 0,25 mm)

Terra Silficia G Merck (espessura 0,25 mm)

Celulose microcristalina Merck (espessura 0,4 mm)

b. Condições

Os cromatogramas foram realizados em placas de vidro de dimensões 20 x 20 cm, em câmara saturada (segundo Stahl , (88) e Randerahht (72)), com altura de migração de 15cm. O equipamento para a preparação e desenvolvimento dos cromatogramas, foi o conjunto Desaga, Heidelberg, seg. Stahl.

c. Eluentes

• para cromatogramas em camadas de sílicagel GF₂₅₄

- S₁ Sulfeto de carbono, acetoneitrila, água (85:5:10) (91)
 S₂ Tolueno, clorofórmio, acetona (40:25:35) (22)
 S₃ Acetato de etila, isopropanol, água (44: 45 :11)
 S₄ Acetato de etila, tolueno, água (10:40:50) (91)
 S₅ Tolueno, acetato de etila, ácido fórmico (55:36:9) (91)

• para cromatografia em camada de terra sílícia G

- T₁ Isopropanol, acetato de etila (35:65) (56)

• para cromatogramas em placas de celulose

- C₁ Ácido propiônico, ác. fórmico, ác. clorídrico conc., água
 (15:35:7:43) (78)
 C₂ Ácido fórmico, ác. clorídrico conc., água (60:9:20) (78)
 C₃ Ácido acético glacial, ác. clorídrico conc., água
 (45:7:48) (78)
 C₄ Ácido fórmico, ác. clorídrico conc., água (50:20:30) (43)

1.2.2. Cromatografia em papel

a. adsorventes

Papel Whatman número 1
 papel Whatman número 3

b. condições

Cromatografia ascendente. Os cromatogramas em Whatman número 3 (folhas de 46 x 57 cm) foram desenvolvidas em cuba saturada de 60 x 80 cm (Fa. De Leo S.A.), tendo como tempo de corrida 16 horas.

Os cromatogramas em papel Whatman número 1 foram desenvolvidos de modo ascendente em equipamento para cromatografia em camada delgada.

c. eluentes

P₁ n-butanol, HCl 2N (50:50) (11)

P₂ Acetato de etila, piridina, água (55:27:18) (91)

P₃ n-butanol, ácido acético glacial, água (35:10:25)

Observação: As proporções dos solventes foram expressas em ml.

Os solventes utilizados são de procedência Merck e Carlo Erba.

1.2.3. Reagentes empregados para a detecção cromatográfica

R₁ Cloreto de alumínio 5 % em etanol

R₂ Anisaldeído (88)

0,5 ml de anisaldeído, 10 ml de ácido acético glacial, 5 ml de ácido sulfúrico conc., foram adicionados a 85 ml de metanol

Após nebulização a placa foi aquecida, em estufa, a 125°C, até formação de coloração intensa.

R₃ Ftalato de anilina (11,88)

0,93 g de anilina e 1,66 g de ácido o-ftálico foram dissolvidos em 100 ml de n-butanol saturado com água, e o cromatograma nebulizado, após o que foi aquecido, em estufa por 10 min, a 105°C

R₄ Ácido fosfomolibdico 10% em metanol (88)

Após nebulização, o cromatograma foi aquecido a 105°C por 10 min .

R₅ FeCl₃ 2% em metanol (88)

2. Reagentes empregados nos testes preliminares

2.1 Reativo de Mayer (58,80)

Solução A : 1,36 g de HgCl₂ em 60 ml de água

Solução B : 5 g de KI em 10 ml de água.

Misturou-se A e B, completando-se o volume de 100 ml com água.

2.2 Reativo de Dragendorff (80)

Solução A : 8 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 20 ml de HNO_3 conc. .

Solução B : 27,2 g de KI em 50 ml de água.

Misturou-se A e B, deixando precipitar os cristais de KNO_3 . Após dois dias decantou-se a solução, completando com água até 100 ml.

2.3 Papel picro-sodado

Uma tira de papel de filtro foi embebida em uma solução saturada de ácido pícrico. Após seca, foi mergulhada em solução de carbonato de sódio a 10% e seca.

2.4 Solução de cloreto férrico a 5 % (58)

3. Reagentes utilizados na análise espectroscópica

3.1 Solução de AlCl_3 anidro 10% em metanol (60)

Para cubeta de espessura de 1 cm adicionou-se tres gotas e fez-se a leitura logo após a adição.

3.2. Solução de metóxido de sódio (60)

2,5 g de sódio metálico, recentemente cortado, foram adicionadas, cuidadosamente, em pequenas porções a 100 ml de metanol. Desta solução empregou-se tres gotas para cubeta com espessura de 1 cm, fazendo-se a leitura logo após a adição e a cada 5 minutos, até completar 30 minutos .

4. Técnicas empregadas

4.1 Material vegetal

Foi utilizado o vegetal inteiro. Este material após coleta,

no verão de 1973, na cidade de Novo Hamburgo, RS, foi secado ao abrigo do sol, e reduzido em moinho.

4.2 Ensaios preliminares

a. Extração para pesquisa de alcalóides (58,80)

5 ml de um extrato alcoólico, obtido por turbolização de 10 g do vegetal e 100 ml de etanol, foram evaporados até secura, e retomados em 5 ml de água e dez gotas de ácido sulfúrico 2N. Aqueceu-se por mais dois minutos, filtrando e dividindo em duas partes, para reações com os reativos de Mayer e Dragendorff.

b. Extração para a pesquisa de antraquinonas (76)

Para a realização da reação de Borntraeger, 0,2 g da droga em pó foram adicionadas de 5 ml de H_2SO_4 2N, e aquecidas até a fervura. Após resfriamento da solução tratamos com 10 ml de benzeno. Agitamos a seguir com 2 ml de NaOH 2N. Em caso de reação positiva, a fase aquosa deveria ficar vermelha.

c. Pesquisa de cianogenéticos (82)

2 g da planta fresca foram cortados e misturados num tubo de ensaio com água, ficando o material vegetal submerso. Fechou-se o tubo, colocando-se, juntamente com a rolha um papel de filtro embebido em NaOH 2N e outro impregnado com ácido picríco (papel picro-sodado). Aquecemos até fervura em banho-maria.

Sobre o papel embebido com hidróxido de sódio adicionamos tres gotas de sulfato ferroso 5 %, aguardando por 3 minutos, após o que pipetamos duas gotas de HCl 2N, sobre o papel. A reação seria positiva caso houvesse a formação de coloração azul.

A reação com o papel picro-sodado seria positiva pelo aparecimento de coloração vermelha.

d. Pesquisa de flavonóides (28)

O teste de Shinoda para anéis benzopirona realizou-se pela

adição de 0,5 ml de HCl 10% e magnésio em pó, a um mililitro de extrato alcoólico. Caso houvesse formação de coloração vermelha a vermelha pálida, teríamos indício seguro da presença de flavonóides.

e. Pesquisa de saponinas (90)

A detecção preliminar de saponinas foi realizada através do teste de espumas. Para tanto 0,5 g da droga foram colocados em tubo de ensaio e tratados com 10 ml de água quente. Após resfriamento, agitou-se por 10 segundos, vigorosamente. Na presença de saponinas formar-se-ia um anel de espumas de 1 a 10 cm de altura, persistente por um mínimo de 10 minutos, que não desapareceria pela adição de algumas gotas de HCl 2N.

f. Pesquisa de taninos (15,58,77)

Um método de identificação para taninos foi o da reação com $FeCl_3$. 2 ml do extrato alcoólico foram adicionados de etanol até que a coloração da solução ficasse vermelho clara. Acrescentou-se duas gotas de solução alcoólica de $FeCl_3$ a 5 %, não se notando alteração de coloração. Realizando-se a extração de 0,5 g da planta com 10 ml de água, por turbolização, e adicionando-se duas gotas da solução de cloreto férrico, obteve-se coloração azul, indicando a presença de taninos gálicos.

Outro método empregado foi a reação com acetato de chumbo. A extração foi efetuada pelo tratamento de 0,5 g da planta em pó com 50 ml de água, aquecendo-se até fervura. Após resfriamento e filtração, verificou-se o pH da solução, constatando que o mesmo estava neutro. Tratou-se 5 ml deste extrato com duas gotas de acetato de chumbo, formando-se um precipitado branco, diagnóstico da presença de taninos.

4.3. Preparação dos extratos

a. Extração para flavonóides

500 g do vegetal seco e moído foram extraídos com uma mistura de etanol e água (1: 4,5 litros), por aquecimento a uma temperatura de 60-70°C, por duas horas. A utilização de uma mistura álcool-água, em vez de álcool puro, prende-se ao fato de diminuir a quantidade de clorofila e outros produtos apolares de serem extraídos.

Após resfriamento, os extratos obtidos por decantação e prensagem do bolo vegetal, foram reunidos e filtrados em Büchner, sendo então concentrados a aproximadamente 1 litro. Este extrato concentrado foi tratado com tres porções de 200 ml de acetato de etila.

A camada orgânica adicionou-se sulfato de sódio anidro, deixando-se em contato por 24 h, seguido o que filtrou-se e evaporou-se até a secura em concentrador rotatório à vácuo.

O resíduo assim obtido foi redissolvido em 50 ml de uma solução de hidrogenocarbonato de sódio a 5 %, e adicionado de 100 ml de éter etílico.

A fase aquosa foi levada a pH 5 com HCl 2N, tratada a seguir com acetato de etila. Esta camada orgânica recebeu sulfato de sódio anidro, com finalidade de eliminar ao máximo a água presente, sendo após 24 horas filtrada e levada à secura. O resíduo foi ressuspendido em cerca de 10 ml de etanol e reservado para a pesquisa cromatográfica e espectroscópica de flavonóides.

b. Hidrólise ácida dos compostos flavonóidicos

Para a extração das agliconas flavonóidicas utilizou-se o método prescrito por Mabry (60,91). A solução metanólica de cada uma das frações isoladas por cromatografia em papel Whatman

número 3, com ácido acético, foi reduzida em volume a cerca de 2 ml, em concentrador rotatório à vácuo, e adicionada de 5 ml de ácido clorídrico 2N, sendo a seguir refluxada por 45 minutos.

Após refluxo, retirou-se por destilação, o máximo de metanol. A solução ácida foi então extraída com éter etílico e esta camada orgânica foi levada à secura, sendo o resíduo redissolvido em metanol e reservado para análise espectroscópica e cromatográfica das agliconas flavonoidicas.

c. Extração para a pesquisa de açúcares (60,91)

A solução ácida obtida na hidrólise dos heterosídeos flavonoidicos, após extração com éter etílico, (ver item anterior), foi neutralizada com bicarbonato de sódio e evaporada até secura completa.

Como passo seguinte efetuou-se maceração do resíduo com tres porções de 5 ml de piridina, e filtrou-se. Os extratos piridínicos reunidos foram concentrados a um volume mínimo e reservados para a pesquisa de açúcares.

d. Extração para pesquisa de antocianinas

Para a extração de antocianinas foi realizada a técnica descrita por Schönert. (78)

10 g da planta moída foram tratados com 100 ml de uma mistura de n-butanol e HCl 2N (95:5 ml), por refluxo em banho-maria fervente, durante 30 minutos e filtrados à quente. O resíduo foi submetido à mesma operação por 5 vezes.

Os extratos reunidos foram levados à secura em concentrador rotatório, e o resíduo tratado com 100 ml de uma solução de HCl 2N em metanol (50 : 50). Após digestão, retirou-se o metanol por destilação e filtrou-se. O processo foi repetido por mais duas vezes.

As fases aquosas foram extraídas por tres porções de 50 ml de álcool iso-amílico.

As camadas iso-amílicas foram reduzidas em volume até cerca de 20 ml e adicionadas de 200 ml de éter de petróleo 40 - 60° C. O resíduo vermelho formado foi separado por decantação e solubilizado em metanol, sendo reservado para pesquisa por cromatografia e através de espectroscopia.

e. Extração para pesquisa de ácido gálico

10 g do vegetal seco e moído foram adicionados de 100 ml de etanol, turbolizados por 5 minutos a 10.000 rpm e filtrados.

O filtrado foi concentrado a cerca de 2 ml e adicionado de 10 ml de HCl 2N, sendo após levado a refluxo por 1 hora. Realizada a hidrólise ácida, retirou-se o metanol por destilação e tratou-se a solução aquosa ácida com éter etílico.

A camada etérea foi levada à secura, ressuspensa em cerca de 5 ml de etanol e reservada para a análise cromatográfica.

IV- RESULTADOS E CONCLUSÕES

1. Ensaio preliminar

Tabela 1- Testes efetuados nos ensaios preliminares e seus resultados.

Testes	Resultados
1. Alcalóides	negativo
2. Antraquinonas	negativo
3. Cianogenéticos	negativo
4. Flavonóides	negativo
5. Saponinas	negativo
6. Taninos	positivo

A fim de realizarmos um estudo orientado para compostos específicos, efetuamos uma série de testes preliminares, em tubos de ensaio, baseados nas características quimiotaxonômicas de Euphorbiaceae.

1.1 Testes para alcalóides - negativos

Os reagentes empregados foram os de Mayer e Dragendorff. Estas reações são reações de precipitação, pela formação de um sal entre um cátion (do alcalóide) e um ânion complexo do reativo, BiO_4^- na reação de Dragendorff, e HgI_4^- na reação de Mayer. (58,75,80)

1.2 Teste para antraquinonas - negativo

A reação de Borntraeger, para a caracterização de antraquinonas, não desenvolveu coloração vermelha ou amarela, diagnóstico para 1,8-dihidroxi-antraquinonas e antronas, respectivamente. (76,100)

1.3 Testes para cianogenéticos - negativos

Foram realizados dois testes para a verificação de glicosídeos cianogenéticos: o teste rápido e o teste do papel micro-sodado.

O primeiro teste baseia-se na formação do azul da Prússia, pela hidrólise ácida do glicosídeo, que libera HCN, o qual pela reação com sulfato ferroso e ácido clorídrico forma $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. (82).

O teste do papel micro-sodado produz, quando na presença de HCN, coloração vermelha pela formação de isopurpurato.



Esta reação é positiva também para outras substâncias redutoras, como aldeídos, cetonas, etc..., pela formação de sais do ácido picrâmico. Diferencia-se a presença destes compostos, do HCN, tratando-se o papel com solução de ácido acético a 10%. O isopurpurato, formado pela reação com o HCN, não perde sua cor, enquanto que o produto formado pela reação com as outras substâncias descolore. (82)

1.4 Teste para flavonóides - negativo

O teste de Shinoda é um teste que executa uma redução através do magnésio em meio ácido clorídrico. Os produtos da redução são sais do cátion hidroxiflavílio coloridos. Wichtl registra a falha desta reação para alguns flavonóides e aponta limitações quanto ao seu emprego. (100)

1.5 Teste para saponinas - negativo

O teste da formação de espumas para saponinas, é diagnóstico seguro da ausência destes compostos, quando a reação é negativa, enquanto que no caso de reações positivas, devemos levar em consideração que outras substâncias como taninos, podem causar este resultado. (90,100)

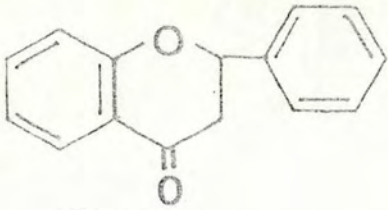
Fundamenta-se este teste na propriedade de abaixamento da tensão interfacial causado pela saponina.

1.6 Teste para taninos - positivo

A detecção de taninos é feita através de reações de precipitação ou então por reações de coloração.

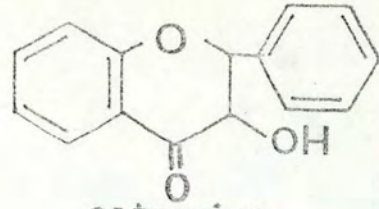
A formação de precipitado na reação entre acetato básico de chumbo é indicativa da presença de taninos. (77)

O tratamento do extrato etanólico do vegetal com cloreto férrico não desenvolveu coloração, como se esperava. Este fato fez com que realizássemos modificação da técnica, através da uti

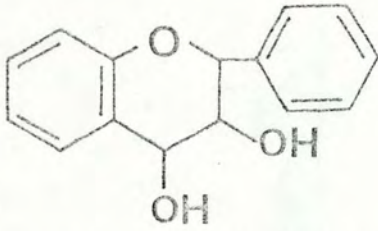


Flavano

2-fenilcromano

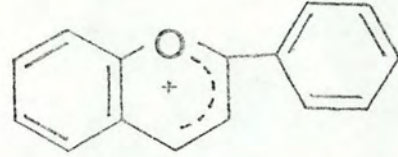


catequina

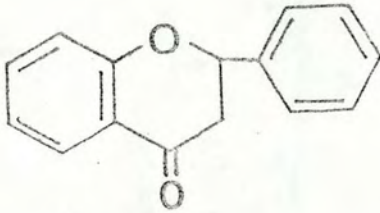


Flavan-3,4-diol

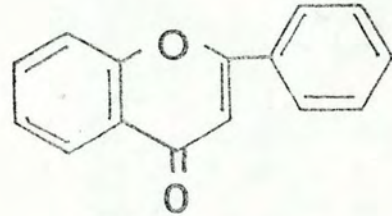
(leucoantocianidina)



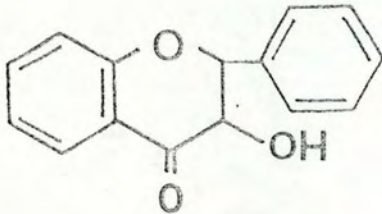
antocianidina



Flavanona

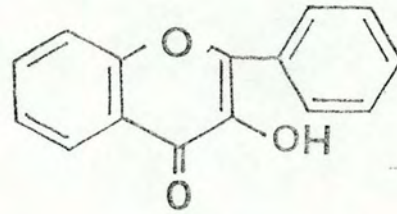


Flavona

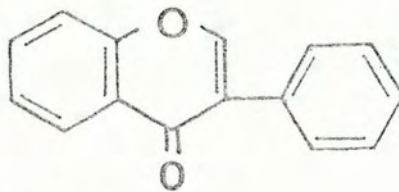


Dihidroflavonol

(flavanonol)



Flavonol



isoflavona

fig.2 - Estruturas fundamentais de flavonóides. (29,59)

Devido a estes efeitos são utilizados como anti-hemorragi-
cos e anti-edematosos. (20,93)

Segundo Laszt empregam-se os flavonóides na terapêutica das
varicosidades. (53)

Por possuírem ação inibidora da hialuronidase, e por agi-
rem diretamente na parede celular, são utilizados em doenças in-
fecciosas, impedindo o desenvolvimento de bactérias e a produção
de toxinas. Esta mesma propriedade os faz ser utilizados como an-
ticonceptivos, pois bloqueiam a penetração do espermatozóide na ó-
vulo. (20,93)

Apresentam também efeito diurético notável. (93) Tendo a capa-
cidade de complexar-se com íons cálcio, agem consequentemente co-
mo anticoagulantes e produzem retenção corporal de cálcio.

DeEds relata o uso de flavonóides em hemorragia de retina,
retinopatia diabética, púrpura, febre reumática, choque anafilático
e histamínico. (20) Foi ainda demonstrado que possui ação coleré-
tica, colagoga e espasmolítica. (93) A ação estrogênica de isofla-
vonas foi comentada por Biggers. (9)

Lavollay e Neumann descreveram a ação sinérgica dos flavo-
nóides com a vitamina C, no aumento da resistência capilar. (54)

Flavonóides não apresentam toxicidade ao homem e animais e
a possibilidade de acúmulo no organismo é eliminada pela degrada-
ção metabólica a hidroxíedidos aromáticos, que são excretados
pela urina. (20,98)

Schüler utiliza o vegetal em pesquisa -Euphorbia prostrata
Ait. - em casos de disfunção renal, inflamações dos nefrônios e em
processos degenerativos dos rins, obtendo ótimos resultados. (79)

2.3 Distribuição de flavonóides em Euphorbiaceae

A maioria dos trabalhos sobre a composição química de Eu--

phorbiaceae salienta a presença de compostos terpênicos e alcalóides, sendo que nos últimos anos tem sido dada ênfase à pesquisa de flavonóides.

Kapoor e colaboradores estudando seis espécies nativas da Índia, constataram a presença de flavonóides em uma só espécie (Sapium insigne Benth.). (49)

Ugarte e colaboradores determinaram a presença de heterosídeos de canferol e quercetina, glicosilados com ramnose, arabinose e glicose, em Euphorbiaceae chilenas. (96)

Rutina e quercetrina são comumente encontradas em vegetais desta família, assim como xantorramnina e cosmosina (apigenina-7-glicosídeo). (6,10,21,22,74)

As agliconas mais largamente distribuídas são canferol, quercetina, ramnetina, miricetina e luteolina. (3,13,21,22,38,63,66,97)

Em Riccinocarpus miricatus foi determinada a estrutura de um flavonóide que apresenta as posições 3,7 e 8 metoxiladas, enquanto que as posições 5,3' e 4' hidroxiladas. (40)

Janistyn e colab. encontraram quercetina em Euphorbia amygdaloides e E. myrsinitis, provando assim que a literatura anterior a este respeito estava incorreta. (44) Pohl e Janistyn estudando E. sequeiriana encontraram um heterosídeo da quercetina esterificado por ácido gálico. (67) O mesmo composto foi isolado de E. verrucosa e E. platiphyllos. (64)

2.4. Pesquisa de flavonóides em Euphorbia prostrata Ait.

O vegetal seco e moído foi extraído com uma mistura de etanol e água (4:1), diminuindo assim a presença de clorofila e outros componentes pouco polares. Este extrato foi tratado com acetato de etila, a fim de retirarmos os heterosídeos flavonóidicos, sendo a camada orgânica levada à secura. O resíduo ressuspendido com solução de hidrogenocarbonato de sódio, foi extraído com éter

etílico. A fase etérea foi evaporada até a secura e o resíduo assim obtido, foi dissolvido em etanol

O extrato etanólico foi cromatografado em papel Whatman número 1, tendo como sistema eluente ácido acético a 15 %, a fim de constatar a presença de compostos flavonoides.

A detecção das manchas realizou-se pela observação em luz ultravioleta (366 nm). Os heterosídeos flavonoides apresentam, geralmente, coloração escura quando detectados por este procedimento. Constatou-se mudanças de coloração de algumas das manchas, pela ação de vapores de amônia e nebulização com solução etanólica de cloreto de alumínio 2 %. Os flavonoides mostram fluorescência amarela ou amarela esverdeada, sob luz ultravioleta (366 nm), devido à formação de complexos entre estes reativos e os grupos cetônicos e hidroxílicos livres. (22,60)

O cromatograma apresentou 11 manchas, sendo que somente 6 sofreram alteração, quer pela exposição aos vapores de amônia, quer pela nebulização com $AlCl_3$. (fig 3-1) Assim, as manchas 3, 5 e 6, sob a ação da amônia e $AlCl_3$ passaram de coloração escura para fluorescência amarela. A mancha 2 intensificou sua fluorescência amarela, a mancha 7 também sofreu intensificação da fluorescência azul que apresentava anteriormente, e a mancha 11, que possuía fluorescência azul, mostrou fluorescência azul-esverdeada após revelação.

2.5. Isolamento dos compostos flavonoides através de cromatografia em papel.

Após constatação da presença de flavonoides pela pesquisa cromatográfica, realizou-se a separação dos mesmos por cromatografia em papel Whatman número 3, tendo como sistema móvel ácido acético 15 %, aplicando em linha, com a finalidade de isolar maior quantidade de substâncias.

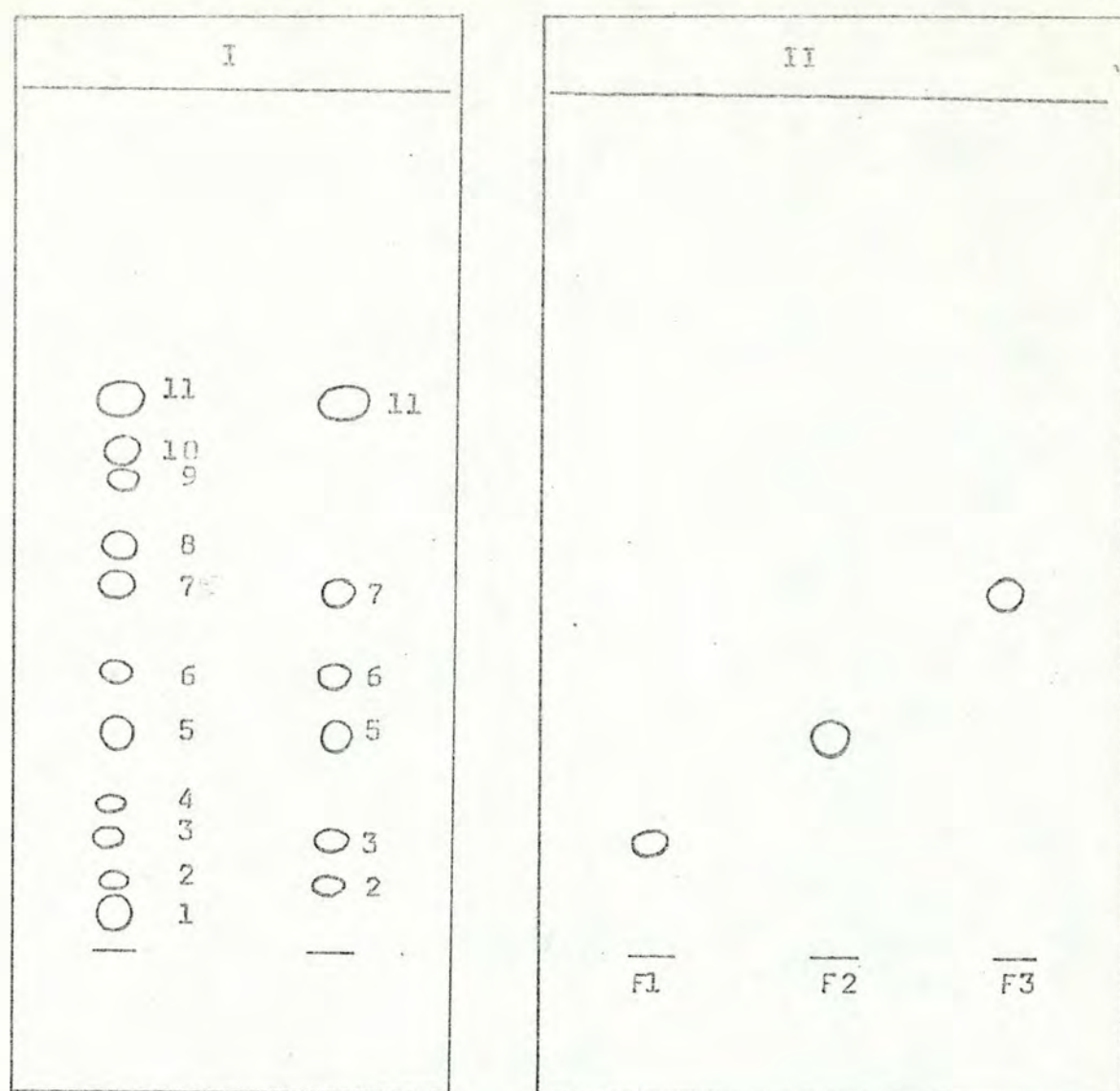


fig.3 - Análise de heterosídeos flavonóidicos

adsorvente : papel Whatman número 1

eluente : ácido acético 15 %

deteção : Ia - UV₃₆₆

II - UV/NH₃

Ib - UV/AlCl₃

mancha	Rf	UV ₃₆₆	UV ₃₆₆	
			NH ₃	AlCl ₃
1	0,04	violeta	-----	-----
2	0,07	amarela	amarela inten,	amarela intensa
3	0,16	escura	amarela	amarela
4	0,18	azul	-----	-----
5	0,24	escura	amarela	amarela
6	0,32	azul	-----	-----
7	0,42	escura	amarela	amarela
8	0,46	azul	-----	-----
9	0,54	azul	-----	-----
10	0,57	amarela	-----	-----
11	0,64	azul	azul esverd.	azul esverd.

Foram retiradas do cromatograma tres frações com os seguintes valores Rf :

- Fração F1 0,16
- Fração F2 0,24
- Fração F3 0,42

Estas frações apresentaram coloração escura quando detectadas pela luz ultravioleta, e tinham dado anteriormente reações positivas de caracterização para flavonóides frente a vapores de amônia e cloreto de alumínio.

As partes retiradas dos cromatogramas foram tratadas com metanol e levadas a uma temperatura de cerca de 60°C, com agitação durante 15 minutos, sendo após filtradas, reduzidas em volume e reservadas para a análise cromatográfica, espectroscopia ultravioleta e pesquisa das agliconas e açúcares.

Realizou-se a cromatografia das frações isoladas em papel Whatman número 1, em ácido acético 15%, fazendo-se a detecção das manchas sob luz ultravioleta 366 nm, e pela ação de vapores de amônia, método este que nos auxilia na elucidação da estrutura de flavonóides. (60)

As manchas correspondentes a F1, F2 e F3, pelos métodos de detecção, passaram de escuras para fluorescência amarela.

Da comparação das mudanças ocorridas neste cromatograma, antes e após exposição aos vapores de amônia, podemos estabelecer a suposição da existência dos seguintes tipos de estruturas flavonóidicas: (60)

Manchas escuras que passam a possuir fluorescência amarela, podem ser devidas à presença de :

- FLAVONAS, com grupamentos hidroxílicos livres em 5 e 4' (III)
- FLAVONÓIS, com grupamentos hidroxílicos livres em 5 e 4' , mas com hidroxila substituída em posição 3. (IV)

-FLAVANONAS sem hidroxilas em posição 5 e 4' (V)

-4'-HIDROXICHALCONAS, sem hidroxilas no anel A (VI)

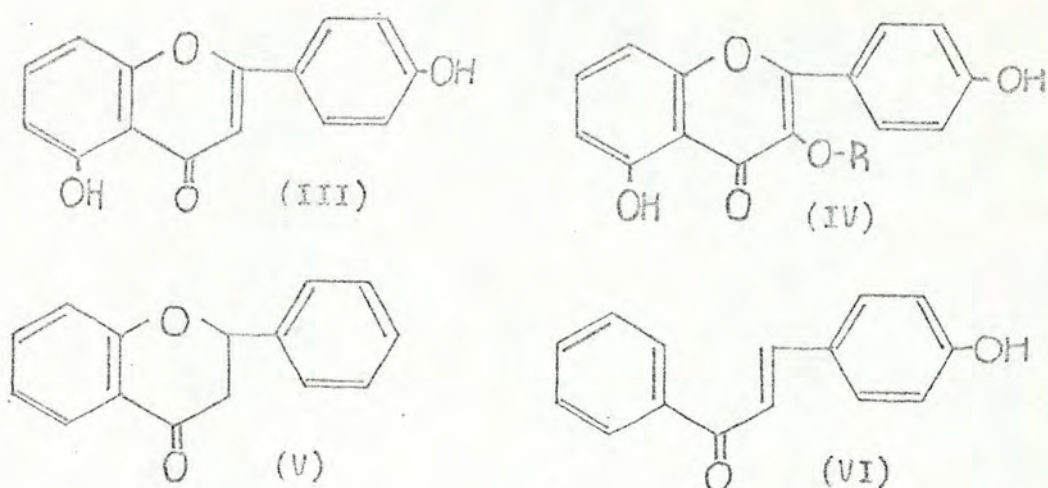


fig.4- Estruturas parciais de flavonóides que possuem a propriedade de alterar a sua coloração escura para fluorescente amarela, sob a presença de amônia, em análise cromatográfica.

2.6. Espectroscopia Ultravioleta de flavonóides

Um método importante na elucidação da estrutura dos flavonóides é a espectroscopia ultravioleta. (60)

Vários autores desenvolveram pesquisas no campo da análise por meio do ultravioleta e preconizam a utilização de reativos capazes de auxiliar no esclarecimento estrutural destes compostos. (45,46,47,60) A marcha sistemática para a investigação espectroscópica de flavonóides é a da realização dos espectros em meio alcoólico (etanol ou metanol), seguindo-se o estudo das modificações produzidas pela adição de $AlCl_3$ e, após, por acidificação com ácido clorídrico. Outro processo é o da adição de agentes básicos, como o metóxido de sódio e acetato de sódio.

A absorção de flavonóis e flavonas é devida à ligação de dois sistemas conjugados. O sistema benzoila, relacionado com o anel A e o sistema cinamoila, relacionado com o anel B. (fig.4)

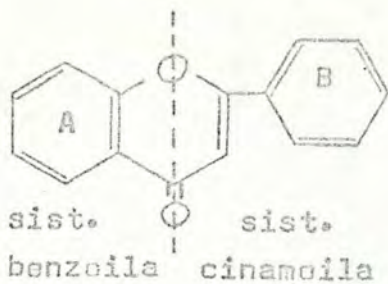


fig.4-Sistemas responsáveis pela absorção no ultravioleta de flavonóis e flavonas.

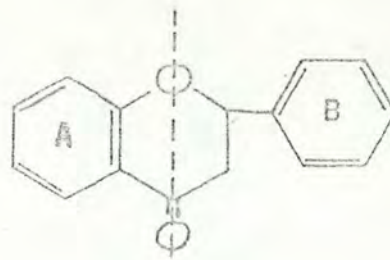


fig.5-Sistemas responsáveis pela absorção no ultravioleta de flavanonas.

Os espectros de flavonas e flavonóis apresentam duas bandas de absorção na região de 240 -400 nm. A banda na região de 300 a 380 nm é denominada banda I, enquanto que a banda na região de 240 - 280 nm de banda II. A banda I está relacionada ao sistema cinamoil do anel B, e a banda II ao sistema benzoil do anel A.

Flavanonas e dihidroflavonóis apresentam espectros mais simples, devido a falta do cromóforo cinamoila. (fig.5) Portanto possuem pouca ou nenhuma conjugação entre os anéis A e B. Seus espectros são distintos dos de flavonóis e flavonas por apresentarem absorção intensa na banda II (de menor comprimento de onda), enquanto que a banda I é representada por somente um ombro ou por um pico de baixa intensidade.

Existe influência notável nos valores dos comprimentos de onda de absorção causada pelo padrão de oxigenação dos anéis A e B. Assim, flavonóis e flavonas que apresentam somente o anel A oxigenado, possuem banda II pronunciada e banda I de fraca intensidade, e os que apresentam ambos os anéis oxigenados mostram a banda I mais pronunciada e em comprimentos de onda maiores. A posição da banda I, nos fornece informações ainda, quanto ao tipo de flavonóide. (veja tab. 2)

Tab.2: Absorção da banda I da flavonóides

tipo de flavonóide	região de absorção da banda I (nm)
Flavonas	304 -350
Flavonóis (3-O-subst.)	328-357
Flavonóis (3-OH livre)	352-385

A cada oxidrila adicional ligada ao anel B há um deslocamento batocrômico, não ocorrendo, entretanto, deslocamentos para a banda II. Um padrão de oxigenação 3',4'- e 3',4',5'- mostra a banda II desdobrada em duas, ou um máximo com um ombro no lado de maior comprimento de onda (250-270). Os compostos 4'-oxigenados apresentam uma banda só. Em isoflavonas a banda II (245-270 nm) não é relativamente afetada pela hidroxilação no anel B, mas sofre deslocamentos batocrômicos pelo aumento da oxigenação do anel A, de cerca de 10 nm.

Segundo Scott, absorções da banda I de flavonas na região de 250-270 nm são características para grupamentos hidroxílicos livres na posição 7. (46,81) A presença ou ausência de hidrogênio ligado à hidroxila do C5 tem efeito marcante sobre as bandas I e II no espectro de flavonas. Se o grupo estiver ausente, as bandas aparecem em comprimentos de onda menores do que a flavona 5-hidroxilada. O efeito hipsocrômico da banda I, neste caso, é de 3-10 nm, e da banda II de 6-17 nm.

Grupamentos hidroxílicos vicinais, assim como grupos hidroxílicos em C3 e ou C5 complexam com ácidos de Lewis. São utilizados frequentemente Al, Zr, B. (veja fig 6)

A adição de $AlCl_3$ a compostos flavonóidicos forma complexos com grupamentos orto-dihidroxílicos que se encontram no anel A e B, e complexos envolvendo o quelato 4-oxo-5-hidroxílico ou 4-oxo-3-hidroxílico. Jurd e Geissman estudando os complexos $AlCl_3$ -flavonóides, concluíram pela formação de uma estrutura planar com

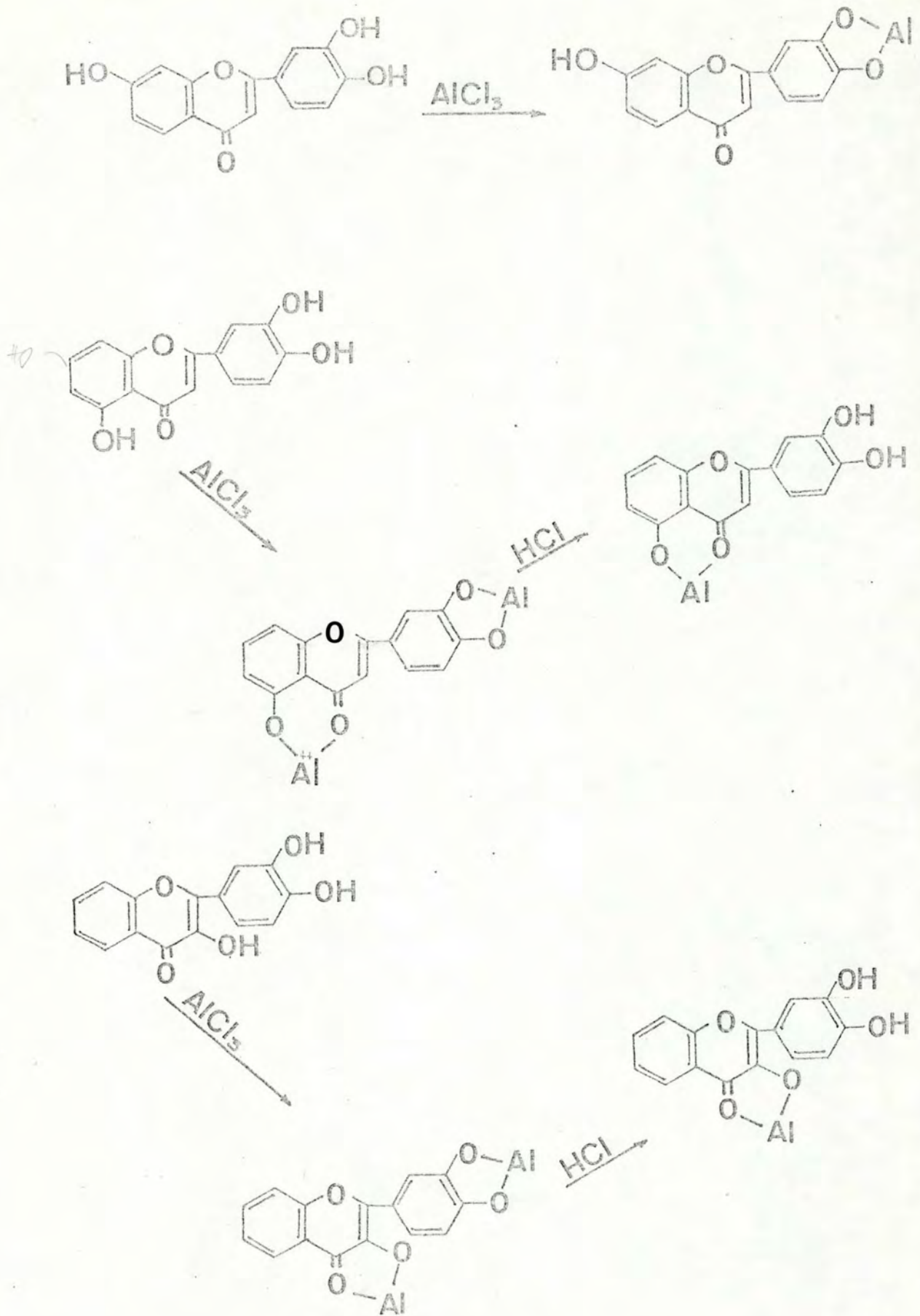
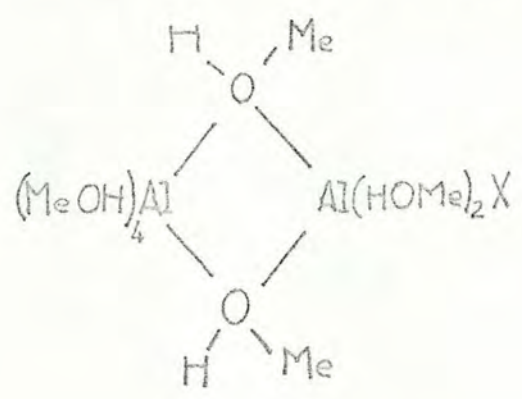


Fig.6 - Formação de complexo entre AlCl_3 e flavonóides e ação de HCl sobre os complexos.

o sistema de elétrons π do anel benzênico. (45) A formação destes complexos promovem um estendimento do grupo cromóforo, ocasionando por conseguinte deslocamentos batocrômicos. (48,60,62,71)

Porter e Markham estabeleceram a estrutura destes complexos, (fig 7) verificando ainda que a presença de água inibe a formação do complexo entre $AlCl_3$ e os grupos 5-hidroxi-4-oxo. (69,70)



X é uma 5-hidroxi-4-oxo-flavona, que está ligada ao alumínio da seguinte maneira :

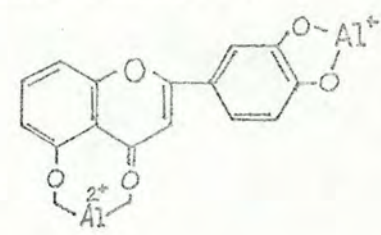


fig. 7 -Estrutura do complexo Flavonóide- $AlCl_3$ em meio neutro.

Grupos orto-3',4'-dihidroxílicos em flavonas e flavonóis sofrem, pela ação do $AlCl_3$, deslocamentos para o vermelho da banda I de 30-40 nm, relativo ao espectro em metanol. Deslocamentos batocrômicos da banda I de 40-50 nm, são encontrados para flavonóides que apresentam o anel B substituído por 3'-hidroxi-4'-metoxi, 3'-metoxi-4'-hidroxi ou 3',4'-dimetoxi. (tab. 3) (62)

tab.3- Efeito batocrômico (nm) da banda I em MeOH, em relação a banda Ia em $AlCl_3/HCl$, em 5-hidroxi-4-oxo-flavonóides.

C3	C7	C3'	C4'	deslocamento
H	O-GLIC	H	OH	49
O-GLIC	OH	OMe	OH	46
O-GLIC	OH	OH	OH	43

Os complexos entre $AlCl_3$ e o quelato 4-ceto-5-hidroxi ou 4-ceto-3-hidroxi, não são decomponíveis pela ação de ácidos minerais, enquanto que aqueles formados com grupamentos o-dihidroxílicos

cos são ácida lábeis. Assim, pela comparação entre os espectros obtidos em metanol, pela adição de AlCl_3 e pela acidificação deste último, nos dá informações quanto ao padrão de oxigenação dos flavonóides. (45, 60)

A presença de grupos o-dihidroxílicos no anel B de flavonas e flavonóis: pode ser detectada pela comparação entre os espectros em AlCl_3 e o obtido pela adição de HCl , devido a presença de um efeito hipsocrômico na ordem de 30-40 nm na banda I (ou banda Ia, quando a banda I consiste em dois picos). Este deslocamento é devido à decomposição do complexo entre AlCl_3 e os grupos o-dihidroxílicos. A presença de hidroxila em C3 causa, através deste método, deslocamentos hipsocrômicos de 20 nm. Hidroxila, ou metoxila na posição 6 de flavonas e flavonóis-3-substituídos, apresenta efeito batocrômico de 20 nm, comparando o espectro AlCl_3/HCl com o espectro em metanol (60)

Flavonóides quando tratados com bases fortes, como alcoólatos de sódio, sofrem ionização de todos os grupos oxidrílicos, com excessão dos estericamente impedidos, causando deslocamentos batocrômicos em comparação ao espectro em meio alcoólico neutro. (48)

A adição de NaOMe geralmente produz deslocamentos batocrômicos em todas as bandas de absorção, sendo contudo, utilizada para a detecção de grupamentos hidroxílicos livres em C3 e C4'. (veja fig. 8)

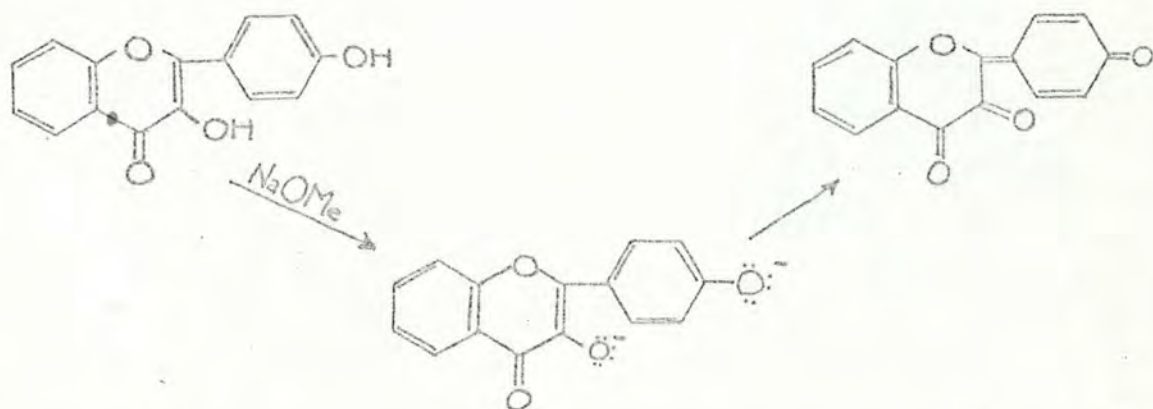


fig. 8- Ação do metóxido de sódio sobre os grupos hidroxílicos de flavonóides.

Deslocamentos batocrômicos da banda I, de 40-65 nm, e o espectro não apresentando as bandas com intensidade decrescente, é diagnóstico para hidroxila livre em C4; enquanto que flavonóis sem este grupo apresentam deslocamentos para o vermelho de 50-60 nm, porém com os picos mostrando intensidade decrescente. Neste caso o efeito é causado pela hidroxila livre em posição 3. Flavonóis com hidroxilas livres em 3 e 4' são instáveis na presença de NaOMe, e os picos do espectro UV degeneram em poucos minutos. (19,30) O tempo para que ocorra a decomposição dos espectros em metóxido, é também indicação para o padrão de substituição de flavonóis. Assim, 3,3',4'-trihidroxiados decompõe-se mais rapidamente que os 3,4'-dihidroxiados. (46)

2.7. Análise de Fração F1

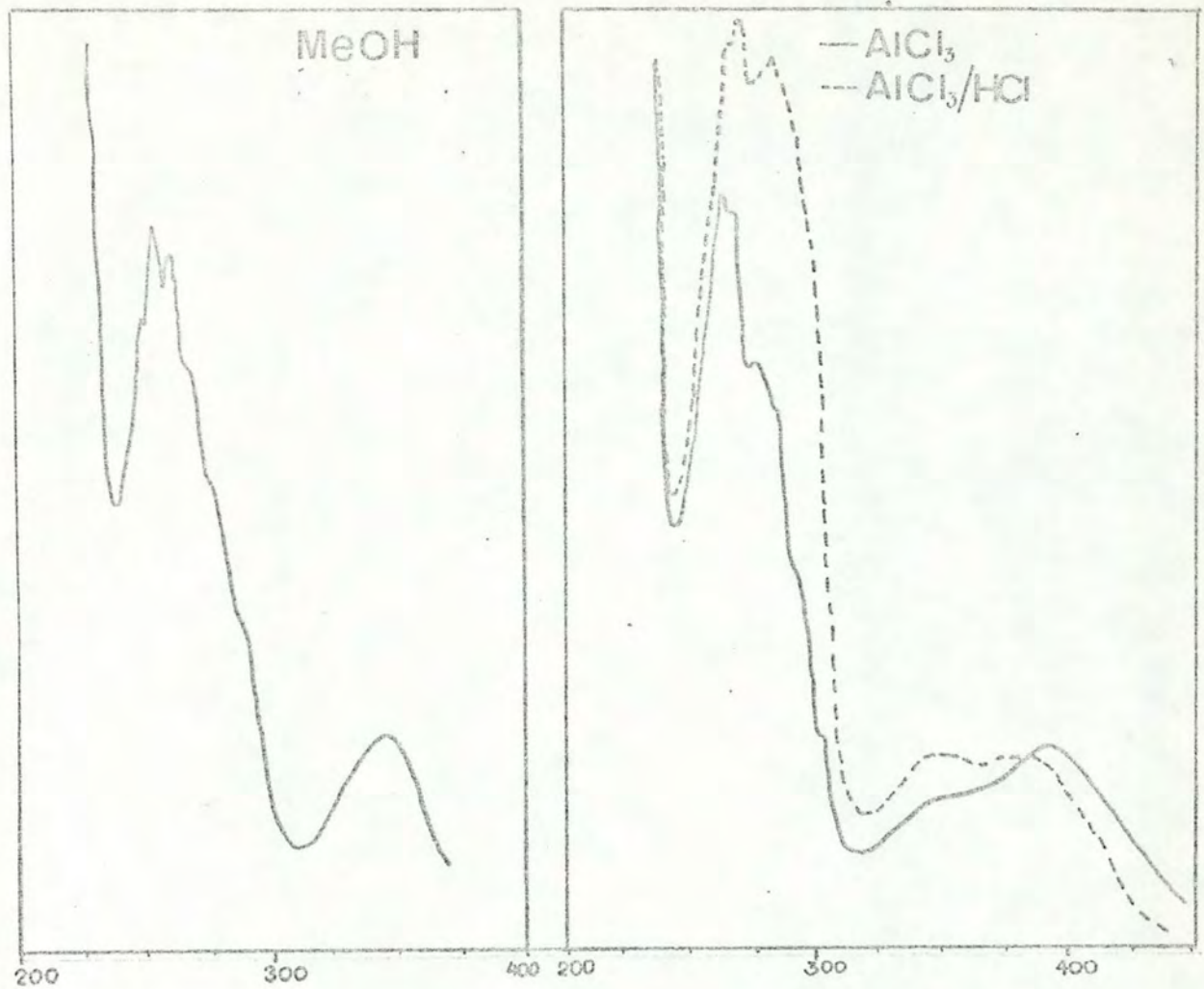
A análise por espectroscopia ultravioleta da fração que apresentou valor Rf 0,16, quando cromatografada em papel Whatman número 1 com ácido acético 15 %, e que detectada usando luz ultravioleta (366 nm) apresentou coloração escura, que passou a fluorescência amarela após exposição à vapores de amônia, mostrou dois grupos de absorção.

O primeiro grupo a 345 nm, representado por uma única absorção, e o segundo na região de 300 a 240 nm, com máximo a 257 nm e acompanhado por absorções em 245 sh*, 263, 269sh, 279sh e 290 sh nm.

Este grande número de valores nos faz pressupor que esta fração apresenta mais do que uma substância, as quais interferem na absorção da banda II, pois sabe-se que flavonóides não apresentam estrutura fina para esta banda.

Os espectros realizados pela adição de $AlCl_3$ e posterior acidificação com ácido clorídrico, confirmam esta suposição, pelo não deslocamento de grande parte das absorções da banda II (veja espectro 1). Na tabela 10, apresentamos os valores encontrados

* sh "shoulder" (ombro)



ESPECTRO 1

FRACAO F1deteccão cromatográfica

(UV) escura
 (UV/NH₃) fluorescência amarela

Valor Rf

AcOH 15% 0,16

Dados espectrais (nm)

MeOH 245sh, 250sh, 257, 263, 269sh, 279sh, 290sh, 345.
 AlCl₃ 250sh, 257, 262, 273sh, 278sh, 290sh, 352, 397.
 AlCl₃/HCl 250sh, 257sh, 263, 276, 279, 290sh, 352, 384.

na análise espectroscópica da Fração Fl.

tab.4- Valores de absorção do espectro ultravioleta da Fração Fl.

MeOH	245sh, 250sh, 257, 263, 269sh, 279sh, 290sh, 345
AlCl ₃	250sh, 257, 262, 273sh, 278sh, 290sh, 352, 397
AlCl ₃ /HCl	250sh, 257sh, 263, 276, 279sh, 290sh, 352, 384

Com a finalidade de verificar a hipótese de que a fração Fl fosse composta por mais de uma substância, realizou-se mais um cromatograma em papel Whatman número tres, com ácido acético 15%, aplicando em linha para obter maior quantidade de substância. A mancha correspondente a Fl foi retirada, subdividida em 3 partes, e cada nova fração foi tratada com metanol. Os extratos metanólicos foram analisados por espectroscopia ultravioleta. (espec. 2)

A fração inferior (Flx) mostrou uma absorção de baixa intensidade a 321 nm e um grupo de absorções na região 250-270 nm. (tab.5) A presença desta estrutura fina nesta região é característica de ácidos fenolcarboxílicos simples, como por exemplo o ácido salicílico. (81)

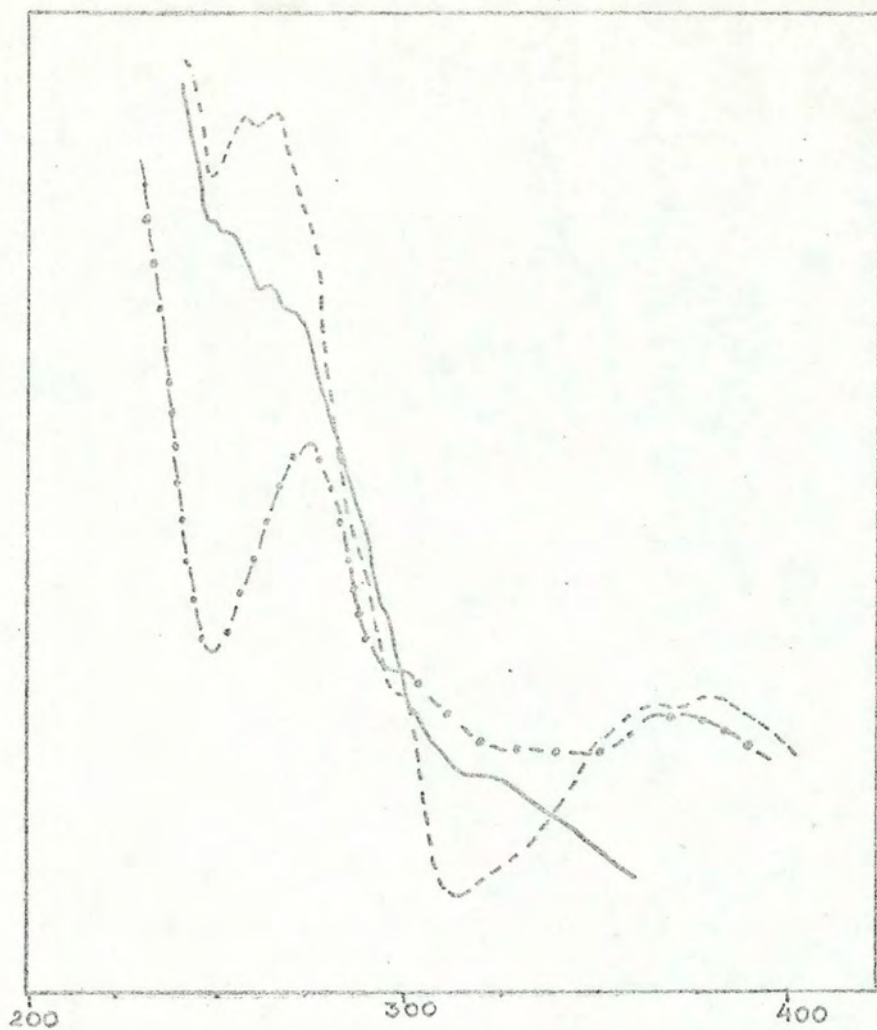
A fração intermediária (Fly) apresentou um máximo a 362 e um grupo de absorções entre 240-300 nm. (tab.5)

A fração superior (Flz) teve como absorções os valores de 275 e 357 nm. (tab.5)

tab. 5 - Absorção das frações componentes de Fl, em metanol. (nm)

Flx	252sh, 257sh, 263sh, 270sh, 321
Fly	240sh, 254, 263, 270sh, 289sh, 362
Flz	275, 357

Logo, devido apresentarem espectros diferentes, confirmamos a presença de outros compostos na fração Fl, os quais interferem



ESPECTRO 2

Espectros ultravioleta das partes componentes da Fração Fl, em metanol.

— Flx

--- Fly

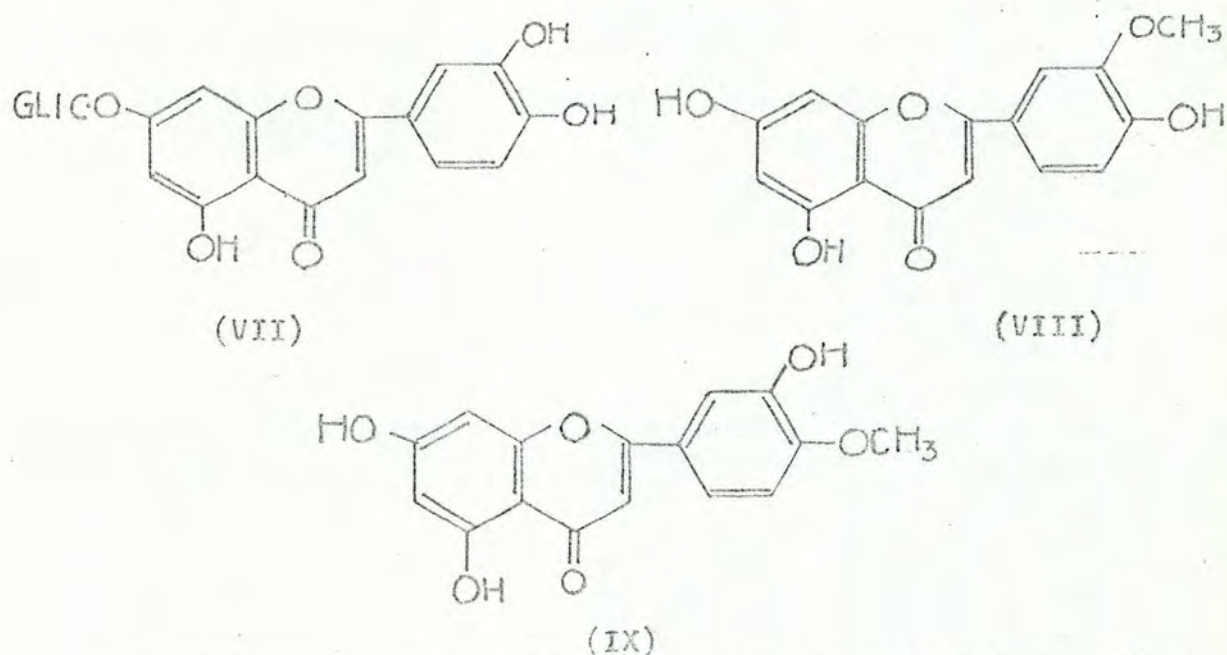
-•- Flz

na medida do espectro.

Pela positividade da mancha correspondente a Fl frente aos reativos de diagnóstico de flavonóides, supomos a existência de um heterosídeo flavonóidico como componente da fração Fl.

Da análise das alterações causadas no espectro metanólico pela adição de $AlCl_3$ e pela posterior acidificação da solução que continha alumínio, levando em consideração a interferência de outros componentes da fração Fl, obtemos auxílio na tentativa de esclarecimento da estrutura deste heterosídeo flavonóidico, com relação ao padrão de oxigenação dos anéis A e B.

A comparação entre os valores da banda I do espectro de Fl em metanol, com a banda Ia em $AlCl_3/HCl$, revelou um deslocamento batocrômico de 39 nm. Este valor encontra-se na região dos deslocamentos característicos para 5-hidróxiflavonas, excluindo assim a presença de hidroxila em posição 3. O valor do deslocamento é característico, por exemplo, para luteolina-7-glicosídeo (VII), criscoeriol (VIII) e diosmetina (IX). (60)



Devido aos baixos valores de R_f de criscoeriol (0,05) e da diosmetina (0,07), na cromatografia em papel com ácido acético a 15 % e por apresentarem colorações diferentes quando detectadas sob luz ultravioleta (366 nm) pela ação de vapores de amônia, em

relação aos dados encontrados para Fl, afastamos a possibilidade de ser um dos dois o composto em análise, sugerindo assim que o flavonóide contido em Fl poderia ser luteolina-7-glicosídeo.

A fase etérea da hidrólise ácida de Fl, mostrou uma só mancha por cromatografia em papel Whatman número 1 e eluente ácido acético 15%, que detectada por luz ultravioleta (366 nm) apresentou coloração escura, que passou a amarela por ação de vapores de amônia, com um valor Rf de 0,08. Realizou-se paralelamente um cromatograma em camada delgada segundo Stoess, apresentando um valor Rf 5,4. (veja fig 9) (91)

A análise através de espectroscopia ultravioleta do produto de hidrólise da fração Fl (espectro 3), apresentou em solução metanólica absorções em 241sh, 255sh, 268 e 350 nm. A adição de $AlCl_3$ promoveu deslocamento dos comprimentos de onda das bandas para 273, 300sh, 330 e 424 nm. Pela acidificação da solução metanólica contendo $AlCl_3$, observou-se os seguintes valores de absorção 263sh, 276, 297sh, 355 e 383 nm. O espectro da solução metanólica em presença de NaOMe teve como absorções 272, 313 e 402 nm, sendo que esse espectro não se alterou até 20 minutos após a adição do reagente.

A análise dos deslocamentos verificados entre os espectros em metanol, $AlCl_3$, $AlCl_3/HCl$ e NaOMe é apresentada na tabela 6.

tab.6 - Deslocamentos apresentados pelos espectros da aglicona de Fl frente aos reagentes de diagnóstico para flavonóides. (nm)

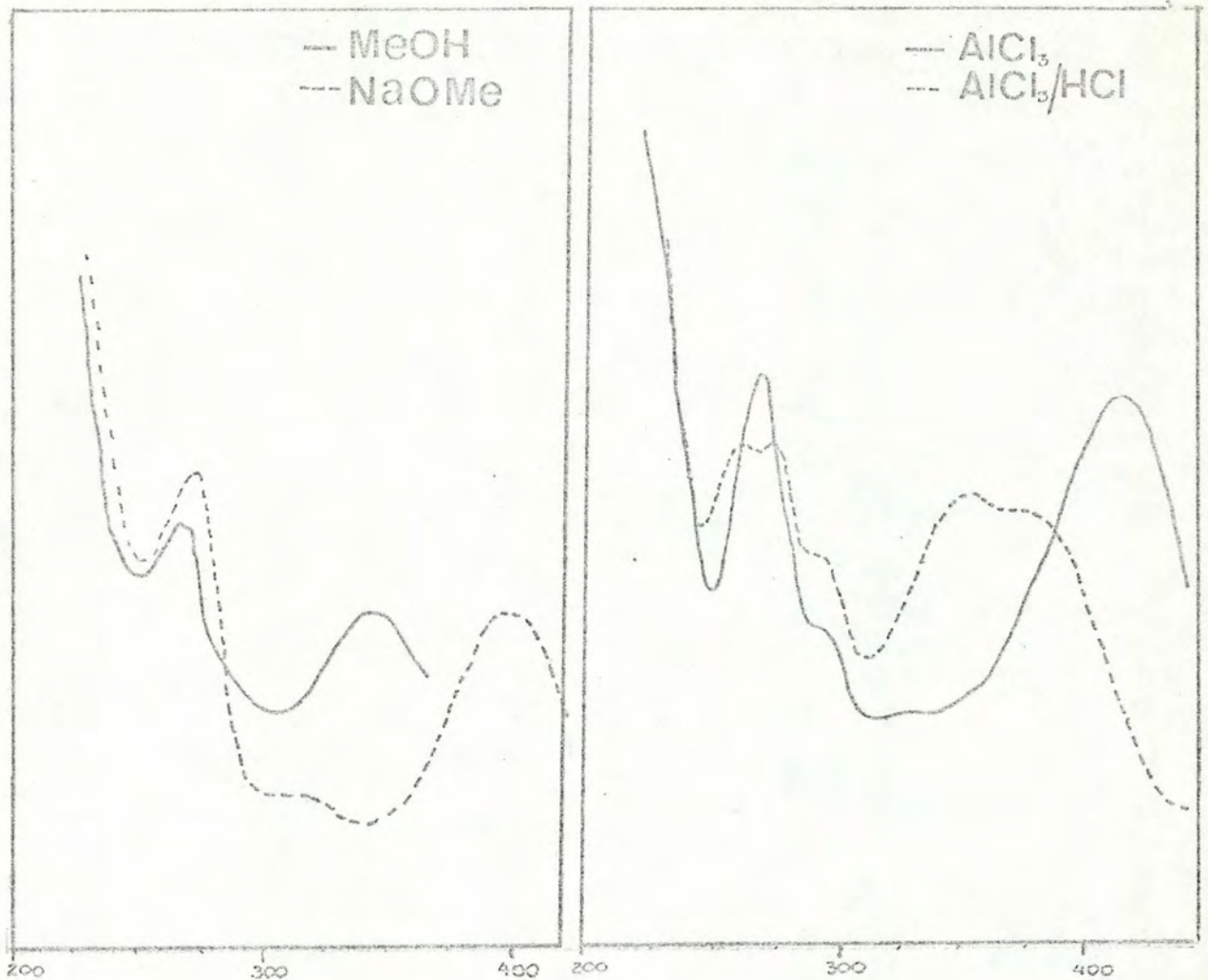
	A	B	C	D
Banda II	5	8	3	4
Banda I	74	33	-41	52

A- (Abs. em $AlCl_3$) - (Abs. em MeOH)

B- (Abs. $AlCl_3/HCl$) - (Abs. MeOH)

C- (Abs. $AlCl_3/HCl$) - (Abs. $AlCl_3$)

D- (Abs. NaOMe) - (Abs. MeOH)



ESPECTRO 3

AGLICONA F1Deteccão cromatográfica

(UV) escura
 (UV/NH₃) amarela

Valor Rf

AcOH 15% 0,08

Dados espectrais (nm)

MeOH	241sh, 255, 268, 350
AlCl ₃	273, 300sh, 330, 424
AlCl ₃ /HCl	263sh, 276, 297sh, 355, 383
NaOMe	272, 313sh, 402

O deslocamento hipsocrômico de 41 nm, verificado entre as bandas Ia dos espectros em AlCl_3 e AlCl_3/HCl , nos indica que houve decomposição do complexo formado com AlCl_3 , conseqüentemente deve estar presente, no anel B, um grupo o-dihidroxílico, pois outro padrão de substituição neste anel mostraria deslocamentos menores. (60)

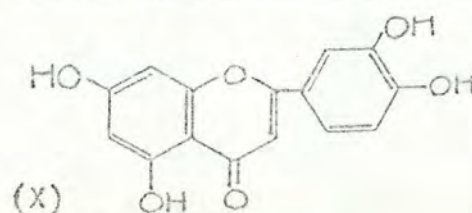
A diferença entre o posicionamento da Banda Ia em AlCl_3/HCl com relação à banda do espectro em metanol, com um valor positivo de 33 nm é característica para 5-hidroxi-flavonas, o que está de acordo com o resultado obtido para o heterosídeo.

Indicações adicionais são fornecidas pelo espectro em NaOMe. O deslocamento batocrômico da banda Ia para a banda I em metanol, de 52 nm é diagnóstico para flavonóides com grupamento hidroxílico livre em posição 4'. Realizada a medida do espectro após 20 minutos da adição do reagente, não mostrou alteração alguma, revelando assim que o composto apresenta hidroxila livre em 4' e não apresenta grupo hidroxílico na posição 3. Logo, com estes resultados podemos concluir que a aglicona de F1 apresenta uma estrutura parcial de 5,3',4'-trihidroxiflavona.

Comparação entre os dados espectroscópicos e cromatográficos da aglicona da fração F1 com 5,3',4'-trihidroxiflavonas mostrou coincidência com os dados de luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona). (tab.7) (X)

Tab.7- dados espectroscópicos da aglicona F1

	MeOH	AlCl_3	AlCl_3/HCl	NaOMe
Aglicona	241sh, 255,	273, 300sh,	263sh, 276,	272, 313sh
F1	268, 350	330, 424	297sh, 355, 383	402
luteolina	242sh, 253, 267,	274, 300sh,	266sh, 275,	266, 329sh
	291sh, 349	328, 426	294sh, 328, 385	401

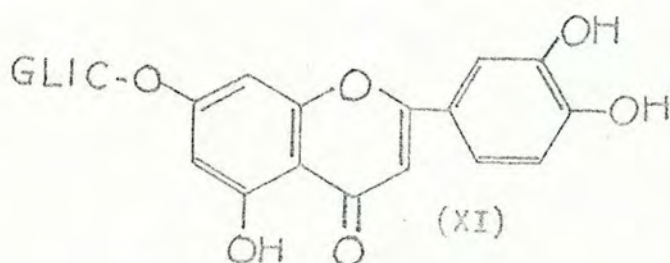


A pesquisa de açúcares na fração F1 utilizou o extrato piridínico, obtido a partir da fase aquosa ácida da hidrólise do heterosídeo, sendo cromatografado em papel Whatman número 1, com sistema eluente acetato de etila, piridina e água (55:27:18). O meio de detecção empregado foi a nebulização com ftalato de anilina (R_f), mostrando uma única mancha, coincidente com o padrão de glicose, com R_f 0,48. (fig. 10)

Podemos concluir então que a aglicona, por detecção cromatográfica e análise ultravioleta, é luteolina (X).

O açúcar componente do heterosídeo é glicose, comprovada por cromatografia frente padrão, e só poderia estar ligada, como O-heterosídeo, na posição 7, pois os dados espectroscópicos comprovam a hidroxila livre em C5, por isso propomos, para a fração F1 a estrutura de luteolina-7-glicosídeo (XI), salientando que esta conclusão está de acordo com :

- Dados espectroscópicos do heterosídeo
- Dados espectroscópicos da aglicona, demonstrando que a mesma é luteolina.
- Presença de glicose como componente osídico, em posição 7.
- Valor R_f do heterosídeo, em papel Whatman número 1, em ácido acético a 15%.



2.8. Análise da fração F2

A cromatografia em papel Whatman número 1, com ácido acético a 15%, apresentou mancha única, com valor R_f 0,24, que possuía

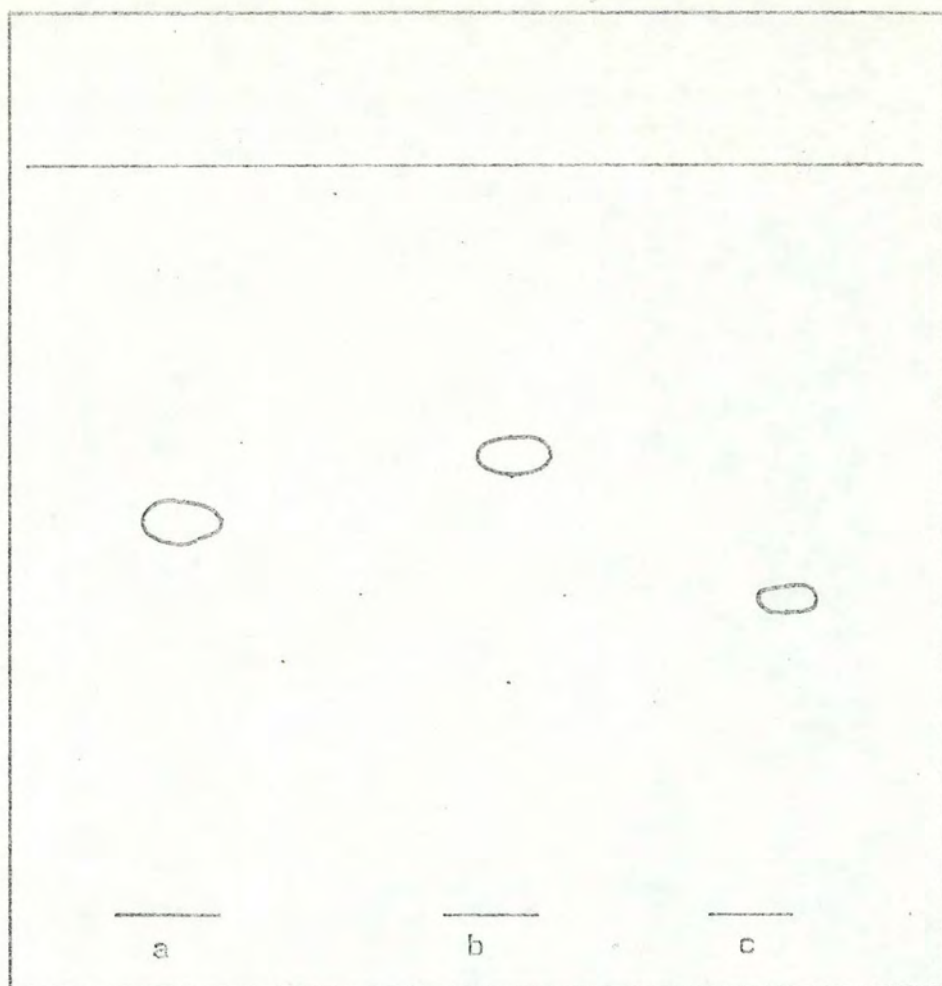


fig.9 - Pesquisa de agliconas

adsorvente : Sílicagel GF₂₅₄

eluente : S₄

deteção : Oxidoreto de Zircônio/UV₃₆₆

a aglicona da fração F1

b aglicona da fração F2

c aglicona da fração F3

coloração escura quando examinada sob luz ultravioleta (366 nm), a qual passou, após exposição a vapores de amônia, a apresentar fluorescência amarela.

Depois de isolada através de cromatografia em papel Whatman número 3, com eluente ácido acético 15 %, realizou-se análise espectroscópica ultravioleta.

A solução metanólica da fração F2 apresentou duas bandas principais de absorção. A primeira com máximo a 334 nm e a segunda com máximo de absorção a 268 nm (espectro 4). Pela ação do cloreto de alumínio houve desdobramento de ambas as bandas. A banda I, de maior comprimento de onda, apresentou-se desdobrada em duas, com máximos a 385 e 347 nm (bandas Ia e Ib respectivamente), a banda II, a 299 e 272 nm (bandas IIa e IIb).

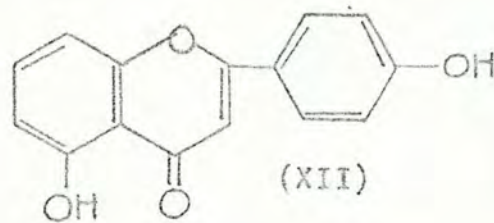
A adição de ácido clorídrico à solução metanol- AlCl_3 promoveu pequeno deslocamento das bandas para 383, 342, 298 e 276 nm, o que nos indica a presença de grupamento hidroxílico livre em C3 e/ou C5, devido à formação de complexo estável com AlCl_3 , e ausência de grupo o-dihidroxílico no anel B.

A existência de quatro bandas no espectro AlCl_3/HCl é típica para 3-hidroxi-flavonas, 3,5-dihidroxi-flavonas e 5-hidroxi-flavonas (60). Um deslocamento da banda I (em metanol) para a banda Ia (em AlCl_3/HCl), dentro de uma faixa de 35-55 nm é característico para 5-hidroxi-flavonas. No nosso caso, o deslocamento é de 49 nm. Os deslocamentos para 3-hidroxi-flavonas e 3,5-dihidroxi-flavonas encontram-se em torno de 60 nm e entre 50-60 nm, respectivamente.

Segundo James Mears, deslocamentos batocrômicos de cerca de 20 nm, da banda I (metanol) para a banda Ia (AlCl_3/HCl), são diagnóstico para 5 hidroxi-flavonas contendo uma função oxigenada na posição 6. (60) Deslocamentos maiores indicam aposição 6 não oxigenada, o que também reforça o indicio de ausência de grupos or-

to-dihidroxílicos, anteriormente mencionados.

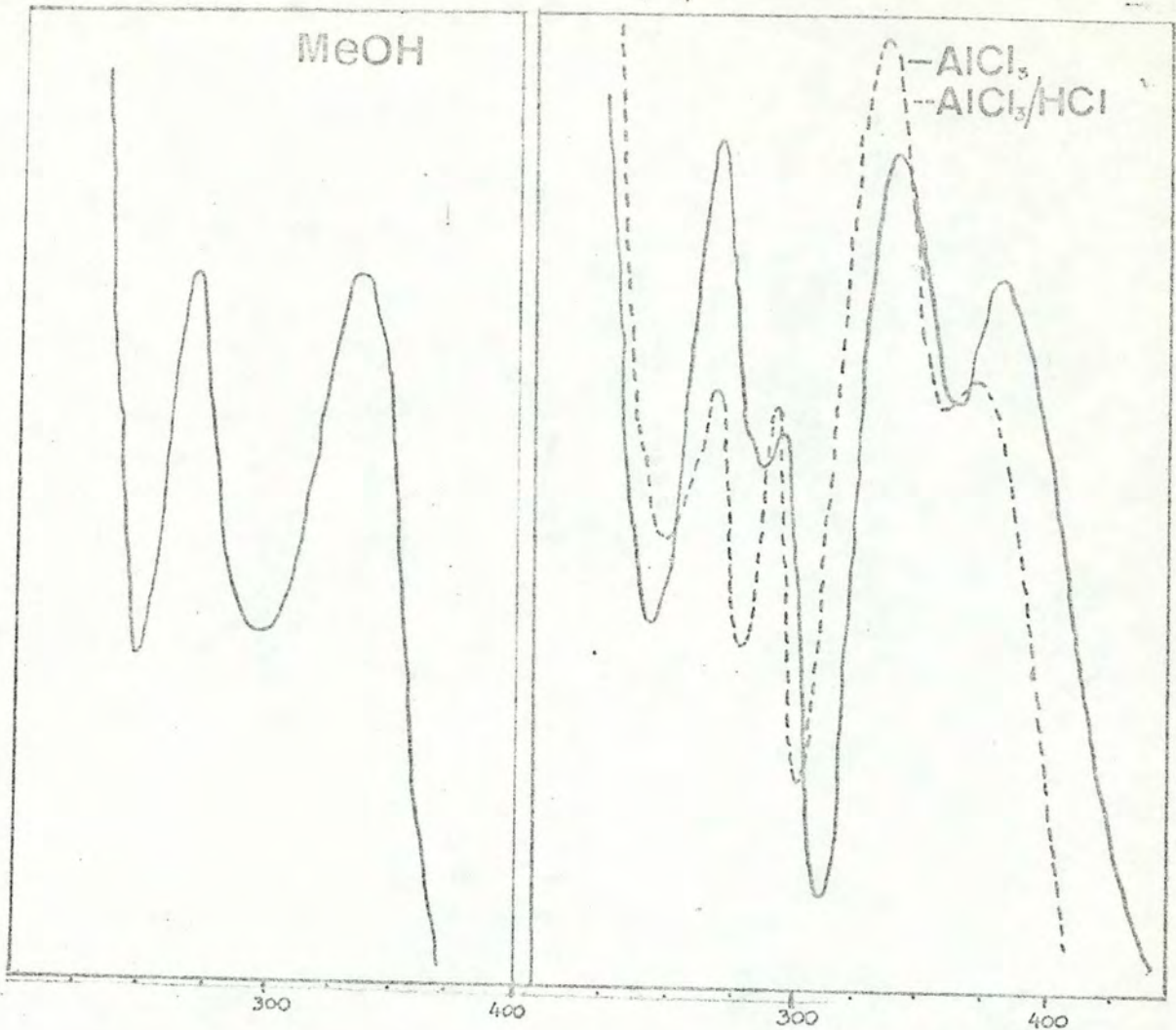
O máximo de absorção, a 268 nm (banda I em metanol) é característico para 5-hidroxi-flavonas ou 5,7-dihidroxi-flavonas. (47,60) Logo, pelos dados apresentados acima, pressupomos que F2 seja uma 5-hidroxi-flavona-7-substituída. Juntamente com a análise cromatográfica - alteração da coloração da mancha de escura para fluorescência amarela, sob a ação de NH_3 - nos confirma a estrutura de uma flavona com grupamentos livres em 5 e 4'. (XII)



Com base nestas observações, realizamos a comparação entre os espectros de F2 e de 5-hidroxi-flavonas-7-substituídas, notando concordância entre o composto em análise e apigenina-7-glicosídeo. Esta hipótese é reforçada pelos valores R_f obtidos em papel Whatman número 1, com eluente ácido acético 15% (0,24 para F2 e 0,26 para apigenina-7-glicosídeo, apresentado na literatura). (60)

A solução metanólica da fração F2 foi hidrolisada, pelo aquecimento em refluxo, com adição de HCl 2N, e extraída com éter etílico. A fase éterea foi levada à secura e o resíduo foi ressuspendido em metanol e reservado para a análise cromatográfica e espectroscópica da aglicona.

A solução metanólica do resultado da hidrólise ácida de F2 foi cromatografada em papel Whatman número 1, tendo como sistema eluente ácido acético 15%, apresentando valor R_f 0,11. A detecção da mancha foi realizada sob luz ultravioleta (366 nm) e pela exposição aos vapores de amônia. A mancha, que inicialmente mostrava coloração escura, passou a apresentar fluorescência amarela. Realizamos também cromatografia em camada delgada de sílicagel ...



ESPECTRO 4

FRACÃO F2Deteccão cromatográfica

(UV) escura .

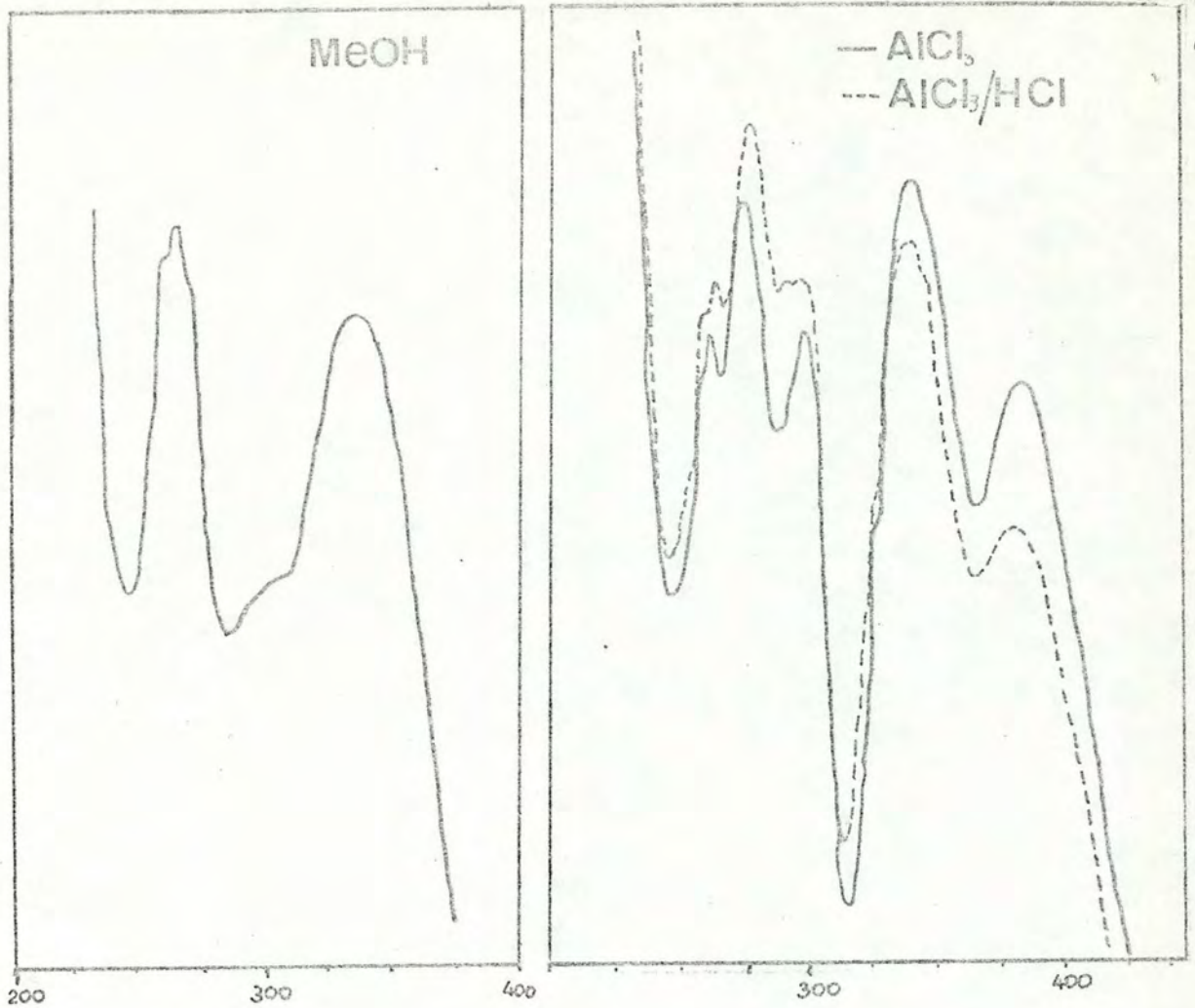
(UV/ NH_3) fluorescência amarelaValor Rf

AcOH 15% 0,24

Dados espectrais (nm)

MeOH 268, 286sh, 334

 AlCl_3 277, 299, 347, 385 AlCl_3/HCl 270, 298, 342, 384



ESPECTRO 5

AGLICONA F2

Deteccão cromatográfica

(UV) escura
 (UV/NH₃) fluorescência amarela

Valor Rf

AcOH 15% 0,11

Dados espectrais (nm)

MeOH	251sh, 256, 264, 267sh, 336
AlCl ₃	251sh, 256sh, 263, 276, 289sh, 301, 345, 385
AlCl ₃ /HCl	251sh, 257sh, 263, 278, 293, 298, 341, 383

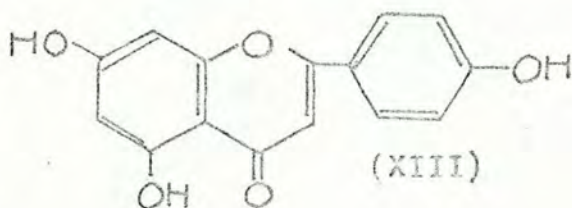
GF₂₅₄, e empregando tolueno, clorofórmio e ácido fórmico como sistema eluente. (veja fig. 9)

O extrato metanólico da aglicona de F2 foi analisada através de espectroscopia ultravioleta, observando-se os espectros em metanol e as alterações ocorridas no espectro pela adição de AlCl₃ e HCl.

A aglicona de F2 (espectro 5) teve como máximos de absorção, em metanol, os comprimentos de onda a 256, 264, 267sh, 297sh e 336 nm. O espectro em AlCl₃ revelou desdobramento das bandas de absorção, sendo que permaneceram sem apresentar deslocamento as absorções correspondentes a 256 e 264 nm. Houve deslocamento batocrômico para os seguintes comprimentos de onda: 276, 301, 345 e 385 nm.

A adição de ácido clorídrico não causou modificações significantes, em relação ao espectro com AlCl₃, indicando a formação de complexo ácido-estável entre os grupamentos cetônico em C4, e hidroxílico em C5, mostrando ainda a inexistência de hidroxilas vicinais. A confirmação da existência de oxidrila livre na posição 5 nos é dada pelo deslocamento batocrômico de 49 nm entre a banda I (em metanol) e a banda Ia (em AlCl₃/HCl), 336 e 385 nm respectivamente.

Pelos dados compilados, podemos então concluir que o composto em análise é 5,7,4'-trihidroxiflavona (Apigenina) (XIII)



Para a pesquisa cromatográfica dos açúcares componentes do heterosídeo, foi utilizado o extrato piridínico obtido pela maceração da fase aquosa ácida da hidrólise da fração, neutralizada

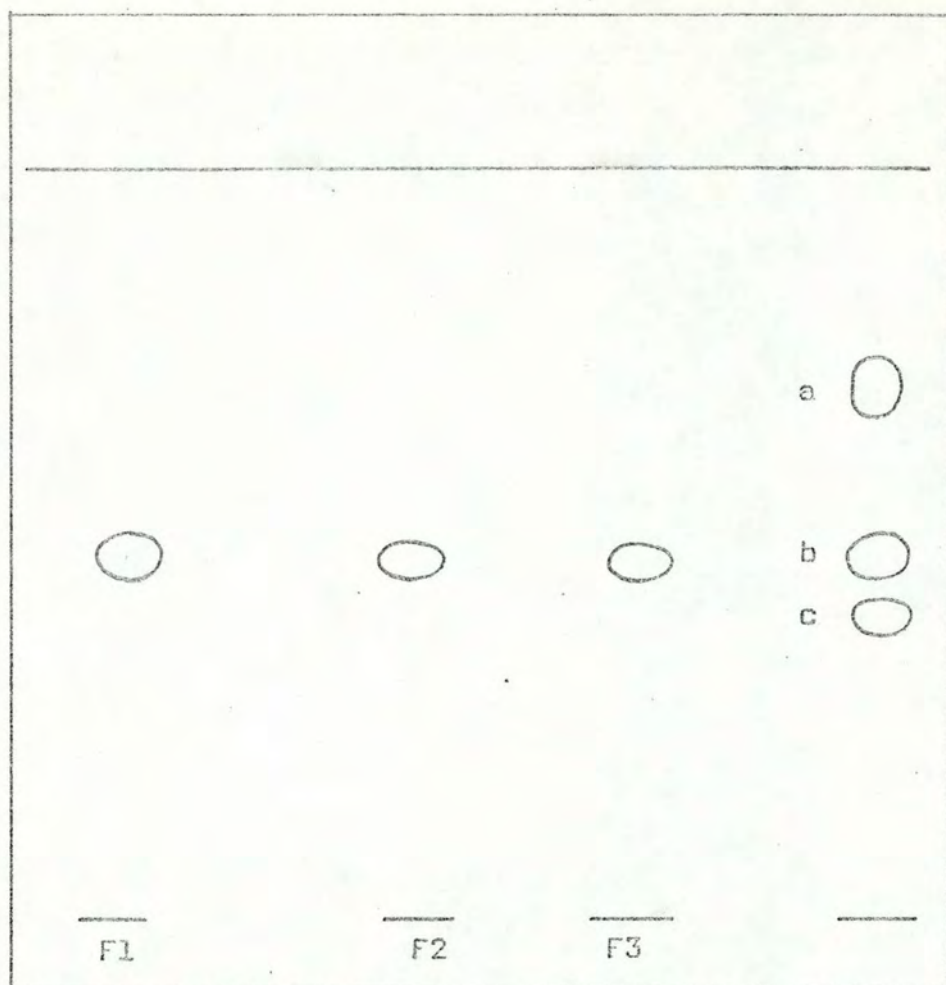


fig. 10 - Análise de açúcares

adsorvente : Papel Whatman número 1

eluente : P_2

deteção : Ftalato de anilina (R_3)

F1 extrato piridínico de F1 para pesquisa de açúcares

F2 extrato piridínico de F2 para pesquisa de açúcares

F3 extrato piridínico de F3 para pesquisa de açúcares

a rarnose

b glicose

c galactose

com hidrogenocarbonato de sódio e levada à secura.

A cromatografia em camada delgada, utilizando adsorvente Terra sílica G, impregnada com acetato de sódio 0,02 M, foi desenvolvida em sistema eluente isopropanol em acetato de etila 65 %, com câmara saturada. (56) Os reveladores empregados foram anisaldeído (R_2), ftalato de anilina (R_3). (11,88) Os reativos de nebulização detectaram somente os padrões, apesar da literatura referir ao reativo anisaldeído (R_2) sensibilidade de até 0,5 ug, para pesquisa de açúcares nestas condições.

Outra técnica empregada foi a cromatografia em placas de sílica gel GF₂₅₄, eluente sulfeto de carbono, acetonitrila e água, na proporção (85:5:10), desenvolvendo-se o cromatograma 4 vezes. (91) O revelador foi anisaldeído (R_2). Novamente apenas os padrões foram detectados.

Necessitando de uma técnica mais sensível, tentamos a cromatografia em papel, adaptando uma técnica descrita, para cromatogramas em camada delgada de celulose, por Stoess. (91) O meio eluente foi acetato de etila, piridina e água, na proporção (55:27:18) e a detecção foi realizada pelo emprego de ftalato de anilina (R_3) utilizando como padrões glicose, rarnose e galactose.

O extrato piridínico de F2 apresentou mancha com reação positiva a glicose, com valor Rf 0,47. (fig.10)

A hipótese de que o heterosídeo F2 seja apigenina-7-glicosídeo, ficou, pela demonstração da aglicona como apigenina, e do açúcar como glicose, mais reforçada. Realizamos a seguir, para tentativa de confirmação de F2 como apigenina-7-glicosídeo, análise cromatográfica em papel Whatman número 1 e eluente ácido acético 15%, fazendo-se a detecção sob luz ultravioleta, e empregando-se como reveladores vapores de amônia e $AlCl_3$ em metanol a 2%. Aplicamos também o padrão apigenina-7-glicosídeo. (fig. 11)

F2 apresentou mancha única com valor Rf 0,24, idêntico ao

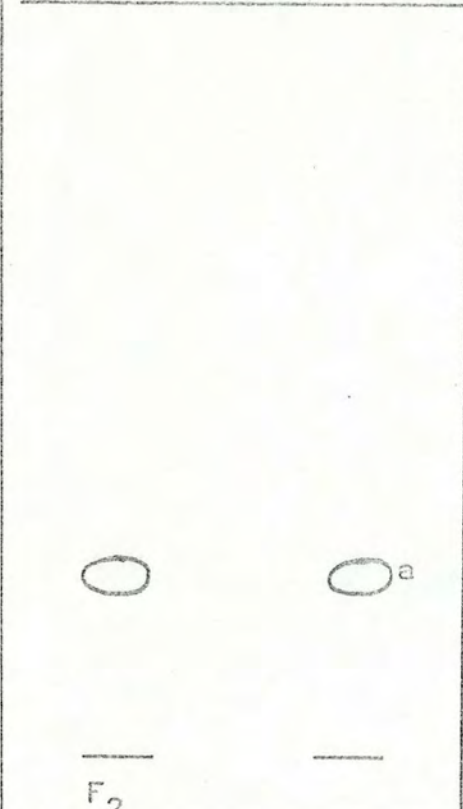
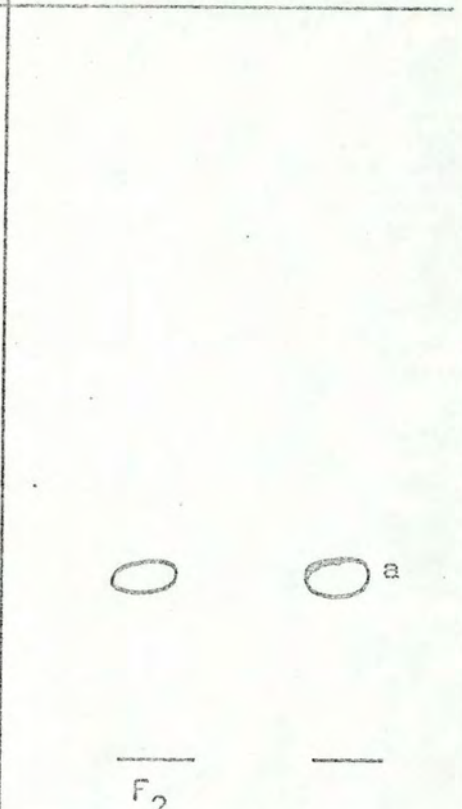
I	II
	

Fig.-11 - Comparação cromatográfica entre a substância F2 e apigenina-7-glicosídeo.

adsorvente : Papel Whatman número 1

eluente : ácido acético 15%

detecção : I UV/vap. NH_3
II UV/ AlCl_3

F_2 : Solução metanólica da Fração F2

a : Apigenina-7-glicosídeo

do padrão, sendo que ambas passaram de escuras a fluorescência amarela, após exposição aos vapores de amônia e nebulização com a solução metanólica de AlCl_3 .

A investigação através de espectroscopia ultravioleta mostrou os resultados apresentados na tabela 8.

tab.8- Espectroscopia ultravioleta comparativa entre a fração F2 e apigenina-7-glicosídeo.

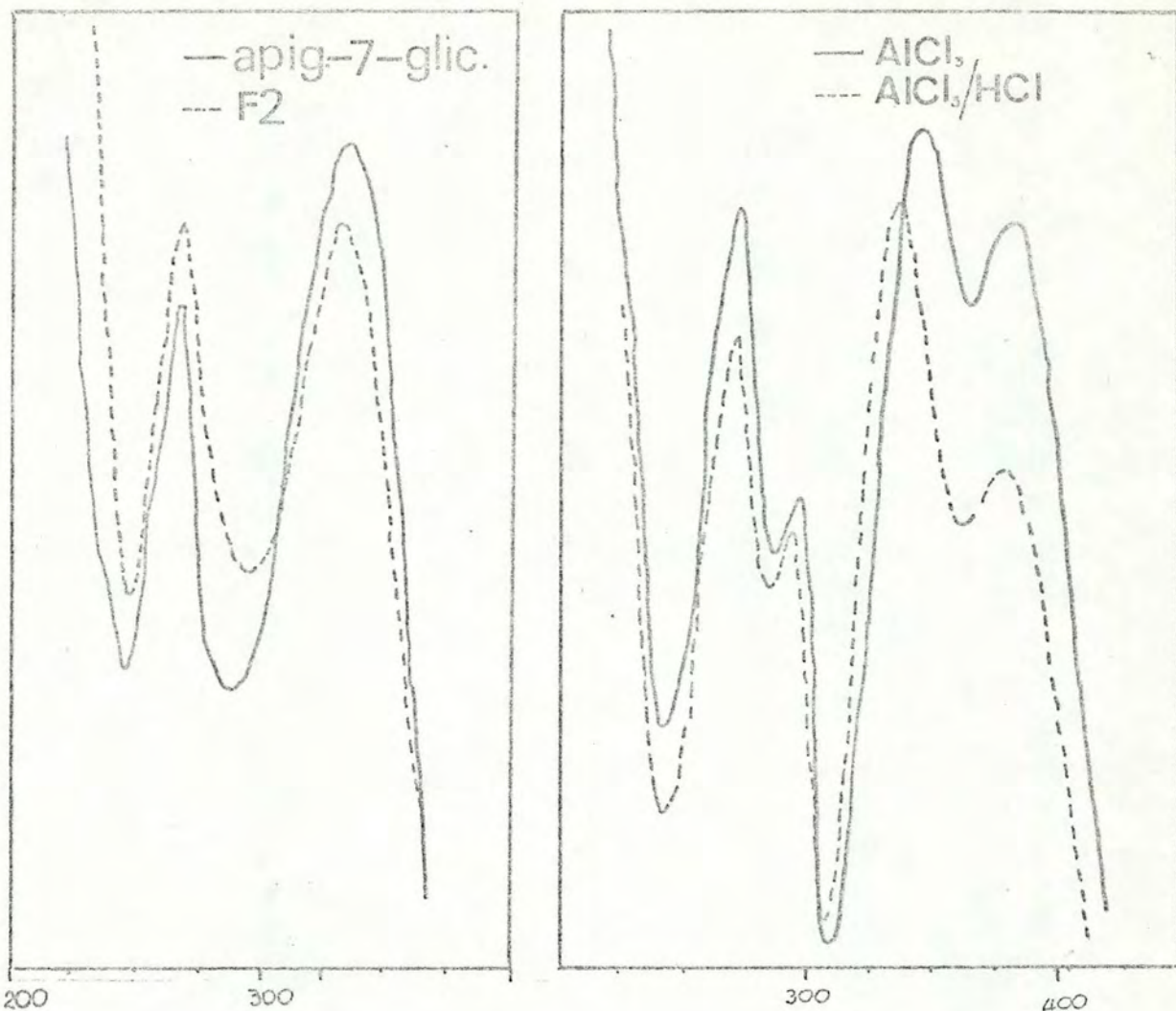
	F2	apigenina-7-glicosídeo	
		padrão	literatura (60)
MeOH	268, 286sh, 334.	268, 334	268, 333
AlCl_3	272, 299 347, 385	276, 299 350, 386	276, 300 348, 386
AlCl_3/HCl	276, 298 342, 383	276, 298 344, 384	277, 299 341, 382

A análise destes dados nos mostra a concordância entre os dados de F2 e de apigenina-7-glicosídeo.

O exame comparativo entre os espectros das agliconas F2 e a apigenina, por sua vez revelou novamente similitude entre os dados. (Tab.9)

Tab.9- Espectroscopia ultravioleta comparativa entre a aglicona de F2 e apigenina.

	Aglicona F2	Apigenina (60)
MeOH	251sh, 256, 264, 267sh 297sh, 336	267, 296sh, 336
AlCl_3	251sh, 256sh, 263, 276, 289sh, 345, 385	276, 301, 348, 384
AlCl_3/HCl	251sh, 257sh, 263 278, 293, 298, 341 383	276, 299, 340, 381

ESPECTRO 6APIGENINA-7-GLICOSÍDIODeteccão cromatográfica

(UV) escura

(UV/NH₃) fluorescência amarelaValor Rf

AcOH 15% 0,24

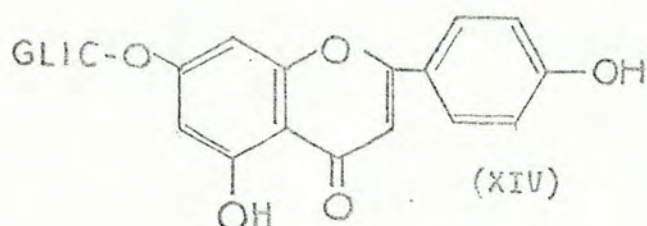
Dados espectrais (nm)

MeOH 268,334

AlCl₃ 276,300,349,386AlCl₃/HCl 276,298,344,383

Concluimos pela estrutura de apigenina-7-glicosídeo para F2, o (XIV) fundamentados em :

- apresentar o mesmo valor Rf e as mesmas reações de detecção cromatográfica como apigenina-7-glicosídeo;
- Possuir concordância entre os valores de absorção por análise ultravioleta com o padrão apigenina-7-glicosídeo;
- Ausência de hidroxilas vicinais e presença de hidroxila livre em posição 5, comprovada pela análise dos deslocamentos na investigação espectroscópica;
- Ter apigenina como aglicona, comprovada por espectroscopia ultravioleta e cromatografia.
- Ter glicose como componente esídico, diagnosticada por cromatografia frente padrão.



2.9 Análise da fração F3

O exame da fração F3 por cromatografia em papel Whatman número 1, com ácido acético 15% apresentou valor Rf 0,42. Detectada sob luz ultravioleta (366 nm) apresentou coloração escura, que passou a fluorescência amarela após exposição a vapores de amônia.

Este valor Rf nos permite concluir por uma estrutura mais polar para F3, o que é representado por um composto com um padrão de oxigenação mais elevado.

A solução metanólica de F3 mostrou, na análise espectroscó-

pica ultravioleta, duas bandas principais de absorção. A primeira a 359 nm, com baixa intensidade, e a segunda a 257, com alta intensidade. Mostrou ainda uma banda intermediária a 299 nm, com intensidade inferior as outras duas. (espectro 7)

O exame do aspecto da curva de absorção da fração F3, sugere a presença de um flavonol. (60)

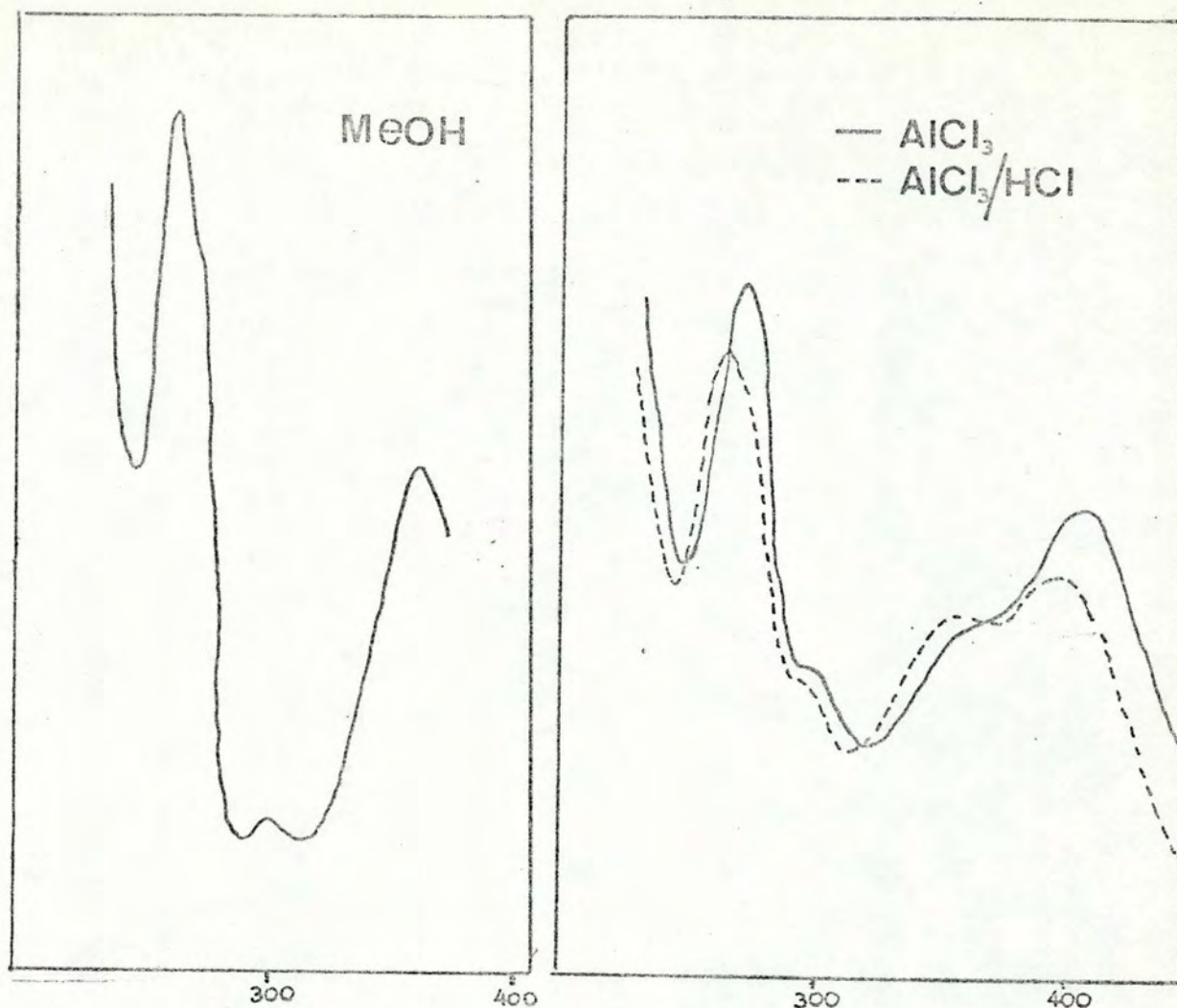
A posição da banda I a 359 nm, encontra-se na região de absorção de flavonóis-3-O-substituídos (veja tabela 2), sendo ainda característica para flavonóis que apresentam grupamento hidroxílico livre na posição 7. (81)

Seguindo a marcha prescrita por Mabry, adicionou-se à solução etanólica de F3, $AlCl_3$ anidro 2% em metanol, obtendo-se um espectro onde as bandas I e II, encontram-se deslocadas, mas não desdobradas, o que vem reforçar a hipótese de estarmos frente a um flavonol. (60) A banda I passou para 409 nm e a banda II para 271 nm.

A adição de HCl à solução metanol- $AlCl_3$ não causou modificações significativas, o que nos faz concluir pela inexistência de grupos o-dihidroxílicos nos anéis A e B, e a formação do complexo ácido-estável 5-hidroxi-4-ceto- $AlCl_3$.

A comparação entre a banda I do espectro em metanol, com a banda I apresentada pelo espectro com $AlCl_3$ acidificado, mostrou um deslocamento de 43 nm, característico para flavonóis com grupamentos 3'-hidroxi-4'-metoxi, 3'-metóxi-4'-hidroxi ou 3',4'-dimetoxi em 5-hidroxiflavonóis. Logo F3 deve possuir no anel B pelo menos um grupo metoxi. (62)

Podemos concluir que F3 apresenta uma estrutura 5,7-dihidroxiflavonol-3-O-substituído, que possui o anel B substituído em 3' e 4' por grupamento hidroxílico e metoxílico, ou então por dois grupos metoxílicos. A mudança da coloração, na detecção cromatográfica produzida pelos vapores de amônia é diagnóstico para fla



ESPECTRO 7

FRACÃO F3

Deteccão cromatográfica

(UV) escura

(UV/ NH_3) fluorescência amarela

Valor Rf

AcOH 15% 0,42

Dados espectrais (nm)

MeOH 257,268sh,299sh,359

AlCl_3 271,303sh,364sh,409

AlCl_3/HCl 266,292sh,359sh,402

vonóis com hidroxila livre em posição 4', evidenciando assim, que o grupo metoxila só pode se encontrar na posição 3'.

O estudo comparativo dos espectros de F3, assim como o valor do deslocamento da banda I em $AlCl_3/HCl$ em relação ao espectro em metanol, mostra similitude com os dados de isorramnetina-3-monoheterosídeo, sendo possível o galactosídeo. (60)

Após extração com éter etílico da solução resultante da hidrólise ácida de F3 segundo Mabry, a fase etérea foi levada à secura e o resíduo ressuspendido em metanol, para a pesquisa da aglicona de F3. (60)

A cromatografia em papel Whatman número 1, com ácido acético a 15%, apresentou uma única mancha com valor R_f 0,02. Pela detecção sob luz ultravioleta (366 nm) apresentou coloração amarelo suja, que não se modificou após exposição aos vapores de amônia, o que nos indica a liberação da hidroxila da posição 3, pois esta reação característica é devida a presença de flavonóis com hidroxila livre em C3 e C5, o que está de acordo com a análise espectroscópica do heterosídeo. Evidencia-se assim que o açúcar encontra-se ligado na posição 3.

O valor R_f 0,02 não nos dá uma informação muito segura, além do que não tivemos possibilidades de confrontá-lo com padrão de isorramnetina, apesar da coincidência dos valores apresentados pela literatura.

O exame ultravioleta da solução metanólica da aglicona apresentou dois picos principais de absorção a 371 e 257 nm e dois ombros a 294 e 270 nm, nos confirmando o padrão de absorção de flavonóis. A banda a 371 nm demonstra a presença de grupo oxidrílico livre em posição 3. A hidroxila livre em C7 é evidenciada pela absorção a 257 nm, que permaneceu inalterada após a hidrólise ácida do heterosídeo.

A adição de $AlCl_3$ provocou deslocamento de todas as bandas

de absorção para comprimentos de onda mais altos. Para a banda I o valor do deslocamento foi de 61 nm e para a banda II de 11 nm.

A acidificação com HCl 2N da solução metanol- AlCl_3 prova, pelo não acontecimento de deslocamentos, que não existem grupos orto-dihidroxílicos na molécula da aglicona, e que houve formação de complexo ácido-estável entre o Al e o quelato 4-oxo-5-hidroxílico como no heterosídeo, ou 4-oxo-3-hidroxílico. (69,71)

O deslocamento batocrômico de 57 nm relacionando as bandas I em AlCl_3/HCl e em metanol, nos indica a presença de hidroxilas livres em posição 3 e 5. (60) Este fato vem a confirmar a estrutura de um flavonol.

O deslocamento da banda II, confrontando os espectros em AlCl_3/HCl e em metanol, de 10 nm é observado para flavonóides com grupamentos 3'-hidroxi-4-metóxi, 3'-metoxi-4'-hidroxi ou 3',4'-dimetoxi no anel B. (62)

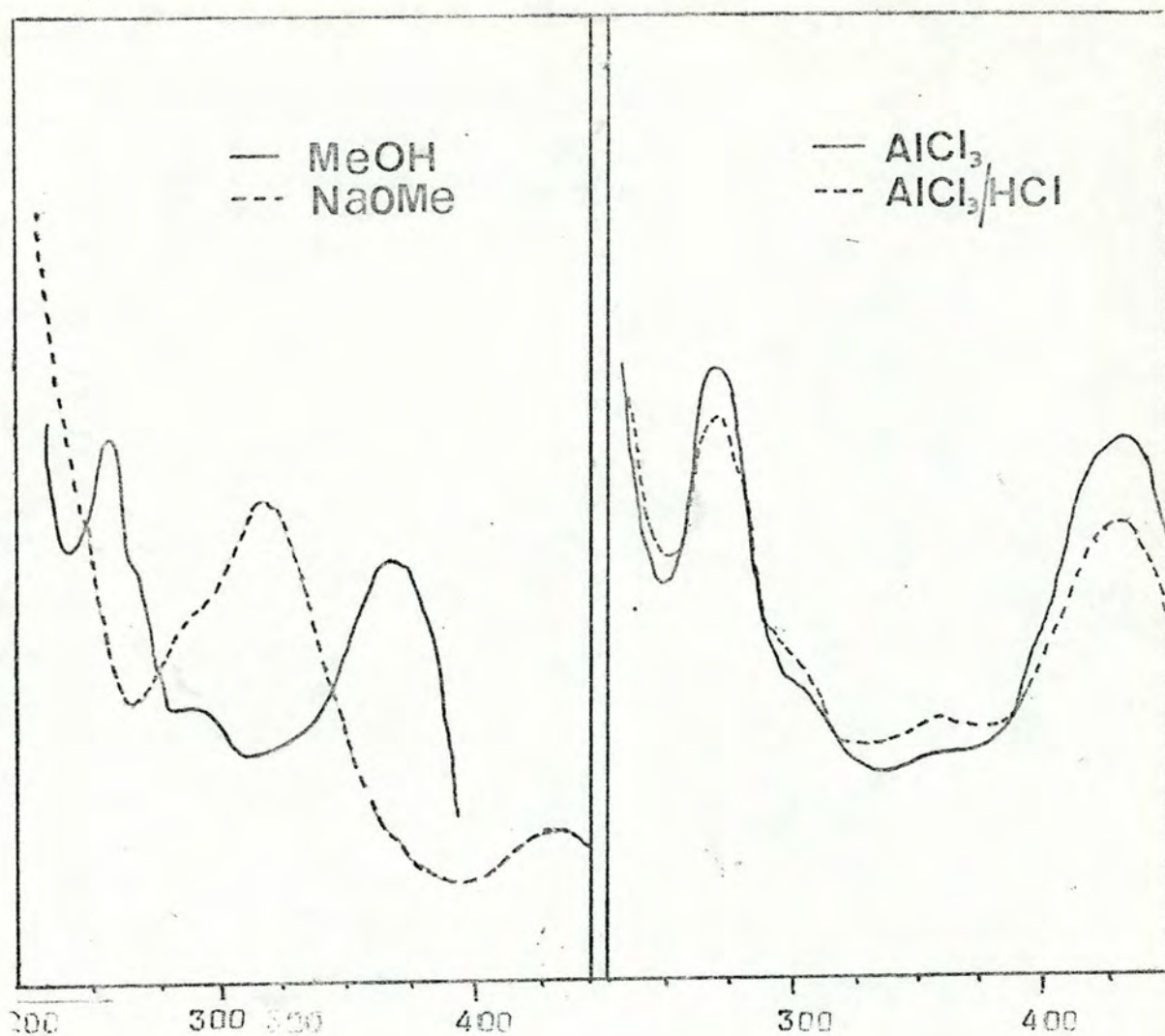
O espectro em NaOMe é utilizado para a verificação principalmente de grupamentos hidroxílicos livres em 3 e/ou 4'. Um efeito batocrômico de 50-60 nm da banda I em relação ao espectro em metanol, mostrando bandas de intensidade decrescente é indício de hidroxilas livres em 3 e 4'.

Assim, podemos concluir que as posições dos grupos hidroxílico e metoxílico no anel B, correspondem respectivamente a 4' e 3'.

Logo, a aglicona de F3 corresponde à estrutura de 3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona.

A comparação entre os dados cromatográficos da aglicona F3 e de isorramnetina, assim como os dados espectrais, mostram que se tratam da mesma substância. (tabela 10)

As pequenas discrepâncias encontradas na análise cromatográfica e espectroscópica do heterosídeo de F3, com os citados na bi



ESPECTRO B

AGLICONA F3Deteccão cromatográfica

(UV) amarelo sujo

(UV/NH₃) amarelo sujoValor Rf

AcOH 15% 0,02

Dados espectrais (nm)

MeOH 257,270sh,294,371

AlCl₃ 268,302sh,360sh,432AlCl₃/HCl 267,292sh,359sh,428

NaOMe 240sh,287sh,322,435 (intens. decrescente)

biografia para o monoheterosídeo de isorramnetina, podem ser devidas aos diferentes açúcares que se encontram ligados ao oxigênio do carbono 3.

tab.10- Comparação entre os dados espectroscópicos da aglicona F3 e isorramnetina.

	Aglicona F3	Isorramnetina (60)
MeOH	257, 270sh, 294sh, 371	253, 267sh, 306sh, 326sh, 370
AlCl ₃	268, 302sh, 360sh, 432	264; 304sh, 361sh, 431
AlCl ₃ /HCl	240sh, 287sh, 322, 435	240sh, 271sh, 328sh, 435

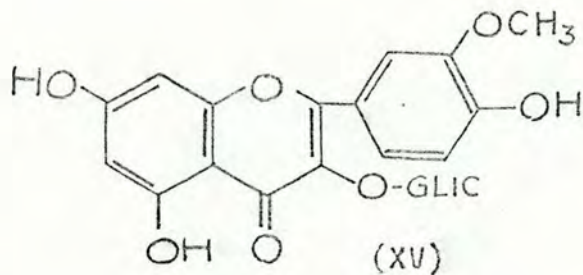
Para a pesquisa cromatográfica dos componentes osídicos de F3, realizamos a extração com piridina, da fase aquosa ácida proveniente da hidrólise ácida do heterosídeo, após neutralização com hidrogenocarbonato de sódio e concentração até secura.

A verificação do açúcar foi efetuada em papel Whatman número 1, tendo como sistema eluente acetato de etila, piridina e água (55:27:18), fazendo-se a detecção pela nebulização com ftalato de anilina (R₃).

O extrato piridínico apresentou uma só mancha coincidente com padrão de glicose (Rf 0,48)

A análise de F3 revelou que este composto é isorramnetina-3-glicosídeo (XV), devido :

- Apresentar como componente aglicônico isorramnetina, comprovada através da análise espectroscópica;
- Possuir glicose como açúcar, ligado à posição 3;
- Mostrar por espectroscopia ultravioleta padrão de substituição no anel B, hidroxila livre em 4' e grupamento metoxila em 3', e de indicar somente posição 3-O-substituída.

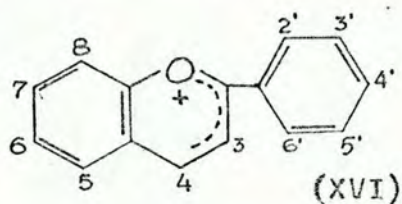


3. Pesquisa de antocianinas

3.1 Introdução

A presença de coloração vermelha nas partes vegetativas e florais de Euphorbia prostrata Ait., e a formação desta cor, no extrato, quando do tratamento do vegetal por HCl 2N, a quente, nos fez supor da existência de compostos antocianínicos. (2,17)

Antocianinas são heterosídeos de sais do cátion polihidroxi flavílio. (XVI) (29,93) São substâncias anfóteras que formam sais de oxônio com ácidos orgânicos e minerais. (87) Consideram-se como os principais responsáveis pelas colorações rosa, vermelha, malva e azul nas plantas. (4,7,8,33)



As agliconas - antocianidinas - produzidas pela hidrólise de antocianinas, são instáveis à luz e insolúveis em água, fazendo concluir deste fato que a glicosilação é fator indispensável para a estabilidade destes compostos.

A maior responsável pela variação das antocianinas não é a natureza das agliconas, mas sim a natureza, número e posicionamento dos açúcares e outros resíduos na molécula da aglicona.

O desenvolvimento alcançado através de técnicas cromatográ-

ficas e espectroscópicas, permitiram o reconhecimento, até os nossos dias, da existência de onze antocianidinas. (tab 11)

tab.11 - Antocianidinas já identificadas (33,50,81)

	3	5	7	3'	4'	5'
apigeninidina	H	OH	OH	H	OH	H
luteolinidina	H	OH	OH	OH	OH	H
pelargonidina	OH	OH	OH	H	OH	H
cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	H
peonidina	OH	OH	OH	OMe	OH	H
rosinidina	OH	OH	OMe	OMe	OH	H
delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH
hirsutidina	OH	OH	OMe	OMe	OH	OMe
petunidina	OH	OH	OH	OMe	OH	OH
malvidina	OH	OH	OH	OMe	OH	OMe
capensidina	OH	OMe	OH	OMe	OH	OMe

As diferentes colorações apresentadas pelas antocianinas são devidas às alterações nos padrões de oxigenação. Assim, cores escarlate estão relacionadas, geralmente, com a presença de pelargonidina, enquanto que as colorações vermelhas a cianidina e malva e azul com delfinidina. Não há influência no padrão de glicosilação com respeito à coloração. (33)

Outros fatores que alteram a coloração são a complexação com metais e copigmentação.

Um ponto importante a considerar, já que a pesquisa de flavonóides foi objeto de estudo em nosso trabalho, é a biossíntese de antocianinas.

Harborne verificou que diversos vegetais apresentavam flavonóides e antocianidinas com mesmo padrão de hidroxilação, provando a existência desta relação entre canferol e pelargonidina, quercetina e cianidina e miricetina e delfinidina. (32) Kuhn mostrou a mesma correlação entre isorramnetina e peonidina. (52)

Geissman e Crout citam como precursores imediatos de antocianidinas 2-flaven-3,4-dióis ou 3-flaven-2,3-dióis. (29)

Quanto ao padrão de glicosilação, há predominância para os compostos 3- e 3,5-substituídos. (29,52)

3.2 Distribuição de antocianinas em Euphorbiaceae

Antocianinas são restritas a vegetais superiores, pteridófitas, musgos, não havendo registro de estarem presentes em fungos e bactérias. No grupo dos vegetais superiores somente estão ausentes em oito famílias da ordem Centrospermae.

Na família Euphorbiaceae, Hegnauer relata a ocorrência de leucoantocianidinas - compostos sem coloração, que quimicamente podem ser flavanodióis ou dímeros condensados de estrutura flavonóidica - na casca de Phyllanthus emblica L e Cleistanthus collinus Benth. leucodelfinidina, e leucocianidina em Acalypha godseffiana e Phyllanthus pulcher. (38) Sen e col. determinaram a presença de antocianidinas no ciétio de Euphorbia caducifolia. (83)

As duas classes mais comuns de antocianinas encontradas são os 3- e 3,5-diglicosídeos. As antocianidinas mais frequentes são a cianidina, delfinidina e pelargonidina, sendo a mais comum a cianidina.

3.3 Métodos de pesquisa de antocianinas.

A pesquisa cromatográfica e a análise por espectroscopia na região do visível são os métodos usualmente empregados na investigação de antocianinas. (18,33,35,42,43)

O valor Rf é a mais simples característica para a identificação de antocianinas, com base nos seus componentes osídicos. Compostos com a mesma aglicona, mas com diferentes açúcares apresentam valores Rf diferentes, acontecendo o mesmo para dois compostos onde o resíduo osídico liga-se à diferente posição.

Outro dado importante fornecido pela análise cromatográfica destes compostos está relacionado ao número de resíduos de açúcares ligados à antocianidina. O aumento do número de moléculas de açúcar corresponde a um decréscimo no valor Rf em butanol-ácido acético e acréscimo em solventes aquosos ácidos. (7,33,87)

Antocianinas, quando analisadas por espectroscopia, apresentam duas bandas de absorção. Uma na região do visível, entre 465 e 550 nm e uma segunda, na região ultravioleta, com um máximo a cerca de 275 nm. As medições foram estandarizadas empregando-se metanol contendo 0,01% de HCl concentrado. (7,33,87)

Na tabela 12 apresentamos as características espectrais de algumas das mais importantes antocianidinas.

tab.12 - Máximos de absorção, em nm, de antocianidinas, em MeOH acidificado com HCl, e deslocamentos causados pela complexação com $AlCl_3$, da banda de absorção na região do visível.

antocianidina	MeOH/HCl	desloc. $AlCl_3$	referências
apigeninidina	277,476	0	33,34
luteolinidina	279,496	48	34,73
pelargonidina	520	0	33,34
cianidina	277,535	20	34,42
peonidina	532	0	33,73
delfinidina	277,546	24	35,42
petunidina	276,543	14	35
malvidina	275,542	0	33,35,42

No capítulo que dedicamos à pesquisa ultravioleta de flavonóides, falamos da utilização de $AlCl_3$ como meio de diagnóstico na determinação do padrão de hidroxilação. Na análise de antocianidinas, emprega-se este reagente a fim da detecção de grupamentos dihidroxílicos vicinais.

As posições onde se ligam os açúcares induzem também a alterações no comprimento de onda das absorções.

O maior problema na identificação de antocianinas está relacionado com sua labilidade e dificuldade de obtê-las em estado puro.

3.4 Pesquisa de antocianinas em Euphorbia prostrata Ait.

O método empregado para a extração das antocianinas em nosso trabalho foi o sugerido por Schönert. (78) Baseia-se no tratamento do vegetal por n-butanol acidificado, em refluxo, e após concentração, adição de solução metanólica de HCl. A extração das antocianinas foi feita com álcool amílico, sendo as mesmas precipitadas com uma quantidade em excesso de éter de petróleo 40^o-60^oC. O resíduo vermelho, assim obtido, foi ressuscitado em metanol.

A fim de verificarmos a influência da concentração do ácido no produto de extração, realizamos uma variação da técnica pelo emprego de HCl 2N (subst. X₁) e HCl 37% (subst. X₂), quando da primeira fase de extração.

As soluções metanólicas foram reservadas para a análise cromatográfica e espectroscópica.

As cromatografias das soluções metanólicas de X₁ e X₂ foram desenvolvidas em papel Whatman número 1 e em camada de celulose com espessura de 0,4 mm.

Os meios móveis empregados foram HCl 2N (55), n-butanol-HCl 2N (50:50) (11), n-butanol-HCl concentrado-água (35:10:25) (43), para a cromatografia em papel e ácido fórmico-HCl concentrado-água (50:20:30) (42), ácido propiônico-ácido fórmico-HCl concentrado-água (15:35:7:43), ácido fórmico-ácido clorídrico 37%-água (30:3:10) e ácido acético glacial-ácido clorídrico concentrado-água (30:40:32) (78) para a cromatografia em camada delgada de celulose. (figura 12)

Os valores R_f da análise cromatográfica encontram-se dispostos na tabela 13.

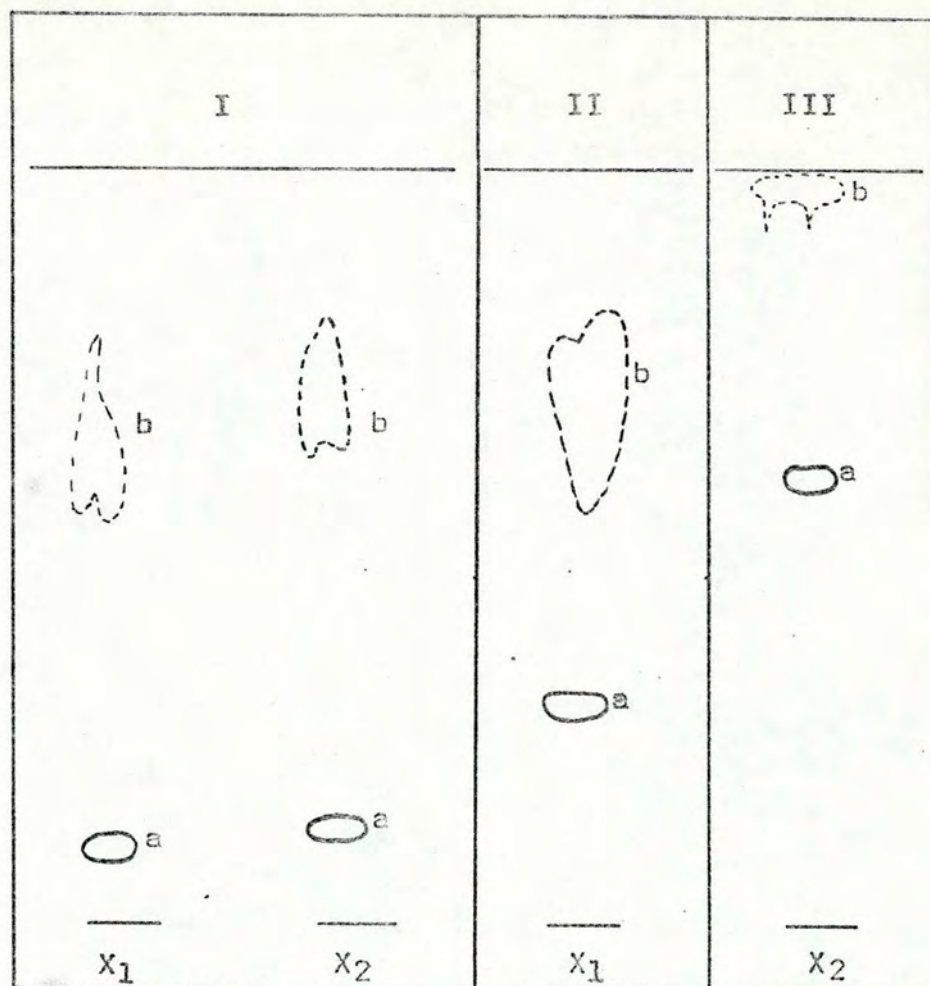


fig. 12 - Pesquisa de antocianinas

adsorvente : Papel Whatman número 1

eluentes : I HCl 2N

II P₁

III P₂

detecção : Visível

a vermelha

b marron amarelada

tab.13 - Valores Rf da análise cromatográfica de

 X_1 e X_2 .

eluentes	HCl 2N	P ₁	P ₂	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
X ₁	0,08	0,16	---	---	---	---	---
X ₂	0,10	---	0,59	0,30	0,32	0,35	0,37

Os baixos valores Rf encontrados para X₁, nos indicam que se trata de uma antocianina, mais provavelmente uma antocianidina-3,5-diglicosídeo, pois valores indicados na bibliografia para as agliconas, nestes eluentes (HCl 2N e P₁) são sempre superiores a 0,20. (11,55)

A alteração do valor Rf em HCl 2N, da mancha vermelha, nos indica que houve hidrólise quando da extração com HCl 37%, mostrando também, pela pequena diferença de Rf, baixa apolaridade do composto X₂ extraído.

Os resultados obtidos por cromatografia de X₂ (fig.13 I aIII) comparados com os resultados obtidos por Schönert, nos indicam que a mancha correspondente a de coloração vermelha (mancha a), deve ser devida à presença de composto polar, o qual no caso de antocianinas só poderia estar relacionada com um alto padrão de hidroxilação, como, por exemplo, delphinidina. (78)

Notamos também a presença constante de uma mancha de coloração marron-amarelada (mancha b) com elevado valor Rf.

Antocianinas absorvem na região do visível entre 450-550 nm e na região do ultravioleta a cerca de 265 nm. (33) A posição do máximo de absorção no visível relaciona-se com o padrão de hidroxilação da antocianidina, da qual é derivada a antocianina.

O solvente preconizado para a análise espectroscópica de antocianinas é uma solução metanólica acidificada com ácido clorídrico concentrado a 0,01%. (33)

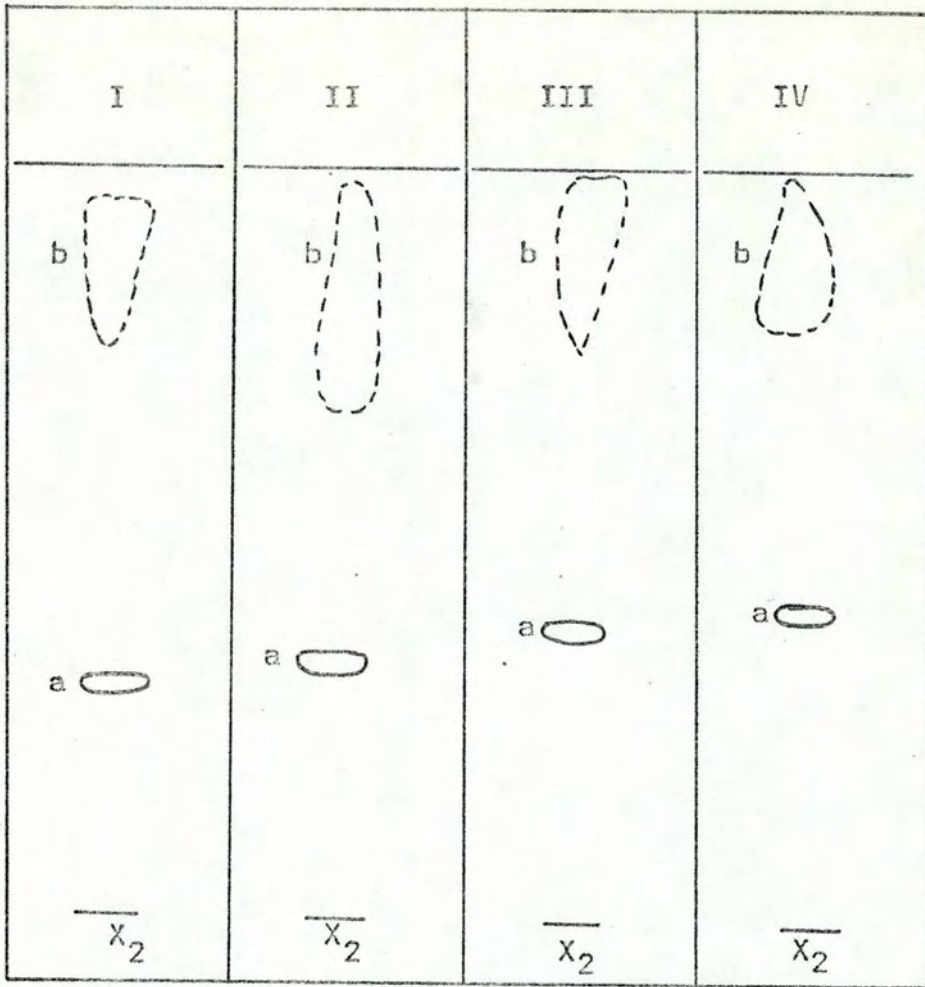


fig. 13 - Pesquisa de antocianidinas

adsorvente : Celulose microcristalina

eluentes : I C₁
 II C₂
 III C₃
 IV C₄

detecção : Visível
 a vermelha
 b marron amarelada

Na tabela 14 encontramos as regiões de absorção de heterosídeos de pelargonidina, cianidina, peonidina e delphinidina.

tab.14 - Absorção no visível de heterosídeos de algumas antocianidinas.

antocianidina	máx. (nm)
pelargonidina	ca. 505
cianidina	520-526
peonidina	520-526
delfinidina	532-537

A adição de $AlCl_3$ a antocianinas promove deslocamentos batocrômicos de 25 -35 nm, quando estão presentes grupos o-dihidroxílicos livres em posição 3',4', por formação de quelato entre estes grupamentos e o ácido de Lewis.

A realização dos espectros de X_1 e X_2 em solução metanólica com HCl a 0,01% e em solução metanol/ $AlCl_3$, apresentou as absorções apresentadas na tabela 15.

tab.15 - Máximos de absorção na região do visível de X_1 e X_2 .

	X_1	X_2
MeOH/HCl 0,01%	523	533
MeOH/ $AlCl_3$	523	534

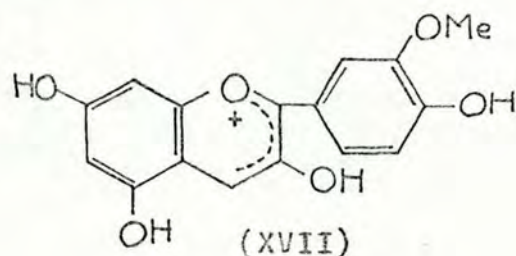
Pela análise dos resultados da tabela podemos notar que não houve deslocamento quando da adição de $AlCl_3$, além disto X_1 absorve na faixa de heterosídeos de cianidina e peonidina. Se o composto em análise fosse o heterosídeo de cianidina, deveria haver um deslocamento batocrômico quando do tratamento por $AlCl_3$, devido apresentar hidroxilas vicinais nas posições 3' e 4' e 5'. Este fato nos leva a supor que o composto em análise X_1 seja um heterosídeo 3,5-dissubstituído da peonidina (p.ex. peonina).

Os resultados encontrados para X_2 sugerem a presença de peonidina como aglicona, pois a absorção na região de 530-535 nm é característica para peonidina e cianidina, sendo que a segunda apresenta deslocamento batocrômico em presença de $AlCl_3$ (tab.12) enquanto que peonidina não mostra este deslocamento.

3.5 Conclusões

A antocianidina presente em Euphorbia prostrata Ait. poderia tratar-se de PEONIDINA-3,5-DIGLICOSÍDIO (XVII), o que é fundamentado :

- Pelos valores R_f , em vários sistemas eluentes de X_1 ;
- Pelo máximo de absorção no visível e não deslocamento com $AlCl_3$, indicando a inexistência de grupamentos o-dihidroxílicos livres em X_1 e X_2 ;
- Pelo valor de absorção no visível de X_2 , e não deslocamento deste máximo pela adição de $AlCl_3$, sugerindo a presença de peonidina como aglicona;
- Pelo relacionamento biossintético com isoramnetina, constatada em Euphorbia prostrata Ait.

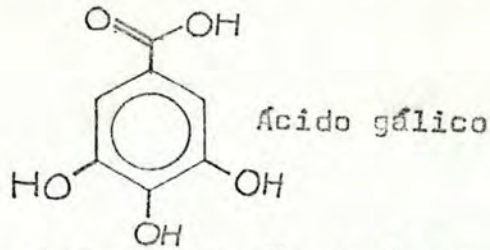


4. Pesquisa cromatográfica de ácido gálico

4.1 Introdução

Ácido gálico encontra-se em vegetais superiores sob a forma de ésteres (reação na carbonila), sob a forma de heterosídeo (reação com os grupos fenólicos), sendo ainda verificada sua presença como produtos de condensação -ácido m-digálico e ácido elá

gico. São conhecidos ainda produtos com ligações glicosídicas entre moléculas de ácido gálico - os taninos gálicos. (29,93)



Hegnauer relata a distribuição de ácido gálico em diversas espécies de Euphorbiaceae. (38)

4.2 Pesquisa de ácido gálico em Euphorbia prostrata Ait.

O resultado positivo do ensaio preliminar para taninos gálicos e a sua larga distribuição na família Euphorbiaceae foram o ponto de partida para que iniciássemos a sua comprovação em nosso vegetal.

O método de extração realizado foi o da turbolização do vegetal seco e moído com etanol. O extrato turbolizado foi concentrado e hidrolizado em refluxo com ácido clorídrico. O produto de hidrólise foi tratado com éter etílico, sendo a fase etérea levada à secura e redissolvida em metanol. A solução metanólica reservou-se para a pesquisa cromatográfica de ácido gálico.

Para a realização dos cromatogramas utilizou-se camada delgada de sílicagel GF₂₅₄, tendo como sistemas eluentes: tolueno, acetato de etila e água (40:10:50); acetato de etila, isopropanol e água (44:45:11) e tolueno, clorofórmio, acetona (40:25:35). A detecção foi realizada sob luz ultravioleta 256 nm e por nebulização com FeCl₃ 2% em metanol (R₅) e ácido fosfomolibdico (R₄).

Os valores encontrados na análise cromatográfica do extrato metanólico, frente padrão de ácido gálico, encontram-se dispostos na tabela 16.

1		2		3	
I	II	III	IV	V	VI
a○ a○	b○	b○			
	a○ a○	a○ a○			
			a○ a○	○ a a○	○ a a○
— P — SM —	— P — SM —	— P — SM —	— P — SM —	— P — SM —	— P — SM —

fig. 14- Pesquisa de ácido gálico

adsorvente : Sílicagel GF₂₅₄

eluentes : 1 S₄
 2 S₃
 3 S₂

detecção :
 I e VI R₅
 III e V R₄
 II e IV UV₂₅₆

P Ácido gálico padrão

SM Solução metanólica

tab.16- Valores Rf da análise cromatográfica de ácido gálico.

cromatograma	1		2		3	
	R ₅	UV ₂₅₆	R ₄	UV ₂₅₆	R ₄	R ₅
padrão Ác.gálico	0,66	0,36	0,36	0,13	0,13	0,13
extrato metanólico	a 0,66	0,36	0,36	0,13	0,13	0,13
	b -----	0,50	0,50	-----	-----	-----

4.3 Conclusão

Concluímos pela presença de ácido gálico no extrato metanólico de Euphorbia prostrata Ait. pela coincidência dos valores Rf com o padrão em diversos sistemas cromatográficos.

V- SINOPSE

A utilização na medicina popular de Euphorbia prostrata Ait. e a inexistência de trabalhos de pesquisa quanto a sua composição química levou-nos a realização desta análise.

O primeiro grupo de substâncias pesquisado foi flavonóides. A análise cromatográfica detectou quatro flavonóides, sendo que isolamos tres, os quais foram examinados por cromatografia e espectroscopia ultravioleta, apresentando os seguintes resultados:

APIGENINA-7-GLICOSÍDIO -Comprovada por cromatografia e pelos dados espectrais frente a padrão; presença de apigenina como aglicona, demonstrada por dados espectrais; detecção de glicose como açúcar componente do heterosídio, detectada frente padrão de glicose, por análise cromatográfica.

ISORRAMNETINA-3-GLICOSÍDIO -Demonstrada pela equivalência entre os dados cromatográficos e espectroscópicos do heterosídio com os apresentados pela literatura; pela constatação de isorramnetina como aglicona, fato este diagnosticado através de análise

cromatográfica e por espectroscopia ultravioleta; determinação do componente osídico como glicose, por comparação frente padrão através de cromatografia.

LUTEOLINA MONOGLICOSÍDIO - Evidenciada por análise espectroscópica; presença de luteolina como fração aglicona, comprovada por exame cromatográfico e espectroscopia ultravioleta; existência de glicose como componente osídico, evidenciada por cromatografia frente a padrão de glicose.

O exame dirigido à pesquisa de antocianinas, nos faz supor a presença de PEONIDINA-3,5-DIGLICOSÍDIO, como responsável pela coloração vermelha apresentada nas partes vegetativas e florais de Euphorbia prostrata Ait., devido aos dados cromatográficos e espectroscópicos obtidos e comparados com os dados da literatura.

A evidenciação de ÁCIDO GÁLICO conclui-se pelo estudo comparativo frente padrão em diversos sistemas cromatográficos.

oo0oo

VI- BIBLIOGRAFIA

- 1- ALLEM, A. C. - Dissertação, (em impressão)
- 2- ALLEM, A. C., IRGANG, B. E. - Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, Bol. Inst. Central de Biociências, UFRGS, (em impressão)
- 3- ALYUKINA, L. et al. - Akad. Nauk. Kaz. SSR, 11, 6, 1969, In: Chem. Abstr., 73, 32343n, 1970
- 4- ASEN, S., STEWART, R. N., NORRIS, K. H. - Phytochem, 11, 1139, 1972.
- 5- ATALLAH, A. M., NICHOLAS, H. J. - Phytochem., 11, 1860, 1972
- 6- AZIMOV, M. A., NAZIROV, Z. N. - Khim. priro. soedin., 6, 271, 1970, In: Chem. Abstr., 73, 63197y, 1970.
- 7- BAYER, E. - Chemische Berichte, 92, 1062, 1959.
- 8- BAYER, E. - Angew. Chemie, 78, 835, 1966.
- 9- BIGGERS, J. D. - Plant phenols possessing oestrogenic activity, In: FAIRBAIRN, J. - The pharmacology of plant phenolics, Londres, Academic Press, 1959.
- 10- BLANC, P., DE SAQUI-SANNES, P. G. - Planta med. phytother., 6, 106, 1972, In: Chem. Abstr., 77, 98756p, 1972
- 11- BLOCK, R. J., DURRUM, E. L., ZWEIG, G. - A manual for paper chromatography and paper electrophoresis, New York, Academic Press, 2ª ed., 1958.
- 12- BOISSIER, C. - Subord. Euphorbieae, In: De CANDOLLE, Prodromus, 15, 3-188, 1862.
- 13- BONDARENKO, O. M. et al. - Farm. Zh., 26, 46, 1971, In: Chem. Abstr., 76, 98576p, 1972.
- 14- BURGH, D. - Ann. Missouri Bot. Garden, 53, 90-9, 1966

- 15- CLARKE, D.D., NORD, F.F.- Simple benzene derivate, In: Peach, K., Tracey, M.V.- Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin, Springer Verlag, 1955, vol.3.
- 16- COIMBRA, R.- Notas de fitoterapia, 2ª ed, Lab. Clin. Silva Araujo S.A., 1958.
- 17- COCKER, E., COCKER, W.- J.chem.soc., 5035, 1952
- 18- CRAMER, F.- Paper chromatography, Londres, MacMillan Co Ltd. , 1955.
- 19- DECHENE, J.- J.Am.pharm. Assoc., 40, 495, 1951. Apud. Jurd, L. Horowitz, R.M.- J.Org.Chem., 22, 1618, 1957
- 20- DeEDS, E.- Physiological effects and metabolic fate of flavonoids. In: Fairbairn, J.- The pharmacology of plant phenolics, Londres, Academic Press, 1959.
- 21- DUMKOW, K., POHL, R.- planta medica, 24, 1973, 1972.
- 22- EGER, K.- Pflanzliche Phenolderivate, In: Stahl, E.- Dünnschicht chromatographie, 2ª ed., Berlin, Springer Verlag, 1967.
- 23- ERNST, A.- J.Bot., 3, 143, 1865. Apud. Hartwell, J.L.- Lloydia, 32, 153, 1969.
- 24- EVANS, F.J., KINGHORN, H.D.- Phytochem., 13, 2324, 1974
- 25- FONG, H.H.S. et Al., Lloydia, 35, 177, 1972
- 26- FOSSAT, A.G.- A cura pelas plantas, Rio de Janeiro, Ed. Eco, 1970
- 27- FREISE, F.W.- Perfumery essent. oil record., 26, 219, 1935. Apud. Hegnauer, R.- Chemotaxonomie der Pflanzen, Basel, Birkhäuser Verlag, 1966, vol.4.
- 28- GEISSMAN, T.A.- Anthocianins, chalcones, aurones and flavones. In: Peach, K. Tracey, M.V.- Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin, Springer Verlag, 1955, vol 3.

- 29- GEISSMAN, T. A., CROUT, D. H. - Organic chemistry of secondary plant metabolism, San Francisco, Freeman, Cooper & Co. 1969.
- 30- GEISSMAN, T. A. - Modern methods of plant analysis, In: Peach, K., Tracey, M. V. Heidelberg, 1955. Apud. Jurd, L., Horowitz, R. M., - J. org. chem., 22, 1618, 1957
- 31- HADIDI, M. N. - Bull. Jard. Bot. Nat. Belgique, 43, 83-100, 1973
- 32- HARBORNE, J. B. - Biochem. J., 68, 12P, 1958
- 33- HARBORNE, J. B. - Anthocyanins and their sugar components, In: Zechmeister, L. - Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Viena, Springer Verlag, 1962, vol. 20.
- 34- HARBORNE, J. B. - Phytochem., 5, 589, 1966
- 35- HARBORNE, J. B. - Phytochem., 6, 1415, 1967
- 36- HECKER, E. - planta medica, 16, 24, 1968
- 37- HECKER, E. - planta medica, 16, 537, 1968
- 38- HEGNAUER, R. - Chemotaxonomie der Pflanzen, Basel, Birkhäuser Verlag, 1966, vol. 4.
- 39- HERNANDEZ, F. - Historia de las plantas de Nueva España, México, Imprenta universitaria, 1942. Apud. Hartwell, J. L. - Lloydia, 32, 153, 1969
- 40- HENRICK, C. A., JEFFERIES, P. R. - Tetrahedron, 21, 3219, 1965
- 41- HOOKER, J. D., JACKSON, B. D. - Index Kewensis, Oxford, Clarendon Press, 1960, vol I.
- 42- IBRAHIM, R. K. et al. - Lloydia, 34, 175, 1971
- 43- ISHIKURA, N. - Phytochem., 10, 2513, 1971
- 44- JANISTYN, B., NAHRSTEDT, A., POHL, R. - planta medica, 25, 98, 1973

- 45- JURD, L., GEISSMAN, T. A. - J. org. chem., 21, 1395, 1956. Apud.
Porter, L. J., Markham, K. R. - J. chem. soc., C, 344, 1970
- 46- JURD, L., HOROWITZ, R. M. - J. org. chem., 22, 1618, 1957
- 47- JURD, L. - Phytochem., 8, 445, 1969
- 48- KAHRS, K. H. - A espectroscopia em ultravioleta, P. Alegre, 1974
- 49- KAPOOR, L. D. et al. - Lloydia, 35, 288, 1972
- 50- KARRER, W. - Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe, Basel, Birkhäuser Verlag, 1958.
- 51- KARSTEN, WEBER, STAHL - Lehrbuch der Pharmakognosie, 9^a ed., Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1962.
- 52- KUHN, - Angew. Chemie, 61, 1, 1949. Apud. Reichel, L. - Angew. Chemie, 62, 86, 1950
- 53- LASZT, L. - Angiologica, 9, 1933, 1972. In: Chem. Abstr., 78, 154650j, 1973.
- 54- LAVOLLAY, J., NEUMANN, J. - Activity of certain flavonoids on vascular resistance, In: Fairbairn, J. - The pharmacology of plant phenolics, Londres, Academic Press, 1959.
- 55- LEDERER, E., LEDERER, M. - Chromatography, Amsterdam, Elsevier Publishing Co., 1957, 2^a ed.
- 56- LEWIS, B. A., SMITH, F. - Zucker und Derivate. In: Stahl, E. - Dünnschichtchromatographie, 2^a ed., Berlin, Springer Verlag, 1967
- 57- LOCKET, M. F. - Capillary structure and the action of flavonoids. In: Fairbairn, J. - The pharmacology of plant phenolics, Londres, Academic Press, 1959.
- 58- LUCKNER, M. - Prüfung von Drogen, Jena, VEB Gustav Fischer, 1966

- 59- LUCKNER, M.-Der Sekundärstoffwechsel in Pflanzen und Tier,
Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1969
- 60- MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS, M. B.- The systematic identification of flavonoids, New York, Springer Verlag, 1970
- 61- MARTIUS, C. F. Ph.-Flora brasiliensis, Weiteim, Verlag von J. Cramer, 1961, vol. XI.
- 62- MEARS, J. A., MABRY, T. J.- Phytochem., 11, 411, 1972
- 63- MÜLLER, R., POHL, R.- planta medica, 18, 114, 1970
- 64- NAHRSTEDT, A., DUMKOW, L., JANISTYN, B., POHL, R.- Tetrahedron letters, (7), 559, 1974
- 65- OPFERKUCH, H. J., HECKER, E.-Tetrahedron letters, (3), 261, 1974
- 66- PIO CORREA, M.-Dicionário das plantas úteis do Brasil, Rio de Janeiro, 1931, vol. 3
- 67- POHL, R., JANISTYN, B.- planta medica, 26, 190, 1974
- 68- POMPA, F.-Collecion de medicamentos indigenas, 5^{ed.}, Caracas, Rojas Hermanos, 1875. Apud. Hartwell, J. L.-Lloydia, 32, 153, 1969
- 69- PORTER, L. J., MARKHAM, K. R.- J. Chem. soc. C, 344, 1970
- 70- PORTER, L. J., MARKHAM, K. R.- J. chem. soc. C, 1309, 1970
- 71- PORTER, L. J., MARKHAM, K. R.- Phytochem., 11, 1477, 1972
- 72- RANDEATH, K.-Cromatografia de capa fina, Espanha, Ed. Urmo SA, 1970
- 73- RAYNAUD, J., NÉTIEN, G.- Ann. pharm. fr., 29, 449, 1971
- 74- SANKARA, S. et al.- Phytochem., 10, 2548, 1971
- 75- SCHENKEL, E. P.- Dissertação, Porto Alegre, 1974
- 76- SCHMID, W.-Anthraglycoside und derivate. In: Peach, K., Tracey, M. V.- Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin, Springer Verlag, 1955, vol. 4

77- SCHMIDT, D.Th.-Natürliche Gerbstoffe. In: Peach, K., Tracey, M.V. -Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin, Springer Verlag, 1955, vol.3.

78- SCHONERT, J.- Dissertação, Münster, 1971.

79- SCHULLER, E.F.- Comunicação pessoal

80- SCHULTZ, O.E., ZYMALKOWSKI, F.- Die Qualitative Bestimmung der Alkaloide in Drogen und Drogenzubereitungen, Stuttgart , Ferdinand Enke Verlag, 1960.

81- SCOTT, A.I.- Interpretation of the spectra of natural products Londres, Pergamon Press, 1964.

82- SEIFERT, P.- Blausäure-verbindungen. In: Peach, K., Tracey, M.V.- Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin, Springer Verlag, 1955, vol.4.

83- SEN, D., et al. -Curr.sci., 89, 401, 1970. In: Chem.Abstr., 73, 117146a, 1970.

84- SMITH, B., DOWNS, R.T.- Resumo preliminar das Euphorbiaceae de Santa Catarina. In: Sellowia, -An.bot.do Herb.Barbosa Rodrigues, Itajai, 11, 1959.

85- SMOLENSKI, S.J., et al.-Lloydia, 35, 1, 1972

86- SDBCLEVA, V.A., CHAGOVETZ, R.K.-Khim.priř. soedin., 7, 528, 1971. In: Chem.Abstr., 75, 148502j, 1971.

87- SONDHEIMER, E., KERTESZ, Z.I.- Anal.Chem., 20, 245, 1948.

88- STAHL, E.-Dünnschichtchromatographie, 2ª ed, Berlin, Springer Verlag, 1967.

89- STARRAT, A.N.-Phytochem., 11, 293, 1972.

- 90- STEINER, M., HOLZTEM, H.- Triterpene und Triterpene-saponine .
In: Peach, K., Tracey, M.V.-Moderne Methoden der Pflanzenana-
lyse, Berlin, Springer Verlag, 1955, vol.3.
- 91- STOESS, G.- Dissertação, Münster, 1972
- 92- SWAIN, T.- Chemical plant taxonomy. New York, Academic Press, 1965
- 93- TEUSCHER, E.- Pharmakognosie, Berlin, Akademie Verlag, 1972, 2 vol.
- 94- UEMURA, D., OHUAKI, H., HIRATA, Y.-Tetrahedron letters, (29), 2527,
1974
- 95- UEMURA, D., HIRATA, Y.-Tetrahedron letters, (29), 2529, 1974
- 96- UGARTE, V., SILVA, M., SAMMES, P.G.-Phytochem., 11, 1859, 1972
- 97- WAGNER, H., et al. -Chem. Berichte, 103, 3678, 1970
- 98- WHALLEY, W.B.- The toxicity of plant phenolics, In: Fairbairn,
J.-The pharmacology of plant phenolics, Londres, Academic
Press, 1959.
- 99- WHEELER, L.C.-Rhodora, 43, 97-154, 1941
- 100- WICHTL, M.- Die Pharmakognostische-chemische Analyse, Frankfurt
am Mein, Akademische Verlagsgesellschaft, 1971.

Agradecemos ao Prof. Dr. Klaus Henning Kahrs,
pela orientação e estímulo na realização deste
trabalho.

A Sra. Maria Margarida Schenkel pelas sugestões
apresentadas.

A Sra. Sônia Freire Petrovick pela leitura do
trabalho e incentivo nos momentos difíceis.

ERRATA

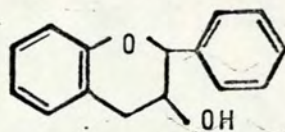
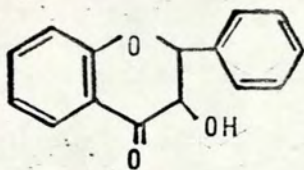
pág. linha

leia-se

2 15 assimétrica

assimétrica

18



CATEQUINA

CATEQUINA

19 9 na óvulo

no óvulo

20 10 quercetrina

quercetina

21 30 qntidade

quantidade

35 10 valor Rf 5,4

valor Rf 0,54

40 28 diagnóstico

diagnósticos

41 4 assima

acima

75 (65) -Tetrahedron Letters,

-Tetrahedron Letters,

77 (100) -Die Pharmakognostische-
chemische Analyse, Frank-
furt am Mein,

-Die pharmakognostisch-
chemische Analyse, Frank-
furt am Main,