

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

ESTUDO QUÍMICO DE *Dimorphandra gardneriana*
(Leguminosae) E PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS
DE FLAVONÓIDES COM FOSFOLIPÍDEOS.

ÍCARO GUSMÃO PINTO VIEIRA

TESE DE DOUTORADO

Fortaleza – Ceará
2003

SONG, B.K., WINTER, W.T., TARAVEL, F.R., Crystollography of highly substituted galactomannans: Fenugreek and Lucerne gums, *Macromolecules*, v. 22 , p. 2641-2644 , 1989.

SWARTZ, W.E., HUPPE, C.A., ELFSTRUM, J.T., USP 6,048,563 , 2000 .

YEH, M.H., USP 5,489,674 , 1996 .

**ESTUDO QUÍMICO DE *Dimorphandra gardneriana*
(Leguminosae) E PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS DE
FLAVONÓIDES COM FOSFOLIPÍDEOS.**

ÍCARO GUSMÃO PINTO VIEIRA

Tese Submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Química Orgânica com requisito parcial para obtenção do Grau de
Doutor

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**

Fortaleza – Ceará

2003

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Ícaro Gusmão Pinto Vieira

TESE APROVADA EM: 31/10/2003

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Ângela Martha C. Arriaga
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Manoel Andrade Neto
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Alberto Cardoso Arruda
Universidade Federal do Pará - UFPa

Profa. Dra. Regina Célia M. de Paula
Universidade Federal do Ceará - UFC

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Ângela Martha Campos Arriaga do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará .

**À Hélio , Jú (em memória) e
Noélia pelo apoio e incentivo
a este trabalho .**

Labor Omni Vincit

AGRADECIMENTOS

À Professora Ângela Martha Campos Arraiaga pela orientação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Edilberto Rocha da Silveira e Otília Loiola Pessoa Cavalcante pela colaboração fundamental na realização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, cujos incentivo e amizade foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Francisco Queiroz Monte, Ângela Martha Campos Arraiaga e Otília Loiola Pessoa Cavalcante, que coordenaram o Curso de Pós Graduação em Química Orgânica no período em que fiz parte do Curso.

Ao Professor Afrânio Aragão Craveiro pela cessão dos equipamentos de cromatografia líquida, instalações e facilidades imprescindíveis no isolamento das substâncias relatadas neste trabalho.

À professora Maria Selene de Moraes pelo incentivo e amizade.

Ao amigo Daniel Esdras de Andrade Uchoa pelos espectros de RMN obtidos e aos colegas de curso.

Aos amigos Ana Patricia Pereira Mendes e Alex Silva de Freitas pela valiosa colaboração.

À FUNCAP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e nomeclaturas	X
Lista de tabelas	XI
Lista de figuras	XII
Resumo	XX
Abstract	XXII
Capítulo 1- Introdução	1
Capítulo 2 Considerações botânicas sobre a espécie estudada	9
2.1. Introdução.....	10
2.2. Taxonomia de <i>Dimorphandra</i>	11
2.3. Descrição botânica de <i>Dimorphandra gardneriana</i> Tull e <i>Dimorphandra mollis</i> Bent.	13
2.4. Fitoquímica da <i>Dimorphandra</i>	15
Capítulo-3 Galactomananas	21
3.1 Introdução.....	22
3.2. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes.....	25
3.2.1. Galactomananas.....	25
3.3. Características de algumas gomas segundo sua natureza.....	28
3.3.1. Gomas exsudadas de plantas.....	28
3.3.2. Gomas de algas	29
3.3.3. Gomas microbiológicas.....	29
3.3.4. Substâncias Pécicas.....	30
3.4. Gomas de sementes.....	32
3.4.1. Galactomananas.....	32
3.4.2. Relação manose:galactose nas galactomananas.....	37
3.5. Revisão sobre métodos de extração de galactomanana de varias matérias primas.....	38
Capítulo 4 Flovonóides	49
4.1. Introdução.....	50
4.2. Propriedades antioxidante dos flavonóides.....	51
4.3. Principais Flavonóides relatados neste trabalho e sua utilização.....	56
4.3.1. Rutina.....	56
4.3.2. Citroflavonoides.....	59
Capítulo 5 - Fosfolipideos e Complexos	68
5.1. Fosfolipideos-Lecitina.....	69
5.2. Complexos com Fosfolipídeos	72

Capítulo 6 – Resultados e Discussão – Galactomananas	85
6.1. Métodos de Extração	85
6.2. Caracterização galactomanana (poli VIII).....	91
6.2.1. Determinação estrutural de poli VIII.....	93
6.2.2. Início da formação do gel de poli VIII por RMN ¹³ C.....	118
6.3. Comparação dos métodos de extração por RMN ¹³ C.....	121
6.4. Composição e sequenciamento de galactomananas utilizando degradação preliminar da amostra.....	127
6.5. Determinação da relação galactose:manose de poli VIII.....	129
Capítulo 7– Resultados e Discussão – Fosfolípidos e Complexos	150
7.1. Preparação da lecitina de soja fracionada LSB-IA	151
7.2. Preparações dos complexos da lecitina de soja fracionada LSB-IA com vários flavonóides.....	160
7.3. Flavonóides.....	168
7.3.1. Rutina.....	168
7.3.2. Análise comparativa dos flavonóides secundários em amostras comerciais de Rutina de origem diferentes.	175
7.3.3. Hidrólise da Rutina.....	176
7.3.4. Benzilação da Quercetina.....	179
7.3.5. Acetilação da Rutina.....	183
7.3.6. Trioxetilrutina e Trioxipropilrutina.....	185
7.3.7. Citoflavonoides.....	191
Capítulo 8 – Parte Experimental	201
8.1. Obtenção do material.....	204
8.2. Métodos.....	204
8.2.1. Métodos cromatográficos.....	204
8.2.2. Cromatografia de camada delgada.....	204
8.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	205
8.2.4- Cromatografia líquido-gasosa	205
8.3 Outras determinações	206
8.3.1 Ponto de fusão.....	206
8.3.2. Rotação Ótica.....	206
8.4. Espectrométricos.....	206
8.4.1. Espectrometria na região do infravermelho(IV) e Ultravioleta (UV) ...	206
8.4.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	207
8.5. Estudo dos constituintes das favas de <i>Dimorphandra gardneriana</i>	209
8.5.1. Separação das sementes das favas.....	209
8.5.2. Métodos de obtenção dos polissacarídeos das sementes de <i>D.</i> <i>gardneriana</i>	209
8.5.2.1 Poli VIII.....	210

8.5.2.2. Poli V.....	210
8.5.2.3 Poli VI.....	211
8.5.2.4. DESP - I.....	211
8.5.2.5 Poli X.....	212
8.5.2.6. Poli XI.....	212
8.5.3 Análise de polissacarídeos.....	213
8.5.3.1. Determinação da umidade.....	213
8.5.3.2. Determinação do nitrogênio total.....	214
8.5.3.3. Determinação das cinzas.....	214
8.5.3.4. Determinação de carboidratos.....	215
8.5.3.5. Determinação de proteínas.....	215
8.5.3.6. Hidrólises ácidas.....	215
8.5.3.7. Cromatografia em papel e em camada delgada.....	216
8.5.3.8. Redução e acetilação dos produtos das hidrólises ácidas.....	216
8.5.3.9. Viscosidade.....	218
8.5.3.10 Determinação da massa molar.....	221
8.5.4. Extração dos flavonóides.....	221
8.5.4.1. Doseamento por HPLC – analítico.....	222
8.5.4.2. Isolamento por HPLC – semi-preparativo.....	223
8.5.4.3. Teste de substâncias análogas.....	225
8.5.5. Preparação dos flavonóides.....	226
8.5.5.1. . Hidrólise da Rutina.....	226
8.5.5.2. Benzilação da Quercetina.....	228
8.5.5.3 Acetilação da Rutina.....	230
8.5.5.4. Tetrabenzoil Rutina.....	231
8.5.5.5. Hidroxietilação da Rutina.....	232
8.5.5.6. . Hidroxipropilação da Rutina.....	233
8.5.5.7. . Benzilação da Rutina.....	234
8.5.5.8 . Hidrolise da Rutina benzilada.....	235
8.5.5.9 Tetrabenzoil Quercetina.....	236
8.5.5.10. 7-O-Benzoil Rutina.....	236
8.5.5.11 7-O-Benzoil Quercetina.....	237
8.5.5.12. Citroflavonoides.....	237
8.5.5.13 Extrato de Semente de Uva.....	238
8.5.6. Fracionamento da lecitina de soja bruta (LSB-IA).....	238
8.5.6.1. Análise de LSB-IA.....	239
8.5.6.2. Índice de acidez.....	240
8.5.6.3. Material insolúvel em hexano.....	241
8.5.6.4. Teor de insolúveis em acetona.....	241
8.5.7. Preparação dos complexos : Método geral e proporções para preparação dos vários complexos (Lipo1- Lipo22).....	241
Capítulo 9 – Conclusão	245
Capítulo 10 –Dados Espectrométricos–Espectros dos Fosfolipídeos Flavonóides e Complexos.....	247
Anexo I- Revisão de métodos de extração de galactomananas de várias matérias primas	296.

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMECLATURAS

BB	Broad band
BZP	Benzopiranoíde
CAR	Carboidratos
CC	Cromatografia líquida em coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CGL	Cromatografia gás líquido
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlation spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
FLA	Flavonoíde
FT	Fourier transform
GPC	Cromatografia por permeação em gel
GS	Experimento de RMN usando gradiente
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance liquid chromatography
IV	Infravermelho
ISI	Institute for scientific information
LSB-IA	Lecitina de soja bruto-Insolúvel em acetona
MIS	Miscelânea
NCL	Não classificado
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
ns	Número de transientes
Pag.	Página
pf	Ponto de fusão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN¹H	Ressonância magnética nuclear de prótio
RMN¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono – 13
USP	United States Patent

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.1	Estruturas das substâncias isoladas e seus derivados.....	5
Tabela 2.1.	Espécies de <i>Dimorphandra</i> relatadas	12
Tabela 3.1	Gomas : funções e aplicações na indústria de alimentos.....	23
Tabela 3.2.	Classificação das gomas quanto á sua natureza.....	24
Tabela 4.1.	Potenciais de redução de radicais dos flavonóides relativos á vitamina C.....	55
Tabela 4.2.	Especificações exigidas para o insumo farmacêutico.....	57
Tabela 4.3	Principais derivados da Rutina.....	60
Tabela 4.4	Especificações para a hesperidina.....	62
Tabela 4.5	Especificações para os citroflavonoides.....	62
Tabela 5.1	Composição da lecitina de soja.....	70
Tabela 5.2.	Composição dos ácidos graxos da lecitina de soja bruta.....	71
Tabela 5.3.	Especificações para lecitina.....	72
Tabela 6.1.	Especificações da Farmacopéia Européia 4ª edição para Galactomananas obtida do guar.	91
Tabela 6.2.	Composição dos monossacarídeos de poli VIII.....	93
Tabela 6.3.	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de poli VIII com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB E DEPT : δ ; D ₂ O; 125, 75MHz).....	96
Tabela 6.4.	Assinalamentos dos picos no espectro de RMN C ¹³ de poli VIII.....	98
Tabela 6.5.	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a Galactomanana isolada de fenugreek (<i>Trigonella foenum- graecum</i> L.)	111
Tabela 6.6	Dados obtidos do diagrama do contorno do espectro GS-HMQC de poli VIII (δ , 500 , 13MHz x 125,77 MHz F2 x F1) : D ₂ O.).....	113
Tabela 7.1.	Composição da lecitina de soja comercial.....	151
Tabela 7.2.	Análise típica da lecitina de soja fracionada com acetona.....	153
Tabela 7.3.	Teor dos principais fosfolípidos por HPLC	155
Tabela 7.4.	Análise de LSB-IA de acordo com a USP.....	156
Tabela 7.5.	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de LSB-IA com Padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB e DEPT : δ :CDCl ₃ , 125,75 MHz)....	157
Tabela 7.6.	Composição dos ácidos graxos da lecitina de soja bruta.....	159
Tabela 7.7	Dados obtidos do diagrama de contorno do espectro GS-HMQC de LSB-IA (δ ; 500,13 MHz x 125,77 MHz (F2 x F1) ; CDCl ₃)..	159
Tabela 7.8.	Relação fosfolípidos:flavonóides testada.....	161
Tabela 7.9.	Flavonóides utilizados para preparação dos complexos	164
Tabela 7.10.	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de EPFD- com Padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB e DEPT : δ : DMSO, 125,75 MHz)	171
Tabela 7.11.	Comparação entre os dados de RMN ¹³ C de EPFD-1 e Rutina.....	172
Tabela 7.12.	Comparação entre os dados de RMN ¹³ C do EPFD-2 e Isoquercitrina (δ ; DMSO; 125,75MHz).....	173

Tabela 7.13	Comparação entre os dados de RMN ¹³ C do EPFD-3 e Kaempferol-3-O-Rutosídeo.....	174
Tabela 7.14	Deslocamentos químicos RMN ¹³ C do produto de hidrólise da Rutina com o padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB e DEPT : δ : DMSO, 125,75 MHz).....	178
Tabela 7.15	Comparação entre os dados de RMN ¹³ C do produto da hidrólise da Rutina (DMSO , δ , 125 MHz) com os dados encontrados na literatura.....	180
Tabela 7.16	Deslocamentos químicos RMN ¹³ C da Quercetina Benzilada com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB e DEPT : δ : CHCl ₃ , 125,75 MHz).....	182
Tabela 7.17	Deslocamentos químicos RMN ¹³ C dos citroflavonoides com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB e DEPT : δ : DMSO , 125,75 MHz).....	193
Tabela 7.18	Comparação entre os dados de RMN ¹³ C dos citroflavonoides e Hesperidina	195
Tabela 8.1.	Dados cromatograficos obtidos dos alditois acetatos de POLI VIII – hidrolizados.....	217

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estruturas das substâncias isoladas e seus derivados.....	7
Figura 2.1	Árvore de <i>Dimorphandra gardneriana</i>	14
Figura 2.2	Favas e Sementes de <i>Dimorphandra mollis</i>	14
Figura 3.1	Estruturas químicas dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular.....	27
Figura 3.2	Estrutura da Dextrana.....	31
Figura 3.3.	Estrutura da Pectina.....	31
Figura 3.4	Estrutura das Galactomananas.....	33
Figura 3.5	Diferentes estruturas das Galactomananas vegetais	35
Figura 3.6	Estruturas das Galactomananas obtidas do Guar	36
Figura 3.7	Estruturas das Galactomananas obtidas de Locust bean.....	37
Figura 3.8	Possíveis estruturas da distribuição das unidades D-galactose(G) ao longo da cadeia principal e D-manose (M)	39
Figura 4.1.	Núcleo dos flavonóides e sua numeração.....	50
Figura 4.2.	Representação esquemática simplificada da biossíntese dos flavonóides.....	51
Figura 4.3	Esquema de transformação e estruturas dos principais Citroflavonoides.....	61
Figura 5.1.	Estrutura dos principais constituintes da lecitina de soja.....	70
Figura 5.2.	Complexo entre flavonóides e fosfolipídeos.....	74
Figura 5.3.	Complexo silimarina-fosfolipídeos.....	76
Figura 5.4.	Principais constituintes do extrato de <i>Vitis vinifera</i>	78
Figura 5.5	Principais constituintes do extrato de <i>Gingko biloba</i>	79
Figura 5.6	Ácido Glicirrético.....	80

Figura 5.7	Saponinas de <i>Centella asiatica</i> e <i>Terminalia sp.</i>	80
Figura 6.1.	Espectro de RMN ^1H de poli VIII [δ , D_2O ; 500,13 MHz].....	94
Figura 6.2.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de poli VIII	94
Figura 6.3.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli VIII – Expansão de δ 98 a 102 [δ ; D_2O ; 125,77 MHz].....	95
Figura 6.4.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli VIII [δ ; D_2O ; 125,77 MHz].....	95
Figura 6.5	Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli VIII - Expansão de δ 66 a 79 [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]	97
Figura 6.6	Espectro de RMN ^{13}C DEPT (135) de poli VIII [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]	97
Figura 6.7	Estrutura para a galactomanana.....	99
Figura 6.8.	Estruturas possíveis para a substituição na Galactomanana....	100
Figura 6.9.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli VIII – expansão de δ 77 a 70 [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]	101
Figura 6.10	Estruturas possíveis para a substituição na Galactomanana....	102
Figura 6.11	Região espectral de RMN ^{13}C do C-6 (Manose substituída) de várias amostras de Galactomananas de <i>Gleditsia triacanthos</i> hidrolisadas com ácido ortofosfórico.....	105
Figura 6.12	Estruturas possíveis para a substituição na Galactomanana.....	107
Figura 6.13	Diagrama de contorno do espectro COSY de poli VIII [δ ; D_2O ; 500,13 MHz x 500,13 MHz ; TD = 1024 x 128 ; SW = 10 x 10 ppm (F2 x F1) ; DS = 4 ; ns = 2 (F2) ; SI = 1024 x 256 (F2 x F1)]	107
Figura 6.14	Diagrama de contorno do espectro COSY de poli VIII [δ ; D_2O ; 500,13 MHz x 500,13 MHz ; TD = 1024 x 128 ; SW = 10 x 10 ppm (F2 x F1) ; DS = 4 ; ns = 2 (F2) ; SI = 1024 x 256 (F2 x F1)]	108
Figura 6.15	Diagrama de contorno do espectro GS-HMCQ DE poli VIII Expansão entre 3,80 e 6,20 ppm [δ ; D_2O ; 500,13MHz x 125,75 ; TD = 1024 x 128 ; SW = 10 167 ppm (F2 x F1) ; DS = 4 ; ns = 2 (F2)] ; SI = 1024 x 512 (F2 x F1)].....	109
Figura 6.16	Diagrama de contorno do espectro GS-HMCQ DE poli VIII Expansão entre 4,00 e 4,80 ppm [δ ; D_2O ; 500,13MHz x 125,75 ; TD = 1024 x 128 ; SW = 10 167 ppm (F2 x F1) ; DS = 4 ; ns = 2 (F2)] ; SI = 1024 x 512 (F2 x F1)].....	110
Figura 6.17.	Diagrama de contorno de espectro GS-HMBC de poli VIII e Representação dos acoplamentos G1/M6 , M1/M4 e G1/G-M6 do GS-HMBC; Expansão da região 60 a 110 ppm do espectro de POLI VIII, e representação dos acoplamentos observados do GS-HMBC VIII [δ ; D_2O ; 500,13 MHz 125,75 ; TD = 1024 x 128 ; SW = 10 x 167 ppm (F2 x F1) ; DS = 4 ; ns = 2 (F2) ; SI = 1024 x 512 (F2 x F1)]	116
Figura 6.18	Diagrama de contorno de espectro GS-NOESY de poli VIII e Representação dos acoplamentos M1/M5 , M1/M3 e M1/G3 e M1/G5 do GS-NOESY; Expansão da região 3,8 a 5,8 ppm do espectro de POLI VIII, e representação dos acoplamentos	

	observados do GS-NOESY [δ ; D ₂ O ; 500,13 MHz 500,13 ; D = 2048 x 512 ; SW = 6,122 ppm (F2 x F 1);DS =16 ; ns = 4 (F2) ; SI = 1024 x 1024 (F2 x F 1)].	117
Figura 6.19	Espectro de RMN ¹³ C por CPMAS[δ ;125,77 MHz],de poli VIII.	119
Figura 6.20	Espectro de RMN ¹³ C-BB de poli XII [δ ; D ₂ O; 125,77 MHz]..	119
Figura 6.21	Espectro de RMN ¹³ C-BB de poli XII [δ ; D ₂ O; 125,77 MHz]..	120
Figura 6.22	Espectro de RMN ¹³ C-BB de poli VIII [δ ; D ₂ O; 125,77 MHz].	120
Figura 6.23	Espectro de RMN ¹ H de poli X [δ ; D ₂ O ; 500,13 MHz].	121
Figura 6.24	Espectro de RMN ¹³ C-BB de poli X [δ ; D ₂ O ; 125,77 MHz]..	122
Figura 6.25	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT(135) de poli X[δ ; D ₂ O; 125,77 MHz]	122
Figura 6.26.	Espectro de RMN ¹ H de poli XI[δ ; D ₂ O ; 500,13 MHz].....	123
Figura 6.27.	Espectro de RMN ¹³ C-BB de poli XI [δ ; D ₂ O ; 125,77 MHz]..	123
Figura 6.28.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT(135) de poli XI [δ ; D ₂ O; 125,77 MHz]	124
Figura 6.29.	Espectro de RMN ¹³ C-BB de poli XI - Expansão de δ 67 a 79 [δ ; D ₂ O ; 125,77 MHz]	124
Figura 6.30.	Espectro de RMN ¹ H de poli VI[δ ; D ₂ O ; 500,13 MHz].	125
Figura 6.31.	Espectro de RMN ¹³ C-BB de poliVI [δ ; D ₂ O ; 125,77 MHz]	125
Figura 6.32.	Espectro de RMN ¹ H de poli V[δ ; D ₂ O ; 500,13 MHz].	126
Figura 6.33.	Espectro de RMN ¹³ C-BB de poli V [δ ; D ₂ O ; 125,77 MHz].	126
Figura 6.34.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT(135) de poli V δ ; D ₂ O; 125,77 MHz]	127
Figura 6.36.	Espectro da região do IV [cm ⁻¹ , KBr] de desp I.....	131
Figura 6.37.	Espectro de RMN ¹ H de desp-I[δ D ₂ O;500,13 MHz].	131
Figura 6.38.	Espectro de RMN ¹³ C-BB de desp I [δ ; D ₂ O ; 125,77 MHz]..	132
Figura 6.39.	Espectro de RMN ¹³ C-BB de desp-I – Expansão de δ 67 a 79 [δ ; D ₂ O ; 125,77 MHz]	132
Figura 6.40.	Espectro de RMN ¹³ C-BB de desp I- Expansão de δ 98 a 102 [δ ; D ₂ O ; 125,77 MHz]	133
Figura 6.41.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT(135) de desp-I [δ ; D ₂ O; 125,77 MHz]	133
Figura 6.42.	Diagrama de contorno do espectro GS-HMCQ de desp-I Expansão entre 4,00 e 5,50 ppm [δ ; D ₂ O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW =10 167 ppm (F2 x F1) ; DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 512 (F2 x F1)].	134
Figura 6.43.	Diagrama de contorno do espectro GS-HMCQ de desp-I Expansão entre 4,00 e 4,70 ppm [δ ; D ₂ O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW =10 167 ppm (F2 x F1) ; DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 512 (F2 x F1)	135
Figura 6.44.	Diagrama de contorno do espectro GS-HMBC de desp-I e Representação dos acoplamentos G1/M6 , M1/M4 e G1/G-M6 do GS-HMBC; Expansão da região 60 a 110 ppm do espectro de POLI VIII , e Representação dos acoplamentos observados no	

	GS-HMBC. [δ ; D ₂ O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW =10 167 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 512 (F2 x F1)].....	136
Figura 6.45.	Diagrama de contorno do espectro COSY de desp-I [δ ; D ₂ O ; 500,13MHz x 500,13MHz ; TD = 1024 x 128; SW =10x10 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 256 (F2 x F1)].....	137
Figura 6.46.	Diagrama de contorno do espectro COSY de desp-I [δ ; D ₂ O ; 500,13MHz x 500,13MHz ; TD = 1024 x 128 ; SW =10x10 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 256 (F2 x F1)].....	138
Figura 6.47.	Diagrama de contorno de espectro GS-NOESY de POLI VIII e Representação dos acoplamentos M1/M5 , M1/M3 e M1/G3 e M1/G5 do GS-NOESY; Expansão da região 3,8 a 5,8 ppm do espectro de desp I , e representação dos acoplamentos observados do GS-NOESY [δ ; D ₂ O ; 500,13 MHz 500,13 ; TD = 2048 x 512 ; SW = 6,122 ppm (F2 x F 1); DS =16 ; ns = 4 (F2) ; SI = 1024 x 1024 (F2 x F 1)].....	139
Figura 6.48.	Diagrama de contorno de espectro GS-TOCSY de Desp I, expansão entre 3,9 a 5,2 ppm [δ ; D ₂ O ; 500,13 MHz x 500,13 MHz ; TD = 2048 x 512 ; SW = 6,127 ppm (F2 x F 1); DS =16 ; ns = 4 (F2) ; SI = 1024 x 1024 (F2 x F 1)].....	140
Figura 6.49.	Diagrama de contorno de espectro GS-TOCSY de Desp I, expansão entre 4,0 a 4,7 ppm [δ ; D ₂ O ; 500,13 MHz x 500,13 MHz ; TD = 2048 x 512 ; SW = 6,127 ppm (F2 x F 1); DS =16 ; ns = 4 (F2) ; SI = 1024 x 1024 (F2 x F 1)].....	141
Figura 7.1.	Estruturas dos principais constituintes da lecitina de soja (onde R e R' são ácidos graxos cuja as composições estão relacionadas na tabela 7.6,pag. 159)	158
Figura 7.2	Estrutura das flavonóides utilizados para preparação dos complexos.....	165
Figura 7.3	Estrutura dos constituintes da extrato de uva.....	167
Figura 7.4	Cromatograma de Rutina comercial obtida de <i>Dimorphandra gardneriana</i>	176
Figura 7.5	Cromatograma de Rutina comercial obtida de <i>Sophora japonica</i>	176
Figura 7.6	Reação de β -hidroxietilação da Rutina(1).....	187
Figura 7.7	Reação de β -hidroxipropilação da Rutina(1).....	190
Figura 7.8	Hesperidina(15) e seu topoisômero.....	196
Figura 8.1	Cromatograma dos acetatos de alditóis de poli VIII hidrolizado	218
Figura 8.2.	Determinação da viscosidade intrínseca de poliVIII.....	220
Figura 8.3.	Cromatograma de EPFD- analítico.....	223
Figura 8.4.	Cromatograma de EPFD- preparativo.....	225
Figura 8.5	Cromatograma da Quercetina benzilada.....	230

Figura 8.5.	Cromatograma de LSB-IA.....	240
Figura10.1.	Espectro de RMN ^1H de LSB-IA [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz.....	248
Figura10.2	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de LSB-IA.....	248
Figura 10.3.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de LSB-IA [δ ; CDCl_3 125,77 MHz].....	249
Figura10.4.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) de LSB-IA [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	249
Figura10.5.	Diagrama de contorno do espectro GS-HMCQ DE LSB-IA Expansão entre 0,00 e 4,00 ppm [δ ; CDCl_3 ; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW =10 167 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 512 (F2 x F1)].	250
Figura10.6.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 1[δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]......	250
Figura10.7.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 1 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	251
Figura10.8.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) de Lipo 1 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	251
Figura10.9.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo.1.....	252
Figura10.10.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 2[δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]......	252
Figura10.11.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 2 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]......	253
Figura10.12.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) de Lipo 2 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]..	253
Figura10.13.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 2.....	254
Figura10.14.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 3[δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]	254
Figura10.15.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 3 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	255
Figura10.16.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) de Lipo 3 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	255
Figura10.17.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 3.....	256
Figura10.18.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 4[δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]......	256
Figura10.19.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 4 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	257
Figura10.20.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) de Lipo 4 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	257
Figura10.21.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 4.....	258
Figura10.22.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 5 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]......	258
Figura10.23.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 5 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	259
Figura10.24.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 5.....	259
Figura10.25.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 6 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]	260
Figura10.26.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 6 [δ ; CDCl_3 ;	

	125,77 MHz]	260
Figura10.27.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 6.....	261
Figura10.28.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 7 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	261
Figura10.29.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 7 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	262
Figura10.30.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) de Lipo 7 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	262
Figura10.31.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 7.....	263
Figura10.32.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 8 [δ ; CD_3OH ; 500,13 MHz].....	263
Figura10.33.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 8.....	264
Figura10.34.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 9 [δ ; CD_3OH ;500,13 MHz].....	264
Figura10.35.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 9.....	265
Figura10.36.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 10 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	265
Figura10.37.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 10.....	266
Figura10.38.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 11 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	266
Figura10.39.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 11 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	267
Figura10.40.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 11.....	267
Figura10.41.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 12 [δ ; CDCl_3 ;500,13 MHz]	268
Figura10.42.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 12 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz].....	268
Figura10.43.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) de Lipo 12 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	269
Figura10.44.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 12.....	269
Figura10.45.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 13 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	270
Figura10.46.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 13.....	270
Figura10.47.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 14 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	271
Figura10.48.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 14.....	271
Figura10.49.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 15 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	272
Figura10.50.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 15.....	272
Figura10.51	Espectro de RMN ^1H de Lipo 16 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	273
Figura10.52.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 17 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	273
Figura10.53.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 17 [δ ; CDCl_3 ;125,77 MHz]	274
Figura10.54.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) de Lipo 17 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	274
Figura 10.55.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 17.....	275
Figura 10.56.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 18 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	275
Figura 10.57.	Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 18 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	276
Figura 10.58.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 18.....	276
Figura 10.59.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 19 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	277
Figura 10.60	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 19.....	277
Figura 10.61.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 20 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	278
Figura 10.62.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 20.....	278
Figura 10.63.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 21 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	279
Figura 10.64.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 21.....	279

Figura 10.65.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 22 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	280
Figura 10.66.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 22.....	280
Figura 10.67.	Espectro de RMN ^1H de Lipo 23 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz].....	281
Figura 10.68.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 23.....	281
Figura 10.69.	Espectro de RMN ^1H da Rutina [δ ; DMSO ; 500,13 MHz].....	282
Figura 10.70.	Espectro de RMN ^{13}C -BB da Rutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz].....	282
Figura 10.71.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) da Rutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]	283
Figura 10.72.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] da Rutina.....	283
Figura 10.73.	Espectro de RMN ^1H da Quercetina Benzilada [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]	284
Figura 10.74.	Espectro de RMN ^{13}C -BB da Quercetina Benzilada [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	284
Figura 10.75.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) da Quercetina Benzilada [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]	285
Figura 10.76.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] da Quercetina Benzilada	285
Figura 10.77.	Espectro de RMN ^1H da Quercetina [δ ; DMSO ; 500,13 MHz]	286
Figura 10.78.	Espectro de RMN ^{13}C -BB da Quercetina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]	286
Figura 10.79.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) da Quercetina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]	287
Figura 10.80.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] da Quercetina	287
Figura 10.81.	Espectro de RMN ^1H da Troxirutina [δ ; DMSO ; 500,13 MHz]	288
Figura 10.82.	Espectro de RMN ^{13}C -BB da Troxirutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]	288
Figura 10.83.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) da Troxirutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]	289
Figura 10.84.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] da Troxirutina.....	289
Figura 10.85.	Espectro de RMN ^1H da Trioxipropilrutina [δ ; DMSO ; 500,13 MHz]	290
Figura 10.86.	Espectro de RMN ^{13}C -BB da Trioxipropilrutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]	290
Figura 10.87.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) da Trioxipropilrutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]	291
Figura 10.88.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] da trioxipropilrutina.....	291
Figura 10.89.	Espectro de RMN ^1H do Decaacetato de Rutina [δ ; DMSO ; 500,13 MHz].....	292
Figura 10.90.	Espectro de RMN ^{13}C -BB do Decaacetato de Rutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz].....	292
Figura 10.91.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] do Decaacetato de Rutina	293

Figura 10.92.	Espectro de RMN ^1H do Hesperidina [δ ; DMSO; 500,13 MHz].....	293
Figura 10.93.	Espectro de RMN ^{13}C -BB do Hesperidina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz].....	294
Figura 10.94.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135) da Hesperidina [δ ; DMSO; 125,77 MHz]	294
Figura 10.95.	Espectro da região do IV [cm^{-1} , KBr] da Hesperidina	295

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 8.1.	Fluxograma utilizado para extração das Galactomananas (PoliVIII) a partir das Sementes de <i>Dimorphandra Gardneriana</i>	212
Fluxograma 8.2.	Fracionamento da lecitina comercial com acetona.....	239

RESUMO

Faveira e fava d'anta são nomes comuns às duas espécies exploradas industrialmente no Brasil pertencentes ao gênero *Dimorphandra* (Leguminosae), para produção industrial de rutina, bioflavonóide de importância terapêutica em virtude do seu mecanismo de ação em benefício da resistência e da permeabilidade dos vasos capilares, especialmente quando administrada em combinação com a vitamina C.

Este trabalho relata o estudo químico das favas de *Dimorphandra gardneriana* coletada no Crato, Estado do Ceará.

A investigação fitoquímica das favas de *Dimorphandra gardneriana* levou ao isolamento de três flavonóides: rutina, isoquercitrina e kaempferol-3-O-rutinosídeo. À partir de suas sementes foi isolada e sequenciada uma galactomanana com alto rendimento e com elevada pureza. A partir da rutina foram preparados derivados flavonoidicos com importância comercial: quercetina, benzilquercetina, rutina deca-acetilada, rutina benzoilada, trioxetil-rutina, trioxipropil-rutina, rutina benzilada, rutina benzilada e hidrolisada, rutina benzoilada e hidrolisada, 7-O-benzoil-rutina, 7-O-benzoil-quercetina.

O presente trabalho relata uma nova metodologia para preparação e caracterização de complexos obtidos a partir da rutina e de seus derivados em combinação com os fosfolípidos obtidos da lecitina de soja. É importante ressaltar que alguns destes complexos estão sendo relatados pela primeira vez e que se descreve também uma técnica inédita para obtenção de galactomanana.

A análise dos extratos e derivados foi feita por métodos cromatográficos principalmente utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, e técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

uni e bidimensionais foram utilizadas para a determinação estrutural dos constituintes dos extratos e derivados preparados .

Descreve-se também, pela primeira vez, a análise da galactomanana obtida, por RMN ^1H e RMN ^{13}C uni e bidimensional sem a necessidade de hidrólise parcial, precipitação, complexação ou purificação cromatográfica.

ABSTRACT

“Faveira” and “Fava d’anta” are common names of two species of the *Dimorphandra* genus, *D. mollis* and *D. gardneriana*, that are used to industrial production of rutin an important nutrient due to its ability to strengthen and modulate of the walls of the blood vessels including capillaries, especially when used in combination with vitamin C .

The present work reports the phytochemical investigation of the fruits of *Dimorphandra gardneriana* collected in Crato of Northeast region of Brazil. The chromatographic analysis of the fruits led to isolation of three flavonoids: rutin, isoquercitrin and kaempferol-3-O-rutinoside. From the seeds was isolated and sequenced a galactomannan with high yield and purity. Derivatives from rutin was synthesized : quercetin , benzylquercetin , decaacetyl rutin, benzoylated rutin , trioxyrutin, trioxypropilrutin , benzylated rutin , hydrolysed benzoylated-rutin, hydrolysed benzylated-rutin , 7-O-benzoyl rutin , and 7-O- benzoyl quercetin .

This work also reports a new methodology of preparation and characterization of complex obtained from rutin, their derivatives and other flavonoids like hesperidin with phospholipids obtained from soy lecithin. Some of these complexes and the methodology used to prepare them, as well as, the methodology used to isolate the galactomannan were described by the first time. The galactomannan structure was determined based on the results from spectroscopic analysis (IR,NMR) including 2D NMR (COSY,HMQC,HMBC,NOESY and TOCSY) without partial hydrolysis, precipitation, complexation or chromatographic purification .

The isolation of all secondary metabolites was accomplished by HPLC, and the structures determinations of the flavonoids and of their derivatives and complex have been established based on spectral data especially 2D NMR techniques.

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

O gênero *Dimorphandra* (Leguminosae) táxon natural de regiões tropicais da América do Sul é constituído de 36 espécies [RAGONESE, 1972]. Dentre estas espécies *Dimorphandra mollis* e *Dimorphandra gardneriana* possuem interesse econômico, pois são utilizadas para produção industrial de Rutina.

Estas duas espécies são árvores pequenas que habitam os cerrados [TOMASSINI e MORS, 1966] e são conhecidas popularmente como faveira ou fava d'anta.

A verificação da ocorrência de Rutina em elevadas proporções e de fácil extração em matéria prima vegetal abundante é de considerável interesse econômico, pois trata-se de uma substância pertencente à classe dos flavonóides, muitos deles possuem importância econômica [SOUSA E COLABORADORES, 1991].

A Rutina (3-Rutosídeo da Quercetina), juntamente com a Hesperidina (7-Rutosídeo da Hesperitina), a Eriodictina (7-Ramnosídeo do Eriodictiol) e ainda outros flavonóides, bem como suas respectivas agliconas, fazem parte do grupo dos chamados " Bioflavonóides ", também designados de " Fatores P " nome remanescente do nome " Vitamina P " hoje em desuso.

Estas substâncias adquiriram importância terapêutica em virtude do seu mecanismo de ação ser em benefício da normalização da resistência e da permeabilidade dos vasos capilares, especialmente quando administrada em combinação com a vitamina C.

A Rutina é largamente distribuída no reino vegetal. Além das espécies citadas, ela é encontrada também no trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench.), na arruda (*Ruta graveolens* L.), e em menores concentrações no tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) [SOUSA E COLABORADORES, 1991].

Estas observações reforçaram a proposta do estudo fitoquímico da espécie *Dimorphandra gardneriana* encontrada no Estado do Ceará, precisamente na Região do Cariri, visando propiciar alternativas para o desenvolvimento de recursos naturais sustentáveis para a população local,

através de possíveis aplicações farmacológicas, quimiosistemáticas e industriais, ampliando assim o conhecimento da Flora Cearense.

Do extrato das favas de *Dimorphandra gardneriana*, foram isolados 3 flavonóides; Rutina(1), Isoquercitrina(2) e Kaempferol-3-rutosídeo(3), destes somente a Rutina já havia sido descrita para a espécie.

Vários flavonóides com importância comercial foram preparados e caracterizados a partir da Rutina : Quercetina(4), Benzquercetina(5), Rutina deca-acetilada(6) , Rutina benzoilada(7), Trioxetil-Rutina(8), Trioxipropil-Rutina(9), Rutina benzilada(10) , Rutina benzilada hidrolisada (11) , Rutina benzoilada hidrolisada(12), 7-O-Benzoil-Rutina(13), 7-O-Benzoil-Quercetina(14) (Ver figura 1.1, pag. 5 e 6).

Para a obtenção e análise dos extratos e derivados foram desenvolvidos métodos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, aliado ao emprego de novas técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e RMN ^{13}C uni e bidimensionais no processo de elucidação estrutural dos constituintes dos extratos e derivados preparados :

Embora os flavonóides possuam propriedades farmacológicas reconhecidas e investigadas, eles apresentam problemas em termos de biodisponibilidade, a qual pode ser aumentada pela reação dos flavonóides com fosfolipídeos [BOMBARDELLI e Colaboradores, 1989].

O presente trabalho relata uma nova metodologia para preparação e caracterização de complexos obtidos a partir da rutina, dos seus derivados e outros flavonóides importantes(hesperidina(15), flavonóides presentes no extrato da semente de uva : Ácido Gálico,(+)-Catequina,(-)-Epicatequina , de dímeros (Proantocianidinas B1,B2,B3 e B4 na forma livre ou esterificada) e de trímeros e tetrâmeros) com Fosfolipídeos padronizados obtidos da lecitina de soja. É importante ressaltar que alguns destes complexos estão sendo relatados pela primeira vez , descreve-se também uma técnica inédita para obtenção de Galactomanana(16) , polissacarídeo presente nas sementes de muitas leguminosas. Com a metodologia desenvolvida, a partir das sementes

de *Dimorphandra gardneriana*, é possível a obtenção de Galactomanana (16) com alto rendimento e com elevada pureza (Ver figura 1.1, pag 7).

A determinação estrutural da Galactomanana (16) obtida foi feita por RMN ^1H e RMN ^{13}C uni e bidimensional sem a necessidade de hidrólise parcial, precipitação, complexação ou purificação cromatográfica. Este fato também está sendo relatados pela primeira vez.

Este trabalho está dividido em 10 capítulos, descritos a seguir :

Capítulo 1- Introdução.

Capítulo 2- Considerações botânicas sobre a Família Leguminosae e o gênero *Dimorphandra*, bem como da revisão bibliográfica das substâncias isoladas das espécies pertencentes ao gênero *Dimorphandra*.

Capítulo 3- Levantamento sobre as atividades bioquímicas e farmacológicas dos flavonóides, assim como os principais flavonóides utilizados comercialmente.

Capítulo 4- Levantamento sobre polissacarídeos, sua ocorrência, estrutura e metabolismo.

Capítulo 5– Revisão sobre fosfolipídeos e a formação de complexos fosfolipídeo-flavonóides.

Capítulo 6 – Resultados e a discussão para as galactomananas.

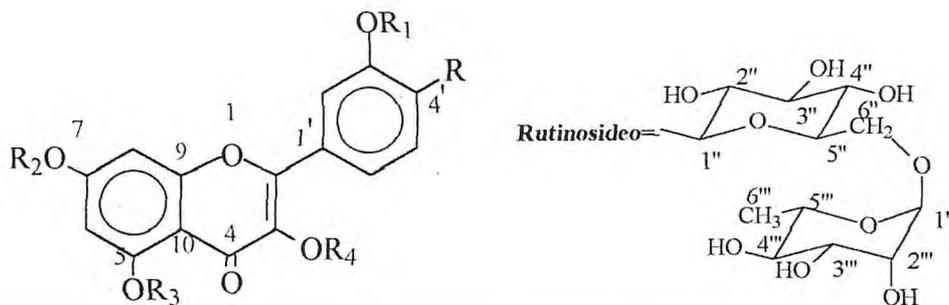
Capítulo 7 – Resultados e a discussão para os fosfolipídeos, flavonóides e seus complexos.

Capítulo 8–Procedimentos experimentais para isolamento das galactomananas, flavonóides, fosfolipídeos e preparação dos complexos. Descreve também, as técnicas utilizadas e as especificações dos materiais e instrumentos.

Capítulo 9 – Conclusão.

Capítulo 10 – Dados Espectrométricos.

Anexo 1- Revisão de métodos de extração de galactomananas de várias matérias primas.



Estroica	R	R1	R2	R3	R4
1	OH	H	H	H	Rutinosideo
2	OH	H	H	H	
3	H	H	H	H	Rutinosideo
4	H	H	H	H	H
5					Rutinosideo
6	OAc	Ac	Ac	Ac	
7					Rutinosideo
8	OCH ₂ CH ₂ OH	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₂ CH ₂ OH	Rutinosideo
9	-OCH ₂ CHOHCH ₃	-CH ₂ CHOHCH ₃	-CH ₂ CHOHCH ₃	-CH ₂ CHOHCH ₃	Rutinosideo

Figura 1.1 Estruturas das substâncias isoladas e seus derivados

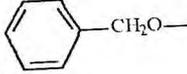
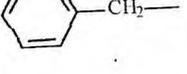
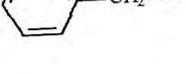
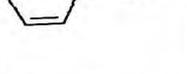
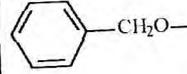
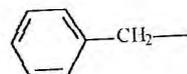
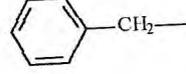
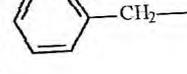
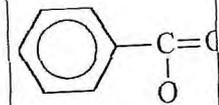
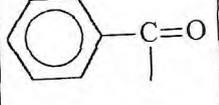
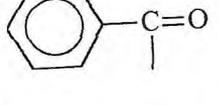
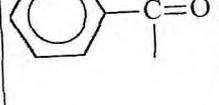
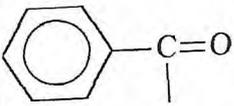
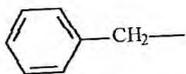
	R	R1	R2	R3	R4
10					Rutinosideo
11					H
12					H
13	OH	H		H	H
14	OH	H		H	H

Figura 1.1 Estruturas das substâncias isoladas e seus derivados-Continuação

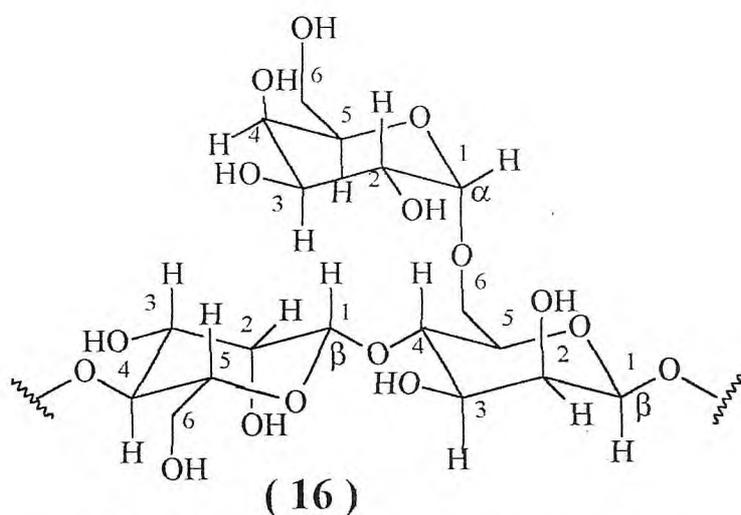
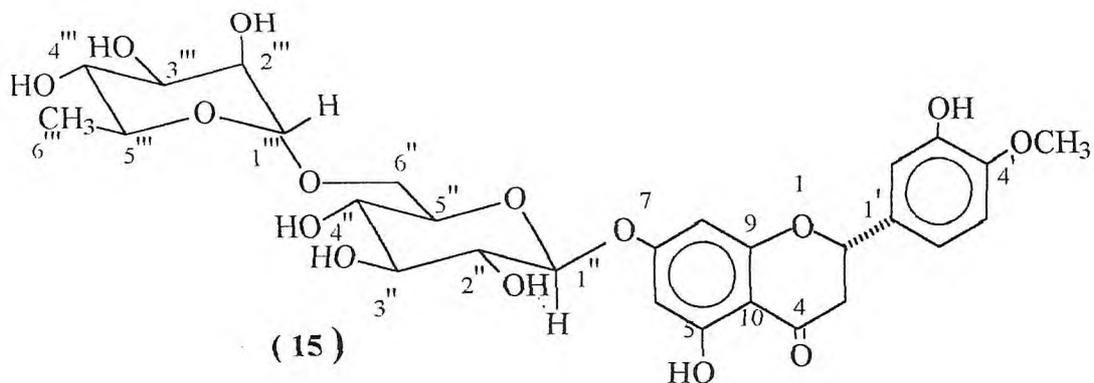


Figura 1.1 Estruturas das substâncias isoladas e seus derivados-Continuação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

BOMBARDELLI, E., CURRI, S.B., DELLA LOGIA, R., DEL NEGRO, P., TUBARO, A., GARIBOLD, P.L., Complexes Between Phospholipids and Vegetal Derivatives of Biological Interest, *Fitoterapia*, v. 60(1), p. 1, 1989.

RAGANOSE, A.M., Systematic Anatomical Characters of the Leaves of *Dimorphandra* and *Mora* (*Leguminosae: Caesalpinoideae*) *Bot. J. Linn. Soc.* v. 7(3) , p. 255-274, 1972.

SOUZA, M.P., MATOS, M.E.O., MATOS, F, J, A. , *Constituintes Químicos de Plantas Medicinais Brasileiras*. Imp. Universitária/UFC, Fortaleza p. 416 , 1991 .

TOMASSINI, E., e MORS, W. B., *Dimorphandra mollis Benth.* e *D. gardneriana Tul.* , Novas e Excepcionais Fontes de Rutina , *Anais Acad. Bras. Ciênc.* v. 38 , p. 321-323, 1966.

Capítulo 2

Considerações Botânicas sobre a Espécie Estudada

2.1	Introdução	10
2.2	Taxonômia de <i>Dimorphandra</i>	11
2.3.	Descrição botânica de <i>Dimorphandra</i> .	13
2.4.	Fitoquímica da <i>Dimorphandra</i>	15

2 . CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A ESPÉCIE ESTUDADA

2.1. - Introdução

Shultz (1943) confere ao táxon *Leguminosae* o valor de uma família dividida em três subfamílias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Faboideae* ou *Papilionoideae*. Cronquist(1988) conferiu à família *Leguminosae* o valor duma ordem *Fabales*, inserida na subclasse *Rosidae*, dando então às subfamílias o valor da famílias, com as denominações de *Mimosaceae*, *Caesalpinaceae* e *Fabaceae* (*Papilionaceae*) e relata que a família *Fabaceae* é a mais avançada da ordem *Fabales* pois pode ser considerada como derivada da *Caesalpinaceae*. De acordo com Wooldland(1991), as duas classificações podem ser utilizadas, já que existem evidências para ambos segmentos de classificação, mas considera a ordem *Fabales* dividida em três famílias: *Mimosaceae*, *Caesalpinaceae* e *Fabaceae* (Leguminosa) .

A família *Leguminosae* (*Fabaceae*) da ordem *Rosales*, é uma das mais extensas das plantas floríferas com cerca de 650 gêneros, reunindo mais de 18.000 espécies espalhadas pelo mundo [ILDIS, 1999], especialmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta [JOLY, 1977]. No Brasil, a família *Leguminosae* é distribuída em todo território nacional, compreendendo cerca de 152 gêneros e 2.800 espécies para a subfamília *Mimosoidae* e 482 gêneros e 2.000 espécies para a subfamília *Papilionoideae* (*Faboideae*) [BARROSO, 1984].

As plantas desta família apresentam hábito muito variado, havendo sempre ervas, arbustos, trepadeiras e árvores. Vivem nos mais variados ambientes, em diferentes latitudes e altitudes .

Algumas *Caesalpinioideae* são empregadas na medicina popular como: *Copaifera* sp (Copaíba, no tratamento de úlceras e feridas), *Hymenaea courbaril* (Jatobá no tratamento das moléstias do peito), *Tamarindus indica* (Tamarindeiro, tem fracos efeitos purgativos), *Bauhinia candicans* (pata de vaca, é empregada no tratamento de doenças renais) [SHULTZ, 1943] os melhores copais – resinas viscosas célebres pela sua resistência e estabilidade em vernizes, tintas e lacas, são encontrados especialmente nos gêneros *Hymenaea* e *Copaifera* [LEWIS, 1987].

Semelhante a *Caesalpinioideae*, a maioria das *Mimosoideae* (50-56 gêneros, cerca de 3.000 espécies) [WOODLAND, 1991], são árvores e arbustos tropicais e subtropicais

A subfamília *Papilionoideae* (451 gêneros e 12.000 espécies) [WOODLAND, 1991; ZARUCCHI, 1994], é a mais extensa das três subfamílias com aproximadamente dois terços de todos os gêneros e espécies da família.

2.2. Taxonomia de *Dimorphandra*.

Os dois gêneros de *Leguminosae* sul-americanos, *Dimorphandra* e *Mora*, são interessantes do ponto de vista taxonômico pois eles representam em suas características morfológicas externas de acordo com alguns botânicos, a transição entre duas subfamílias, a *Caesalpinioideae* e a *Mimosoideae*. Existem cerca de 36 espécies de *Dimorphandra* e todas ocorrem na região tropical da América do Sul, especialmente na região da Amazônia Brasileira [RAGONESE, 1972] (ver TABELA 2.1.).

De acordo com os dados fornecidos por Ildes (2003), foi possível sugerir que o gênero *Dimorphandra* é representado por 36 espécies (ver tabela 2.1, pag. 12), dentre estas, as espécies 13 e 33 não são aceitas pelo Banco de dados Ildes.

Tabela 2.1.- Espécies De *Dimorphandra* RELATADAS [RAGANOSE, 1972; RIZZINI, 1963, BRAGA, 1976, CORRÊA 1984a e 1984b, E ILDIS 2003].

Espécies de <i>Dimorphandra</i>	Espécies de <i>Dimorphandra</i>
1. <i>Dimorphandra campinarum</i> Ducke	19. <i>Dimorphandra lorentensis</i> M.F. Silva
2. <i>Dimorphandra caudata</i> Ducke	20. <i>Dimorphandra macrostachya</i> Benth.
3. <i>Dimorphandra coccinea</i> Ducke	21. <i>Dimorphandra macrostachya</i> Benth. Subsp. <i>Congestiflora</i> (Sprague & Sandw)
4. <i>Dimorphandra congestiflora</i> Sprague e Sandw	22. <i>Dimorphandra macrostachya</i> Benth. Subsp <i>grablifolia</i> (Ducke) M. F. Silva
5. <i>Dimorphandra conjugata</i> (Splitg.) Sandw.	23. <i>Dimorphandra macrostachya</i> Benth. Subsp. <i>Macrostachya</i>
6. <i>Dimorphandra cuprea</i> Sprague & Sandw.	24. <i>Dimorphandra mediocris</i> Ducke
7. <i>Dimorphandra cuprea</i> Sprague & Sandw. Subsp. <i>Cuprea</i>	25. <i>Dimorphandra mollis</i> Benth
8. <i>Dimorphandra cuprea</i> Sprague & Sandw. Subsp. <i>feruginta</i> (Ducke) . M.F., Silva	26. <i>Dimorphandra multiflora</i> Ducke
9. <i>Dimorphandra cuprea</i> Sprague & Sandw. Subsp. <i>Velutina</i> (Ducke) M. F. Silva	27. <i>Dimorphandra parviflora</i> Benth
10. <i>Dimorphandra davisii</i> Sprague & Sandw	28. <i>Dimorphandra pennigera</i> Tul.
11. <i>Dimorphandra dissimilis</i> Cowan	29. <i>Dimorphandra polyandra</i> Benoist
12. <i>Dimorphandra exaltada</i> Schott	30. <i>Dimorphandra pullei</i> Amshoff
13. <i>Dimorphandra ferruginea</i> Ducke	31. <i>Dimorphandra unijuga</i> Tul.
14. <i>Dimorphandra gardneriana</i> Tul.	32. <i>Dimorphandra urubuensis</i> Ducke
15. <i>Dimorphandra gigantea</i> Ducke	33. <i>Dimorphandra velutina</i> Ducke
16. <i>Dimorphandra Hohenkerkii</i> Sprague & Sandw. Subsp.	34. <i>Dimorphandra vernicosa</i> Benth
17. <i>Dimorphandra Ignea</i> Ducke Sprague & Sandw. Subsp.	35. <i>Dimorphandra williamii</i> M. F. Silva
18. <i>Dimorphandra jorgei</i> M.F. Silva	36. <i>Dimorphandra wilsonii</i> Rizz

2.3. – Descrição Botânica de *Dimorphandra* .

Dirmophandra gardneriana e *Dimorphandra molis* pertencem à família *Leguminosae–Caesalpinoideae*(*Caesalpinaceae*) e são duas espécies exploradas industrialmente no Brasil, para a produção de Rutina(1), ambas são árvores pequenas que habitam os cerrados e são conhecidos popularmente como faveira e fava d'anta. Ambas são árvores pequenas que habitam os cerrados [TOMASSINI E MORS,1966] .

Dimorphandra gardneriana possui folhas bipinadas , compostas , com 5-8 jugas formadas de 10-20 jugos de folíolos largo-ovado , medindo cada um de 3 a 4 cm , glabros na página superior e mais ou menos ferrugíneo-tomentosos na inferior.Flores sésseis dispostas em espigas corimbiformes . Ocorre na zona do cerrado, nos estados do Maranhão, Bahia , Ceará , Piauí [CORREIA,1984a](Figura 2.1,pag.14).

Dimorphandra mollis apresenta ramos ferrugíneo-pubescente,folhas compostas bipinadas,com 6-12 jugas alternas ou subopostas formadas de 10-20 jugos de folíolos,mais ou menos lípticos,obtusos,muito pequenos , pubescentes em ambas as páginas e com as margens recurvadas . Flores sésseis, amarelas, carnosas , disposta sem espigas corimbiformes , quase palmiformes . Ocorre nos estados de Minas Gerais,São Paulo,Goiás e Mato Grosso[TOMASSINI e MORS,1966;CORREA,1984b](Figura 2.2, pag.14) .

Os frutos destas faveiras são vagens semideiscentes, compridas, medindo até 15 cm de comprimento, mesocarpo farináceo adocicado mas desagradáveis, muito procuradas pelo gado [TOMASSINI e MORS 1966; CORREA , 1984a e 1984b].

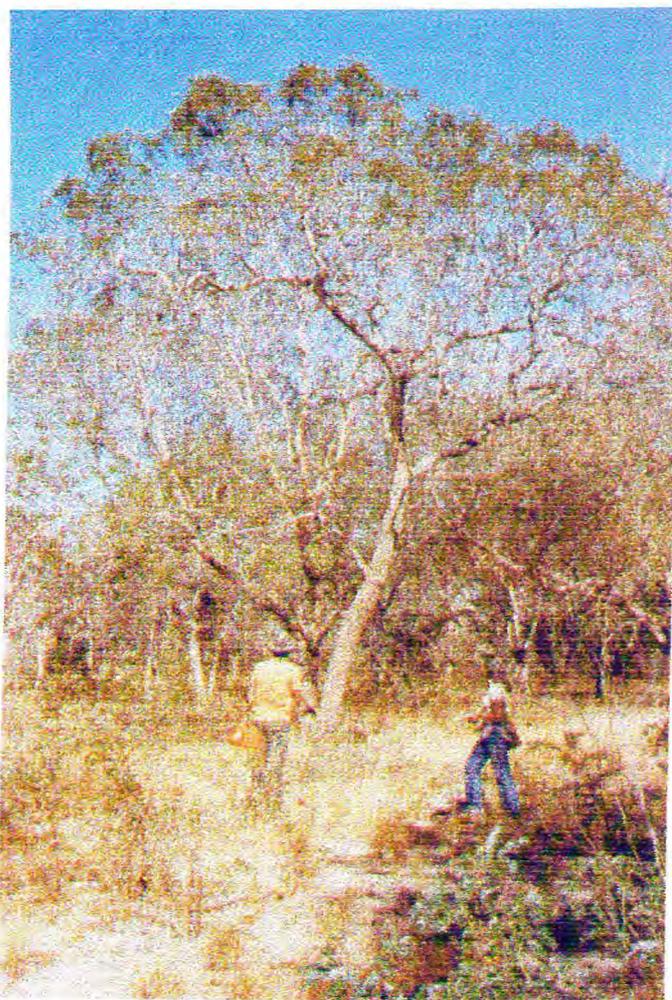


Figura 2.1. Árvore de *Dimorphandra gardneriana* . Foto retirada do livro : Vegetação Arbórea e Arbustea nos Altiplanos das Chapadas do Piauí Central [JENRICH,1989] .

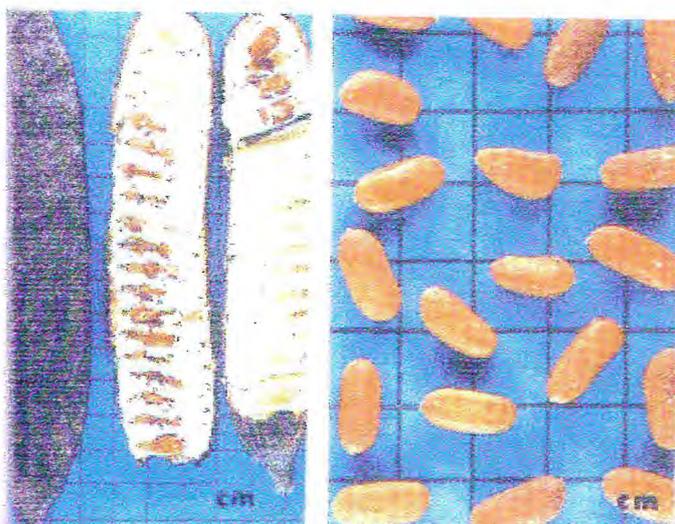
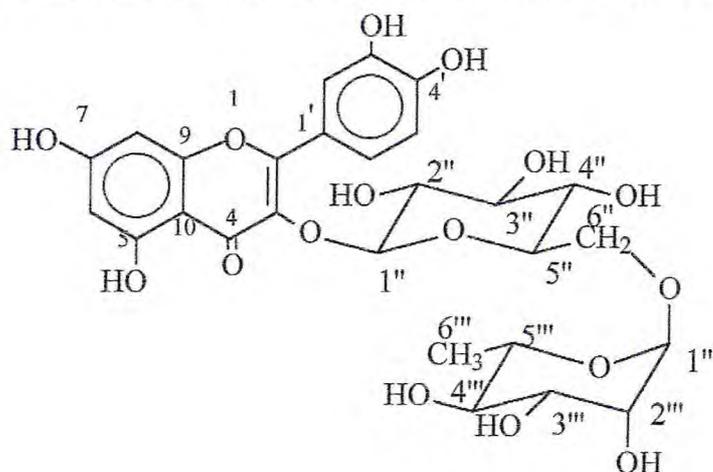


Figura 2.2. - Favas e Sementes de *Dimorphandra mollis* . Foto retirada do livro : Arvores Brasileiras : Manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas e nativas do Brasil[LORENZI,1992] .

2.4. -Fitoquímica de *Dimorphandra*

Levantamento bibliográfico no Chemical Abstract, Institute for Scientific Information < ISI <http://www.webofscience.fapesp.br>>, International Legume Database&Information Service<Ildis, <http://www.ildis.org/leguminosae>> , Agrícola< <http://www.nal.usda.gov/>>, relata a ocorrência de 36 espécies (VER TABELA 2.1,pag. 12) , mas os únicos estudos químicos encontrados na literatura são relacionados com *Dimorphandra mollis* e *Dimorphandra gardneriana* .

A maioria das citações bibliográficas é relacionada com o isolamento e identificação de flavonóides e taninos. É descrito nas favas de *Dimorphandra mollis* e *Dimorphandra gardneriana* a presença de Rutina (1),sua hidrólise e identificação dos açucares[TOMASSINI E MORS,1966].



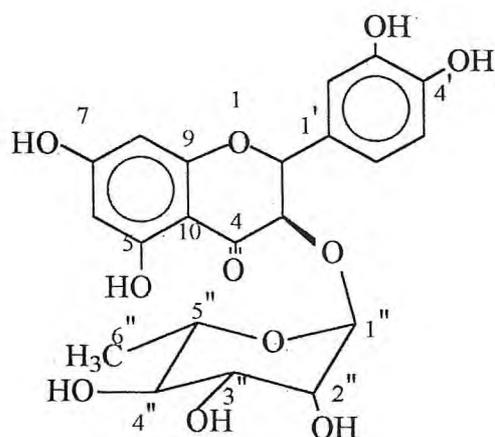
(1)

O pericarpo e a polpa do fruto contem glicosídeos flavônicos , especialmente RUTINA. Para extração desta substancia a indústria utiliza os frutos em estado de prematuraçãõ . A produção de RUTINA atinge no país cerca de 1000 toneladas anuais [ABIQIF,2002].

As cascas do tronco , pela abundância de tanino, são usadas nos curtumes para curtir couros [TOMAZZINI e MORS, 1966; RIZZINI 1963] .

Embora existisse a suspeita popular de que as favas *Dimorphandra mollis* e *Dimorphandra gardneriana* , que são muito procuradas pelo gado, teriam ação abortiva, a investigação sobre uma possível atividade miotrópica destes frutos, não mostrou qualquer atividade [TOMASSINI e MORS,1966] . Ensaio biológicos em animais com os extratos exibiram atividades hipotensora , betabloqueadora[SOUZA e Colaboradores,1991; LANGELOH,1992]. A atividade tóxica das favas destas espécies também é abordado[DOBEREINER e Colaboradores,1985 ;FILHO, 1985].

A literatura[SANTOS e Colaboradores, 2002] relata a presença de taninos e compostos fenólicos nas folhas e casca do tronco de *Dimorphandra mollis* . Alguns compostos isolados de *Dimorphandra mollis* como a Astilbina(17) apresentam atividade inseticida[CINTRA e Colaboradores,2002] e foram encontradas tamb"em citações de estudos da atividade moluscicida realizados por BEZERRA e Colaboradores,(2002) .



17

Referências Bibliográficas.

ABIQUIF-Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica. Exportações 2000. Dez 2000 .Disponível em: <http://www.abiquif.org.br> acesso em 31 de setembro de 2003.

BARROSO,G.M., *Sistemática de angiospermas do Brasil*,vol. 2 , Imprensa Universitária de Viçosa ,MG ,1984 .

BEZERRA, J.C.B., SILVA. I.A., FERREIRA, H.D., FERRI, P.H., SANTOS, S.C., Molluscicidal Activity Against *Biopharmalaria globrata* of Brazilian Cerrado Medicinal Plants, *Fitoterapia*, v. 73, p. 428-430, 2002.

BRAGA,R., *Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará*. Mossoró: Ed. Mossoreense.1976

CINTRA, P., MANSPUNA, O., PETACCI F., FERNANDES J.B, BUENO, O.C., VIEIRA, P.C., SILVA, M.F.G.F., Toxicity of *Dimorphandra mollis* for Workers of *Apis mellifera* .J., *Braz. Chem. Soc.* v.13 N.º1, p. 115-118, 2002.

CORRÊA, M. P., *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa nacional, v. II, p. 370-375, 1984a.

CORRÊA, MANUEL PIO, *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro , *Imprensa Nacional*, v. I. p. 267, 1984b.

CRONQUIST, A., *The evolution and classification of flowering plants*.
2nd ed. USA: The New York Botanic Gardem, 1988.

DOBEREINER, J., TOKARNIA, C.K., CONSORTE, L.B., Intoxicação
Experimental em Bovinos pela Fava de *Dimorphandra gardneriana*
(*leguminosae Caesarpinoideae*), *Pesq. Vet. Bras.* v. 5(2), p. 47-51;
1985.

FILHO., J.A.B.M., Intoxicação Experimental pela fava de *Dimorphandra*
mollis em Bovinos, *Pesq. Vet. Bras.* v. 5(3), p. 93-96, 1985.

ILDIS. International legume database & information service. Apr. 1999.
Disponível em: <<http://www.ildis.org/leguminosae>>. acesso em 29 de
Abril de 2003.

ILDIS. International legume database & information service. Espécies
de *Dimorphandra*. 2003 . Disponível em: [http://biol.soton.ac.uk/cgi-
bin/legumeweb](http://biol.soton.ac.uk/cgi-bin/legumeweb) acesso em 29 de Abril de 2003.

JENRICH, H., *Vegetação Arbórea e Arbustea nos altiplanos das*
chapadas do Piauí central, Teresina, ed. DNOCS, 1989.

JOLY, A. B., *Botânica – Introdução à taxionomia vegetal*. 4 ed. São
Paulo: Companhia Editorial Nacional, p 218-383,1977.

LANGELOH, A., LEGNIZAMAN, F.M., DALSENTER, P., Potencial
Abortivo e Infertilizante de plantas Brasileiras Ocasionalmente de
pastagens de Bovinos e outros Herbívoros de Interesse Econômico,
Pesq. Vet. Bras. v. 12 (1/2), p.11-18, 1992.

LEWIS, G.P. , *Legumes da Bahia* , Royal Botanic Gardens Kew , 1987.

LORENZI, H. , *Árvores brasileiras : manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil* , São Paulo , Ed. Plantarum, 1992.

RAGANOSE, A.M., Systematic Anatomical Characters of the Leaves of *Dimorphandra* and *Mora* (Leguminosae: Caesalpinoideae) *Bot. J. Linn. Soc.* v. 7(3) , p. 255-274, 1972.

RIBEIRO, J.E.L.S., *Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia central*. Manaus: Inpa, p.816 , 1999.

RIZZINI, C.T., *A Flora do Cerrado – Análise Florística das Savanas Centrais em Simpósio sobre Cerrado*, São Paulo: ed. USP, p. 127-177. 1963.

SANTOS, S.C., COSTA, W.F., RIBEIRO, J.P., GUIMARAES, D.O., FERRI, P.H., FERREIRA, H.D., SERAPHIN, J.C., Tanin Composition of *Barbatimam* *Specie, Fitoterapia*, v. 73, p.292-299, 2002.

SHULTZ, A. R., *Introdução ao estudo da botânica sistemática*. Porto Alegre: Ed. Livraria Globo, 1943.

SOUZA, M.P., MATOS, M.E.O., MATOS, F, J, A., *et al* , *Constituintes Químicos de Plantas Medicinais Brasileiras*. Imp. Universitária/UFC, Fortaleza p. 416, 1992 .

TOMASSINI, E., e MORS, W. B., *Dimorphandra mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tul. , Novas e Excepcionais Fontes de Rutina , *Anais Acad. Bras. Ciênc.* v. 38 , p. 321-323, 1966.

WOODLAND, D. W., *Contemporary plant systematics* , USA: Prentice-Hall, 1991.

ZARUCCHI, J.I., *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae* , London: Chapman & Hall, v.1, 1994.

Capítulo 3

Galactomananas

3.1	Introdução	22
3.2	Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes (PRPC).	25
3.2.1	Galactomananas	25
3.3.	Características de algumas gomas segundo sua natureza	28
3.3.1.	Gomas exsudadas de plantas	28
3.3.2	Gomas de algas	29
3.3.3	Gomas microbiológicas	29
3.3.4	Substâncias pécticas	30
3.4.	Gomas de sementes	32
3.4.1	Galactomananas	32
3.4.2	Relação manose:galactose nas galactomananas	37
3.5.	Revisão sobre métodos de extração de Galactomanana de várias matérias primas	38

3. GALACTOMANANAS

3.1. – Introdução

O interesse no estudo de sementes de frutos remonta, provavelmente, a pré-história, quando o homem percebeu o extraordinário fato de que elas eram capazes de se transformar em plantas iguais às que lhes deram origem. Hoje, as sementes representam para o homem uma grande fonte de alimento. Cerca de 70% de todo alimento para o consumo do homem vem diretamente delas, principalmente dos cereais e legumes [BEWLEY e BLACK, 1986], além de constituírem matéria prima para indústria química e farmacêutica, cosméticos e lubrificantes, entre outras.

O conhecimento da composição química das sementes está mais direcionada às espécies comestíveis onde predominam os carboidratos e proteínas.

Os carboidratos estão presentes em vegetais freqüentemente como polissacarídeos (com dez ou mais unidades), produtos da policondensação de monossacarídeos ou seus derivados (ácidos urônicos, açúcares aminados, etc.), ligados por ligações glicosídicas através da eliminação de água entre duas moléculas adjacentes [MILLER, 1979], .

O termo goma foi inicialmente atribuído a um grande número de compostos, incluindo polissacarídeos, terpenos, proteínas e polímeros sintéticos. Hoje é mais utilizado para polissacarídeos e seus derivados, que se hidratam em água, fria ou quente, formando soluções viscosas ou dispersões [PAULA, 1995]. As gomas naturais são geralmente insolúveis em solventes orgânicos, são hidrofílicas e se decompõem a temperaturas elevadas. São substâncias amorfas e não possuem pontos de ebulição e

fusão característicos [MANTELL, 1947]. Possuem, em geral, a propriedade de geleificar e são muito utilizadas como espessantes e estabilizantes nas indústrias alimentícia e farmacêutica [CHURMS e Colaboradores, 1986]. Incluem-se nesta categoria, os exsudados de plantas e as gomas extraídas de algas e de sementes. Algumas de suas funções e aplicações são mostrados na tabela 3.1. Atualmente, além das gomas naturais, são utilizadas gomas modificadas e sintética (Tabela 3.2, pg. 24). As gomas modificadas derivam de polissacarídeos insolúveis em água na forma natural, como celulose e amido. As sintéticas são macromoléculas que apresentam propriedades semelhantes às das gomas naturais e por isso, industrialmente, também são denominadas de gomas embora não sejam encontradas na natureza .

Tabela 3.1 Gomas : funções e aplicações na indústria de alimentos [STEPHEN e CHURMS, 1995]

GOMAS	FUNÇÕES	APLICAÇÕES
Goma guar	Estabilizante, Retentor de água	Laticínios, sorvetes, sobremesas, padaria
Carragenanas	Estabilizante, Espessante, Geleificante	Sorvetes, flans, sobremesas, produtos para carne, pudins instantâneos
Ágar	Geleificante	Laticínios, confeitarias, produtos para carne.
Goma arábica	Estabilizante , Espessante , Emulsificante	Confeitarias, padarias, bebidas, molhos.
Goma tragacante	Estabilizante , Espessante , Emulsificante	Laticínios, sobremesas, molhos, confeitarias.
Pectinas	Geleificante , Espessante , Estabilizante	Geléias, conservas , bebidas, padarias, confeitarias, laticínios.
Alginatos	Estabilizante , Espessante	Sorvetes, bebidas, pudins, instantâneos.
Goma xantana	Estabilizante , Espessante	Sobremesas, bebidas, laticínios.
Carboximetilcelulose	Estabilizante , Espessante , Retentor de água	Sorvetes, massa para bolo, panquecas, coberturas para sobremesas

Tabela 3.2 Classificação das gomas quanto á sua natureza

[PAULA(1990); WHISTLER eBEMILLER (1993); PAULA (1995)]

Gomas Naturais	Exsudados de Plantas	Goma Arábica
		Goma Caraya
		Goma Tagacanth
		Goma Ghatti
		Goma do Cajueiro
		Goma do Angico
	Extraídas de Algas	Ágar
		Carragenana
		Alginato
	Extraídas de Sementes	Goma Guar
		Goma Carob
		Goma Tara
		Goma Fenugreek
	Fermentação microbiológica	Dextrana
		Xantana
Goma Modificadas	Celulose	Carboximetilcelulose
		Hidroximetilcelulose
		Hidroxietilcelulose
	Amido	Carboximetilamido
		Hidroxietilamido
		Hidroxipropilamido
		Acetato de Amido
	Guar	Carboximetilguar
	Alginato	Alginato de propilenoglicok
Gomas sintéticas	Álcool polivinílico	
	Álcool poliacrílico	
	Poliacrilamida	
	Polióxido de etileno	

3.2. – Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular em sementes.

Entre os principais polissacarídeos de reserva em plantas estão o amido, os frutanos e os polissacarídeos de reserva de parede celular. Estes últimos ocorrem principalmente em sementes e podem ser classificados de acordo com suas estruturas em mananas, xiloglucanas e galactanas. Apesar das diferenças estruturais marcantes, os polímeros dos três grupos apresentam propriedades físico-químicas semelhantes.

Os PRPC (Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular) são classificados em três grupos distintos: as mananas, as xiloglucanas e as (arabino)galactanas. Esta classificação é baseada essencialmente na estrutura química desses polímeros, sendo as mananas subdivididos em mananas puros, glucomananas e galactomananas (Ver figura, 3.1).

3.2.1 Galactomananas .

Os primeiros estudos com espécies que armazenam galactomananas em suas sementes foram realizados por Nadelmann em 1890, incluindo uma espécie tropical, *Schizolobium* sp. Estes polissacarídeos são compostos por uma cadeia linear de resíduos de manose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), à qual resíduos de galactose estão unidos por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6) (Figura 3.1, pag 27) . As galactomananas ocorrem tipicamente em endosperma de sementes de leguminosas .

Sendo uma das maiores famílias no reino vegetal, *Leguminosae* (\cong 18.000 espécies) tem o maior número de espécies estudadas até hoje quanto à

presença de galactomananas . A razão manose:galactose e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia de manose variam de espécie para espécie , sendo importante para estudos quimiotaxonômicos e evolutivos [REID e MEIER,1970;BUCKERIDGE e DIETRICH,1990; BUCKERIDGE e Colaboradores,1995].As três subfamílias de *Leguminosae*(*Caesalpinioideae*,*Mimosoideae* e *Faboideae*) podem ser distinguidas utilizando-se este parâmetro .

Além do papel de reserva, a galactomanana influencia no fluxo de água na semente devido a sua maior solubilidade nos primeiros estágios da germinação . Este polissacarídeo absorve, proporcionalmente, grande quantidade de água e a distribui ao redor do embrião . O endosperma embebido protege o embrião contra perda de água através de um efeito conhecido como “tampão de água”, durante períodos de seca pós-embebição [REID e BEWLEY, 1979].

O grau de ramificação dos mananos define suas relações estrutura-função. Quanto menos ramificado , maior a indicação de que a função biológica está relacionada com a dureza e proteção do embrião . Por outro lado, quanto maior o grau de ramificação, mais solúvel o polissacarídeo e maior a participação deste em funções como as relações hídricas . No entanto, não se sabe ao certo qual dessas funções é a primária.: reserva, dureza ou relações hídricas. É certo,por outro lado, que as mananas e galactomananas são moléculas multifuncionais,desempenhando suas funções durante fases distintas do crescimento e desenvolvimento das plantas .

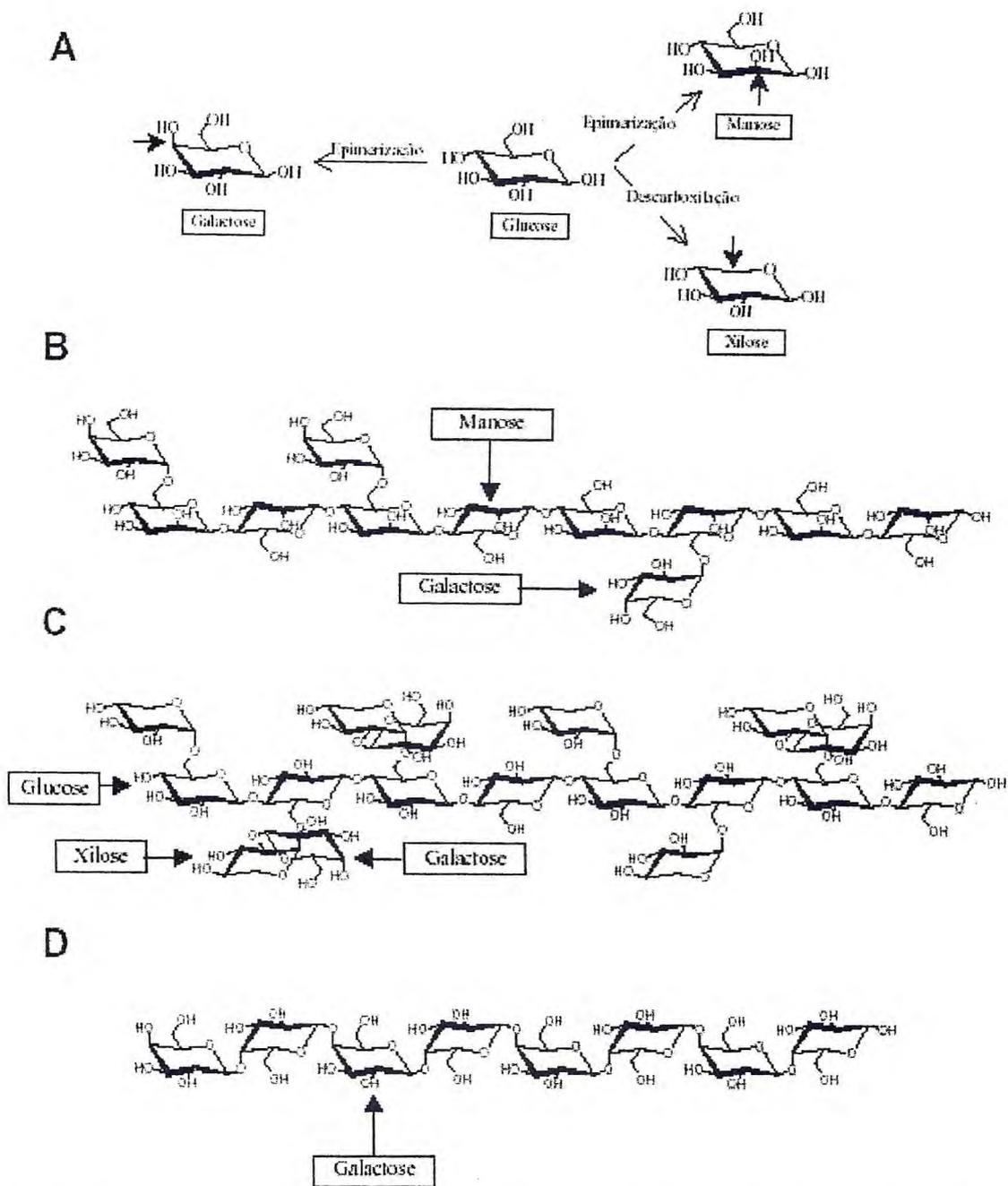


Figura 3.1 – Estruturas químicas dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular que ocorrem em sementes e os monossacarídeos que os constituem (A). As setas em (A) indicam as posições dos carbonos que sofreram alteração (epimerização ou descarboxilação) a partir da glucose, dando origem aos outros monossacarídeos. Os PRPC são classificadas como (B) (galacto) mananas, (C) xiloglucanas e (D) galactanas. Em (B) o polissacarídeo é denominado “galactomanana” quando é ramificado com resíduo de galactose for superior a 10% do contrario, denomina-se “manana” puro.

3.3. – Características de alguma gomas segundo a sua natureza .

3.3.1.- Gomas exsudadas de plantas

Três famílias,principalmente,incluem espécies que produzem gomas na forma de exsudados:as *Leguminosas*,as *Combretaceas* e as *Anacardiaceas*.Estas gomas são exudadas principalmente no caule e galho das plantas , como defesa contra predadores e como consequência de ferimentos. Condições climáticas desfavoráveis e solos pobres também estimulam a produção de goma [ANDERSON e MCDOUGALL,1987; MILLER,1979].A formação de exudados pode ser induzida também por introdução de agentes químicos,como óxido de etileno e derivados do ácido benzóico.Exemplos de polissacarídeos desse grupo são as gomas arábica ,karaia, tragacanth, ghatti[WHISTLER e MILLER, 1993] e aquelas do cajueiro e do angico[PAULA, 1995].

As gomas de exsudatos vegetais são largamente utilizadas para estabilizar bebidas e emulsificar flavorizantes oleosos usados em bebidas. Também são utilizadas em preparações farmacêuticas e indústrias cosméticas em produtos para cuidados do rosto e dos cabelos , podem citar , por exemplo a Goma Karaya que é utilizada como laxativo e em adesivos dentários , e as gomas exudadas de *Anacardium occidentale* (cajú) e *Anadenanthera macrocarpa*(angico),que estão sendo empregadas no Brasil como um substituto para goma arábica [PAULA,1995].

3.3.2 Gomas de algas

Os polissacarídeos extraídos de algas constituem, principalmente, componentes estruturais das paredes celulares. A presença de determinados polissacarídeos em algas é sazonal variando de acordo com a temperatura da água, o acesso aos nutrientes e com a luz do sol [KENNEDY e WHITE, 1988].

A maioria das gomas de algas, como é o caso do ágar, alginatos e carragenana pode ser extraída dos tecidos em água quente, ácido diluído ou álcalis. O ágar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas da classe *Rhodophyceae*, é insolúvel em água fria e bastante solúvel em água quente. O ágar é um dos agentes geleificantes mais usados. A baixas concentrações, forma géis firmes de alta resistência e reversibilidade. Na indústria alimentícia o ágar é usado como estabilizante e em laboratório é corriqueiramente usado como suporte em técnicas de eletroforese, imunoeletroforese, imunodifusão, filtração em gel e para meios de cultura.

As gomas de algas são largamente usadas em aplicações industriais principalmente em indústrias de alimentos, como: geleificantes, emulsionantes, estabilizantes, espessantes.

O ágar tem baixo teor em metabólitos e substâncias inibidoras por isso é ideal para a propagação e cultura pura de fungo, levedura e bactérias. Contudo, devido ao seu alto custo, ágar tem sido substituído por outras gomas em muitas aplicações [WHISTLER, 1959].

3.3.3 Gomas microbiológicas

Diferentemente das gomas descritas anteriormente, as gomas de origem microbiológica não estão sujeitas a alterações estruturais dependentes do clima, poluição ou localização geográfica [KENNEDY e

WHITE 1988]. Através do controle da composição do meio de cultura das bactérias fermentadoras pode-se desenvolver polissacarídeos com estruturas e propriedades específicas .

As gomas dextrana e xantana são exemplos deste tipo de goma. As gomas dextrana conhecidas são sintetizadas pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* por fermentação da sacarose, ou por outras bactérias pertencentes à família *Lactobacillaceae* .

As dextranas são neutras, constituídas de cadeias de α -D-glucopiranosose, geralmente através de ligação α -(1 \rightarrow 6), tendo algumas vezes ramificações que formam ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) [KENNEDY e WHITE, 1988] (Ver figura 3.2, pag. 31) .

As gomas dextrana são largamente utilizadas na indústria alimentícia como estabilizantes. Em laboratório de pesquisa, as dextranas são também utilizadas em filtração de gel [PHARMACIA, 1993].

3.3.4 Substâncias Pécicas

É o termo genérico para um grupo de polissacarídeos, principalmente os do Ácido poligalacturônico parcialmente metoxilados, os quais estão localizados nas paredes celulares de frutas cítricas (30%), polpas de beterrabas (25%) maçãs (15%) e também estão presentes em pequenas proporções em tecidos vegetais .As pectinas consistem de cadeias de resíduos do Ácido α -D-galacturônico unidos por ligações 1 \rightarrow 4 (Ver figura 3.3 , pag. 31) .

Figura 3.2. – Estrutura da Dextrana

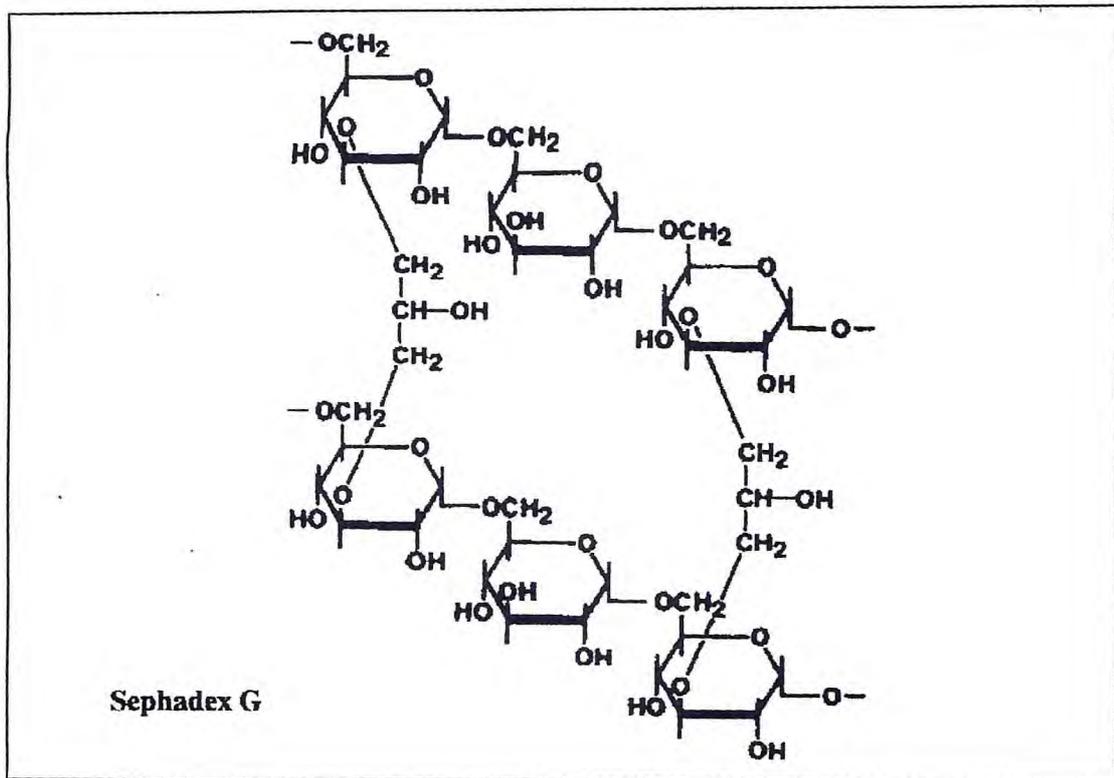
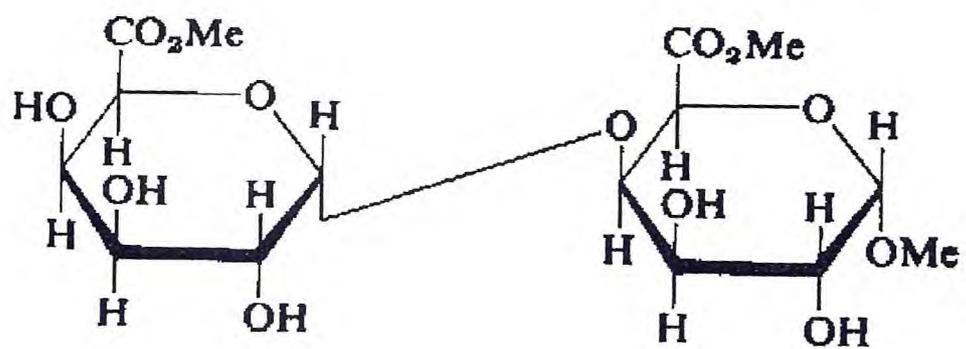


Figura 3.3 – Estrutura da Pectina(Ácido α -D-galacturônico)



3.4 Gomas de sementes

Além do amido, carboidrato comumente armazenado com maior representatividade nas sementes, outros polissacarídeos como mananas, galactomananas, glucomananas, xiloglucanas, arabinanas, dentre outros, podem ocorrer[BEWLEY e BLACK,1986].

Uma função provável para as gomas presentes nas sementes, gomas endospermicas, é a defesa contra estresse hídrico, já que acumulam muita água durante o intumescimento da semente garantindo, assim, o estabelecimento da plântula[ASPINALL, 1973].

3.4.1 Galactomananas

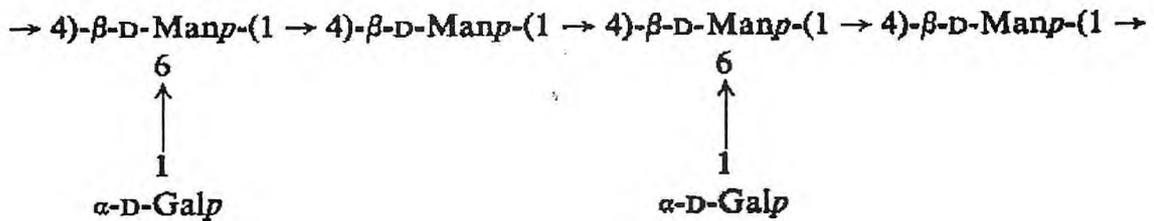
Uma grande variedade de plantas apresentam polissacarídeos com características diferentes, dentre eles podemos destacar as galactomananas que são encontradas no endosperma das sementes e representam as vezes até 50% do seu peso seco[GANTER e Colaboradores , 1992 ; REICHER e Colaboradores , 1991].Estas galactomananas são polissacarídeos ramificados constituídos por uma cadeia principal de unidades de manose com ramificações de unidades de galactose que variam de acordo com a espécie vegetal onde se encontram [PETKOWICZ, 1993] .

As galactomananas são encontradas principalmente no endosperma das sementes de plantas da família *Leguminosae*, mas também em menor quantidade, no endosperma de sementes das famílias *Palmae*, *Annonaceae*, *Convulvolaceae* e *Loganiaceae*[DEA e MORRISON, 1975; DEY, 1978], podem ainda ser provenientes de líquens, leveduras e fungos. No entanto, estes grupos de galactomananas são estruturalmente diferentes, apresentando uma variação no tipo e ligação, além de apresentarem conformações (piranose/furanose) diferentes para as unidades de galactose e manose[GORIN e BARRETO, 1983; TEIXEIRA e

Colaboradores , 1994 ; HEARN e Colaboradores , 1989 ; IKUTA e Colaboradores,1997;KIHO e Colaboradores,1997].Por hidrólise da galactomanana dois açúcares são obtidos : D-galactose e D-manose, e assim as gomas são referidas como galactomananas.

Nos vegetais elas correm como uma cadeia linear de unidades β -D-manopirranose, unidas por ligação (1 \rightarrow 4), com ramificações de α -D-galactopirranose unidas por ligação (1 \rightarrow 6) ao longo da cadeia principal(Figura 3.4 ,pag 33)[GANTER e Colaboradores,1992;REICHER e Colaboradores,1991 REICHER e Colaboradores,1992;ZAWADKI-BAGGIO e Colaboradores,1992 GANTER e Colaboradores,1995] .

Figura 3.4. –Estrutura das Galactomananas



O endosperma das sementes de plantas leguminosas freqüentemente contém quantidades substanciais de D-galacto-D-manana e é a principal fonte de galactomananas nas sementes, com exceção das galactomananas de *Gymnocladus dioica* e *Glycine max*, encontradas na casca do caule [DEA e MORRISON, 1975]. A quantidade de endosperma nas sementes é muito variável podendo atingir valores superiores a 50% do seu peso. Em leguminosas o teor de galactomananas também é variado, atingindo 38% nas sementes de *Ceratonia siliqua* e estando ausente em outras espécies [DEA e MORRISON, 1975].

Desvios na estrutura clássica das galactomananas foram constatados em várias espécies de Leguminosas como *Caesalpinia pulcherima* [URAU e Colaboradores.,1970]*Parkinsonia aculeata* [GURHA,198].A primeira (Figura 3.5-A, pag. 35) apresenta uma pequena proporção de ligações(1→3),(1→2) na cadeia principal,e a segunda é multi-ramificada com ligações(1→3),(1→4) e (1→6). Em alguns casos (Figura 3.5-B , pag. 35), como para as galactomananas das sementes de *Gleditsia ferox*, *Gleditsia amorphoides* e *Trifolium repens*, cadeias curtas de α -(1→6) D-galactose ligadas à cadeia principal de manose foram detectadas [DEA e MORRISON, 1975](Ver figura 3.5.) .

Galactomananas verdadeiras possuem mais de 5% de galactose, entretanto as reservas polissacarídeas das sementes maduras de espécies da família *Palmae* apresentam proporções pequenas de D-galactose, e mesmo assim são consideradas galactomananas [DEA e MORRISSON, 1975; DEY, 1978].

A maioria dos estudos sobre galactomananas visa principalmente o interesse comercial que envolve estes polissacarídeos, com aplicações nas diferentes áreas da indústria. Estas aplicações são decorrentes das propriedades reológicas das soluções aquosas, formado soluções de alta viscosidade em baixas concentrações, levemente afetadas por variação de pH , por ciclos de aquecimento e de resfriamento. Embora muitas galactomananas tenham sido isoladas nos últimos anos, somente as galactomananas de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) , de alfarroba ou "locust bean" (*Ceratonia siliqua*) e de "tara" (*Caesalpinia spinosa*) são utilizadas comercialmente[DEA e MORRISON,1975;WHISTLER e BEMILLER,1993].Desde 1953 a galactomanana de guar (goma de guar) predomina no mercado destes polissacarídeos.

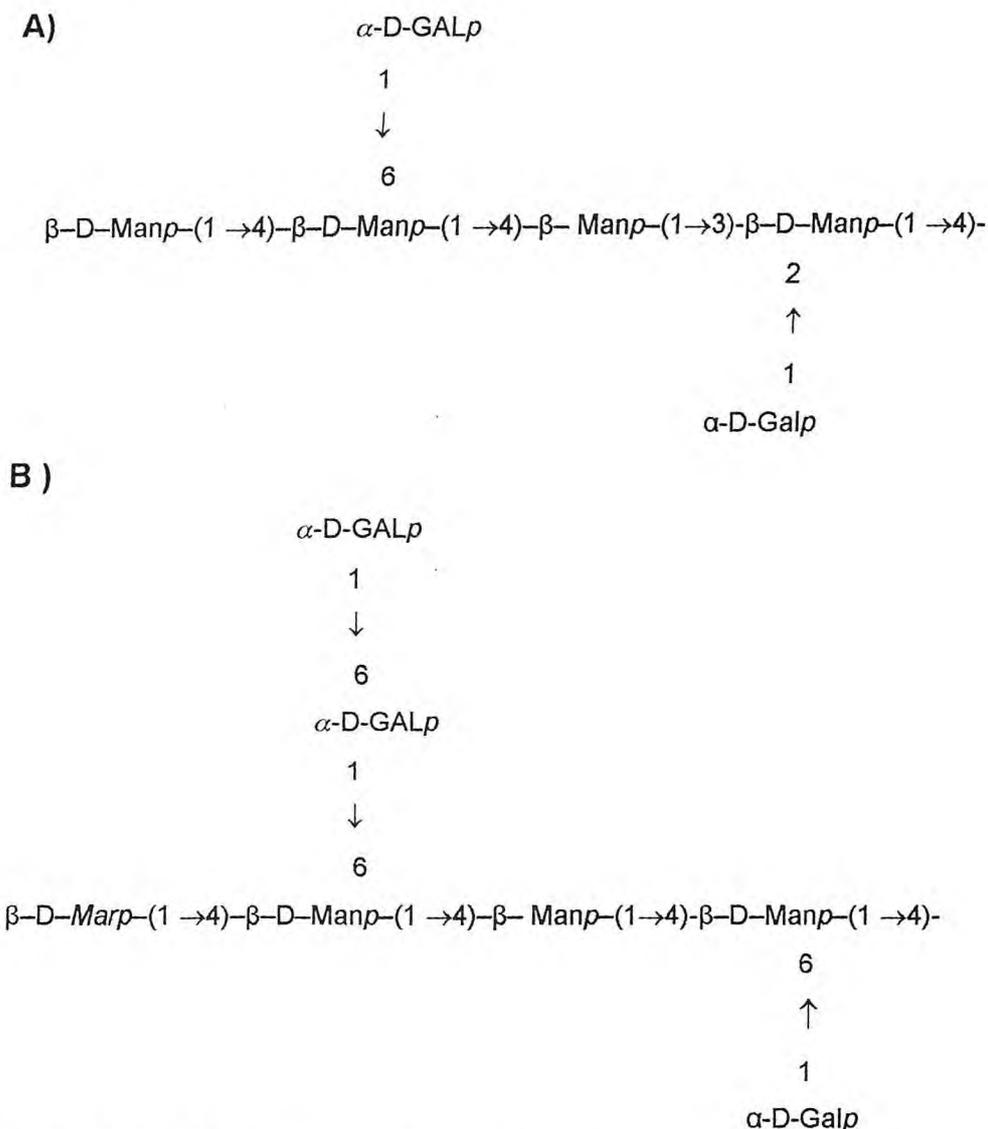


Figura 3.5. - Diferentes estruturas das galactomananas vegetais.

A Goma Guar é extraída das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, planta que ocorre extensivamente no Paquistão, Índia e Estados Unidos. O endosperma, compreende aproximadamente 40% da semente e o Guar comercial é o endosperma moído, e está disponível comercialmente em diferentes graus de pureza. A relação manose:galactose de 1,4:1 a 1:2,0 (Figura 3.6 ,pag. 36), permite que esse polissacarídeo seja completamente solúvel em água fria [WHISTLER e

BEMILLER, 1993; DAAS e Colaboradores , 2000; PETKOWICZ e Colaboradores ,1998].



Figura 3.6. Estruturas das Galactomananas obtidas de Guar

O locust(*Ceratonia siliqua*) é uma árvore sempre verde que se desenvolve abundantemente nas regiões costeiras do mediterrâneo e que também produzem vagens em abundância. A produção comercial envolve a moagem para permitir a separação da casca, germe e endosperma. O endosperma moído serve como goma bruta. As gomas purificadas são obtidas por dissolução, filtração (remoção de materiais fibrosos e outras impurezas) e precipitação com álcool. A galactomanana de locust (*Ceratonia siliqua*) é a mais conhecida e uma das mais antigas gomas extraídas de sementes. A espécie é nativa dos países Mediterrâneos, e hoje está sendo cultivada em muitas outras partes do mundo, incluindo Austrália e Estados Unidos. A galactomanana de alfarrobo é comercializada em quatro principais classes, que variam no grau de pureza e na malha utilizada na sua produção. Esse polissacarídeo quando apresenta uma proporção manose:galactose de 3,6:1 (figura 3.7, pag 37), é apenas parcialmente disperso em água fria e totalmente solúvel em água quente [DAAS e Colaboradores , 2000 ; PETKOWICZ e Colaboradores ,1998].

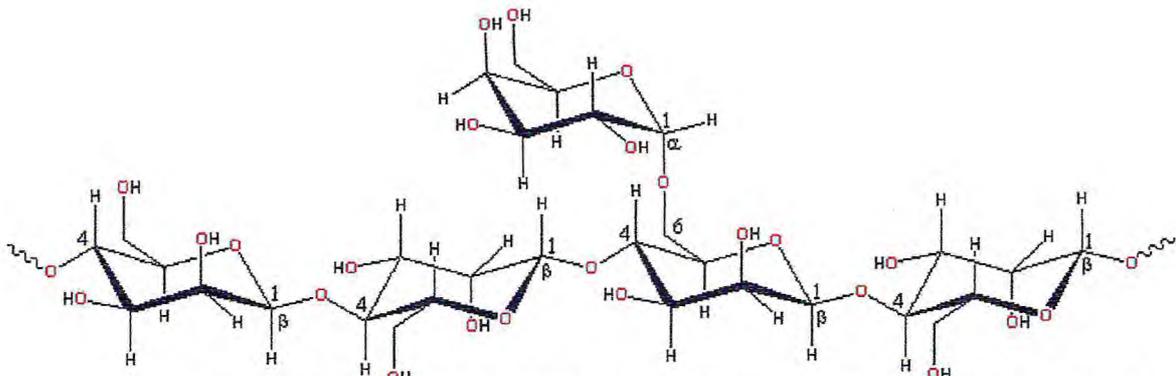


Figura 3.7. Estruturas das Galactomananas obtidas de Locust bean

3.4.2 Relação manose:galactose nas galactomananas

A relação D-manose:D-galactose, obtida a partir de galactomananas de 70 espécies, varia de 1:1 para *Medicago sativa* até 5,3:1 para *Sophora japonica* [DEA e MORRISON,1975;BUCKERIDGE e Colaboradores,1995].

Segundo DEA e MORRISON,(1975) ; WHISTLER e MILLER (1993), três possíveis estruturas da distribuição das unidades de D-galactose (**G**) ao longo da cadeia principal de D-manose (**M**), numa galactomanana, podem ocorrer como na FIGURA 3.8 (pag. 39), nela **A** representa um arranjo regular de cadeias laterais, **B** uma distribuição randômica e **C** uma estrutura na qual as cadeias laterais ocorrem em blocos. Vale ressaltar que intermediários dessas estruturas podem ocorrer .

Outro fator importante a ressaltar é a distribuição dos grupos D-galactose ao longo da cadeia principal , que tem efeito fundamental nas propriedades das galactomananas, não só na sua solubilidade em água como também na sua capacidade de interação intramolecular e susceptibilidade à degradação enzimática [DEA e MORRISON,1975; DEA

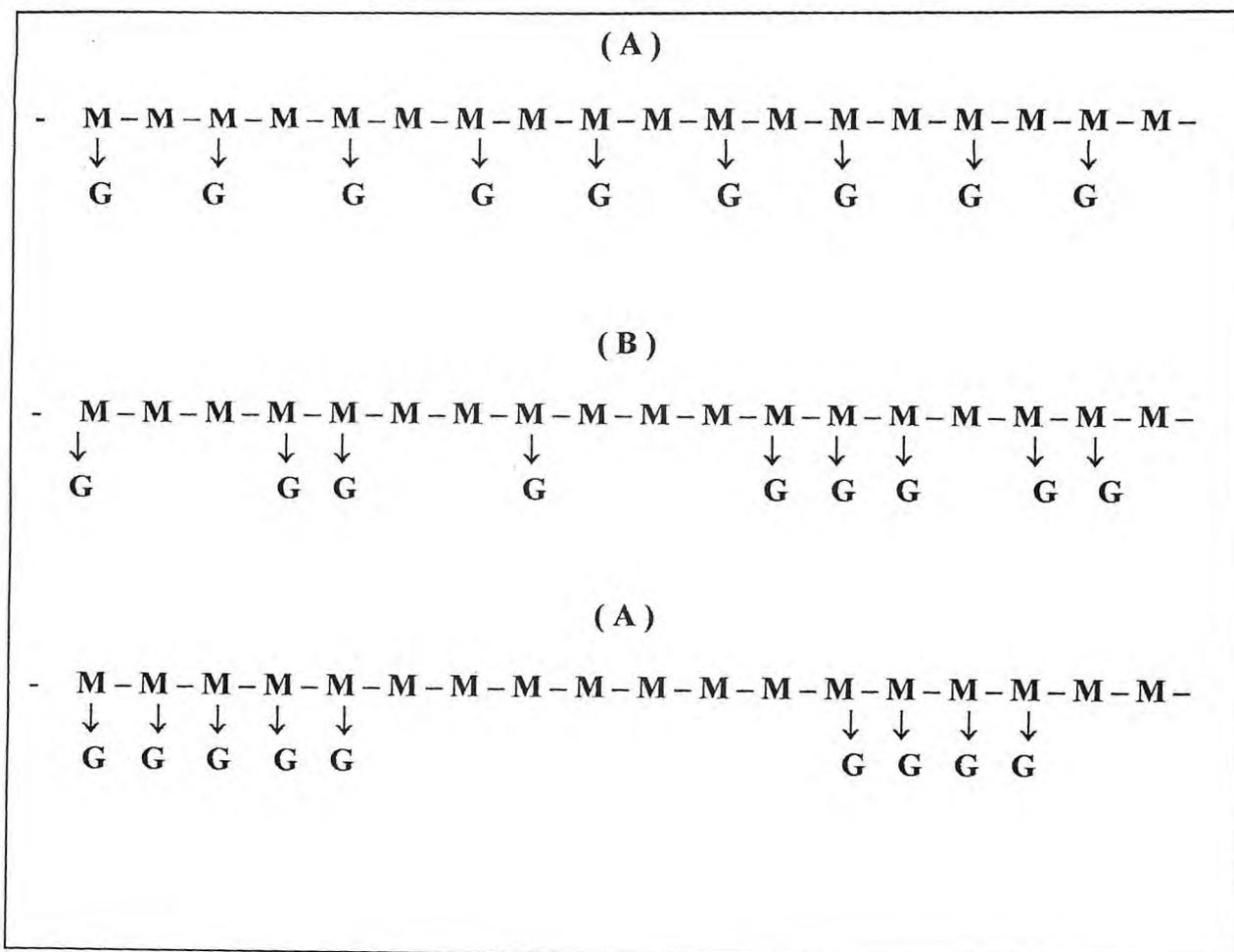
e Colaboradores,1986; DEA e Colaboradores , 1972 ;Ver figura 3.8 , pag. 39] .

3.5. Revisão de métodos de extração de galactomananas de várias matérias primas.

Investigação da estrutura de galactomananas obtidas de sementes de outras plantas leguminosas mostraram que uma cadeia principal de D-manana ligada β -D-(1 \rightarrow 4) com uma cadeia lateral de D-galactose ligada α -D-(1 \rightarrow 6) é uma regra geral, e que o teor de galactomanana nas várias sementes pode variar de 3 a 60 % e a relação galactose : manose varia de 1:1,1 até 1:5 , conforme relatado pela literatura [Para revisão geral ver : GEBERT e Colaboradores , 2000 ; BUCKERIDGE e Colaboradores , 1995 , MILLER ,1979;Para outros Leguminosas ver :ZAWADZKI-BAGGIO e Colaboradores,1992;SINGH e Colaboradores,1997;DAAS e Colaboradores, 2000 ;RAMESH e Colaboradores,2001;GARTI e Colaboradores, 1998 ; ISHRUD e Colaboradores, 2001] .

Vários métodos de extração e purificação para a produção de galactomananas obtidas de várias matérias primas são descritos pela literatura e estão detalhados no anexo I, página 296[RUTENBERG e MOLNAR,1981 ; ELVERUM , 1959 ; KEEN , 1969 ; DEWU ,1984;GEBERT e COLABORADORES,2000;SWARTZ e Colaboradores,2000;CHIU e Colaboradores , 200 ; KARSTENS e STEIN , 2002 ; YEH ,1996 ; ALCOCK, 1989 ; CHANG ,1999;GARTI e Colaboradores,1998;McCLEARY e Colaboradores , 1983].

Figura 3.8. -Possíveis estruturas da distribuição das unidades de D-galactose (G) ao longo da cadeia principal de D-manose (M)



Referências Bibliográficas

- ALCOCK, N.W., Sterechemistry of the 4-Hydroxyisoleucine from *Trigonella foenum-graecum*, *Phytochemistry*, v.28, p. 1835-1841, 1989.
- ANDERSON, D.M.W., McDOUGALL, F.J., Degradatives studies of gum-arabic (*Acacia senegal* (L.) Willd.) with special reference to the fate of the amino-acids present, *Food Addit. Contam.*, v.4, p 247-255, 1987.
- ASPINALL, G.O., Isolation and fracionation of polysaccharides, *The Polysaccharides*, v.1, Academic Press, New York, p. 19-26, 1973.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M., Seeds germiton structure, and composition. In: *Seeds: physiology of development and germination*, New York. *Pleming Press*, p. 1-27., 1986.
- BUCKERIDGE, M. S., PANEGASSI, V. R., ROCHA, D. C., DIETRICH, S. M. C. Seed galactomannam in the classification ond evolution of *Leguminosae*. *Phytochemistry*, v 38(4), p. 871-875, 1995.
- BUCKERIDGE, M.S., DIETRICH, S.M.C. Galactomannan from Brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 13, p. 109-112, 1990.
- CHANG, P., USP 5,997,877, (1999).

CHIU, C.W., HENLEY, M.J., ZALLIE, J.P., JEFFCOART, R., USP 6,299,924 (2001).

CHURMS, S. C., STEPHEN, A. M. , STEYN, C. B., Analytical comparison of gum from *Acacia hebeclada* and other gummiferae species, *Phytochemistry* v. 25 , p.2807-2809 ,1986.

DAAS, P.J.H., SCHOLS, H., JONGH, H.H.J., On the galactosyl distribution of commercial galactomannans, *Carbohydrate Research*, v. 329 , p. 609-619 , 2000 .

DEA, I. C. , MORRISON, A. Chemistry and interations of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, San Diego, v. 31, p. 241-312, 1975

DEA, I. C. M., MacKINNON, A. A. , REES, D., Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide sytems winth model cohesion: reversible changes in conformation and association of agarose, carreegeenan and galactomannans. *J. Mol. Biol.*, London, v. 68, p. 153-172, 1972.

DEWU, S.R., USP 4,659,811 ,1984 .

DEY, P. M., Biochemistry of plant galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* , v. 35, p. 341-376, 1978.

ELVERUM, G.W., USP 2,891,050, 1959 .

GANTER, J. L. M. S., HEYRAUD, A., PETKOWICZ, C. L. , RINAUDO, M. , REICHER, F., Galactomannans from Brazilian seeds:

characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 17 n.º 1, p. 13-19, 1995.

GANTER, J. L. M. S., MILAS, M., CORRÊA, J. B. C., REICHER, F. , RINAUDO, M., Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. *Carbohydr. Polym.*, Barking., v. 17, p. 171-175.1992.

GARTI, N., ASERIM, A., MADAR, Z., STERNHEIM, B., USP 5,847,109 ,1998 .

GEBERT, M.S., FRIEND, D.R., WONG, D., PARASRAPURIA, J., USP. 6,063,402 , 2000.

GORIN, P. A. J. , BARRETO-BERGTER, E., The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: ASPINAL, G. O, The Polisaccharides. *New York: Academic Press*, v. 2 , p. 366-409, 1983.

GUHRA, S. G. , SINGH, L., Structural studies of D-galacto-Dmannon from the seeds of *Parkinsonia aculeata* linn.. *carbohydr res.* v. 182, p. 144-149, 1988.

HEARN, V. M., GRIFFTHS, B. L. , GORIN, P. A., Structural analisis of water-soluble fractions obtained from *Aspergillus fumigatus* mycelium. *Glicoconj. J.*, v. 6 (1), p. 85-100, 1989.

IKUTA, K., SHIBATA, N., KANEHIKO, H., KOBAYASHI, H., SUZIKI, S. , OKAWA, Y., N.m.r. assignment of the galactomannan of *Candida lipolytica*. *FEBS Lett.* v. 414(2), p- 338-342, 1997.

- ISHRUD, O., ZAHID, M., ZHOO, H., PAN, Y., A water soluble galactomannan from the seeds of *Phoenix dactylifera* L., *Carbohydrate Research*, v 335 , p. 397-301 , 2001.
- KARSTENS, T., STEIN, A., USP 6,348,590 , 2002 .
- KEEN, J.L., USP 3,455,899 , 1969 .
- KENNEDY, J. F. , WHITE, C. A., em *Carbohydr. Chemistry*, Clarendn Press Oxford, New York, 1988.
- KIHO, T., ITAHASHI, S., SAKUSHIMA, M., USUI, S., UKAI, S., MORI, H., SAKAMOTO, H. , ISHIGURO, Y., Polysaccharides in fungi. XXXVIII. Anti-diabetic activity and structural feature of a galactomannan elaborated by *Pestalotiopsis* species. *Bio. Pharm. Bull* v. 20 (2), p. 118-121, 1997.
- MANTELL, C. L. The Water – Soluble Gums, *Reinhold Publishing Corporaton*, 1947
- MILLER , L. P. , *Phytochemistry - The process and products of photosynthesis* , Van Nostrand Reinhold Company ,New York , volume I , 1979 .
- McCLEARY, B.V., NURTHEN, E., TARAVEL, F.R., JOSELOU, J.P., Characterization of the oligosaccharides produced on hydrolysis of galactomannan with β -D-mannase, *Carbohydrate Research*, v. 111 , p. 91-109 , 1983.
- NADELMANN, H. Uber die Schleimendospermeder Leguminosen. *Pringsheims Jahrb. Wiss.Bot.*, 21:1-83, 1890.

- PAULA, R. C. M. Characterisation of Brazilian Tree Exudate Gums from *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* B. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Química da Universidade de Manchester, 169 pp., Oxford Road, 1995.
- PAULA, R. C. M., *Goma do Anacardium occidentale L.: Isolamento, caracterização e estudo reológico*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, 138 pp., Fortaleza, 1990.
- PETKOWICZ, C.L.O., F. REICHER, F., K. MAZEAU, K. Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains, *Carbohydr. Polym.* v. 37, p.25-39, 1998
- PHARMACIA, Biothec *Gel Filtration, Theory and Practic Pharmacia* - LKB Biotechnology, Upssala, Sweden, 1993.
- RAMESH, H. P., THANARATHAN, R. N.. Water extracted olysaccharides of selected cereals and infuence of temperature on the extractability of polysaccharides in sorghum. *Food Chemistry*, v. 64, p. 345-350, 1999.
- RAMESH, H.P., YAMAKI, K., ONO, H., TSHUSHIDA, T., Two-dimesional NMR spectroscopic studies of fenegreek (*Trigonella foenum-graezum* L.) galactomannan without chemical fragmentation, *Carbohydrata Polymers* . v. 45, p. 69-77, 2001.
- REICHER, F, LEITNER, S. C. S., SIERAKOWSKI, M. R., FONTANA, J. D., CORRÊA, J. B. C., Properties of seed gum of *Stryphnodendron barbatiman*. *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 28/29, p. 353-361, 1991.

- REICHER, F, LEITNER, S. C. S., SIERAKOWSKI, M. R., FONTANA, J. D., CORRÊA, J. B. C., Seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* . *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 34/35, p. 349-357, 1992.
- REID, J.S.G. , BEWLEY, J.D. A dual rôle for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), na endospermic leguminous seed. *Planta*, v. 147 , p. 145-150, 1979.
- REID, J.S.G. , MEIER, H. Chemotaxonomic aspects of the reserve galactomannan in leguminous seeds. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v. 62 , p. 89-92, 1970.
- RUTENBERG, M.W., NOLMAR, T.R., USP 4,269,975 , 1981 .
- SINGH, V., MISHRA, U.C., KHARE, G.C., GUPTA, P.C., A neutral seedgum from *Abutilon indicum*, *Carbohydrates Polymers*. v. 33 , p. 203-205 , 1997 .
- STEPHEN, A.M.; CHURMS, S.C. . *Food Polysaccharides and their Applications*. New York : Marcel Dekker. Inc., 1995.p.1-17.
- SWARTZ, W.E., HUPPE, C.A., ELFSTRUM, J.T., USP 6,048,563 , 2000 .
- TEIXEIRA, A. Z., IACOMINI, M., McCUNE, B. & GORIN, P. A., Heteropolysaccharides of the lichen *Evernia prunastri*. *Carbohydr. Res* v. 264 (1), p. 63-41, 1994.

URAU, A M. , CHOY, Y. M., Identification of linkages of galatomannan isolated from seed of *Caesalpinia pulcherrima*. *Carbohydr. Res.* , Amsterdam, v.14, p. 151-158, 1970.

WHISTLER, R. L. "*Industrial Gums.*" Academic Press, New York and London. 1959 .

WHISTLER, R. L. , BEMILLER, J. N. *Polysaccharides and Their Derivatives. In: Industrial Gums.* New York: Academic Press, 3^a ed., 619 p, 1993.

YEH, M.H., USP 5,489,674 , 1996 .

ZAWADZKI-BAGGIO, S., SIERAKOWSKI, M.R., CORREA, J.B.C., REICHER, F., A linear (1 → 5)-linked α -L-arabinofuranan from the seeds of guapuruvu (*Schilozobium parahybum*), *Carbohydrate Research*, v.233 , p. 265-269 , 1992 .

Capítulo 4

Flavonóides

4.1	Introdução	47
4.2	Propriedades antioxidantes dos flavonóides	51
4.3.	Principais Flavonóides relatados neste trabalho e sua utilização	56
4.3.1	Rutina	56
4.3.2	Citroflavonóides	59

4.1.Introdução.

Os flavonóides (Figura 4.1,pag 49) são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos naturais ,sendo amplamente distribuídos no reino vegetal. Quase ausentes em algas, alguns representantes foram identificados com briófitas, existindo somente um relato de ocorrência em fungos.Em pteridófitas também foram encontrados, mas sua variabilidade estrutural é pequena.Todavia,estão presentes em abundância nas angiospermas,apresentando então enorme diversidade estrutural [SIMÕES,1999] .

O termo "fenolico" ou "polifenol" pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais(ésteres, metoxila,glicosídeos e outros).Entretanto, uma definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, uma vez que existem compostos contendo hidroxilas fenólicas, fazendo parte de outras classes metabólica.Dessa forma, é mais conveniente empregar-se uma definição que leva em conta também a origem biogenética.

Uma representação esquemática da biossíntese de flavonóides está representada na figura 4.1,pag.49. Nos flavonóides, os nomes triviais são empregados freqüentemente e possuem, na grande maioria dos casos, relação com a planta na qual foram identificadas pela primeira vez. Por exemplo: tricina foi isolada de *Triticum sp.*, robinetina *Robinia sp.*, vitexina de *Vitex sp.*, e Quercetina *quercus sp.* O grande número de nomes triviais e suas diversidade podem causar uma certa confusão para os estudantes, ainda não familiarizados com este tipo de nomenclatura.

Podem-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B, e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para o núcleo A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para os núcleos B (FIGURA 2). Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonóides por 8a e 4a, respectivamente. As chalconas, excepcionalmente, possuem uma numeração diferente, como apresentado no item correspondente a seguir.

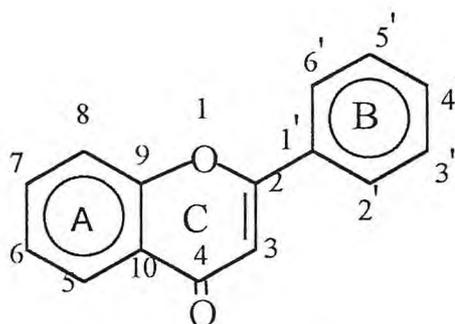


Figura 4.1. Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração .

Os flavonóides podem estar presentes em todas as partes da planta (raiz, caule, casca, folhas, flores, frutos) e ocorrem tanto livres como em ligação glicosídica [SWAIN, 1976; JAY, 1975]. Neste caso, os açúcares mais comumente encontrados são L-ramnose, D-glicose e arabinose [HAVSTEEN, 1983].

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas podemos citar: (a) proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioletas e visível além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; (b) atraentes de animais com finalidade de polinização; (c)

antioxidantes;(d) controle de hormônios vegetais;(e) agentes de alelopáticos: e (f) inibição de enzimas.

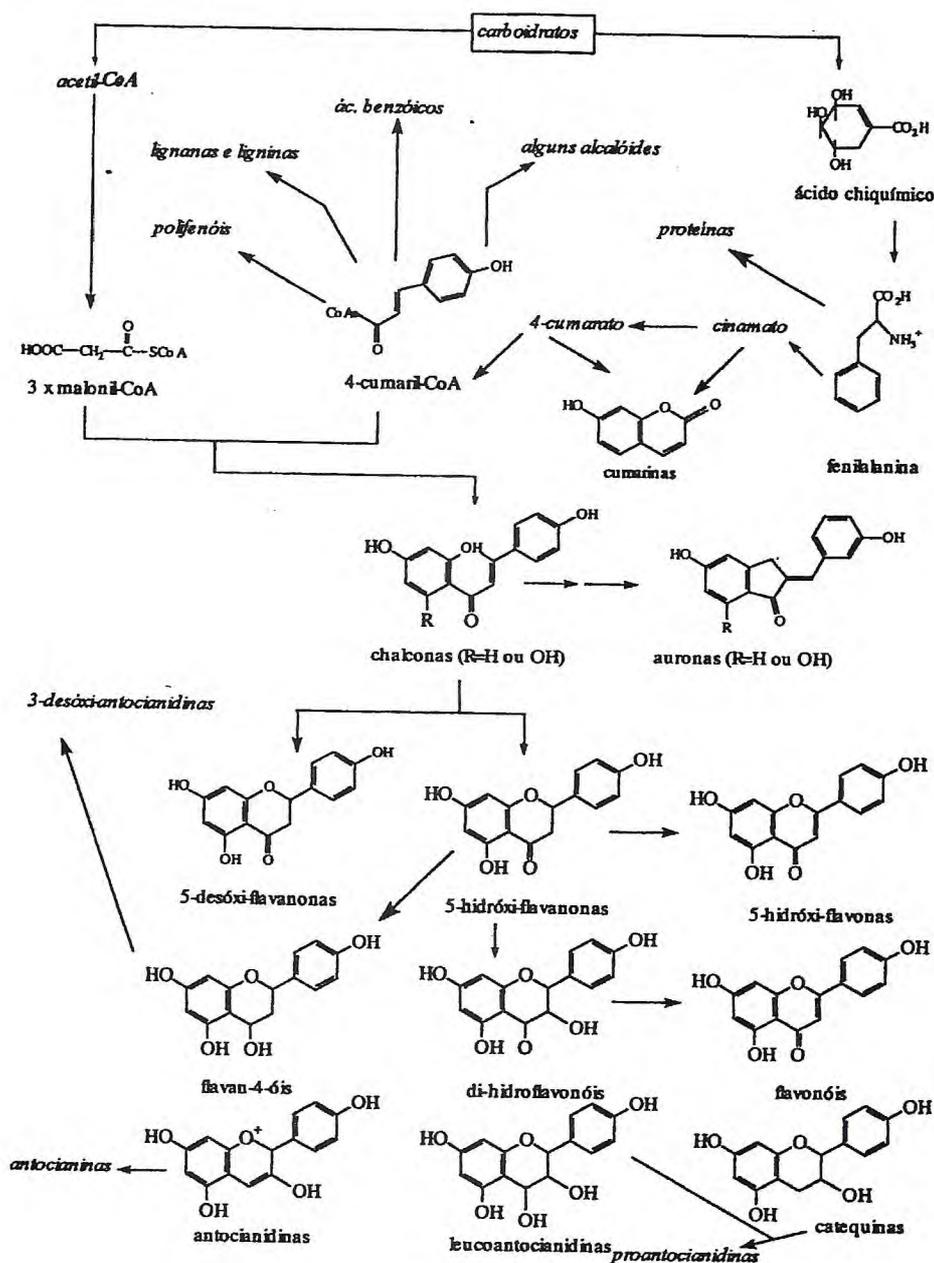
Há séculos que preparações contendo flavonóides são utilizadas por vários povos, em continentes diferentes, no tratamento de diversas disfunções. Entretanto, só muito recentemente o estudo desta classe de substâncias conseguiu despertar um real interesse entre bioquímicos e farmacólogos.

A alta reatividade química dos flavonóides se manifesta na afinidade por enzimas , metais pesados, capacidade de interferir no transporte de elétrons e captação de radicais[HAVSTEEN , 1983] .

O interesse econômico dos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades, como, por exemplo, as cores que esses pigmentos possuem, na sua importância no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá da Índia, na manufatura do cacau e suas contribuições e nutrição e sabor dos alimentos. Além disso, muitos destes compostos possuem também importância farmacológica diversificada [CODY e COLABORADORES,1986; HARBONE e MABRY, 1975;HARBONE e COLABORADORES,1982;MIDDLETON e Colaboradores 2000;RICE- EVANS e PACKER ,1998] e são relatadas desde atividade antimicrobiana [MIDDLETON e Colaboradores 2000;RICE-EVANS e PACKER,1998; HAVSTENN, 1983;WAAG e HEDIN,1984;MITSCHER e Colaboradores,1983],à atividade citotóxica[MIDDLETON e Colaboradores 2000;RICE-EVANS,1998; ROSLER e COLABORADORES,1984;FARKAS,1980].

Devido ao grande número de flavonóides existentes, serão apresentados na Figura 4.2,pag. 51 alguns representantes agrupados em classes de acordo com suas características químicas e biossintéticas

Figura 4.2. Representação esquemática simplificada da biossíntese dos flavonóides



4.2. Propriedades antioxidantes dos flavonóides

As uvas escuras produzem um vinho rico em antocianidinas, proantocianidinas e outros flavonóides, que são substâncias antioxidantes.

Estes compostos fenólicos são encontrados no vinho tinto e menos freqüentemente no vinho branco ou rosê. Em estudo apresentado em 1995 por Fuhrman e Aviram, 17 homens com idade de 24-45 anos, tomaram ambos os vinhos branco e tinto diariamente em suas refeições por duas semanas. Quando as amostras de sangue foram retiradas ao fim do período e testadas para sua capacidade de resistência a danos por radicais livres, as amostras de plasma daquelas pessoas que tomaram vinho tinto tinham probabilidade 20% menor de sofrer oxidação. Estudos também mostram menor incidência de doenças cardiovasculares entre os que o consomem diariamente e de forma moderada [St. LEGER, 1992; GROENBAEK, 1995; CRIQUET e RINGEL, 1994; RIMM, 1996; FUHRMAN e AVIRAM, 1995; HERTOOG e COLABORADORES, 1992; KNEXT, 1996]. A partir daí foi também descoberto que os compostos fenólicos encontrados no vinho tinto diminuem o nível de agregação plaquetária, tornando o sangue menos viscoso, reduzindo o nível de oxidação do colesterol LDL, enquanto aumenta o do colesterol HDL (bom colesterol), além de relaxar as paredes dos vasos sanguíneos. Estes benefícios aparecem a despeito dos efeitos pró-oxidantes do álcool. Os compostos fenólicos encontrados nas cascas e nas sementes das uvas também tem propriedades antioxidantes .

Ao mencionar antioxidantes e substâncias anti radicais livres nós pensamos imediatamente nas vitaminas C, E, e beta carotenos. Alguns irão se lembrar de certos minerais, mais notadamente zinco e selênio, que são importantes pela sua ação com antioxidantes e/ou como componentes de enzimas antioxidantes que são produzidas pelo organismo. Outros, da coenzima Q10 que é uma substância importante para o funcionamento das mitocôndrias (respiração celular), e certas vitaminas tais como a vitamina A (Ácido retinóico) que fornecem uma proteção antioxidante limitada . Contudo apenas alguns conhecem os benefícios das "vitaminas P" (como

eram designados os flavonóides) ou compreendem o real benefício dos bioflavonóides e antioxidantes e protetores de tecidos.

Brucker e Szent-Gyorgyi em 1936[KANDASWAMI,1998] observaram que uma mistura complexa de flavonóides a qual eles chamaram de "Citrin" foi isolada dos limões(contendo hesperidina e eriodictol glicosídeos,ver figura 4.2,pag. 61) possuíam atividades parecidas com as vitaminas, e que estes extratos brutos de suco de limão eram mais efetivos na cura do escorbuto em "Porquinhos da India" que a vitamina C. Bensath e colaboradores em 1937[KANDASWAMI,1998] classificaram os flavonóides(citrina) como vitaminas (vitamina P), os quais possuíam a propriedade de diminuir a fragilidade capilar e reduzir os sinais de hipovitaminose C em animais. Estes sintomas que não respondiam ao tratamento com a vitamina C pura eram erradicados com suco de limão e com os extratos de pimenta vermelha da Hungria. Eles concluíram também que a vitamina P(como eram designados os flavonóides) requeria para sua atividade a presença de traços de vitamina C.

O conceito de vitamina P foi sendo modificado de uma noção de nutriente para um conceito farmacológico. Na França investigadores tem considerado os flavonóides como o segundo fator anti-escorbuto (C₂). Eles classificam as catequinas(derivados dos flavan-3-ol) e os OPC (proantocianidinas oligoméricas) como sendo um fator C₂ ou uma vitamina P [MASQUELIER e Colaboradores,1979;RENAULT,1988]. Muitos flavonóides possuem potenciais REDOX que são próximos aos da vitamina C(Ver tabela 4.1,pag 55).

Portanto os flavonóides e compostos a eles relacionados podem preencher os requisitos para a vitamina P, fazendo uma função complementar a da vitamina C devido o seu potencial efeito biológico.

Os flavonóides são antioxidantes doadores de hidrogênio em virtude das propriedades redutoras dos vários grupos hidroxilas ligados ao anel aromático, além de sua capacidade de deslocalizar o radical antioxidante dentro da molécula. As propriedades doadoras de elétron/hidrogênio dos flavonóides tem sido a base de sua ação antioxidante.

A compreensão de suas propriedades captadoras de radicais livres é melhor compreendida através da relação estrutura/ atividade antioxidante. A facilidade dos flavonóides de agirem como antioxidantes pela doação de elétrons dependem diretamente do seu potencial de redução dos seus radicais e inversamente da reatividade dos flavonóides ao oxigênio, com a geração de radical peroxila pode propagar reações oxidativas [JOVANOVIC e COLABORADORES,1998].Uma faixa de potenciais de redução de radicais de flavonóides é mostrada na TABELA 4.1, pag. 55 e é relativa aos potenciais de redução do ácido ascórbico e α -tocoferol.

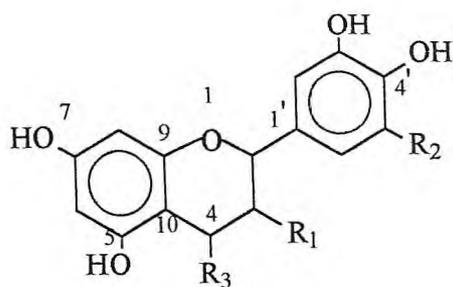
Radicais livres podem ser capturados de muitas diferentes maneiras, o mais simples procedimento para um antioxidante é ele mesmo doar um elétron e então formar uma molécula estável. Antioxidantes são por definição substâncias as quais são facilmente oxidadas. Os antioxidantes mais usados são aqueles os quais quando oxidados se tornam substâncias inofensivas e são excretadas ou tem alguma ação benéfica sobre o organismo ou ambos.

Baseados nestas observações em 1991, o comitê de implementação de guias de dietas da Academia Nacional de Ciências dos EUA adotaram um novo guia de dietas enfatizando a necessidade do aumento do consumo de frutas e vegetais , onde é enfatizada principalmente as propriedades antioxidantes, em particular os benefícios da vitamina C,E,betacaroteno e outros carotenóides.

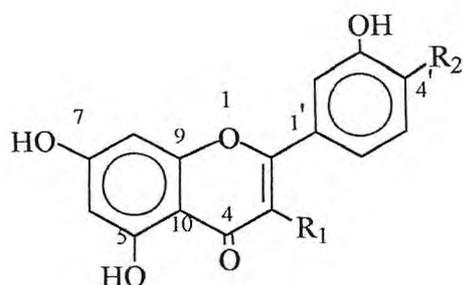
Os flavonóides poderam então ser adicionadas à lista de substâncias que promovem a saúde e de substâncias “anti-aging” que combatem os sinais de envelhecimento. Hoje, existe suporte suficiente dentro da Comunidade de Pesquisa Biomédica para que a teoria do estresse oxidativo seja responsável pelo envelhecimento e por várias doenças.

Tabela 4.1. POTENCIAIS DE REDUÇÃO DE RADICAIS DE FLAVONÓIDES-RELATIVOS À VTAMINA C.

Flavonóide	Potencial de Redução
QUERCETINA	0,33
EPIGALOCATEQUINA GALATO	0,43
EPIGALOCATEQUINA	0,42
TAXIFOLIN	0,5
CATEQUINA	0,57
LUTEOLINA	0,6
RUTINA	0,6
KAEMPFEROL	0,75



	R ₁	R ₂	R ₃
Epigalocatequina	OH	OH	H
Epigalocatequina galato		OH	H
Taxifolin	OH	H	OH
Catequina	OH	H	H



	R ₁	R ₂
Luteolina	H	OH
Quercetina	OH	OH
Rutina	Rutosideo	OH
Kaempferol	OH	H

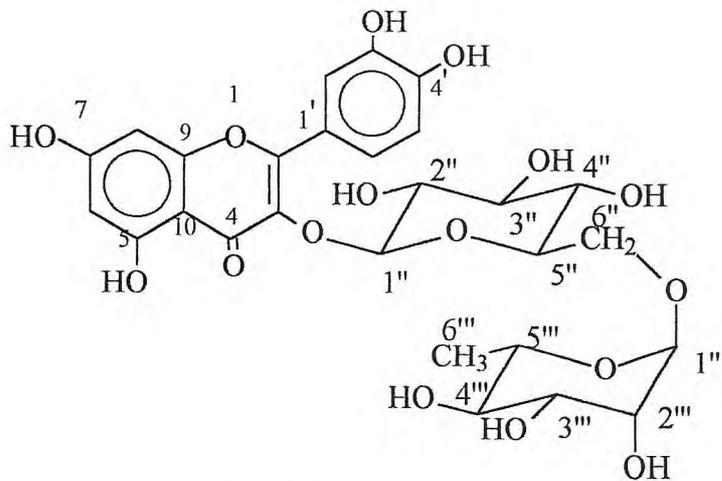
4.3. PRINCIPAIS FLAVONÓIDES RELATADOS NESTE TRABALHO E SUA UTILIZAÇÃO

4.3.1. RUTINA E SEUS DERIVADOS:

A rutina é individualmente o mais comum de todos os glicosidéos da Quercetina e provavelmente ocorre acima de 25% em qualquer flora [HARBONE, 1976].

Ele é encontrado em muitas plantas principalmente no trigo sarraceno *Fagopyrum esculentum* Moench., (Polygonaceae) acima de 3% [THE MERCK INDEX,1976], nas folhas de tabaco, *Nicotina tabacum* L., Solonaceae [THE MERCK INDEX,1976], nos botões florais da *Sophora japonica* L.(leguminosae) entre 15-20%[KHALIFA e Colaboradores,1983]. Nas folhas do eucalipto,*Eucalyptus macrorryncha* F. Muell. que contém acima de 10%[UNDERHILL e COLABORADORES,1957].

No Brasil a extração de rutina destinada à industria farmacêutica é feita a partir dos frutos em estado de prematuração de *Dimorphandra mollis* e *Dimorphandra gardneriana*, estes frutos com baixos teores de mucilagem facilitam o processo de extração e purificação (ver especificações na tabela 4.2 , pag. 57) . O teor da rutina nas favas é 6 a 8% [TOMASSINI e MORS, 1966].



Rutina

Tabela 4.2. - RUTINA – ESPECIFICAÇÕES EXIGIDAS PARA O INSUMO FARMACÊUTICO.

Teste	Especificação
Identificação: Espectro IV, VV	-
Solução 2% (p/v) em amônia 6M	Clara
Solução 2% (p/v) em metanol	Clara
Metais pesados	0,001% max.
Ferro	0,001% max.
Clorofila e pigmentos vermelhos	0,004% max.
Perda por dessecação 130°C	5,5-9,0%
Cinzas sulfatadas	0,5% max.
Doseamento / hidróxido de tetrabutyl amônio	98,0-102,0%
Impurezas (CCD)	5,0% max.
Quercetina (CCD)	0,1% max.

Experiências em animais comprovam a ação da rutina sobre a permeabilidade capilar, pela inibição da formação de edemas e de hemorragias induzidas. Possivelmente, essa ação deve-se à propriedade da rutina de inibir a enzima hialuronidase. Esta substância também está relacionada como o metabolismo do cálcio, atribuindo-se à sua aglicona, a *Quercetina* o papel de catalisador. Esta ação deve ser devido a ação antiácida da Rutina sobre a adrenalina, assim resultando em ligeiro aumento em seu nível e aumentando a toxicidade dos esfíncteres pré-capilares e diminuindo o número total de capilares verdadeiros circulando no sangue [AMBOSE, 1949; AMBOSE, 1947]. Outra propriedade da Rutina é a proteção contra choque histamínico em um caminho indireto embora não seja um antihistaminico verdadeiro [WILSON, 1948 e 1947].

Em concordância com os resultados obtidos em animais, no homem também foi comprovado o efeito profilático e curativo da rutina nas patologias acompanhadas de fragilidade capilar e aumento da permeabilidade da membrana celular [MERCK, 1970].

Os principais derivados de rutina utilizados comercialmente possuem o mesmo mecanismo de ação da rutina e mesma indicação terapêutica, modificando-se a estrutura para melhorar sua biodisponibilidade e aumentar a sua absorção pelo organismo (Tabela 4.3, pag. 60) .

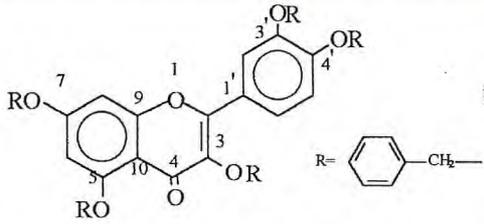
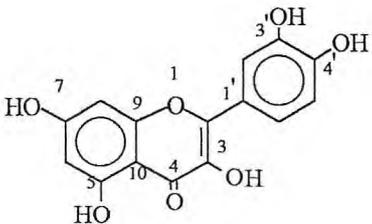
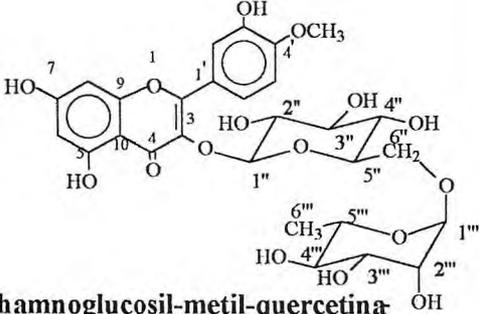
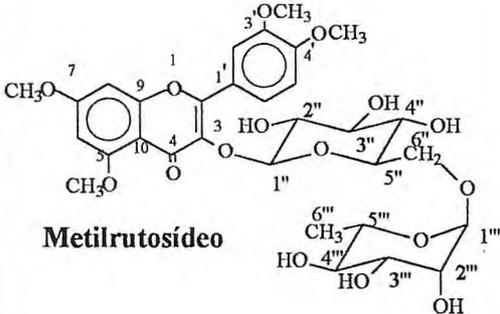
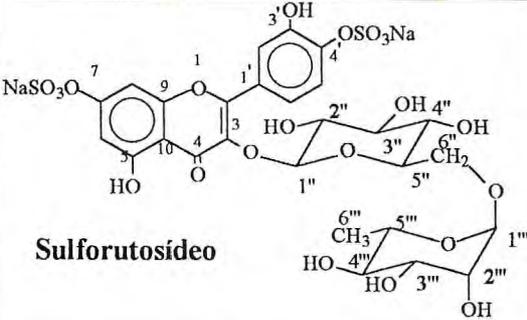
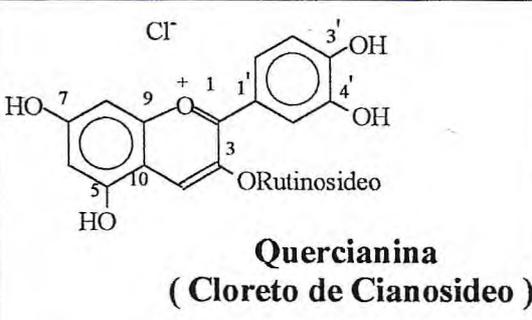
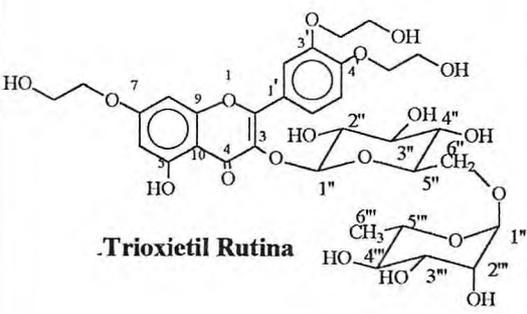
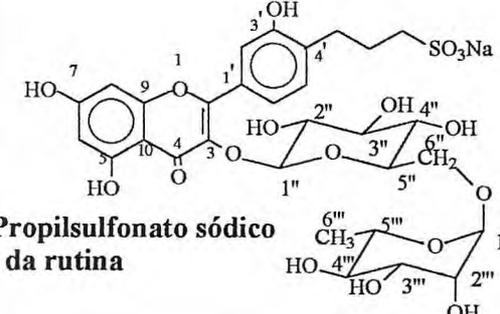
4.3.2. CITROFLAVONÓIDES

Os cítricos (*Rutaceas*) são árvores de origem oriental, dos quais numerosas espécies, e suas variedades e híbridos, são cultivados pelo seus frutos com endocarpo comestível. Muito utilizado pelo teor de vitamina C em seus sucos, por possuírem óleos essenciais em suas cascas e também como fonte de flavonóides abundantes no seu pericarpo. Estes flavonóides são principalmente flavanonas:hesperidina, (hesperitina 7-rutosideo;Extraída das cascas da laranja[ARTHUR, 1956].), naringina (Extraída das cascas da tangerina [KRATKY e TANDY,1991]), nariginina, hesperitina, eridictol diosmina, diosmetina. O eriodictiol ocorre nos limões e a neohesperidina é isolada a partir das limas[WILSON, 1947 e 1955;HIGBY,1947](Ver figura 4.2,pag.61). Estes flavonóides são comercializados conforme seu teor de hesperidina (ver tabelas 4.4 e 4.5, pag. 62) .

A hesperidina é um produto pouco solúvel e é usada principalmente para obtenção de derivados mais solúveis como mostrado na figura 4.2 , pag. 61 [SCHMIDT e COLABORADORES, 1978] .

Os citroflavonoides, são subprodutos da indústria de sucos de frutas, e se extraem dos pericarpos e das polpas em forma de derivados de cálcio ou magnésio. Frequentemente se utiliza os flavonóides totais em associação com outros protetores vasculares ou com a vitamina C.

Tabela 4.3. – Principais derivados da Rutina (Denominação comercial [BIAM, 2003]

ESTRUTURAS	ESTRUTURAS
 <p>Benzquercetina (3,3', 4',5,7-Pentakis (benziloxi) flavona)</p>	 <p>Quercetina</p>
 <p>Rhamnoglucosil-metil-quercetina</p>	 <p>Metilrutosídeo</p>
 <p>Sulforutósídeo</p>	 <p>Quercianina (Cloreto de Cianosídeo)</p>
 <p>Trioxietil Rutina</p>	 <p>Propilsulfonato sódico da rutina</p>

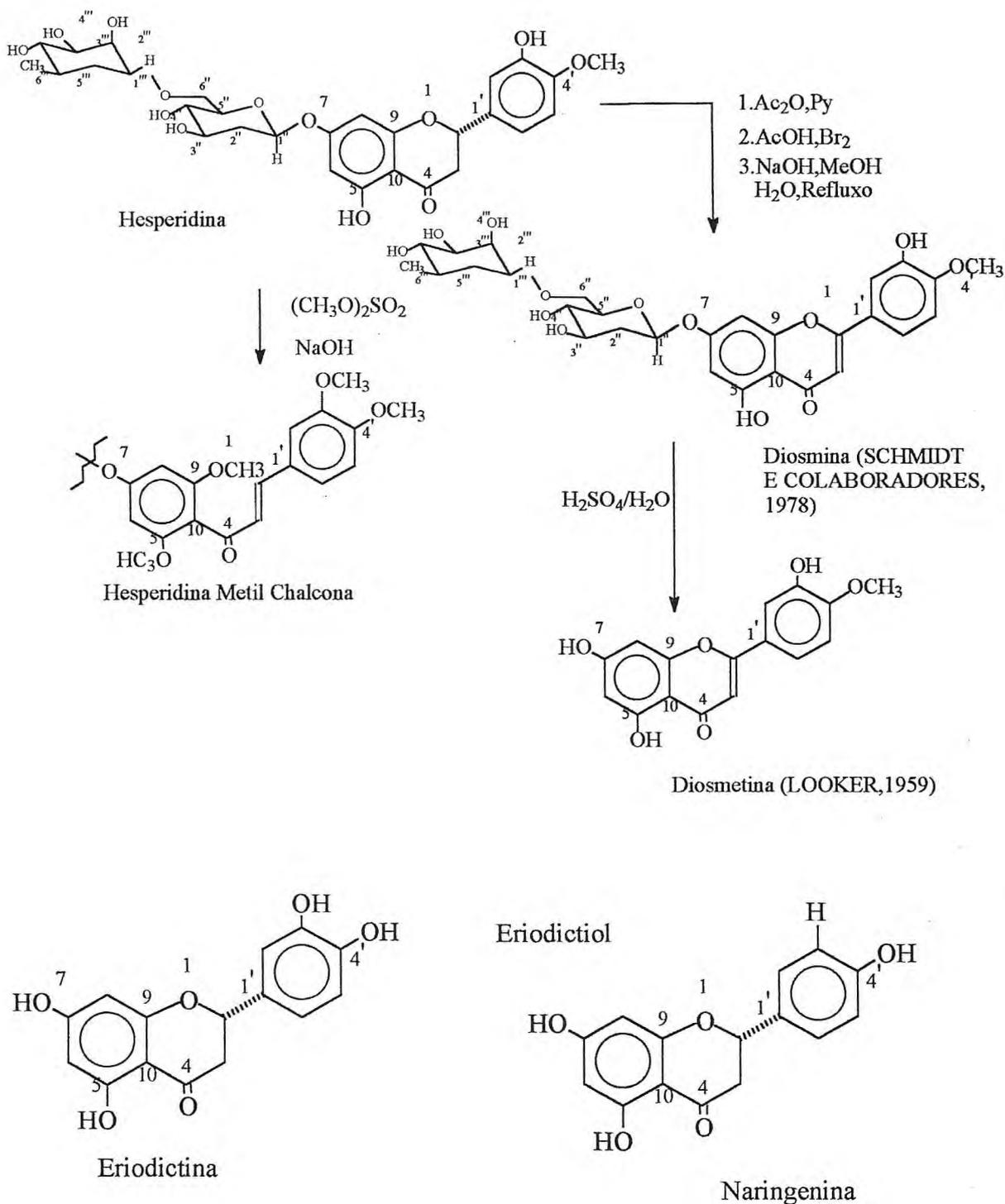


Figura 4.3 Esquema de transformação e estruturas dos principais citroflavonóides .

Tabela 4.4- Especificações para Hesperidina

Teste	Especificação
Cor	Amarela clara
Odor	Inodoro
Solubilidade	Solúvel em formamida e piridina
Aspecto	Pó cristalino
Perda por dessecação	54,0% max.
Identificação	UV
Aparência da solução	Clara
Cinzas sulfatadas	0,2% max.
Doseamento (TBAH)	97% (min.)
Substancias análogas (TLC)	Conforme prescrito

Tabela 4.5 - Especificações para citroflavonóides

Teste	Especificação
Bioflavonóides totais	95 – 98%
Hesperidina	85 - 95%
Metais pesados	0,001%
Rutina	0,8% max.
Outras impurezas	2 – 4 %

Referências Bibliográficas

AMBROSE, A.M., Further observations on the effect of rutin and related compounds on cutaneous capillaries , *J. Pharmacol.*, v. 90, p. 359-636, 1947.

AMBOSE, A.M., Effect of rutin on permeability of cutaneous capillaries , *J. Pharmacol.*, v. 97, p. 115-119, 1949.

ARTHUR, H.R., HUI, W.H., MA, G.N., An examination of the Rutaceae of Hong-Kong I : Flavonoids glycosides from *Zanthoxylum* species and the occurrence of optically active hesperitin , *J. Chem. Soc.* 632-635, 1956

BIAM, Banque de Données Automatisée sur les Médicaments, Jul. 2003.
Disponível em < <http://www.biam2.org/> > acessado em Jul. , 2003 .

CODY E COLABORADORES, Plant Flavonoids in Biology and Medicine II : Biochemical , Pharmacological and Structure-Activity Relationships, *Prog. In Clin. Biol. Res.* , v. 213 , 1986 .

CRIQUE, M.H., RINGEL, B.L., Does diet or alcohol explain the french paradox , *Lancet*, v.334 , p. 1719-1723, 1994 .

FARKAS, L., Active principles of plants of traditional medicine as model of new drugs , *Journal of Ethnopharmacology.*, v. 2 , p.145-148 , 1980 .

FUHRMAN, B.A., AVIRAM ,M., Consumption of red wine with meals reduces the suscetibility of human plasma and low-density-lipoprotein to lipid-peroxidation , *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 61 , p. 549-549 , 1995 .

GROENBAEK, M. , Mortality asociated with moderate intakes of wine, beer or spirits , *Brit. Med. J.* v. 310 , p. 1165-1169 , 1995 .

HARBONE, J.B., *The Flavonids*, Academic Press, New York , 1975 .

HARBONE, J.B., MARBY, T.J., *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall , London , 1982 .

HARBONE, J.B., *Phytochemical Methods* Chapman and Hall, London, 1976.

HAVSTEEN, B.,Flavonoids a class of natural-product of high pharmacological potency , *Biochemical pharmacology* , v. 32 , p. 1141-1148 , 1983.

HERTOG, M.G.L., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B., Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, v. 40, p. 2379-2383, 1992.

HIGBY, R. H., USP 2,421,061, 1947

JAY.M., Qualitative analysis of flavone aglycones using chemotaxonomic optical instrument , *Phytochemistry* , v.14 , p.1605-1612 , 1975.

JOVANOVIC, S., STEENKEN, S., SIMIC, M., E HARA, Y., Antioxidant properties of Flavonoids: Reducion Potencials and Eletron Tranfer

Reactions of Flavonoids Radical. *In Flavonoids in Health and Disease* p 137-161, MERCEL DEKKER. New York 1998.

KHALIFA , T. I., MUHTADI ,F. J. , HASSAN , M.M.A., *Analytical profiles of drug substances* ,Klaus Florey Editors , v.12, p. 624-681 ,1983.

KANDASWAMI , C. , *The health benefits of grapeseed* , Keats publishing,Inc. 1998.

KNEXT, P., *Flavonoid intake and coronary mortality in Finland : a cohort study*, *Brit. Med. J.*, v. 312 , p. 478-481 , 1996 .

KRATKY, Z., TANDY, J.S., USP 5,008,381, 1991.

LOOKER , J.H ., *Diosmetin triacetate from 3-bromhesperitin triacetate and silver acetate-acetic anhydride* , *J. Org. Chem.* , v. 24, p. 1019-1020 , 1959.

MASQUELIER, J., MICHAUD, J. ,LAPAARA, J. , *Flavonoids and pycnogenol* , *Int. J. Vit. Nutr. Res.* , v. 49 , p. 307-311 , 1979 .

MERCK , E., Darmstad, *Vitaminas*, Rutina: p.169,1970.

MIDDLETON,E.Jr., KANDASWAMI,C., THEOHARIS,C.T. , *The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease ,and cancer* , *Pharm. Rev.* , v. 52, p. 673-751,2000 .

MITSCHER, L.A., RAO ,G.S.R ,KHANNA,I. , *Anti-microbial agents from higher plants – Prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota** , *Phytochemistry*, v. 22, p.573-576 , 1983.

- RENAULT , R.C. , The nutritional incidence of flavonoids- some physiological and metabolic consideration , *Experientia* , v. 44 , p 725-733 , 1988 .
- RIMM, E.B. , Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease : the effect due beer , wine or spirits , *Brit. Med. J.*, v. 312 , p. 731-736 , 1996 .
- RICE-EVANS , C , A. , PACKER , L. ,*Flavonoids in health and disease*, Marcel Dekker , Inc. , New York , 1998 .
- ROSLER, H.A., GOODWINN,R.S., MABRY,T.J. Flavonoids with anti-cataract activity from *Brickellia glutinosa* , *J. Nat. Products*, v. 47(2), p. 316-319 , 1984.
- SCHMIDT, C., GLASBRENNER, M., HEUSSER, J., USP 4,078,137, 1978.
- SIMÕES , C . M .O ., *Farmacognosia : da planta ao medicamento*, Ed. Universidade UFRS, Florianopolis, p.489, 1999.
- St. LEGER, A.S., *et al.*, *Lancet*, v. 1, p. 1017 , 1992 .
- SWAIN, T., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, *Academic Press*, New York, p. 425-463 e 166-205 , 1976.
- THE MERCK INDEX, 9th edn. Martma Windholz, Merck Eco. Inc., Rahway, N. J., USA 1976.

TOMASSINI, E., e MORS, W. B., *Dimorphandra mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tul. , Novas e Excepcionais Fontes de Rutina , *Anais Acad. Bras. Ciênc.* v. 38 , p. 321-323, 1966.

UNDEHILL , E.W. , WATKIN , J.E. , NEISH , A.C. , Biossythesis of quercetin in Buckwheat , *Can. J. Biochem. Phys.* , v.35, p.219-228, 1957.

WAAG. S.K., HEDIN, P.A., Biologically active flavonoids from *Gossypum arborium* , *Phytochemistry*, v. 23, p.2509 , 1984.

WILSON, C.W., USP 2,425,291, 1947.

WILSON, C. W., USP 2,700,047, 1955.

WILSON , R.H. , The effect of rutin on anaphylatic and histamine shock, *Science*, v. 107, p. 369, 1948.

Capítulo 5

Fosfolípidos e Complexos

5.1	Fosfolípidos-Lecitina	69
5.2.	Complexos com Fosfolípidos	72

5. Fosfolípidos e Complexos

5.1. Fosfolípidos – Lecitina

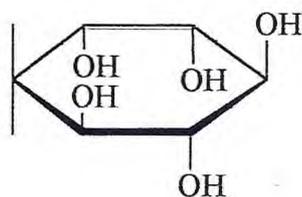
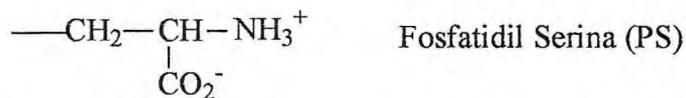
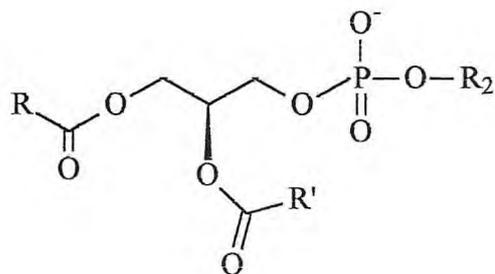
A Lecitina é uma mistura de muitos fosfatídeos (Ver figura 5.1 , pag. 70)que foram observados inicialmente na gema de ovo em 1850(*Lekitho* é o nome grego para gema de ovo) e apenas 20 anos mais tarde, seu principal constituinte foi a identificado(Fosfatidilcolina) [ULMANN'S,2000].

Em 1920 um processo que separava a lecitina do óleo de soja foi desenvolvida.A lecitina comercial é obtida hoje somente do óleo de soja devido a grande quantidade de fosfolípidos no óleo bruto (2,5 – 3,2 %) e a grande quantidade de soja processada para produção de óleo (Ver composição na Tabela 5.1 e 5.2 ,pag. 70 e 71 [WITTCOFF, 1951; DEVEL, 1961]). Geralmente, o termo lecitina é utilizado para descrever a lecitina de soja a qual é composta principalmente de fosfatídeos de soja e contém também 50% de substâncias neutras [Food Chemical Codex, 1980]. Quando produzidos comercialmente por fracionamento dos óleos vegetais brutos (soja, milho, girassol, etc.), os fosfatídeos que estão presentes na lecitina são similares exceto em suas proporções, e nos constituintes minoritários.

Tabela 5.1. – Composição da lecitina de soja.

CONSTITUINTES	TEOR %
Fosfatidilcolina	19-21
Fosfatidil etanoldiamina	8-20
Fosfatídeos de inositol	20-21
Outros fosfatídeos	5-11
Óleo de soja	33-35
Esteróis	2-5
Carboidratos livres	5
Água	1

Figura 5.1. - Estruturas dos principais constituintes da lecitina de soja (onde R e R' são ácidos graxos cuja as composições estão relacionadas na tabela 5.2,pag. 71)



Fosfatidil Inositol (PI)

Tabela 5.2. - Composição dos ácidos graxos da lecitina de soja bruta (R e R' da Figura 5.1, pag.70).

NÚMERO DE CARBONOS/LIGAÇÃO DUPLA	LECITINA COMERCIAL %
C.16:0	15
C 18:0	5
C 18:1	17
C 18:2	55
C 18:3	8

A produção atual de lecitina é baseada principalmente na soja, a qual após compressão produz o óleo bruto de soja. O óleo bruto que contém lecitina sofre então a chamada degonagem, processo no qual o óleo bruto que contém 2-3% de fosfatídeos é tratado com água. Os fosfatídeos presentes no óleo bruto são hidratados e a mistura água-óleo é então aquecida com agitação (70° por 30-60 minutos) e submetida a separação líquido-líquido utilizando uma centrífuga. A fração insolúvel em óleo obtida é então seca à vácuo em evaporador de filme (80-105°C, 3,3 – 4 Kpa) produzindo a lecitina de soja bruta [SORENSEN, 1935; BRIAN, 1976; ULMANN'S, 2000; DAVIS, 1987; ROBERTSON e Colaboradores, 1973; LIST e Colaboradores, 1978].

Embora o Food Chemical Codex classifique os vários tipos de lecitina comercial, de acordo com sua cor e viscosidade, apenas a chamada lecitina fluidizada pode ser utilizada em alimentos (Ver tabela 5.3 , pag. 72) .

Tabela 5.3. - Especificações para a Lecitina[UNITED STATES PHARMACOPEIA ,2000].

Teste	Especificação
Índice de acidez (max..)	36
Água (%max.)	1,5%
Material insolúvel em hexano(%max.)	0,3%
Arsênio (ppm max.)	3 ppm
Chumbo (%max.)	0,001%
Metais pesados (%max.)	0,004%
Material insolúvel em acetona (%min..)	50%

5.2.Complexos com fosfolipídeos .

Os bioflavonóides e os polifenóis são substâncias obtidas com muita frequência a partir de plantas e são conhecidos por possuírem uma grande quantidade de propriedades farmacológicas reconhecidas e investigadas . Alguns autores, como MIDLETON(1984) tendo observado a larga faixa de atividade dos flavonóides e sua capacidade de modular vários processos fisiológicos, formulou a hipótese de que os flavonóides seriam fatores semi-essenciais para humanos os quais diariamente se alimentam de pequenas doses de flavonóides em sua dieta normal.

Como resultado muitas aplicações terapêuticas tem sido atribuídas aos bioflavonóides e polifenóis ou a extratos de plantas que os contenham. Contudo, uma limitação severa existe e é imputada a esta classe de compostos que é a pequena absorção destes quando administrados por via oral ou aplicação tópica. A razão desta pobre absorção é devido a degradação dos fenóis por ação bacteriana e devido a formação de complexos com outras substâncias presentes no trato *gastrointestinal* e evitando assim que ele sejam absorvidos . É conhecido

o fato de que flavonóides e polifenóis apresentam certos problemas em termos de biodisponibilidade, que é geralmente baixa devido a sua tendência de reagir com outras substâncias no trato digestivo em particular com proteínas [MORAZONNI e Colaboradores,1992;CONTI e Colaboradores,1992]. Esta biodisponibilidade é crucial em princípios ativos naturais utilizados como medicamentos e esta pobre absorção pode comprometer a eficácia dos flavonóides e polifenóis. Esta pobre biodisponibilidade é em alguns casos compensada pelo aumento da dosagem e na maioria dos casos a maior parte dos bioflavonóides e polifenóis não são absorvidos mas excretados. E em alguns casos a alta concentração destes no trato intestinal pode afetar o processo digestivo ou causar algum tipo de efeito não desejado.

Os fosfolípidos que podem ser utilizados para preparação de complexos de bioflavonóides e polifenóis podem ser obtidos da lecitina de soja e possuem a fórmula descrita figura 5.1,pag. 70,onde R1 pode ser os ácidos palmítico, esteárico, oléico e linoléico ou linolênico. E R2 pode ser colina, serina e fosfatidil etanolamina.

É conhecido já algum tempo que certos grupos de constituintes de plantas como flavonóides e saponinas formam complexos estáveis com fosfolípidos.

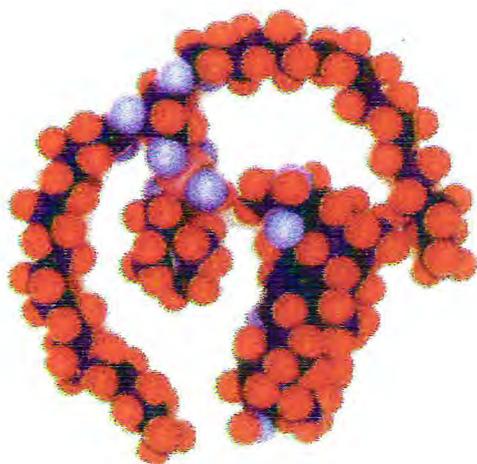
A formação de tais complexos envolve a parte polar dos fosfolípidos enquanto a cadeia de ácido graxo não está diretamente envolvida e retém um alto grau de mobilidade (Ver figura 5.2,pag. 74). O resultado deste complexo é uma nova substância com propriedades marcadamente lipofílicas comparada com o composto original que é hidrofílico. E desde que a absorção é favorecida quando o princípio ativo esta em uma forma lipofílica, estes complexos se caracterizam pela grande afinidade por lípidos e pela biodisponibilidade. Estes complexos podem prontamente atravessar as membranas das paredes do intestino. Estes complexos

aumentam a biodisponibilidade e a estabilidade de bioflavonóides e polifenóis no trato intestinal antes da absorção. Assim graças aos seus caracteres lipofílicos, são perfeitamente absorvidos através da administração oral, aumentando eficácia dos flavonóides por via oral, parenteral ou administração tópica[BOMBARDELLI e Colaboradores, 1989].

As principais vantagens destes complexos são:

- Doses menores dos princípios ativos para obtenção de resultados terapêuticos.
- Reduz o risco de efeitos colaterais indesejados.
- Ideais para tratamentos prolongados.

Figura 5.2. - Complexo entre Flavonóides e Fosfolípidos



O primeiro relato da preparação de complexos utilizando fosfolípidos foi realizado por WITZ-PEITZ em 1982, que publicou uma patente na qual ele prepara um complexo de Ácido rosmarínico (ácido 2,4-dihidroxifenil-propiónico α -[[3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-

propenil]–oxi] composto presente nos extratos de *Rosmarinus officinalis* e *Melissa officinalis* com fosfolípidos. Nesta patente o complexo foi preparado utilizando fosfatidil colina 95%, e o ácido rosmarinico puro por dispersão em água. O complexo produzido foi testado produzindo uma excelente atividade antiflogística, tendo uma baixa toxicidade e não causando formação de úlcera.

Em uma patente publicada em 1988, Gabetta e Colaboradores, relataram a preparação dos complexos de *Silubum marianum*. Os extratos padronizados conhecidos como Silimarina e contêm como constituintes a Silibina, Silidianina e a Silicristina, são usados na Europa no tratamento das doenças do fígado (Ver figura 5.3 , pag. 76). O principal constituinte, a Silibina, tem sido sujeito a muitos estudos farmacológicos e bioquímicos e tem demonstrado propriedades interessantes mas uma pobre biodisponibilidade. Complexação do extrato com fosfatidilcolina 90% fosfatidil-etanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina em acetona, dioxano, produz o complexo o qual aumenta a biodisponibilidade da Silibina. Isto é resultado de uma maior absorção do complexo no trato gastrointestinal resultando em um nível da flavolignana no plasma. Este resultado melhora os parâmetros farmacológicos e farmacocinético da Silimarina que pode ser usado em tratamentos de doenças crônicas e agudas do fígado de origem tóxica, metabólica , infecciosa ou de natureza degenerativa. O complexo possui uma atividade antioxidante e é capaz de prevenir degeneração celular e pode ser utilizado em todas as situações na qual um “stress” oxidativo pode danificar o funcionamento hepatocelular[MARAZONI e BOMBARDELLI, 1995] .

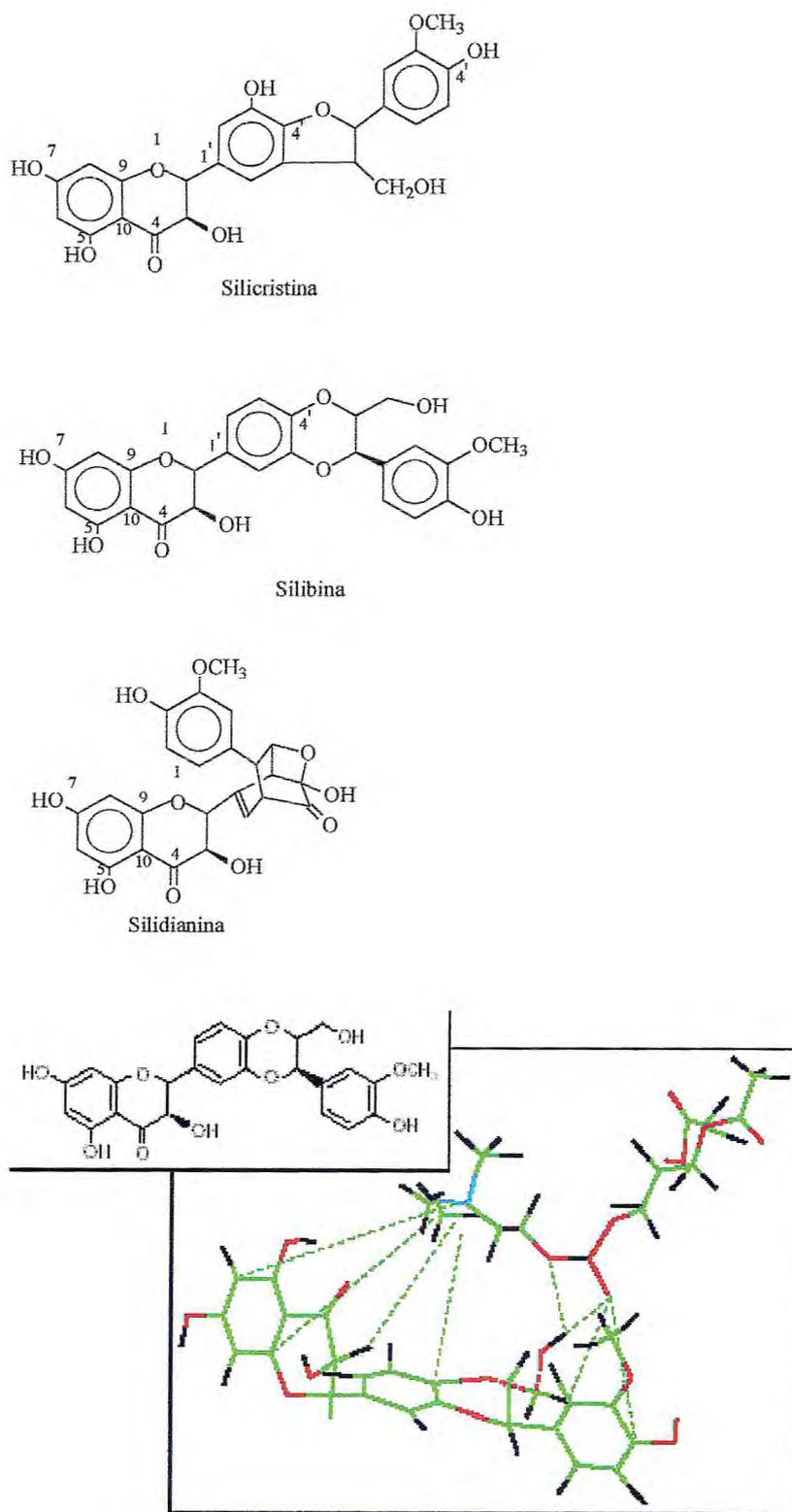


Figura 5.3. –Principais constituintes do extrato de *Silbum marianum* e complexo silimarina-fosfolípidos.

Em 1990 Bombardelli e Sabadie relataram a preparação dos complexos entre fosfolípidos e o extrato de *Vitis vinifera* (Uva, Ver principais constituintes na figura 5.4 , pag. 78). Estes são utilizados na terapêutica principalmente no tratamento de doenças hepáticas e vasculares ou em oftalmologia.

Estes extratos tiveram suas propriedades antioxidante testadas *In vitro* [MAFFEI e Colaboradores, 1998] e os resultados obtidos confirmaram o extrato de uva como um dos antioxidantes mais eficientes dos obtidos de fontes naturais. Estes argumentos servem de base para investigação da atividade *In vivo*. A qual é feita após a complexação destes extratos com fosfolípidos que melhora sua biodisponibilidade por via oral a qual é geralmente pequena [MARAZONNI e Colaboradores, 1992; CONTI e Colaboradores, 1992]. A complexação é realizada utilizando o extrato padronizado com di-esterolfosfatidilcolina, fosfatidilcolina 95%, e uma mistura de fosfolípidos de soja 97%, e lecitina de soja hidrogenada.

Em outra patente publicada em 1991 Bombardelli e Patri relataram a preparação de vários complexos de bioflavonóides com fosfolípidos dando destaque a preparação dos complexos com extrato de *Gingko biloba* (Ver figura 5.5 , pag.79), assim como a atividade dos complexos *In vivo*.

Foram relatadas nesta patente a preparação de complexos de vários flavonóides com diesterolfosfatidilcolina, fosfatidilcolina 95% fosfatiletanolamina, fosfolípidos de soja 97%. Estes complexos quando testados por aplicação tópica, mostraram um efeito protetor, efetivo significativo do ponto de vista aplicativo da tecnologia farmacêutica e cosmética os vários complexos podem ser empregados na preparação de microdispensões ou incorporados em preparações apropriadas. Estes complexos também podem ser utilizados na forma sólida para preparação de capsulas, tabletes, pós, cremes, géis para microdispensão em água.

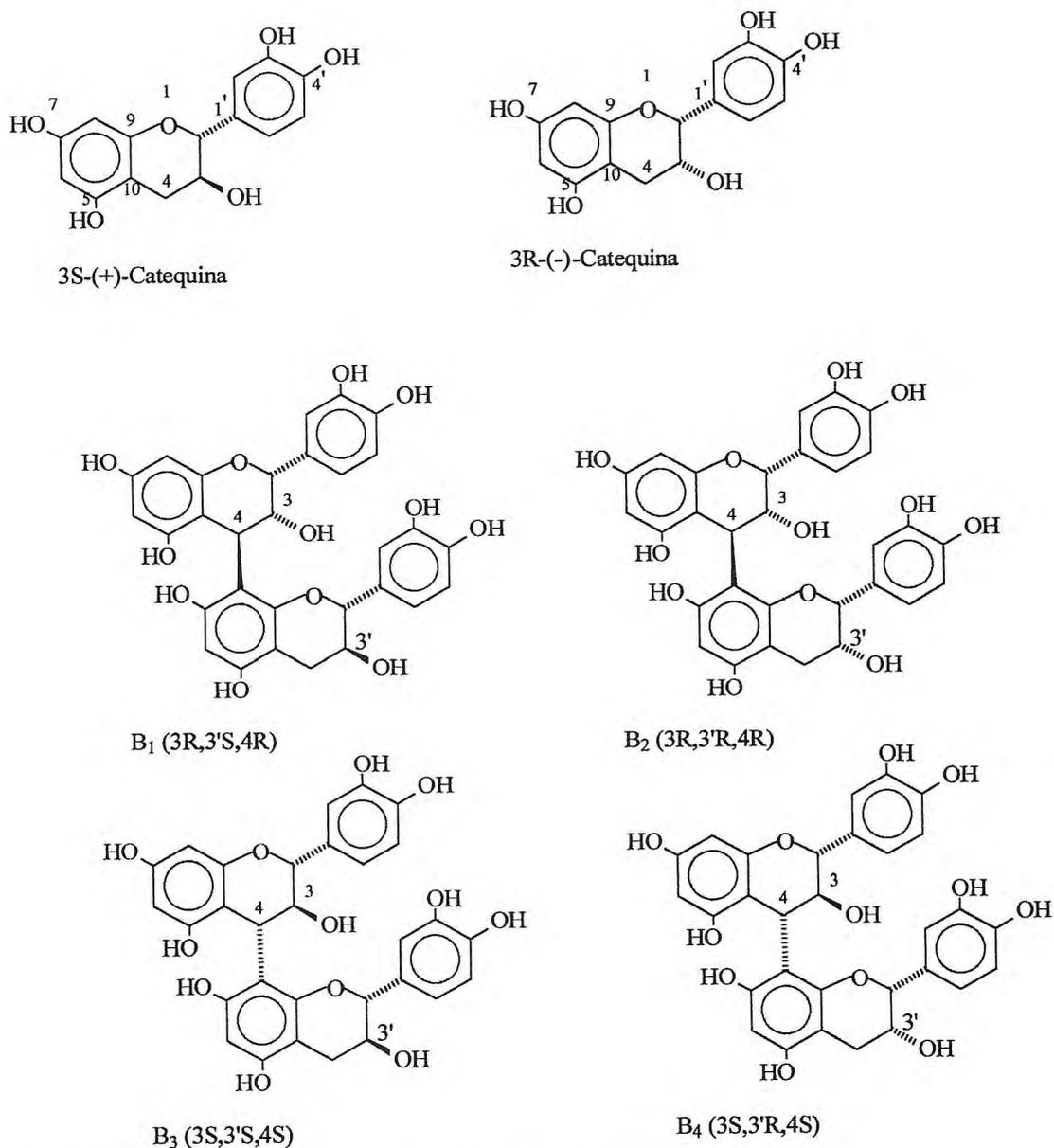


Figura 5.4 Principais constituintes do extrato de *Vitis vinifera*

Em vista da grande atividade exibida pelos complexos relatados, a dosagem dos princípios ativos, pode em certas circunstâncias, diminuir enquanto se mantém uma atividade específica. Outra vantagem destes complexos é que em uma forma para uso farmacêutico/cosmético ele

pode ser administrado por vários dias dependendo da gravidade da patologia a ser tratada e das condições do paciente.

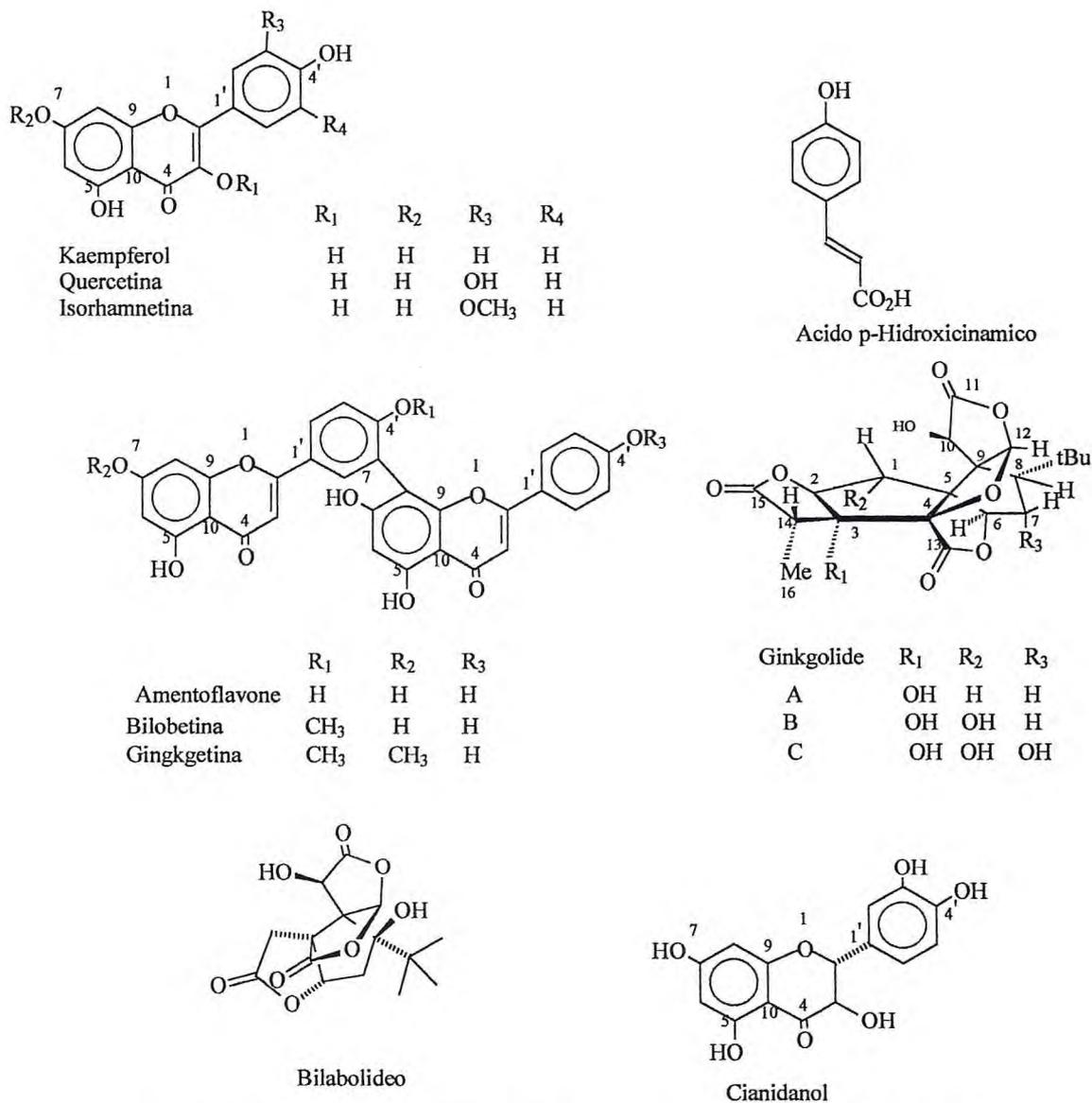


Figura 5.5 Principais constituintes do extrato de *Gingko biloba*

Em duas outras patentes de 1992, Bambardelli e colaboradores relataram a preparação de complexos do ácido glicirretínico (aglicona do ácido glicirrizínico, principal constituinte saponínico da raízes de *Glycyrrhiza glabra*, figura 5.6, pag 80) utilizado como anti-inflamatório, anti-ulcera com propriedades cicatrizantes. Estes complexos foram

preparados utilizando fosfatidilcolina e foram testados farmacologicamente e possuem uma ação maior e mais durável que os compostos ativos livres.

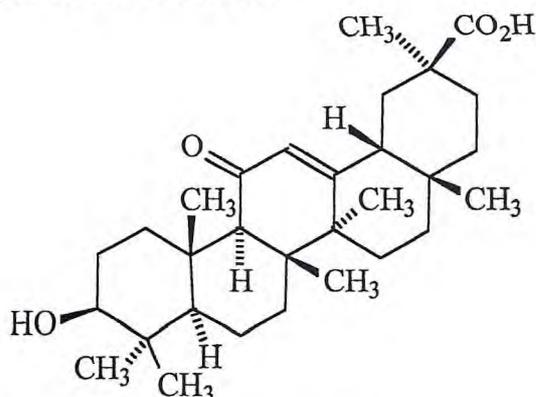


Figura 5.6 ácido Glicirrético

Na outra patente as agliconas das saponinas obtidas de *Centella asiatica* e *Terminalia sp* foram preparadas (sericosideo, madecassicosideo asiaticosideo, figura 5.7) com fosfatidilcolina 95% e diesteralfosfatidil 99%. As saponinas possuem atividades antiinflamatória, vasotônica, vasoprotetora, anti-úlceras e anti-edema. Os complexos preparados foram testados *In vivo* e os complexos são muito mais ativos que as saponinas, e as mesmas atividades antiflamatórias foram obtidas com metade da dosagem para os complexos.

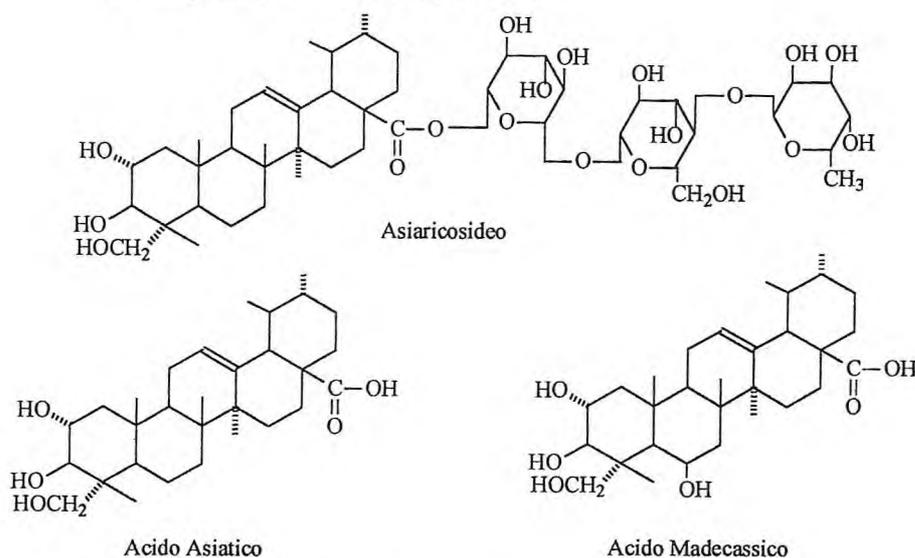


Figura 5.7 Saponinas de *Centella asiatica* e *Terminalia sp*

Referências Bibliográficas

BOMBARDELLI, E., CURRI, S.B., DELLA LOGIA, R., DEL NEGRO, P., TUBARO, A., GARIBOLDI, P.L., Complexes Between Phospholipids and Vegetal Derivatives of Biological Interest. *Fitoterapia*, v. 60(1), p. 1, 1989.

BOMBARDELLI, E., PATRI, G., POZZI, R., USP 5,147,859, 1992.

BOMBARDELLI, E., PATRI, G., PUZZI, R., USP 5,166,139, 1992.

BOMBARDELLI, E., PATRI, G., USP 5,043,323, 1991.

BRIAN, R., Soybean lecithin processing units operations , *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 53 , p.27-29 , 1976 .

CONTI, M., MALANDRINO, S., MAGISTRETI, M.I. , Protective activity of silipide on liver-damage in rodents , *Jpn. J. Pharmacol.* v. 60, p. 315-321 ,1992.

DAVIS, P.F., USP 3,301,881 , 1987 .

DEVEL, H.J., The Lipids Vol. 1, *Interscience Publishers*, New York , 1961.

Food Chemical Codex, 3ª ed, NAS-NRC, Washington, D.C. 1980.

GABETTA, B., BOMBARDELLI, E., PIFFERI, G., USP , 4,764,508 , 1988.

LIST, G.R., EVANS, C.D., BLACK, L.T., MONTE, T.L., Removal of phosphorus and iron by commercial degumming of soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 55, p. 277-276, 1978.

MAFFEI, F.R., CARINI, M., ALDINI, G., CALLONI, M.T., BOMBARDELLI, E., MORAZZONI, P., Sparing effect of procyanidins from *Vitis vinifera* on vitamin E: *in vitro* studies, *Planta Medica*, v. 64, p. 343-347, 1998.

MORAZZONI, P., BOMBARDELLI, E., *Silybum marimum*, *Fitoterapia*, v. 50, p. 3, 1995.

MIDDLETON, E., The Flavonoids, *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 5, p. 335, 1984.

MORAZZONI, P., MAGISTRETTI, M.J., GIACHETTI, C., ZANOLO, G. Comparative bioavailability of silypide, a new flavonolignan complex in rats, *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinetics*, v. 17, p. 39-42, 1992.

ROBERTSON, J.A., MORRISON, W.R., BURDICK, D., Chemical evaluation of oil from field-damaged and storage-damaged soybeans, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 50, p. 443-445, 1973.

SORENSEN, S.O., BEAL, G.F., USP 2,029,398, 1935.

ULMANN'S -ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMISTRY, V.A 15, p. 293-298, John Wiley e Sons, 6th Edition, 2000

US Pharmacopeia, 24^a EDITION, p. 2259,2000.

WITTCOFF,H., The phosphatides, *Reinhold ed.* , New York , 1951 .

WITZ-PEITZ, F., PROBST, M., WINKELMANN, J., USP 4,358,442,
1982.

Capítulo 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO- GALACTOMANANAS

6.1	Método de Extração	85
6.2	Caracterização da galactomanana (poliVIII) .	91
6.2.1.	Determinação estrutural de poli VIII	93
6.2.2.	Início da formação do gel de Poli VIII por RMN ^{13}C	118
6.3	Comparação dos métodos de extração por RMN ^{13}C	121
6.4	Composição e sequenciamento de Galactomananas utilizando degradação preliminar da amostra	127
6.5	Determinação da relação galactose:manose de poli VIII	129

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO - GALACTOMANANAS

6.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Embora presente no endosperma de muitas leguminosas brasileiras [BUCKERIDGE e Colaboradores,1995], mais de 70 espécies já foram estudadas , mas em nenhuma delas foi proposta uma utilização industrial para produção de galactomananas, seja devido ao rendimento, pureza do produto obtido e quantidade de sementes disponíveis para processamento, ou pela relação galactose manose da galactomanana obtida.

As favas de *Dimorphandra mollis* e *Dimorphandra gardineriana*, árvores da família *Leguminosae Caesalpinacea* são utilizadas para produção de Rutina , insumo utilizado na indústria farmacêutica .

A presença de galactomanana nas sementes de *Dimorphandra mollis* foi relatada inicialmente por Franco e colaboradores (1996). Neste trabalho é relatado uma técnica de extração com rendimento de 40% de galactomanana a partir das sementes . Mas nenhuma análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C da galactomanana foi relatada , nem a pureza do material obtido.

As sementes de *Dimorphandra gardneriana* foram obtidas após moagem e peneiramento das favas , produzindo em media 5,5% de rendimento em relação à fava inteira . Este baixo rendimento é compensado , pela grande quantidade de favas de *Dimorphandra mollis* e *Dimorphandra gardneriana* que são comercializadas anualmente (12.000 ton.),com os quais é possível produzir uma grande quantidade de sementes destas plantas (660 ton.)[ABIQUIF,2003].

As sementes de leguminosas são compostas de um par de endospermas, casca e embrião. Em geral, todas as sementes deste tipo

apresentam muitos problemas para moagem devido a dureza do endosperma, tamanho das sementes, dureza da casca, quantidade relativa de endosperma e embrião , etc . Embora o endosperma seja constituído quase inteiramente de galactomananas, ele apresenta fibras e se dispersa lentamente em água, além de ser muito duro.

Sendo assim os tratamentos aplicados às sementes descritos na literatura para a produção de galactomananas , de vários tipos , geralmente levam a galactomananas que produzem soluções viscosas com bastante material insolúvel. Além disto , mesmo removendo o material insolúvel a solução obtida dependendo da forma de tratamento possui outros carboidratos dissolvidos além da galactomanana .

Na literatura existem vários métodos para extração e purificação de galactomananas obtidas da vários matérias primas (sementes), e o método utilizado varia com o tipo de matéria prima e o grau de pureza do produto a ser obtido. Assim após levantamento dos métodos e patentes descritos, observamos que para a extração das galactomananas das sementes *D.mollis* e *D. gardneriana*,nenhum destes métodos poderia ser aplicado para produzir uma galactomanana pura e com bom rendimento (Ver revisão sobre métodos de extração de galactomanana item 3.5 ,pag. 38).

Tendo em vista estes métodos descritos na literatura,e tendo como método de partida a técnica descrita por Franco e colaboradores (1996) e combinando as várias técnicas para a extração,purificação das galactomananas e aplicando às sementes de *Dimorphandra gardneriana* chegamos a um processo que produz a galactomanana com alta pureza e bom rendimento. Utilizando as informações obtidas de ZAWADZKI-BAGGIO e Colaboradores(1992) e PETKOWICZ(1993) que para obterem uma galactomanana mais pura recomendam a separação da película e tegumento e do embrião do endosperma , e após testar vários métodos descritos na literatura chegamos a um procedimento para extração/purificação das

galactomananas da *Dimorphandra gardneriana* que produz um produto de elevada pureza com bom rendimento. Apresentamos os métodos que produziram os melhores resultados abaixo e para podermos comparar, as galactomananas obtidas foram analisadas (determinação da umidade, nitrogênio total, cinzas, carboidratos, proteínas, hidrólise ácida e cromatografia em papel e camada delgada; ver parte experimental 8.5.3 Análise dos polissacarídeos, pag 213):

Poli I – Semente inteira foi tratada com solução de NaOH 5%, seguida de moagem e extração com água (80 °C). O extrato aquoso foi precipitado com 5 volumes de álcool, o precipitado foi filtrado, solubilizado em água e liofilizado (Rendimento 5,0%, produto liofilizado escuro; conforme descrito por Franco e Colaboradores (1996)).

Poli II – A semente moída foi extraída com água até exaustão (80 °C) e o extrato aquoso foi filtrado precipitado com álcool. O precipitado obtido foi filtrado, solubilizado em água e liofilizado (Rendimento 7,0%, produto liofilizado avermelhado).

Poli III – A semente inteira foi extraída com água (80 °C) até exaustão, o extrato aquoso foi filtrado, precipitado com álcool. O precipitado obtido foi filtrado, solubilizado em água e liofilizado (Rendimento 8,0%, produto liofilizado avermelhado).

Poli IV – A semente moída foi extraída com água (80 °C) até exaustão, o extrato aquoso foi filtrado e liofilizado (Rendimento 29%, produto liofilizado avermelhado).

Poli V – As sementes foram fervidas com água, e após resfriamento ficaram em repouso até aumentarem de tamanho. O endosperma foi separado da casca, embrião e tegumento. O endosperma foi então seco a

em estufa, e o produto foi extraído com água quente até exaustão. Seguido de filtração e liofilização (Rendimento 21,7 % , produto liofilizado creme).

Poli VI – A semente inteira foi extraída com água (80 °C) até exaustão, seguido de filtração e liofilização(Rendimento 32,4 %,produto liofilizado avermelhado).

Poli VII – O endosperma seco em estufa a 100°C (como o POLI V) foi extraído com água (85 °C) até exaustão. Seguido de filtração, precipitação com álcool. E o precipitado foi filtrado solubilizado em água e liofilizado liofilizado(Rendimento 9,0%, produto liofilizado escuro).

Poli VIII – As sementes foram fervidas por 20 minutos com água, e após resfriamento ficaram em repouso até aumentarem de tamanho. O endosperma foi separado da casca, embrião e tegumento. O endosperma foi liofilizado, e o produto foi extraído com água (80 °C) até exaustão, seguido de filtração e liofilização (Rendimento 26%, produto liofilizado creme).

Podemos então com os rendimentos obtidos e os resultados das análises comparar os diversos métodos(poli I a poli VIII) e chegar às seguintes observações:

- 1.A remoção da casca é importante para obter uma galactomanana pura.
2. A filtração do extrato aquoso é importante para remoção das fibras.
- 3.A precipitação com álcool não produz uma galactomanana mais pura, e reduz sensivelmente o rendimento.
4. A remoção da casca com NaOH não produz uma galactomanana mais pura.
5. O endosperma produz uma galactomanana mais pura, se for liofilizado:

Os métodos que produzem o melhor rendimento são poli IV , poli V, poli VI, poli VIII e os que produzem um produto mais puro são poli V e poli

VIII (Após análise conforme descrito no item 8.5.3 da parte experimental, pag. 213). Observamos que o rendimento de poli VIII é maior e pureza do produto final também é melhor. Inicialmente a pureza dos polissacarídeos obtidos foram comparados através da hidrólise ácida e CCD,seguida da análise por RMN.

Comparando os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C de poli V(figuras 6.32.–6.34,pag. 126 e 127),poli VI(figuras 6.30 –6.31,pag. 125) e poli VIII(figuras 6.1.-6.5, pag. 94,95 e 97) com padrão locust bean purificado(poli XI figuras 6.26.–6.28,pag. 123 e 124) observamos que a intensidade dos sinais em relação ao ruído, e as absorções características , chegamos a conclusão que o método utilizado em poli VIII apresenta o produto mais parecido com o padrão.Para obtenção do padrão as amostras de locust bean e goma guar da Sigma tiveram que ser extraídas conforme o procedimento utilizado para poli VIII, uma vez que as amostras destes sem purificação não apresentaram a solubilidade necessária para a análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C . A amostra de goma guar obtida da Sigma(poli X) mesmo purificada apresentou,além das absorções características das galactomananas,outas absorções de outros açúcares(ver figuras 6.23–6.25,pag. 121-122). Através da comparação dos resultados obtidos(rendimentos e espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C e análise dos polissacarídeos) dos métodos de extração:poli V,poli VI, poli VIII,goma guar (poli X) e locust bean (poli XI) com a literatura chegamos a conclusão que os procedimentos utilizados para poli VIII são os que melhores se aplicam para extração/purificação da Galactomananas das sementes de *Dimorphandra gardneriana* conforme iremos discutir a seguir.

Apesar da grande quantidade de métodos de extração/purificação para as Galactomananas que podem ser aplicados para as sementes de *Dimorphandra gardneriana* , observamos ser essencial a remoção de toda a casca e embrião produzindo um endosperma limpo de cor amarela-clara também descritos por MANZI e CERZO em 1986 . As sementes de

Dimorphandra gardneriana são relativamente grandes, possibilitando o isolamento manual do endosperma, desejável para obtenção de uma galactomanana livre de contaminantes oriundos do tegumento, do embrião ou da casca. Assim as sementes foram aquecidas por 20 minutos com água à 95 °C seguido de 12 horas de repouso, para destruir a atividade enzimática e para hidratar o endosperma, a casca e o gérmen para facilitar a separação destes. O endosperma foi então separado da casca e embrião manualmente, congelado e liofilizado, produzindo 33,8% de rendimento dos endospermas. O endosperma foi então submetido à extração com água a 80 °C exaustivamente. Os extratos foram combinados e filtrados à quente em membrana de poliéster de 5µm utilizando funil de buchner. O filtrado obtido é um líquido viscoso, amarelo e límpido. O filtrado foi então liofilizado produzindo 76,8% de Galactomananas a partir do endosperma de *Dimorphandra gardnerana* e 26% em relação as sementes.

Através dos resultados obtidos com poli VIII foi possível descrever uma metodologia geral para produção de galactomananas a partir das sementes de *Dimorphandra gardneriana*. Esta metodologia não está descrita na literatura e como as sementes de fava são produzidas em escala comercial (660 ton./ano) e o processo produz um produto com bom rendimento (26%) então poderemos dizer que poderemos produzir algo em torno de 171,6 ton. da galactomanana utilizando este processo (em fase de pedido de privilégio de invenção no IPI). Este processo foi repetido e otimizado sendo o rendimento apresentado o médio obtido.

A galactomanana assim obtida é um produto que atende as especificações exigidas pela Farmacopéia Européia(2002) para a galactomanana obtida da goma guar(ver tabela 6.1, pag. 91). O produto oriundo de poli VIII teve sua relação galactose/manose obtida por hidrólise, redução e análise do acetato de alditóis, por CGL e comparação com acetato de alditóis, padrões e a relação galactose/manose obtida por esta análise é

de 1:2,85 (ver tabela 6.2,pag. 93;tabela 8.1,pag 217;figura 8.1,pag. 218) que é a relação galactose/manose obtida para o locust bean (2,8-4,2:1) a qual já é um produto utilizado na indústria[DAAS e Colaboradores,2000; McCLEARY e Colaboradores, 1985].

Tabela 6.1. Especificações da Farmacopéia Européia 4ª edição para Galactomananas obtida do guar.

TESTE	ESPECIFICAÇÕES
ODOR	CARACTERÍSTICO
ASPECTO	PÓ AMARELADO À BRANCO
IDENTIFICAÇÃO	CONFORME DESCRITO
APARENCIA DA SOLUÇÃO	CLARA
PH	5,5-7,5
VISCOSIDADE APARENTE	75 a 140% DO INFORMADO
MATERIAIS INSOLÚVEIS	7% (MAXIMO)
PROTEÍNAS	5% (MAXIMO)
GOMA TRAGACANTH, AGAR, ESTERCULIA, ALGINATOS E CARRAGENANAS	CONFORME DESCRITO
PERDA POR DESSECAÇÃO	15% (MAXIMO)
CINZAS TOTAIS	1,8% (MAXIMO)

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOMANANA (Poli VIII)

A Galactomanana pura poli VIII é um pó amorfo homogêneo de coloração creme . Galactomananas de cadeias maiores são menos solúveis e apresentam conseqüentemente maiores valores de viscosidade intrínseca [ROBINSON e Colaboradores,1982].O valor da viscosidade intrínseca obtido para Poli VIII foi de 3,85 dL/g(Ver parte experimental item 8.5.3.10, pag. 218 e Figura 8.2,pag. 220).Os valores obtidos da viscosidade intrínseca para amostras de Goma Guar com diferentes massa molar varia de 0,45 a 1,25

dL/g. Pelo valor obtido para poli VIII observamos que a massa molar é bastante elevada. O que é confirmado pelo valor da massa molar descrito por FRANCO e colaboradores(1996) para Galactomanana obtida das sementes de *Dimorphandra mollis* (massa molar aparente 100.000). Através da determinação da massa molar (ver parte experimental 5.5.3.10 , pag. 221) de poli VIII por GPC empregando pululanas como padrão de calibração observou-se uma massa molar de 138.407 g/mol. Este resultado, como aquele da viscosidade intrínseca indicam que poli VIII é um polímero com massa molar elevada.

O espectro de RMN ^1H de poli VIII (Ver Figura 6.1. , pag. 94) mostrou na região anomérica 2 absorções , dois singletos largos a δ 5,55 e δ 5,27 correspondentes aos hidrogênios anoméricos de β -D-manopiranosídeo e α -D-galactopiranosídeo respectivamente e a relação entre estes picos é 1:1,97 (Ver tabela 6.2,pag. 93)[MANZI e CERREZO, 1984] .

O espectro de infravermelho de poli VIII (Ver Figura 6.2.,pag 94) mostrou 2 bandas de absorção a 870 e 810 cm^{-1} características de deformação de ligação equatorial $\text{C}_2\text{-H}$ em mano-oligossacarídeo e a frequência de "Ring-Breathing" do resíduo D-manopiranosil da mesma unidade respectivamente [KATO e Colaboradores , 1973] .

A região de absorção dos carbonos anoméricos (101,24 ppm e 99,99 ppm) e carbonos oximetilênicos (61,76 ppm e 62,29 ppm) está bem documentados [GANTER e Colaboradores, 1995; GRASDALEN e PAINTER, 1980](Ver Figura 6.4, pag 95).

A razão dos monossacarídeos foi determinada por CGL (ver tabela 6.2, pag. 93) através da análise dos acetatos dos alditóis de poli VIII conforme descrito na parte experimental (8.5.3.8 , pag. 216) [GUPTA e GRASDALEN, 1988; GUPTA e BOSE,1986], e por RMN ^1H e RMN ^{13}C a partir das áreas

relativas dos sinais anoméricos de galactose e manose(substituída e não substituída) e estão descritos na tabela 6.2(pag. 93). Durante os estudos de RMN ^{13}C a amostra de poli VIII não apresentou nenhum problema para dissolução e apenas aquecimento foi utilizado para sua dissolução. Assim a amostra poli VIII foi analisada diretamente e nenhum tipo de hidrólise parcial foi utilizada para redução da viscosidade durante os estudos de poli VIII por RMN ^1H e RMN ^{13}C . Nenhum tipo de precipitação, complexação ou purificação cromatográfica foi utilizado. Assim a relação galactose:manose foi obtida pela comparação das áreas dos hidrogênios anoméricos (em δ 5,55 e δ 5,27, ver figura 6.1.) e os carbonos anoméricos (em δ 101,2 e δ 101,09 com δ 99,99; ver figura 6.3, pag.95).

Tabela 6.2. - Composição dos monossacarídeos de poli VIII.

Monossacarídeo	CGL	RMN ^{13}C	RMN ^1H
D-Galactose	1	1	1
D-Manose	2,8	2,1	1,97

Embora os resultados por CGL e RMN sejam diferentes, é necessário para análise por CGL, hidrolisar , reduzir e acetilar a Galactomanana , o que pode, devido as condições de reação e extração, modificar as proporções entre galactose : manose .

6.2.1. - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE POLI VIII

O espectro de RMN ^{13}C -BB (FIGURA 6.4. e 6.5 , pag. 95 e 97) de poli VIII mostrou 17 linhas espectrais que após serem comparadas com o espectro RMN ^{13}C -BB e DEPT(135)(ver figura 6.6 , pag 97) possibilitaram elaborar a tabela 6.3 (pag, 96) .

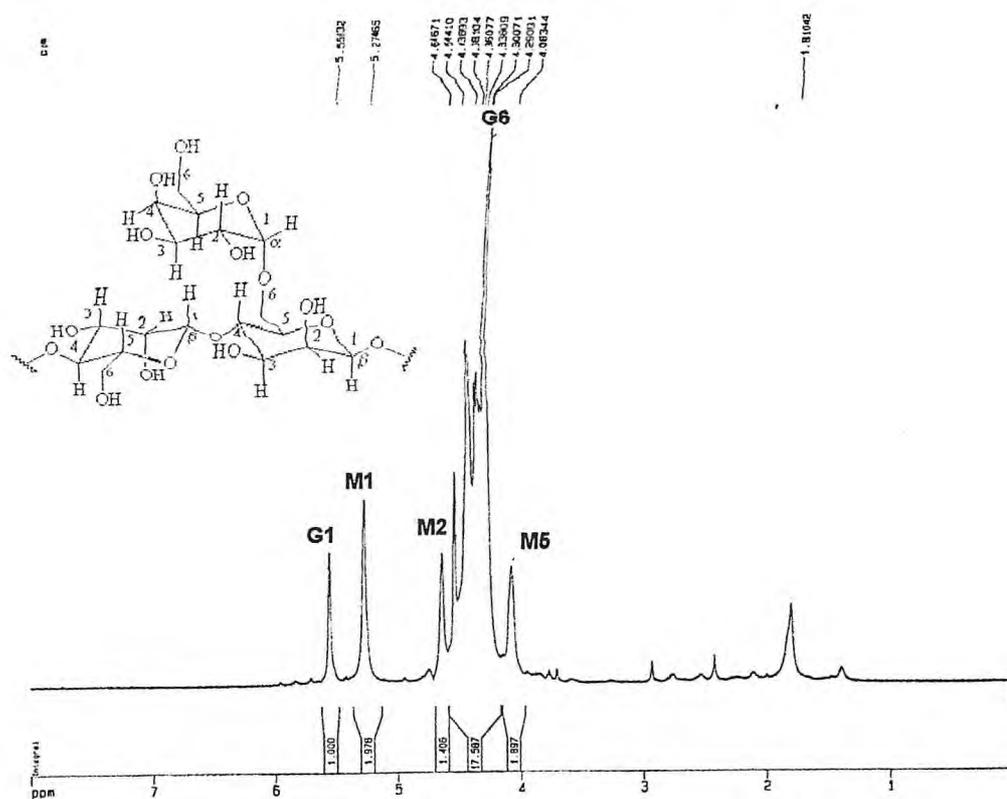


Figura 6.1 - Espectro de RMN ^1H de poli VIII [δ ; D_2O ; 500,13 MHz]

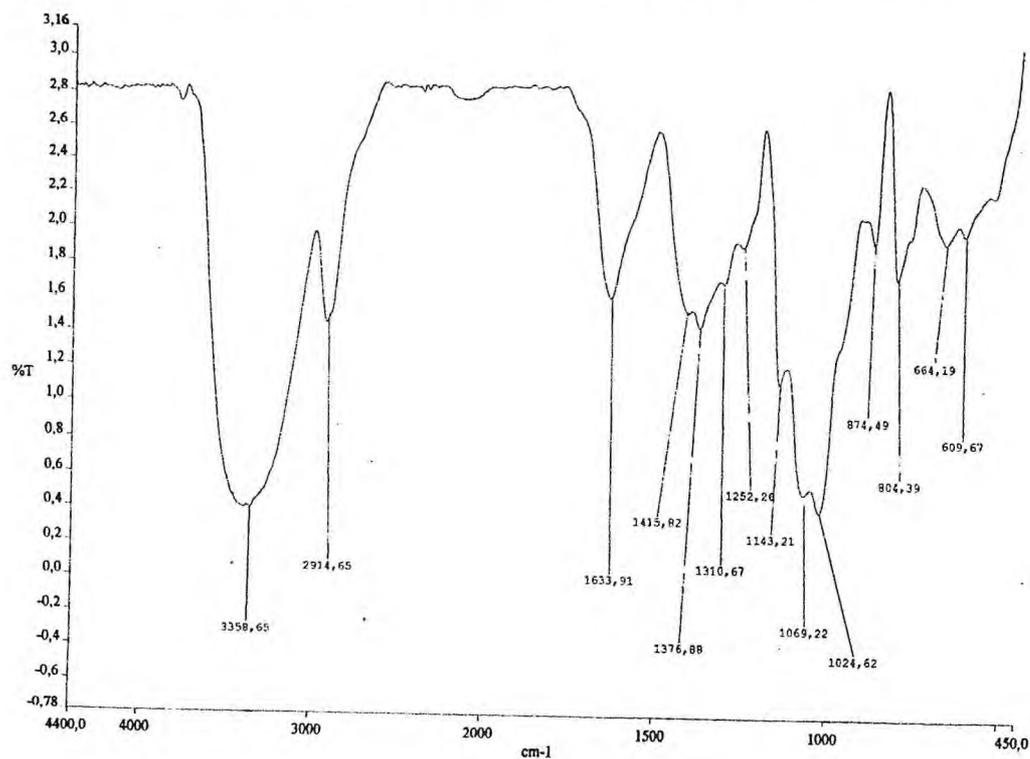


Figura 6.2 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] de poli VIII

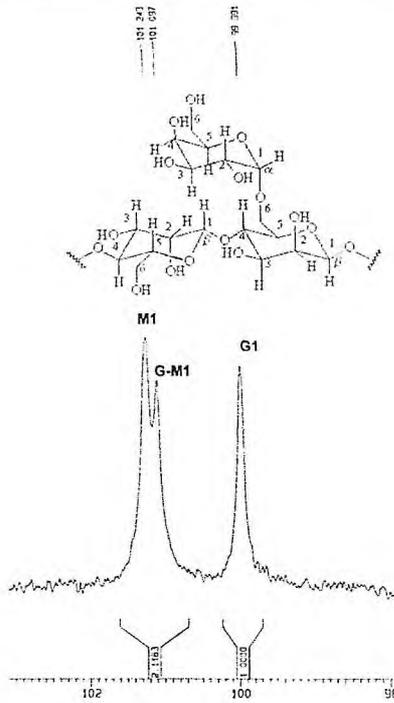


Figura 6.3 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli VIII-Expansão de δ 98 a 102 [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]

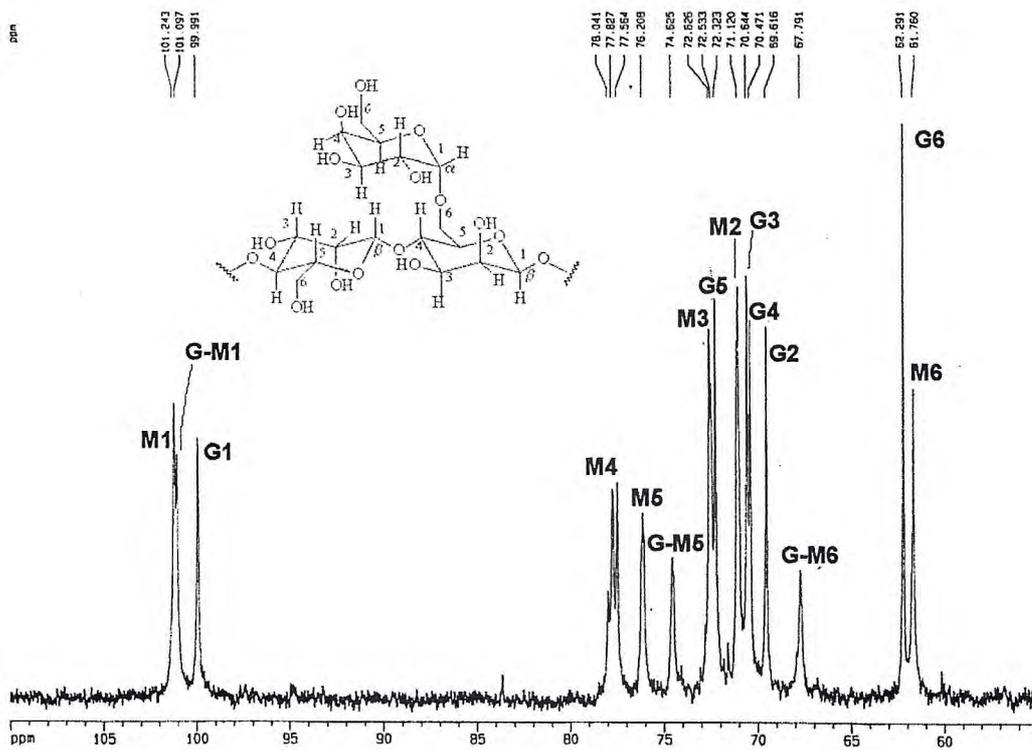


Figura 6.4 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli VIII [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]

A partir dos dados obtidos da análise de poli VIII por hidrólise e comparação por CCD (Ver parte experimental 8.5.3.7 , pag. 216; ver discussão ítem 6.5)) com os padrões de galactose e manose já sabemos que poli VIII era uma galactomanana, e que os sinais obtidos pelos espectros de RMN BB e DEPT (135°) estavam de acordo com os relatados na literatura para galactomananas de várias origens diferentes[GANTER e Colaboradores,1992,1993;GRASDALEN e PAINTER,1980;BOCIEK e Colaboradores,1981]. Assim foi possível prever que devido a relação galactose : manose e da proximidade dos grupos galactosil ao longo da cadeia da D-manana que alguns dos sinais dos carbonos se desdobrariam em vários sinais.

Tabela 6.3. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de poli VIII com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -BB E DEPT : δ ; D $_2$ O; 125, 75MHz)

CH	CH $_2$
101,24	67,79
101,09	62,29
99,99	61,76
78,04	-
77,82	-
77,56	-
76,50	-
74,62	-
75,53	-
72,32	-
71,12	-
70,64	-
70,47	-
69,61	-

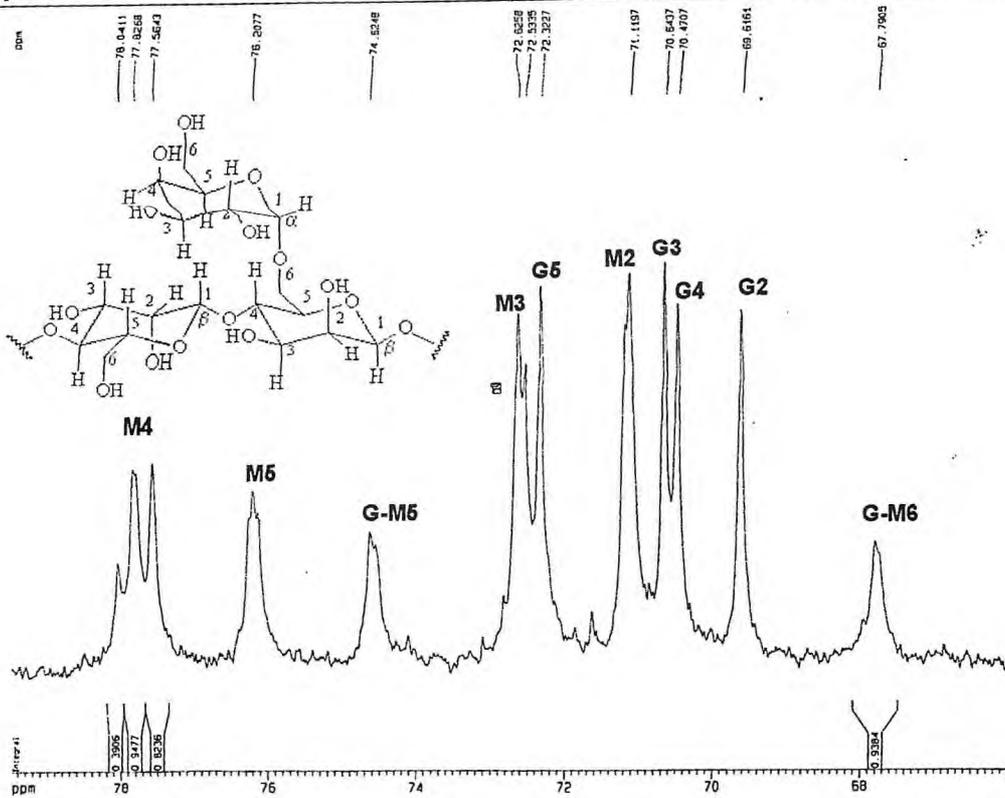


Figura 6.5 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli VIII - Expansão de δ 66 a 79 [δ ; D_2O ; 125,77 MHz] .

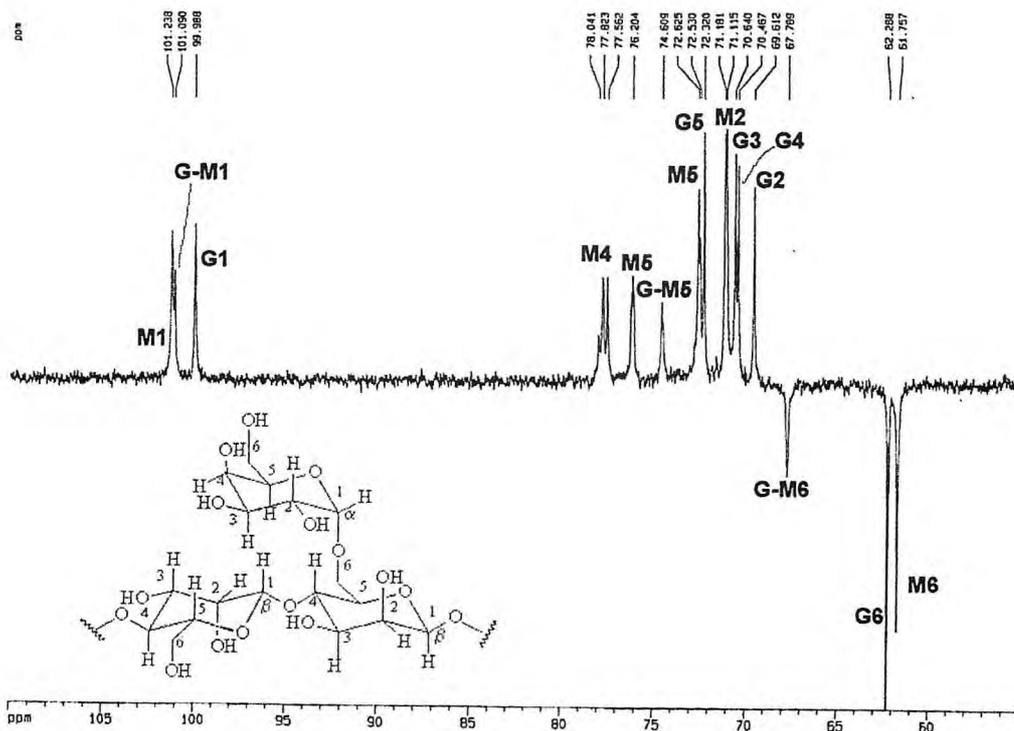


Figura 6.6 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (135°) de poli VIII [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]

No espectro de RMN¹³C de poli VIII a 125,75MHz (ver figura 6.4 , pag. 95),foram observados 3 absorções em δ 101,24 , 101,09 e 99,99 relacionadas aos carbonos anoméricos correspondentes a manose (em δ 101,24 , 101,09) e galactose (em δ 99,99). Também foram observados 3 absorções em δ 78,04 , 77,82 e 77,56 relacionadas ao carbono 4 da manose [GRASDALEN e PAINTER,1980;GANTER e Colaboradores, 1995].

Nos espectros de RMN ¹³C , todas as linhas de carbono são bem resolvidas e os deslocamentos químicos (Tabela 6.4) estão de acordo com a literatura[NOBLE e TARAVEL, 1987; MANZI e Colaboradores, 1986] obtidos de sementes de legumes Guaran [GRASDALEN e PAINTER, 1980],Carob [GRASDALEN e PAINTER,1980;BOZIEK e Colaboradores, 1981],Clover[GRASDALEN e PAINTER,1981],e *Trigonella foneum-graecom* [BOCIEK e Colaboradores,1981;MANZI e Colaboradores, 1986](ver estrutura na figura 6.7 , pag.99).

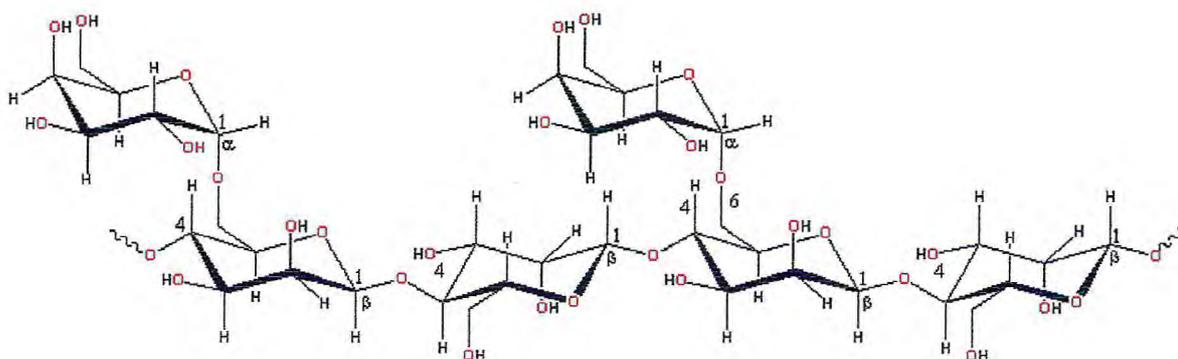
TABELA 6.4.– Assinalamentos dos picos no espectro de RMN ¹³C de poli VIII conforme modelo utilizado por KAPOR e Colaboradores, 1998 .

Tipo de unidade	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α -D-Galactopiranosil	99,99	69,61	70,64	70,47	72,32	62,29
β -D- Manopiranosil (c)	101,24	71,12	72,62	77,56	76,20	61,76
não ramificado no HO-6 (d)	-	-	-	77,82	-	-
β -D-Manopiranosil (c)	101,09	71,12	72,62	77,82	74,62	67,79
ramificado no HO-6 (d)	-	-	-	78,04		

(c) quando o residuo de D-Manose precedente não é substituido

(d) quando o residuo de D-Manose precedente é substituido

Figura 6.7 . – Estrutura para a galactomanana



O espectro de RMN¹³C de poli VIII a 125,75MHz (ver figura 6.4 , pag. 95) mostra a intensidade de todas as linhas da D-manose. O C-1 da manose aparece como 2 sinais(M1 e G-M1), relativos aos resíduos substituído e não substituído, de acordo com a composição monoméricas e as áreas do pico correspondentes ao C-1 substituído da amostra (G-M1) e C-1 da galactose (G1) mostram uma razão próximo de 1:1.

Os carbonos C-2 e C-3 da manose (M2 e M3) mostram 2 linhas bem resolvidas e uma terceira incipiente . Estes acoplamentos, como aqueles para o carbono-4 na manose são devido às estruturas A , B e C(ver figura 6.8 , pag. 100).

várias galactomananas com relação manose:galactose diferentes e as estruturas provavelmente responsáveis por tais desdobramentos .

A figura 6.10 e 6.10b pag. 102 e 103,mostra a expansão da região de ressonância do C-4 da manose de diferentes Galactomananas com diferentes razões galactose:manose. O pico (I) é o mais desprotegido no espectro e se origina de 2 grupos de resíduos de D-manose substituídos contíguos. O pico intermediário (II) representa a superposição de sinais onde apenas um dos dois resíduos de D-manose é substituído . Isto implica que o ambiente experimentado pela C-4 é afetado na mesma extensão tanto por um grupo D- α -galactosil ligado a unidade precedente na cadeia, como por um grupo ligado a seu próprio anel (Ver estruturas na figura 6.10 , pag. 102 e 103) .

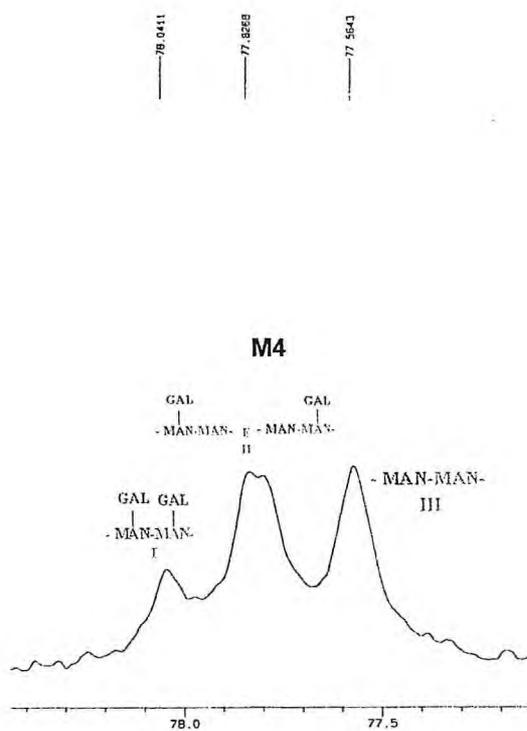
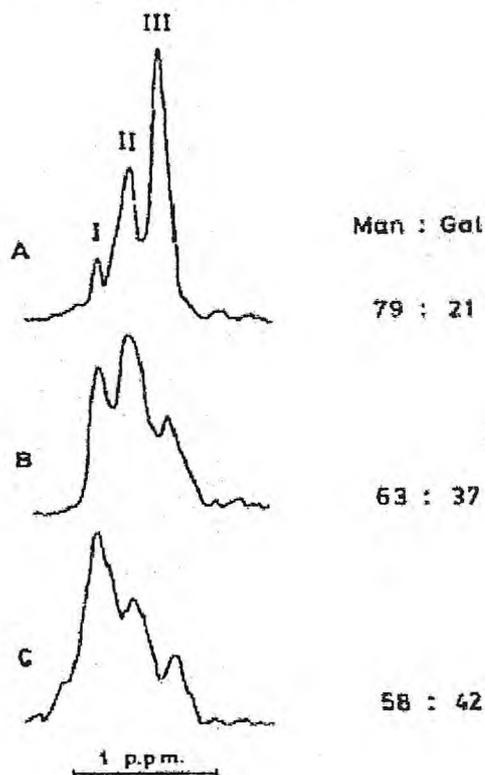


Figura 6.9 -Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -BB de POLI VIII de δ 77 a 70[δ ; D_2O ; 125,77 MHz] mostrando o desdobramento do carbono 4 da manose M-4 .

FIGURA 6.10a –Expansão da região de RMN ^{13}C do C-4 do resíduo da D-manose nas Galactomanana em : A (*Locust bean*); B (*Guar*); C (*Clover seed*), a unidade envolvida está sublinhada [de acordo com GRASDALEN e PAINTER, 1980].



Na expansão do espectro de RMN ^{13}C de poli VIII (Figura 6.9 , pag. 101) os picos II e III são mais intensos que o pico I, sugerindo maior proporção das regiões tendo uma substituição simples de galactose entre 2 unidades de manose vizinhos com regiões nas substituídas. Para comparação, uma distribuição randômica de galactose pode dar as seguintes abundâncias : I(0,39); II (0,94); III (0,82) (Obtidas da integração dos picos I , II , III obtidos da figuras 6.8. e 6.9 , pag. 100 e 101) .

É provável que a ressonância do C-4 das unidades D-manosil substituídas e não substituídas sejam sensíveis não somente aos grupos vizinhos mais próximos mas também devido a outros detalhes estruturais como : razão galactose :manose , massa molecular , etc. .

Devido as substituições na D-manose no oxigênio ligado ao carbono 6, as posições correspondentes as absorções do C-6 e C-5 são deslocadas em relação à absorção da D-manose não substituída, a absorção do C-6 está mais desprotegido 6 ppm e a absorção do C-5 está mais protegida 1,6 ppm. O C-4 da D-manose também tem sua absorção mais desprotegida devido ele estar envolvido em uma ligação glicosídica. Os sinais de ressonância dos resíduos de D-manose não são tão próximos dos resíduos de D-galactose, isto é devido a alta mobilidade da D-galactose [GASDALEN e PAINTER, 1980].

Os sinais dos C-5 da manose não substituída (M5 ; 76,20 δ) e C-5 da manose substituída (G-M5 ; 74,62 δ) , além do C-6 da manose não substituída (M6 ; 61,76 δ) e C-6 da manose substituída (G-M6 ; 67,79 δ) , aparecem como uma linha larga . Isto pode ser explicado assumindo que a ressonância destes carbonos é sensível a existência ou não de unidades D-manosil ramificadas (Substituídas no oxigênio ligado ao carbono 6). A ressonância dos C-5 e C-6 da manose substituída correspondem a superposição dos sinais das tríades onde duas unidades vizinhas são substituídas (ver figura 6.11 , pag. 105) [MANZI e CEREZO, 1984; GRASDALEN e PAINTER, 1980] .

MANZI e colaboradores (1986) fizeram estudos de Galactomanana despolimerizadas tendo diferentes razões galactose:manose e consideraram a ressonância do C-6 da manose substituída. De acordo com este estudo o pico no campo mais baixo é originado da ressonância do C-6 de unidades intermediárias de 3 unidades de manose substituída com na tríade (a).

O sinal no campo mais alto é devido as 3 unidades substituídas onde apenas 1 açúcar intermediário é substituído (c).

O último pico representa a superposição dos sinais (b) onde somente 2 unidades seguidas são substituídas. No caso Galactomanana poli VIII, o C-6 da manose substituída os sinais estão bem resolvidas. A tríade (b) domina

as outras tríades (a e c) e produz alguma "insight" do tipo de arranjo das unidades de galactose. É claro que para uma caracterização e interpretação mais detalhada é preciso utilizar digestão enzimática [McCLEARS e Colaboradores, 1985] e o modelo precisa ser avaliado por estudos biosintéticos [REID e Colaboradores, 1995] .

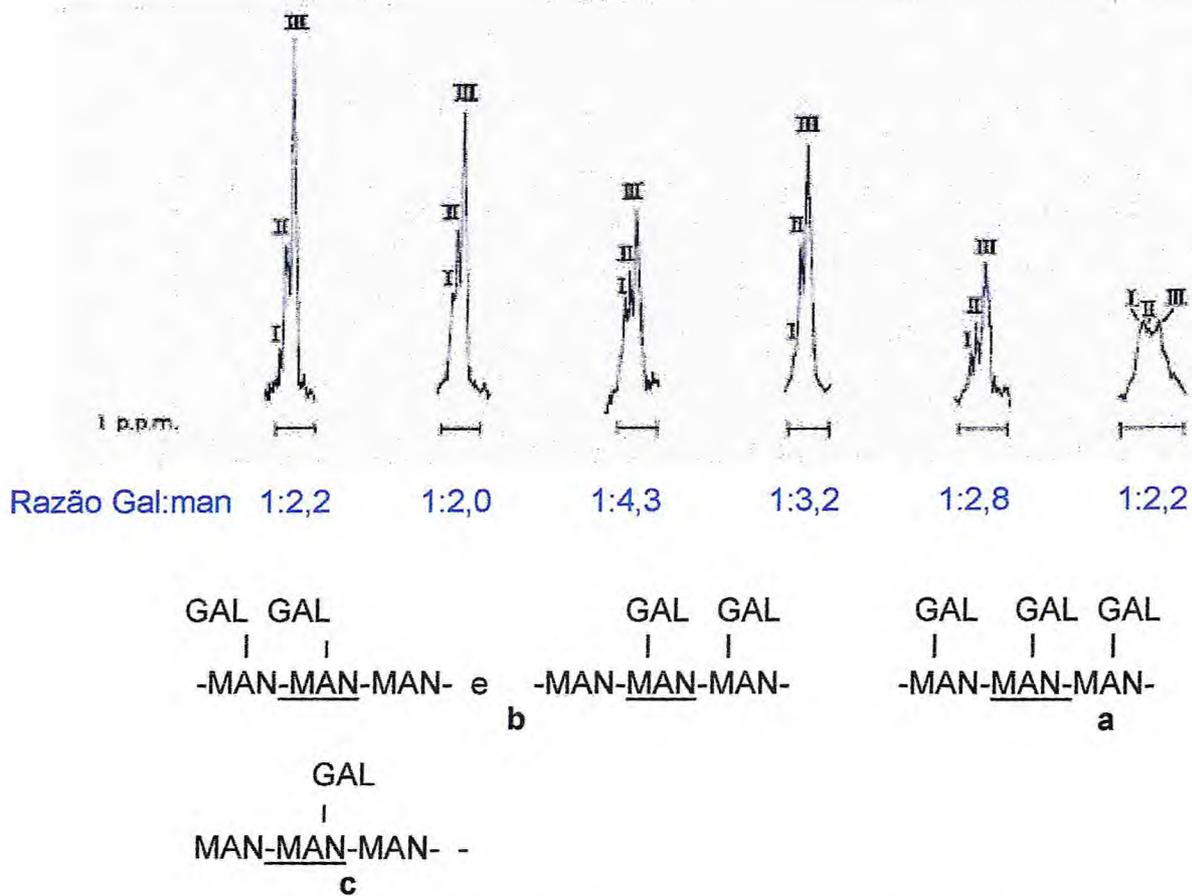


Figura 6.11. - Região espectral de RMN ¹³C do C-6 (Manose substituída) de várias amostras de galactomananas de *Gleditsia triacanthos* hidrolisadas com ácido ortofosforico [MANZI e CEREZO,1986] e as estruturas possíveis para a substituição na galactomanana.

A linha larga do C-6 [MANZI e CEREZO,1986] da manose não substituída pode ser representada pela superposição de sinais originados por IV, V e VI (para poli VIII ver figura 6.5 , pag. 95 e figura 6.12 , pag. 106) .

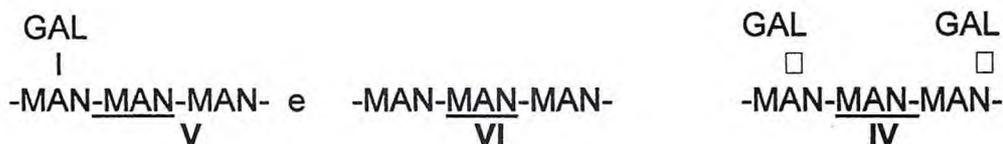


Figura 6..12 –Estruturas possíveis para a substituição na galactomanana .

Estudos integrados de correlação de RMN2D foram aplicados para seqüenciar oligossacarídeos e polissacarídeo [CASSELS e Colaboradores, 1990, PFEFFER e Colaboradores 1979] . Na presente investigação devido a simplicidade da estrutura da galactomanana obtida de *Dimorphandra gardneriana* nenhuma fragmentação química foi realizada antes da análise por RMN . Nestes sequenciamentos embora caracterizem galactomananas de várias origens por RMN sem nenhum tipo de fragmentação (Acetólises , Metilação , etc.) normalmente algum tipo de purificação da galactomanana foram realizados ou por cromatografia(GPC),ou precipitação(Complexação) ou ambos [IKUTA e Colaboradores , 1997; ABEYGUNAWARDANA e BUSH, 1990 ; RAMESH e Colaboradores ,2001] antes da análise por RMN .

A análise do espectro bidimensional COSY de poli VIII (Figura 6.13. e 6.14 , pag. 107 e 108) foi utilizado na determinação dos assinalamentos de ¹H. A análise dos espectros bidimensionais HMQC de poli VIII(figura 6.15. e 6.16 , pag.109 e 110), possibilitou relacionar os carbonos observados no espectro de RMN ¹³C com seus respectivos hidrogênios, resultando na Tabela 6.6 (pag. 113 e 114) , que juntamente com o espectro de RMN bidimensional HMBC de poli VIII (Figura 6.17 , pag. 116), permitiu a identificação da vizinhança de cada carbono . Estas análises permitiram um assinalamento de todos os sinais de ¹H e ¹³C de poli VIII,cujos deslocamentos químicos estão apresentados na Tabela 6.6 , pag.113 e 114.

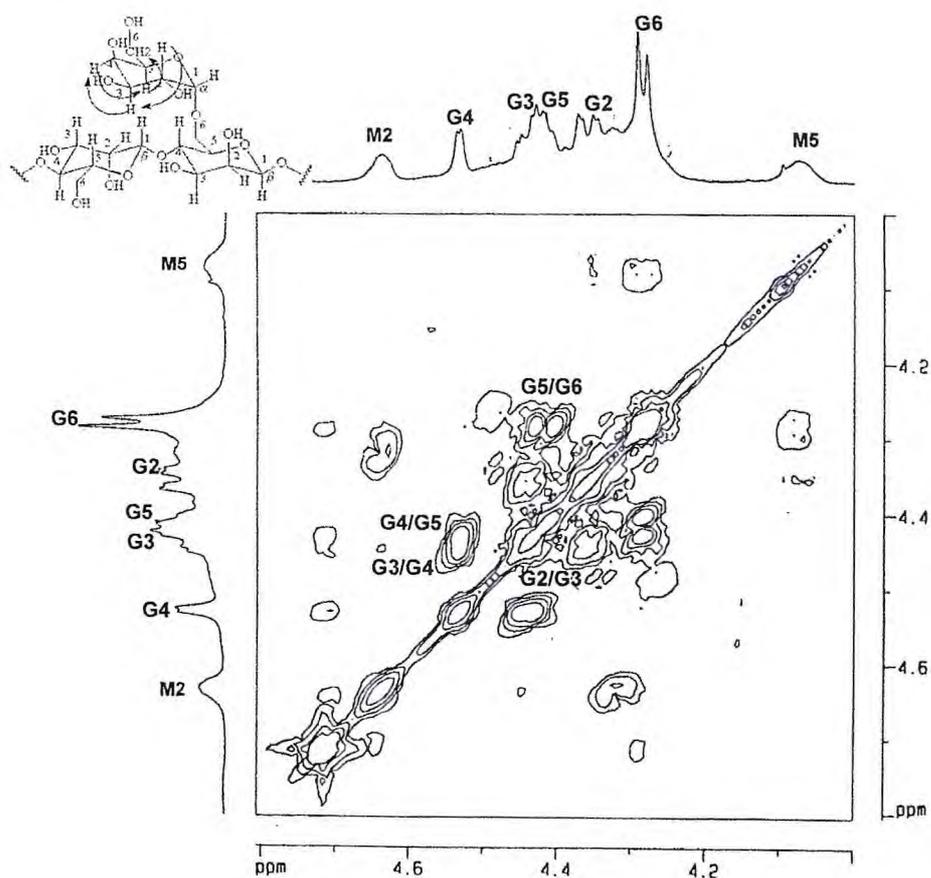


Figura 6.13 - Diagrama de contorno do espectro COSY de poli VIII [δ ; D₂O ; 500,13 MHz x 500,13 MHz ; TD = 1024 x 128 ; SW =10x10 ppm (F2 x F1) ; DS = 4 ; ns = 2 (F2)] ; SI =1024 x 256 (F2 x F1)].

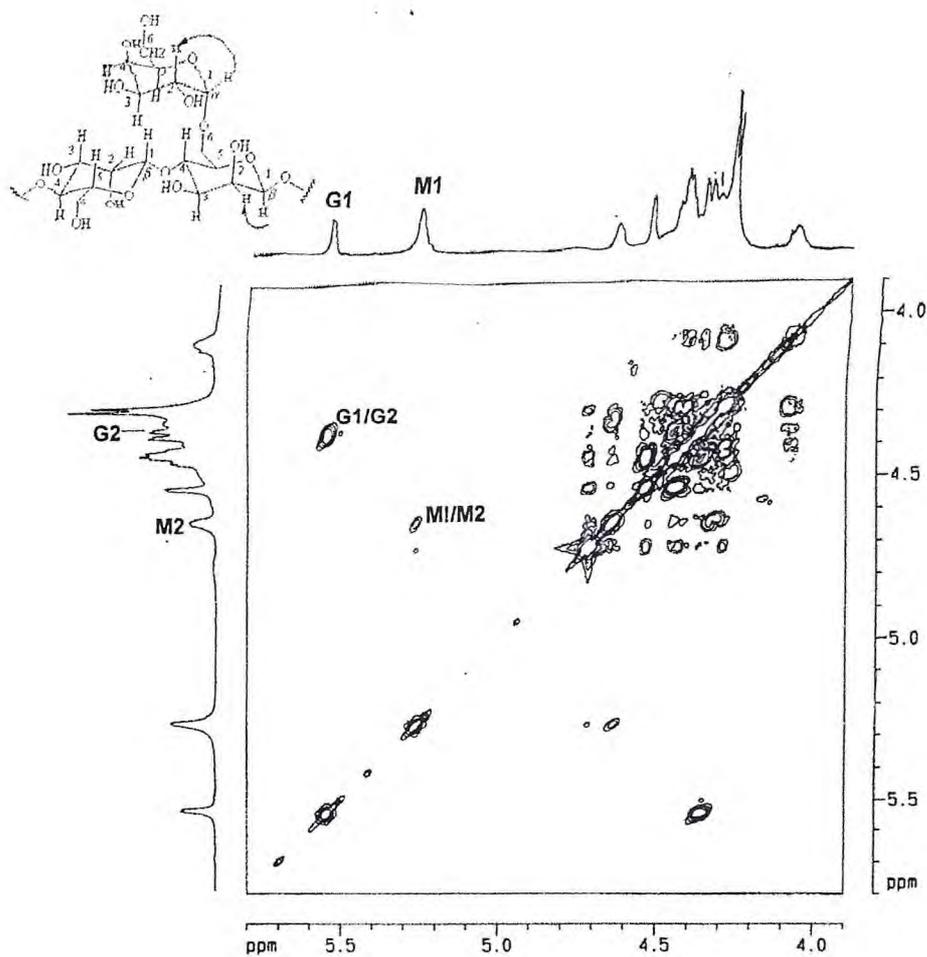


Figura 6.14 - Diagrama de contorno do espectro COSY de poli VIII [δ ; D₂O ; 500,13MHz x 500,13MHz ; TD = 1024 x 128 ; SW =10x10 ppm (F2 x F1) ; DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 256 (F2 x F1)].

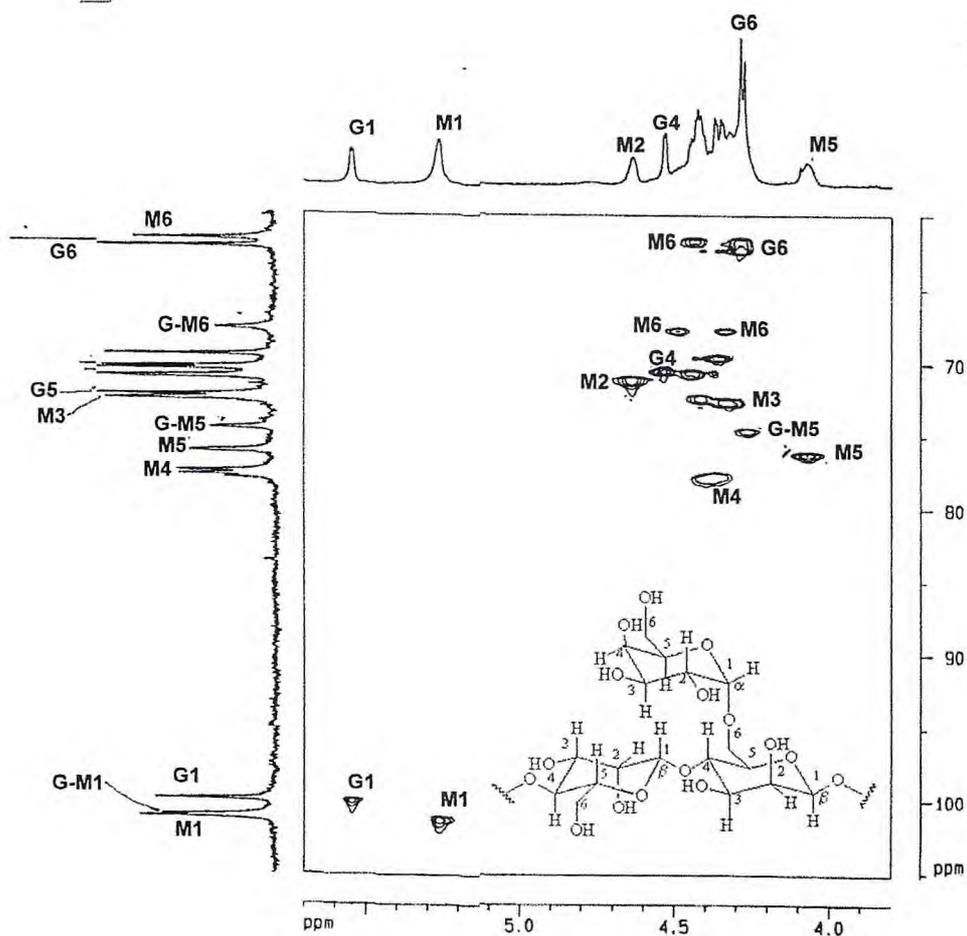


Figura 6.15 - Diagrama de contorno do espectro GS-HMCQ DE poli VIII Expansão entre 3,80 e 6,20 ppm [δ ; D₂O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW =10 167 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 512 (F2 x F1)].

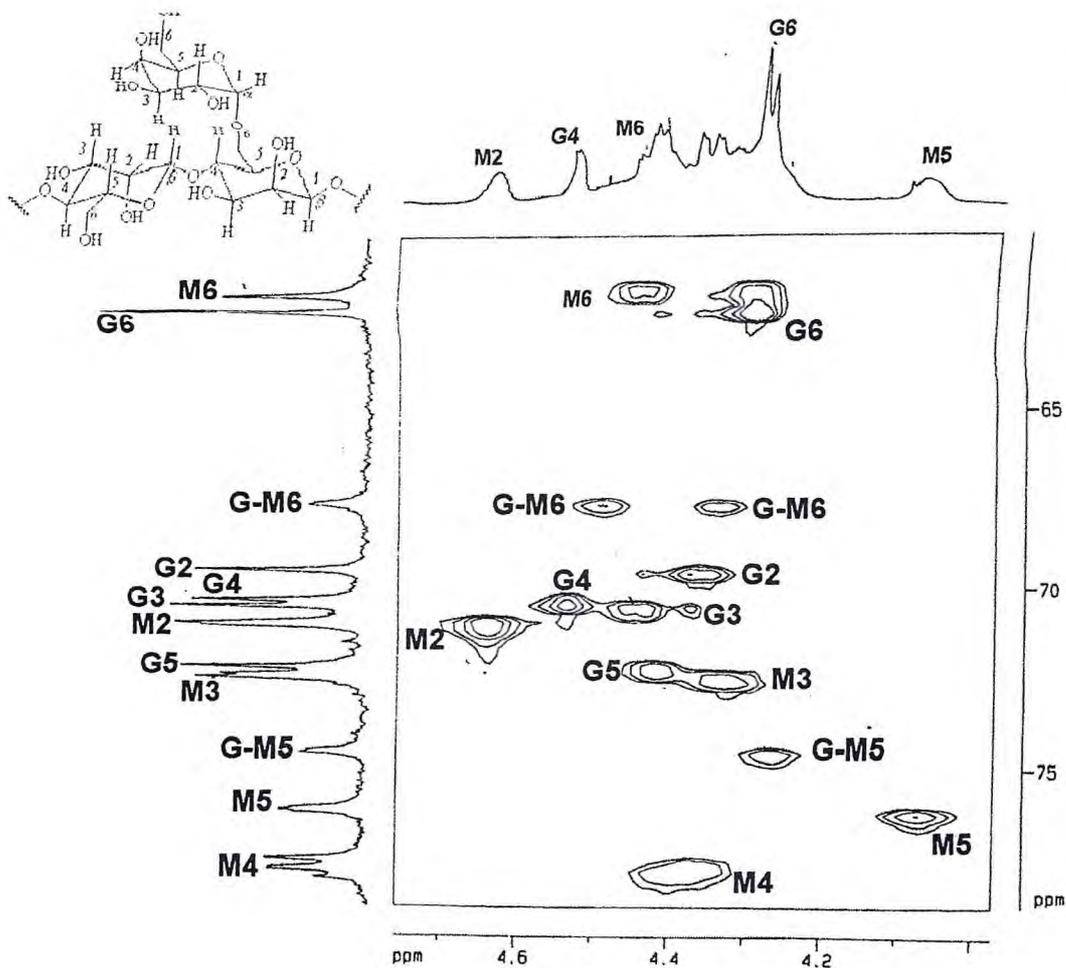


Figura 6.16 - Diagrama de contorno do espectro GS-HMCQ DE poli VIII Expansão entre 4,00 e 4,80 ppm [δ ; D₂O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW =10 167 ppm (F2 x F1) ; DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 512 (F2 x F1)].

Os assinalamentos de ressonância de ^1H da manose e galactose como também seus isômeros α e β foram comparados com dados da literatura(Ver tabela 6.5 , pag. 111)[BOCK e THOGERSEN,1982 , RAMESH e Colaboradores , 1979].

Tabela 6.5- Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a Galactomanana isolada de fenugreek(*Trigonella foenum-graecum* L.) de acordo com RAMESH e Colaboradores(1979) e BOCK e THOGERSEN(1982).

Deslocamentos químicos para a GALACTOSE

POSIÇÃO	RMN ^1H	RMN ^{13}C
1	5,02	100,20
2	3,83	70,00
3	3,92	70,90
4	4,00	70,00
5	3,90	72,65
6	3,76	62,80

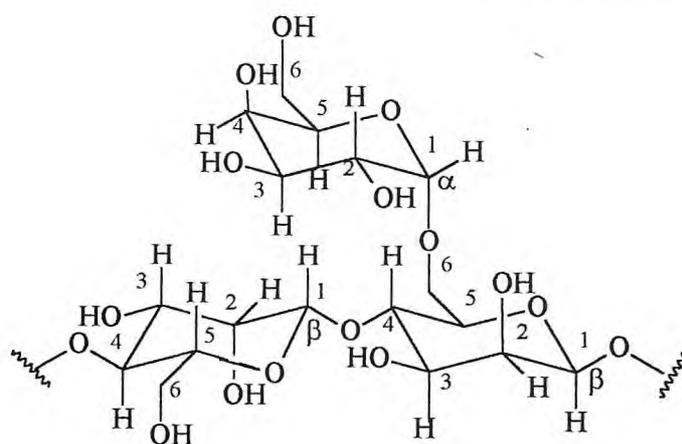


TABELA 6.5 Deslocamentos químicos para a MANOSE-Continuação

POSIÇÃO	^1H	^{13}C
1	4,75	101,80
2	4,13	71,50
3	3,79	73,00
4	3,87	78,30
5	3,74	75,00
6	3,96	68,00

A análise do GS-HMQC de poli VIII (Figura 6.15 e 6.16, pag 109 e 110) possibilitou observar o acoplamento C-H à uma ligação e relacionar os hidrogênios observados no espectro de prótons aos seus respectivos carbonos, conforme Tabela 6.6, pag 113.

A ressonância dos prótons anoméricos está bem separada, contudo, 2 sinais do H-6 da galactose estão sobrepostos, como indicado pelo RMN HMQC e sua intensidade no espectro de RMN ^1H . A região espectral dos carbonos anoméricos (δ 101,24 δ 101,09 e δ 99,91) e carbonos metilênicos (δ 61,76, δ 62,29 e δ 67,79) de ambas galactoses e manose estão bem documentados (ver figura 6.15, pag. 109). A posição de C-6 da unidade β -D-manopiranosil (M6) foi de especial interesse pelo seu potencial de informação a respeito do padrão de substituição.

Esta ressonância foi observada a δ 67,79 a qual corresponde a absorção no C-6 de β -D-manopiranosil (G-M6) substituída na 6-OH. Os assinalamentos seguintes dados para os resíduos de D-galactose estão de acordo com os espectros reportados da α -D-galactose monomérica na forma de piranose [DORMAN e ROBERTS, 1970, GRASDALEN e PAINTER, 1980]. KAPOOR e Colaboradores, em 1998 reportaram um desdobramento do C-4 do resíduo de β -D-manopiranosil na galactomanana

(M4) que se origina devido a probabilidade da presença de grupos vizinhos. Os deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C estão em concordância com os reportados para resíduos de manose substituída. [DAVIS e Colaboradores, 1995]. A Figura 6.17 (pag. 116) mostra o espectro de HMBC usado para sequenciamento. As conectividades C-H a longa distância dos resíduos de glicosil estão claros. De acordo com o espectro o ^1H (GAL; G1) a δ 5,27 está acoplado à ressonância do ^{13}C a 67,29(C-6 da β -man.; G-M6). Enquanto que H-4 da man a δ 4,37 (M4) está acoplado à ressonância ^{13}C a δ 101,24(C1 da β -man;M1). Isto é suportado por outra absorção a δ 4,46 (H-6 de β -man ; M6) a qual esta acoplado à ressonância do ^{13}C a δ 99,99 (C-1 β -gal.). Assim as ligações anoméricas interresiduais, β -man-(1 \rightarrow 4)- β -man e α -gal(1 \rightarrow 6)man estão claras.[RAMESH e Colaboradores,2001](ver acoplamento nas figura 6.17,(pag. 116) .

TABELA 6.6 Dados obtidos do diagrama do contorno do espectro GS-HMQC de poli VIII (δ , 500 , 13MHz x 125,77 MHz (F2 x F1):D2O.

Deslocamentos químicos para a GALACTOSE

POSICÃO	RMN ^1H	RMN ^{13}C
1	5,58	99,99
2	4,35	69,61
3	4,45	70,64
4	4,55	70,47
5	4,42	72,32
6	4,29	62,29

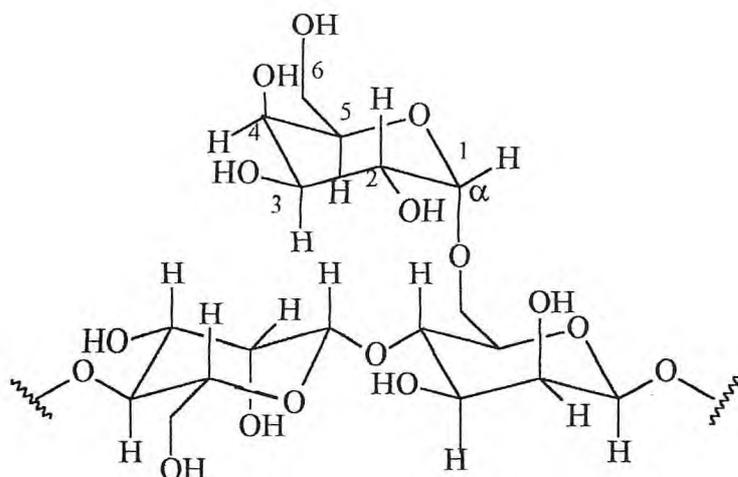
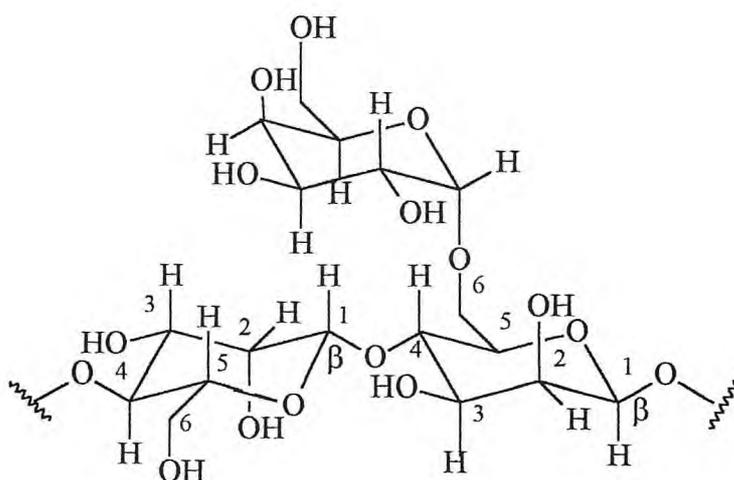


TABELA Deslocamentos químicos para a MANOSE

POSIÇÃO	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
1	5,27	101,09 e 101,24
2	4,64	71,12
3	4,32	72,62
4	4,37	77,56, 78,04 e 77,56
5	4,08	76,20
6	4,46	61,76



A análise do espectro de RMN de correlação homonuclear NOESY(ver figura 6.18 , pag. 117) permitiu identificar o arranjo espacial do grupo ligado ao C-1 da manana, a partir do acoplamento dipolar entre os prótons metínicos axial em δ 5,27 e os prótons metínicos em δ 4,45 e em 4,55 ligados respectivamente aos carbonos 3 e 5 da galactose, e o próton metínico em δ 4,37 ligado ao carbono 1 da manose, e os prótons metínicos em δ 4,32 e 4,08 ligados respectivamente aos carbonos 3 e 5 da manana.

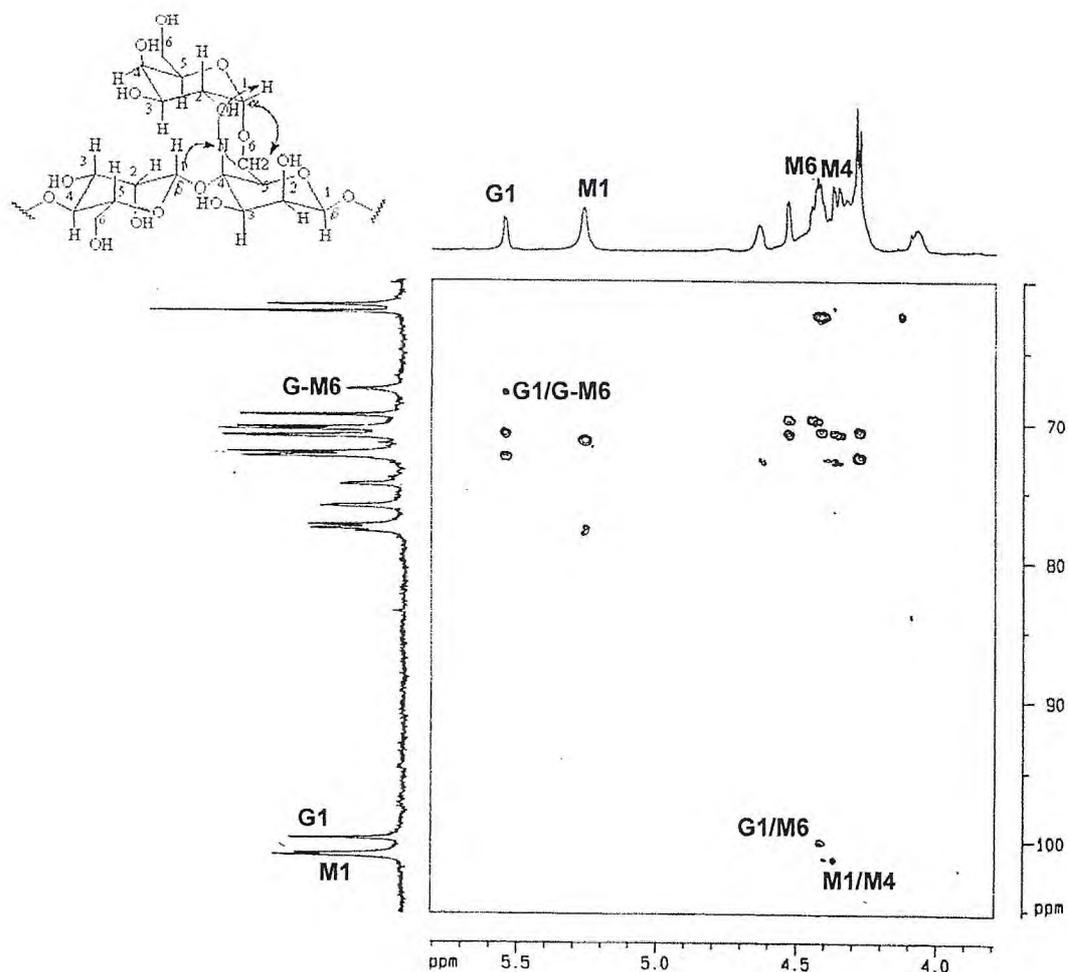


Figura 6.17 - Diagrama de contorno do espectro GS-HMBC de poli VIII e Representação dos acoplamentos G1/M6 , M1/M4 e G1/G-M6 do GS-HMBC; Expansão da região 60 a 110 ppm do espectro de poli VIII , e Representação dos acoplamentos observados no GS-HMBC[δ ; D₂O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW =10 167 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 512 (F2 x F1)].

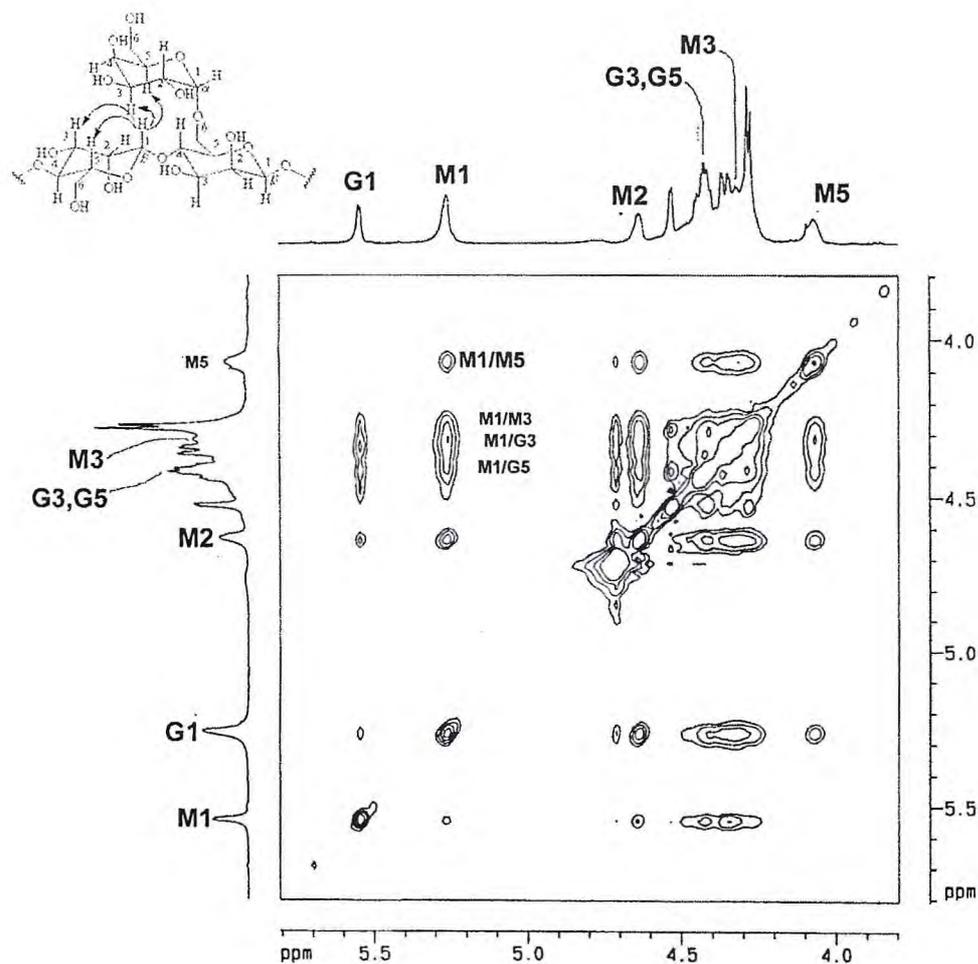


Figura 6.18 - Diagrama de contorno de espectro GS-NOESY de poli VIII e Representação dos acoplamentos dipolares M1/M5 , M1/M3 e M1/G3 e M1/G5 do GS-NOESY; Expansão da região 3,8 a 5,8 ppm do espectro de poli VIII, e representação dos acoplamentos dipolares observados do GS-NOESY [δ ; D₂O ; 500,13 MHz 500,13 ; TD = 2048 x 512 ; SW = 6,122 ppm (F2 x F 1) ; DS =16 ; ns = 4 (F2) ; SI = 1024 x 1024 (F2 x F 1)]

6.2.2. – Início da formação do gel de Poli VIII por RMN¹³C

Através da comparação do espectro de RMN ¹³C de poli VIII (figura 6.22, pag. 120) realizado a 353°K, com poli-XII que é o mesmo polissacarídeo mas com os espectros realizados a 303 K e a 323 K (figuras 6.20 – 6.21, pag. 119-120) e comparado ao espectro de poli VIII obtido no estado sólido por espectroscopia de RMN ¹³C (CP MAS) [SCHAEFER e STESSKAL, 1979] (figura 6.19, pag. 119) podemos observar que as absorções dos C-1 e C-4 da β-(1→4) D-mananas da galactomana (M1 e M4) estão mais desprotegidos no estado sólido comparados com as posições dos picos no estado gel e líquido. Um aspecto dos espectros de RMN ¹³C é que a intensidade dos picos e o deslocamento químico variam com a temperatura. Uma perda substancial da área dos picos é devido a intumescimento insuficiente a baixa temperatura. A causa do alargamento das linhas é interpretado em termos da restrição da mobilidade da cadeia.

Comparando os espectros de RMN ¹³C de poli VIII (figura 6.22, pag. 120), com poli XII (figura 6.20 – 6.21, pag. 119 e 120) observamos que a mudança súbita da intensidade dos picos ocorre a temperatura entre 303K e 323K correspondente ao início da formação do gel.

Os deslocamentos químicos dos C-1 e C-4 da (1→4) β-D-mananas são muito sensíveis a transição conformacional da cadeia da galactomanana de hélix para espiral randômica, como visto pelo deslocamento para campo mais alto dos sinais do ¹³C [SAITO, 1981].

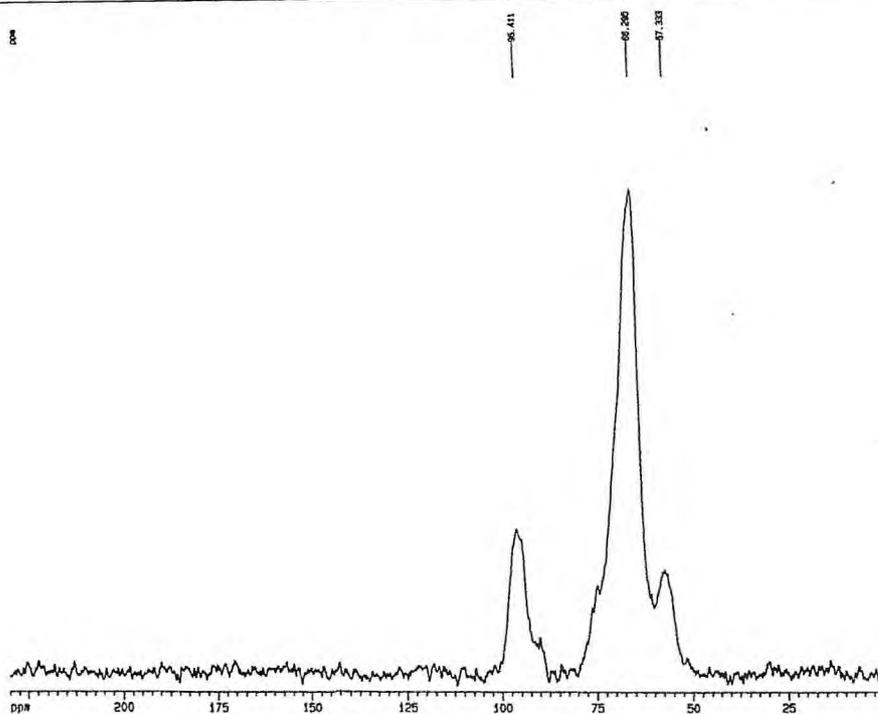


Figura 6.19 - Espectro de RMN ^{13}C por CP MAS [δ ; 125,77 MHz] de poli VIII

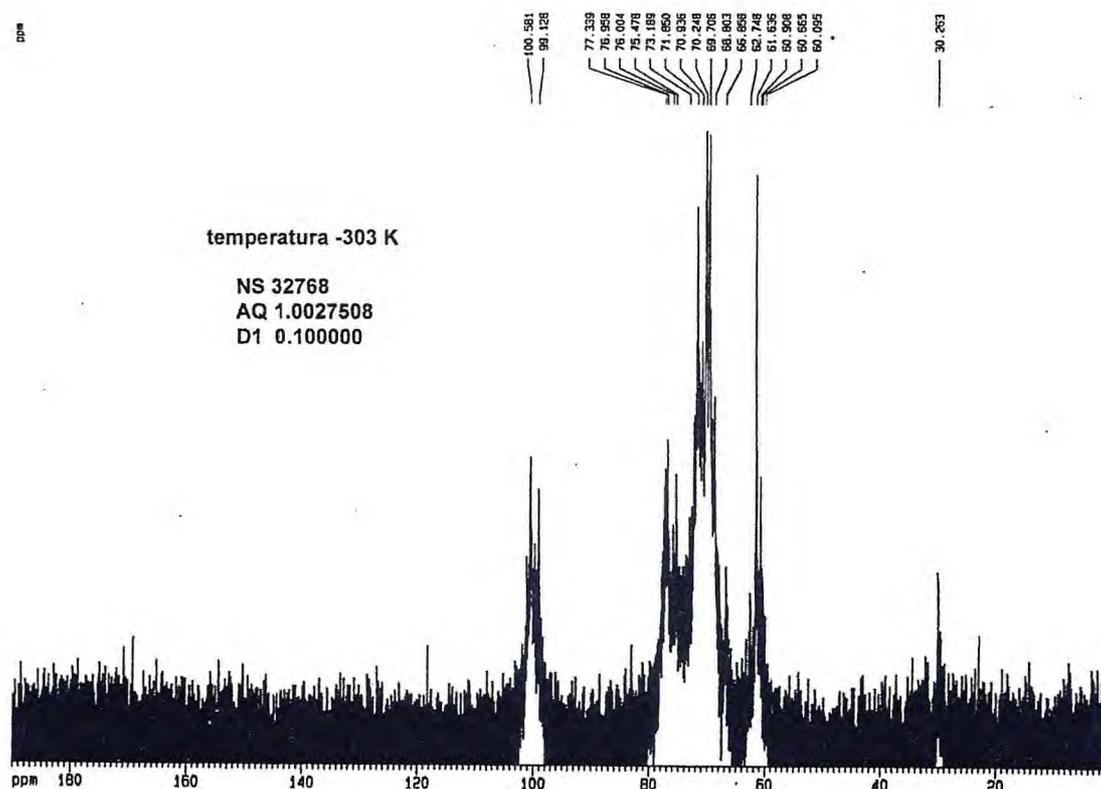


Figura 6.20 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli XII [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]

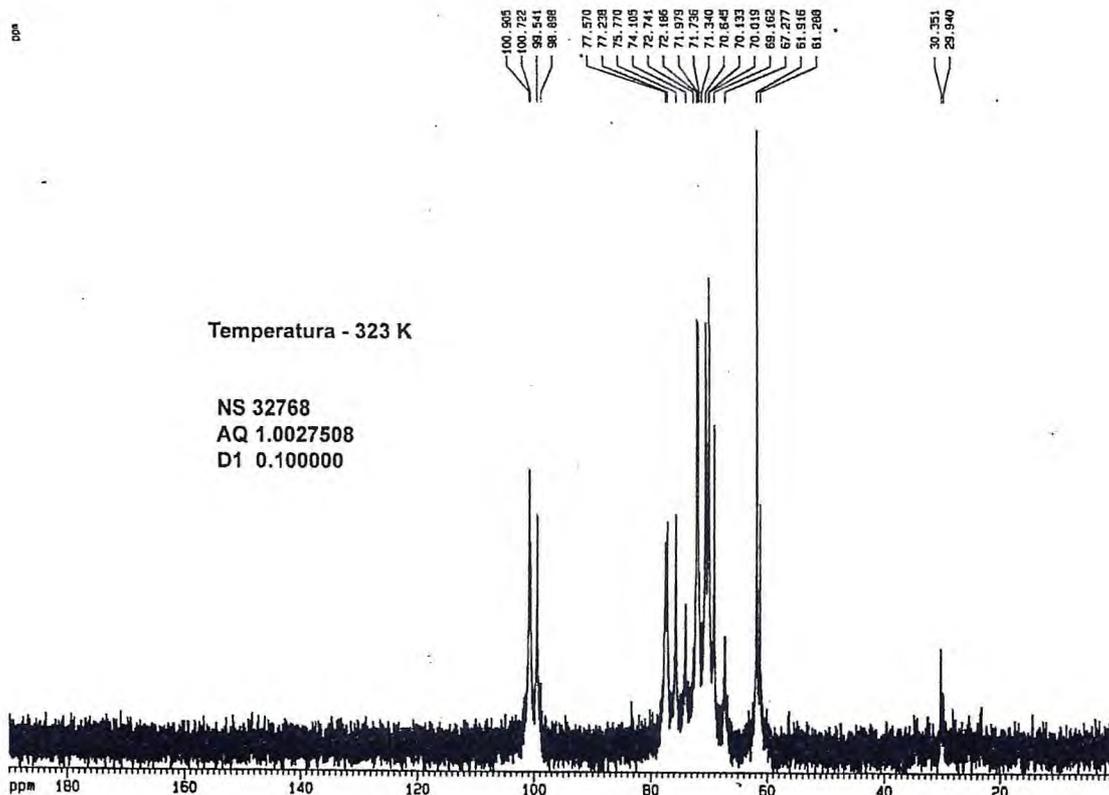


Figura 6.21 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli XII [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]

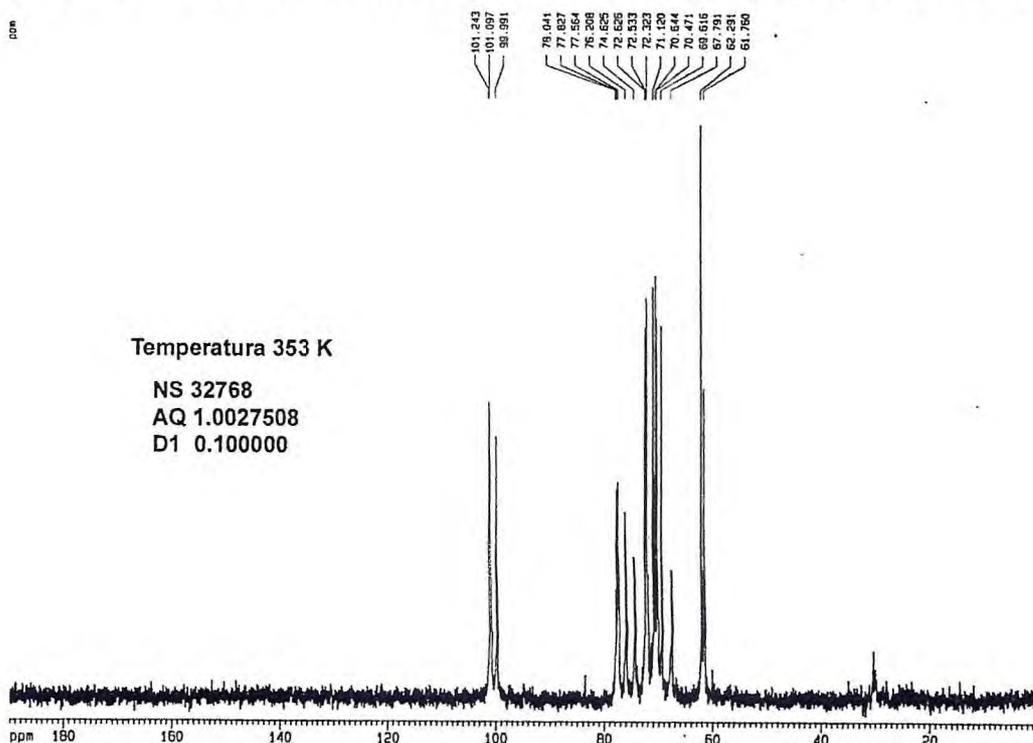


Figura 6.22 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de poli VIII [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]

6.3 – Comparação dos métodos de extração das galactomananas por RMN ¹³C

Utilizando técnicas de RMN¹H e RMN¹³C unidimensional e bidimensionais foi possível fazer o sequenciamento de polissacarídeos e oligossacarídeos sem que seja necessário nenhuma fragmentação química. Ainda assim necessitamos que o produto a ser analisado possua uma certa pureza (mesmo que o polímero possua variação na sua massa molar), e é necessário que este polímero não possua outros carboidratos que dificultem a análise por RMN. Como podemos observar ao comparar poli VIII (figuras 6.1 – 6.5 , pag 94,95 e 97), poli V(figuras 6.32–6.34,pag.126 e 127),poli VI(figuras 6.30 – 6.31, pag. 125),poli XI(figuras 6.27-6.29,pag. 123 e 124) e poli X(figuras 6.23- 6.25,pag. 121 e 122) observamos que somente poli VIII, poli XI apresenta uma pureza satisfatória para podemos fazer o sequenciamento completo por RMN ¹H e ¹³C unidimensional e bidimensionais sem a utilização de fragmentação .

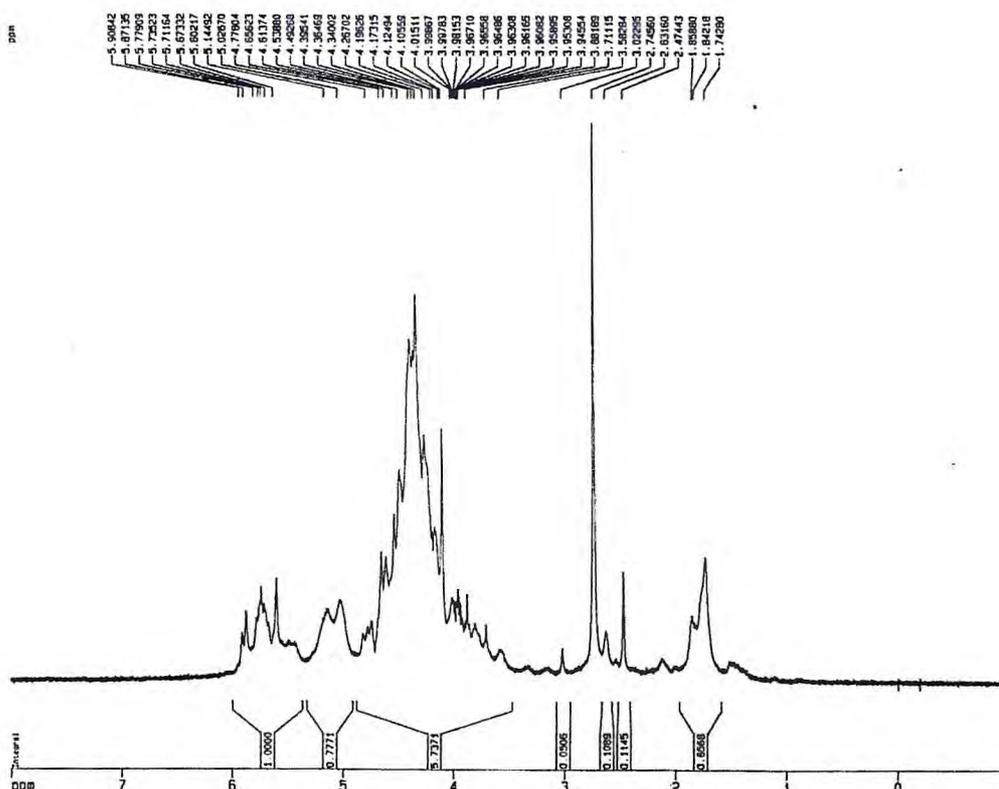


Figura 6.23 - Espectro de RMN ¹H de POLI X [δ ; D₂O ; 500,13 MHz]

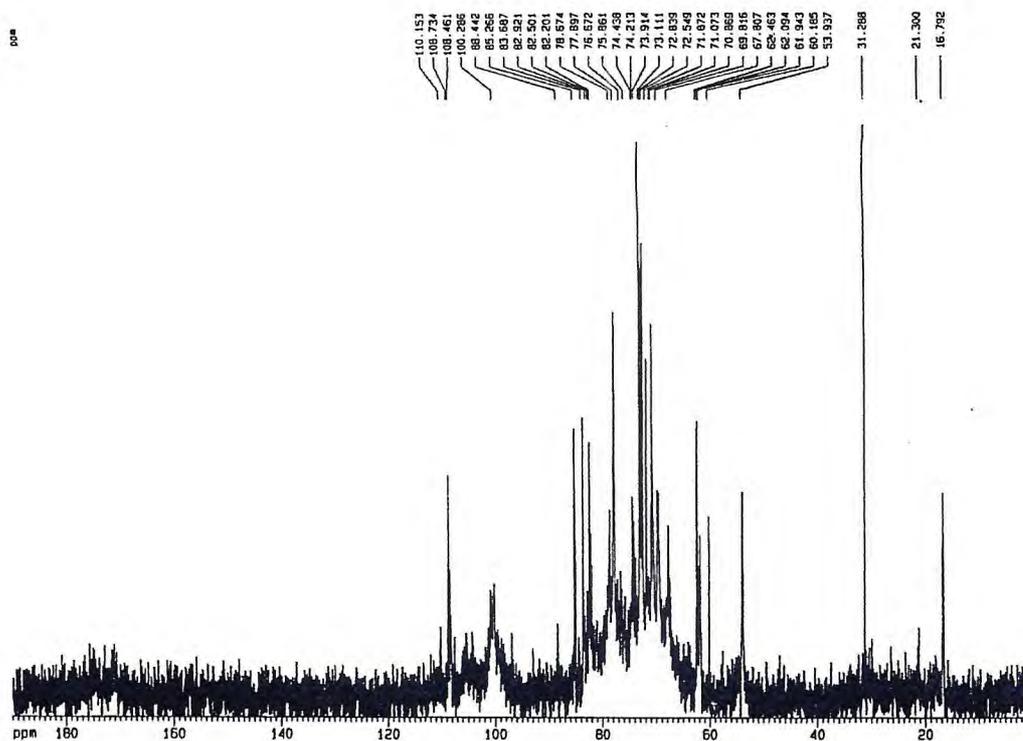


Figura 6.24 - Espectro de RMN ¹³C-BB de poli X [δ ; D₂O ; 125,77 MHz]

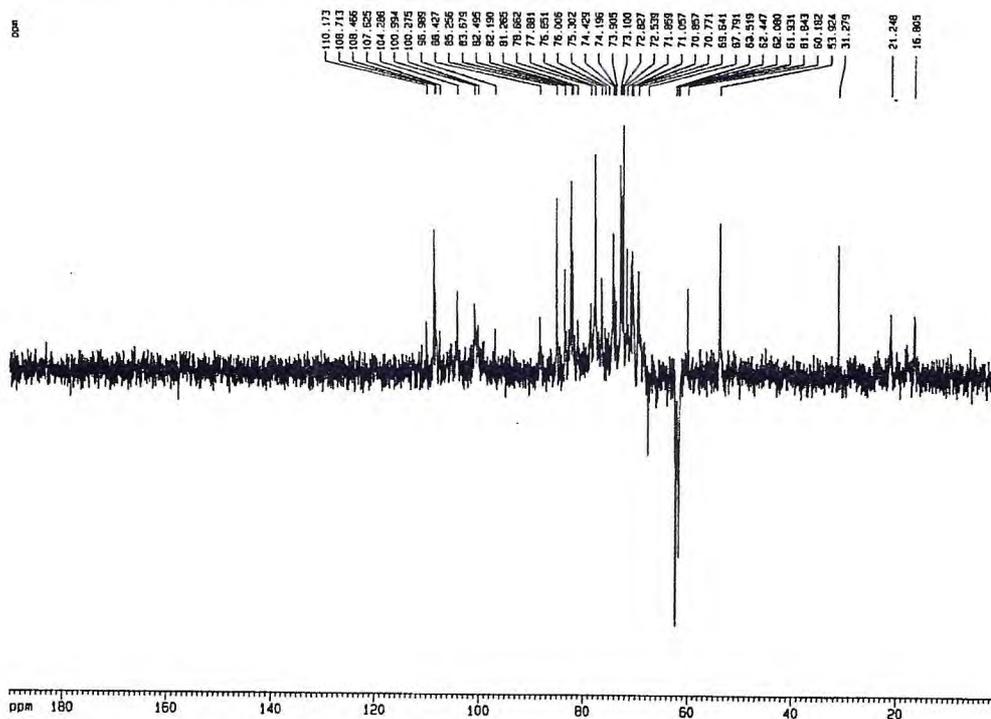


Figura 6.25 Espectro de RMN ¹³C-DEPT(135) de poli X [δ ; D₂O; 125,77 MHz]

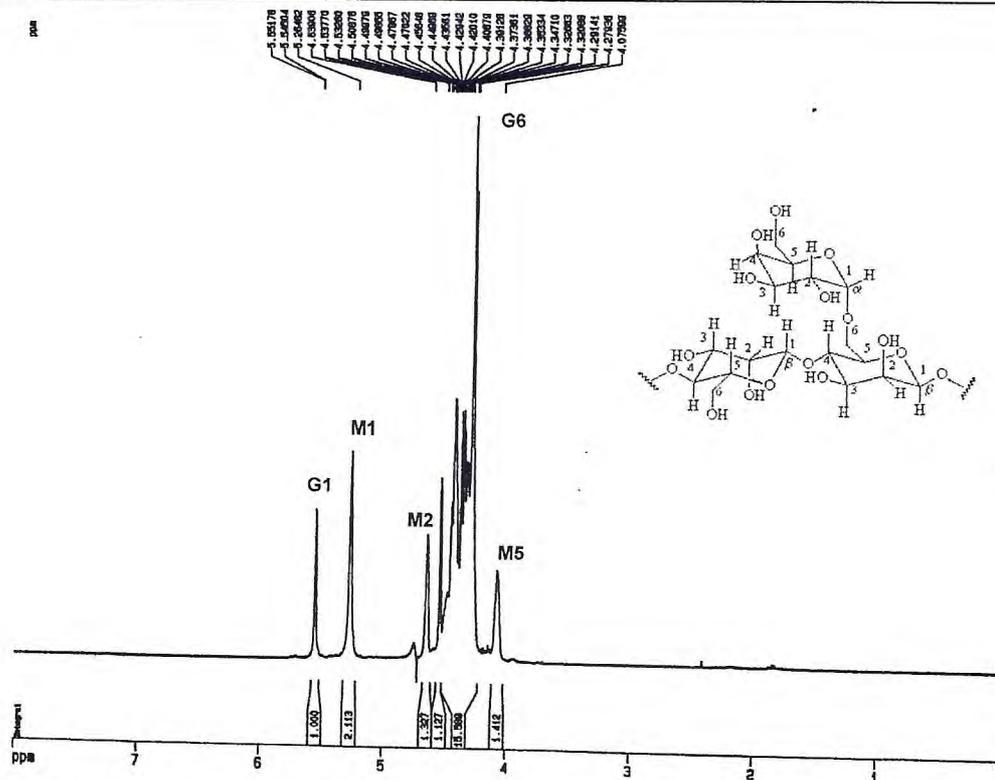


Figura 6.26 - Espectro de RMN ¹H de poli XI [δ ; D₂O ; 500,13 MHz]

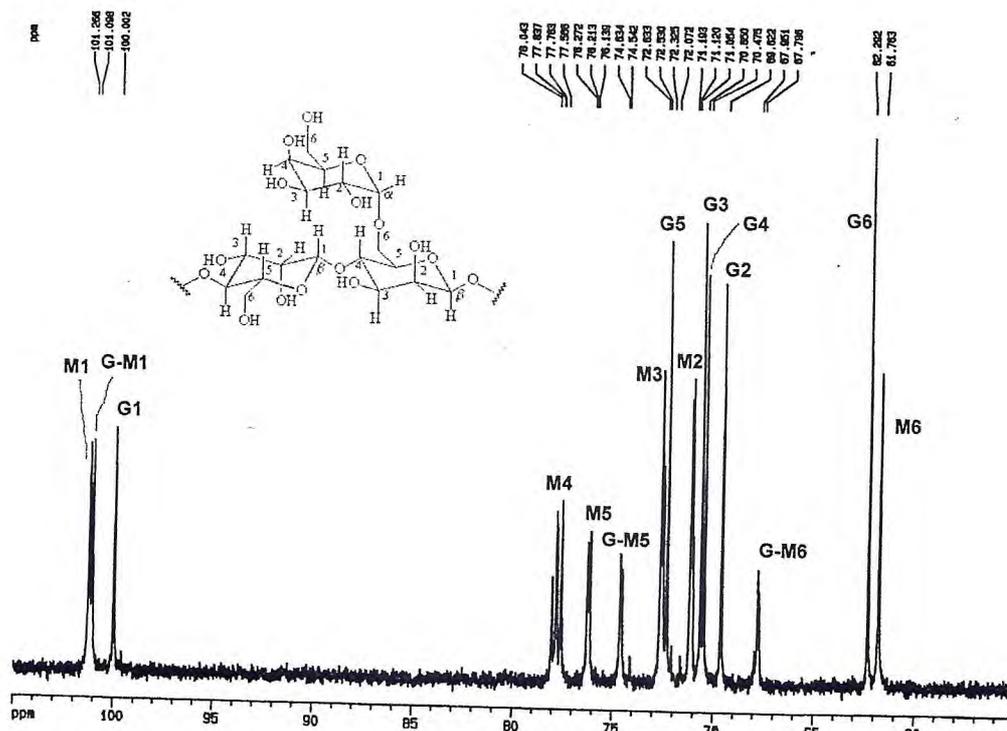


Figura 6.27 - Espectro de RMN ¹³C-BB de poli XI [δ ; D₂O ; 125,77 MHz]

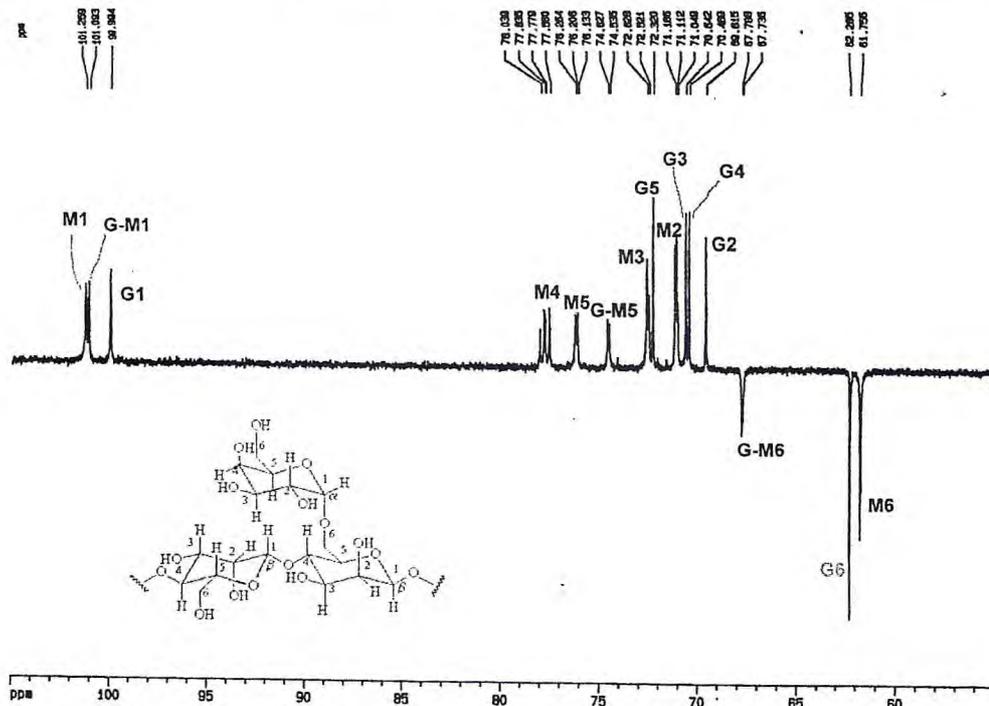


Figura 6.28 - Espectro de RMN ¹³C-DEPT(135) de poli XI [δ ; D₂O; 125,77 MHz].

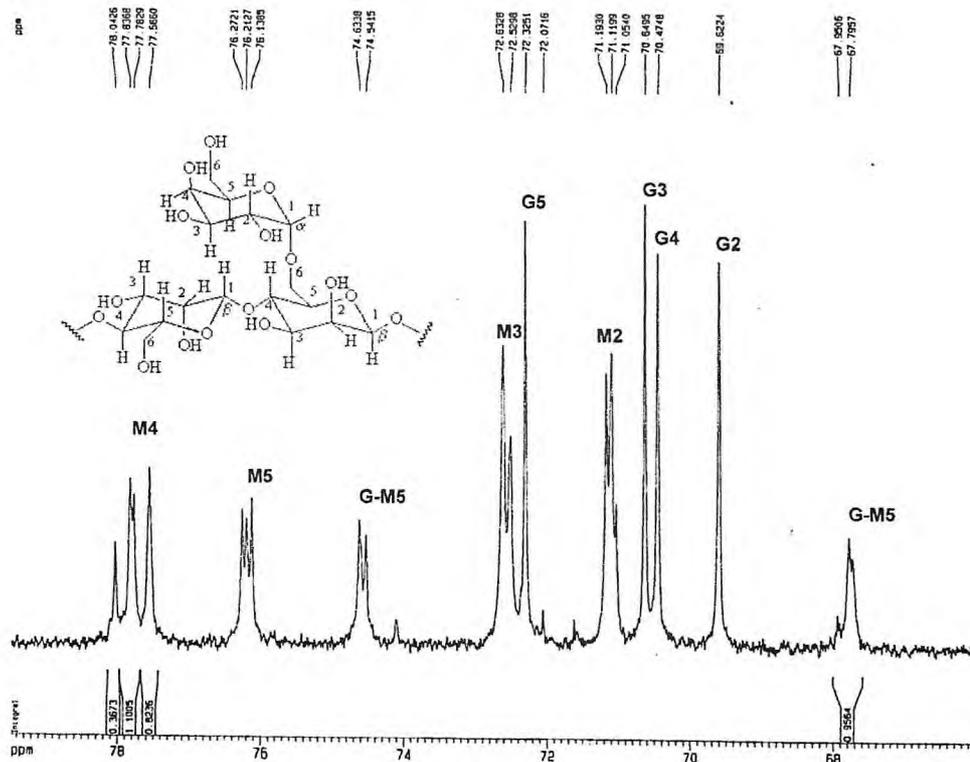


Figura 6.29 - Espectro de RMN ¹³C-BB de poli XI - Expansão de δ 67 a 79 [δ ; D₂O ; 125,77 MHz].

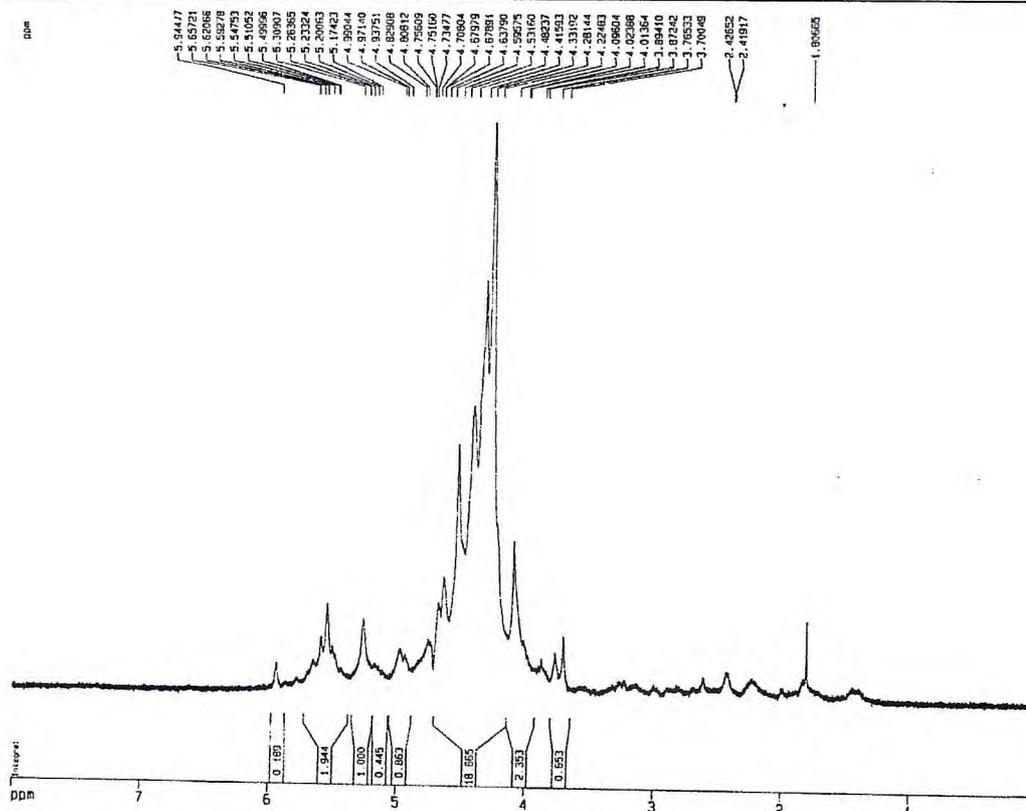


Figura 6.30 - Espectro de RMN ¹H de poli VI [δ ; D₂O ; 500,13 MHz].

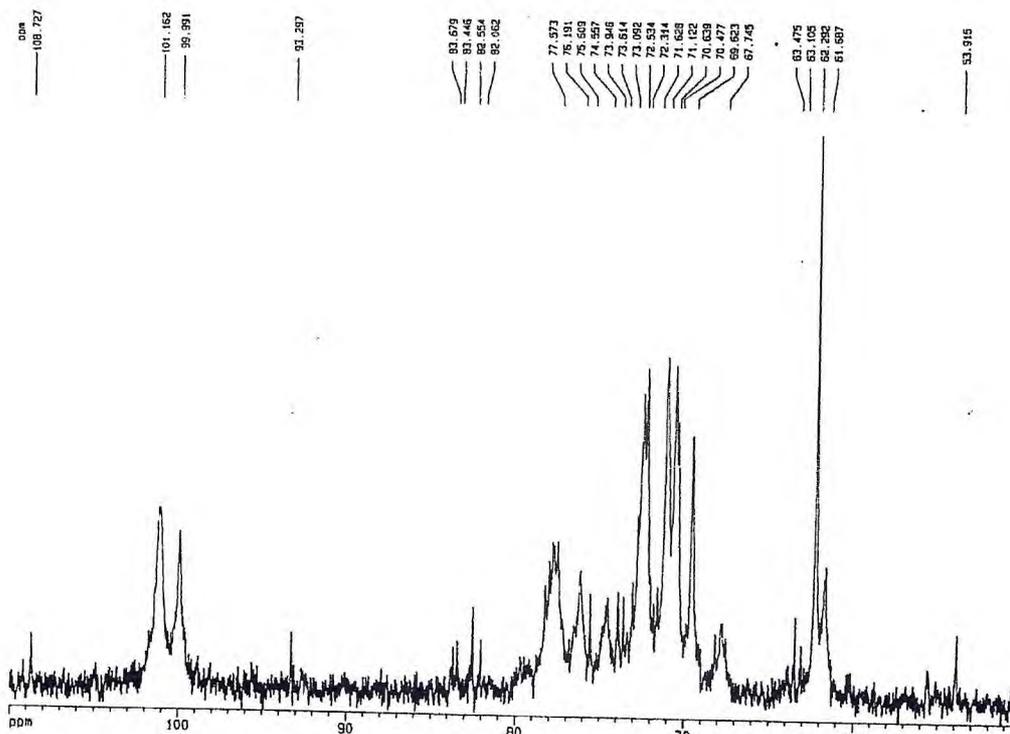


Figura 6.31 - Espectro de RMN ¹³C-BB de poli VI [δ ; D₂O ; 125,77 MHz].

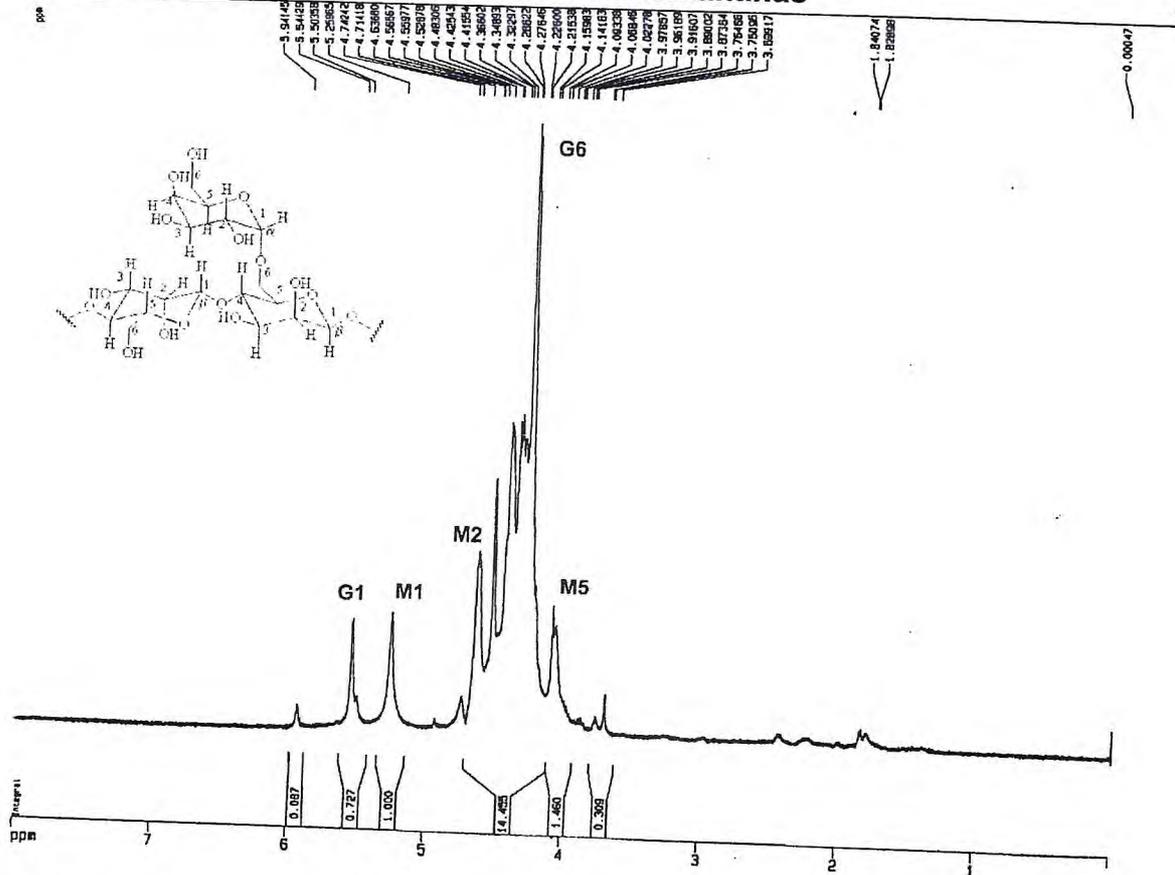


Figura 6.32 - Espectro de RMN ¹H de poli V [δ ; D₂O ; 500,13 MHz].

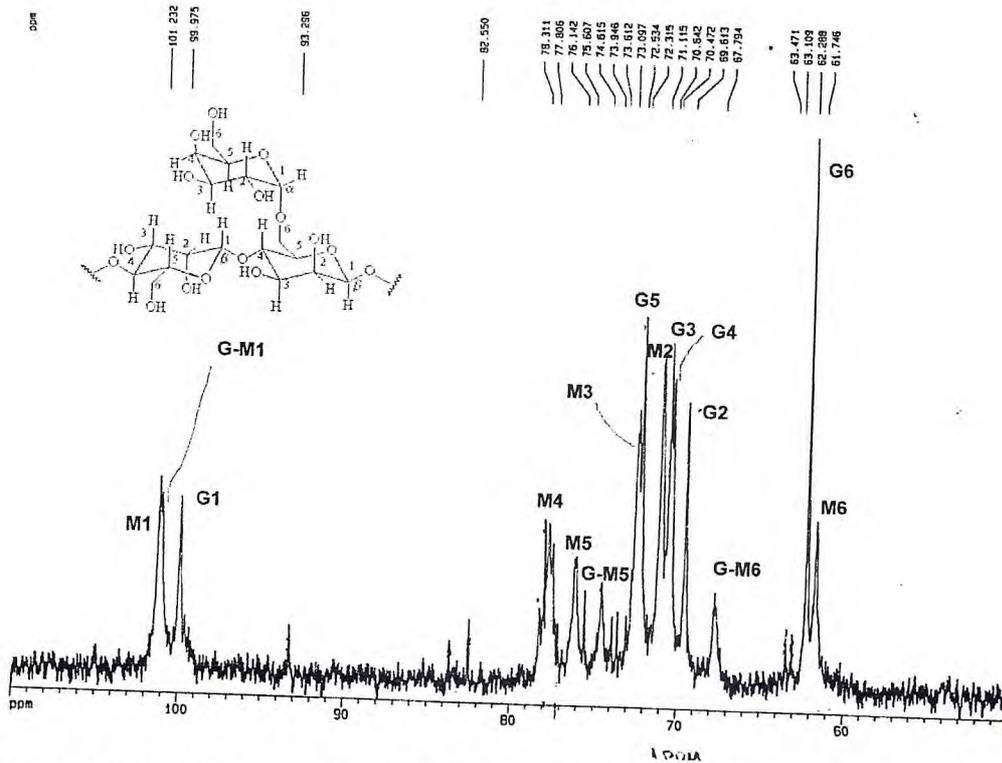


Figura 6.33 - Espectro de RMN ¹³C-BB de poli V [δ ; D₂O ; 125,77 MHz].

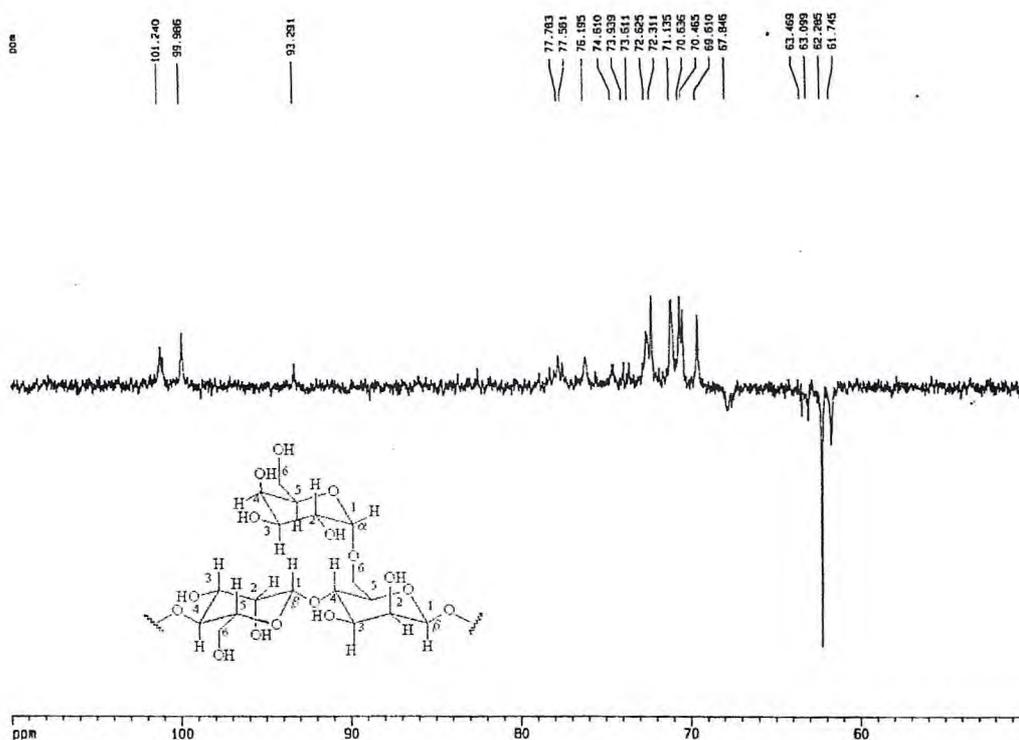


Figura 6.34 - Espectro de RMN¹³C-DEPT(135) de POLI V [δ ; D₂O; 125,77 MHz]

6.4 –Composição e sequenciamento de galactomananas utilizando degradação preliminar da amostra .

Várias técnicas para a determinação da distribuição de ligações(1→6) de grupos laterais de α-D-galactopiranosil ao longo de β-D-mananose ligadas(1→4) em galactomananas[DEA e MORRISON,1975],de sementes de legumes tem sido citados mas métodos diferentes produzem também resultados diversos[PALMER e BALLANTYNE,1950;COURTOIS e DIZET, 1970;McCLEARY e MATHESON,1975;McCLEARY,1978;BAKER e WHISTLER,1975;HOFFMAN e SVENSSON,1978;HOFFMAN e COLABORADORES,1976;PAINTER e COLABORADORES,1979; GONZALEZ, 1978]. Parte da dificuldade deve ser devido a variação na estrutura entre diferentes amostras da galactomanana, isoladas da mesma espécie .

Sabe-se que, as gomas Guaran e Locust-bean podem ser divididas com base na sua solubilidade em água, em frações de diferentes composições, assim as condições de extração devem ser importantes. Em adição há ainda a variação entre as diferentes variedades de uma mesma espécie. Investigações destes pontos requerem o desenvolvimento de métodos simples e rápidos de análise estrutural que sejam acessíveis para análises de rotina.

A chave para o sucesso na espectroscopia de galactomananas provou ser uma despolimerização inicial e parcial, a qual diminui a viscosidade das soluções, aumentando sua solubilidade. A escolha do ácido ortofosfórico concentrado foi ditado pela sua capacidade de dissolver a galactomanana, e a facilidade da remoção por extração com éter. Em adição, este ácido aumenta a taxa de hidrólise de ligações β -D-manopiranosídicas, em relação as ligações α -D-galactopiranosídicas através do aumento na magnitude do efeito anomérico [PAINTER, 1975]. Sob estas condições foi possível diminuir o grau de polimerização ($g.p.n$) da amostra para 20-40, sem nenhuma variação na composição manomérica [GRASDALEN e PAINTER, 1980].

Em um artigo publicado em 1980, Grasdalen e Painter fazem um estudo da composição e seqüenciamento em galactomananas de sementes de legumes por RMN, utilizando uma técnica de despolimerização, por tratamento da galactomanana com ácido ortofosfórico e assim um bom espectro de RMN ^1H e ^{13}C pode ser obtido. O método de extração poli V como já tínhamos discutido produziu uma galactomanana impura conforme os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (figuras 6.32–6.34, pag. 126 e 127) e análise por hidrólise seguido de cromatografia (Ver parte experimental 8.5.3.6 e 8.5.3.7, pag. 215 e 216) para determinar os açúcares presentes.

Ao aplicarmos esta técnica de despolimerização a poli V observamos que o produto obtido(desp-I) apresentou, ao ser analisado, pureza semelhante a poli VIII e poli XI (padrão). Pela comparação dos espectros de poli V(figura 6.32 – 6.34 , pag. 126 e 127) com desp-I(figura 6.36 – 6.48;produto de despolimerização;pag. 131-141) observamos que a ressonância dos prótons anoméricos e dos 12 átomos de carbono foram completamente resolvidos e facilmente identificados, e que as razões correspondentes das áreas dos picos (dos prótons e carbonos anoméricos) indicam a composição manomérica (razão gal:man;pelo espectro de RMN¹H 1:1,87, e pelo espectro de RMN¹³C 1:3,34). Observamos que este procedimento mais que uma despolimerização é uma purificação por recristalização da galactomanana, uma vez que quando comparamos os espectros de RMN de poli V (figura 6.32 – 6.34 , pag 126 e 127) com desp-I (figura 6.35 – 6.49 , pag. 131-141) os carboidratos contaminantes e outras impurezas de poli V não estão presentes em desp-I, este produto é mais puro que poli VIII(figura 6.1 – 6.15 , pag. 94,95,97, 107-110,116 e 117),e muito próximo de poli XI(figura 6.26 – 6.29 pag. 123 e 124;GOMA LOCUST BEAN PURIFICADA). Com desp-I foi possível, como para poli VIII foi possível obter todos os espectros de RMN¹H,RMN¹³C e bidimensionais COSY,HMBC,HMQC,NOESY,TOCSY(ver figura 6.35–6.49,pag. 94,95,97, 107-110,116 e 117) e fazer o seu sequenciamento .

Os espectros de desp-I são semelhantes aos discutidos para poli VIII , sendo assim não há necessidade da sua determinação estrutural . A análise do Espectro de Correlação Homonuclear TOCSY (ver figura 6.48 e 6.49 , pag 140 e 141) de desp-I permitiu identificar os acoplamentos dos prótons por transferência de magnetização. Assim podemos observar o acoplamento dos hidrogenios ligados ao carbono 1 da galactose (G1) com G2 , G3, G5, G4. (ver figura 6.48) além do acoplamento dos prótons ligados ao carbono 5 da manose (M5) com M3, M4, M6, M2, (ver figura 6.49)

6.5 Determinação da relação galactose:manose de poli VIII

A hidrólise da goma da semente de *Dimorphandra gardneriana* (poli VIII) com solução de ácido trifluoroacético permitiu a identificação por cromatografia em papel da galactose (RF 0,15) e manose (RF 0,21; ver parte experimental 8.5.3.6 e 8.5.3.7, pag. 215 e 216); A razão dos constituintes dos monossacarídeos foi determinada por CGL [KAPOOR e Colaboradores, 1995].

A goma purificada (poli VIII) após hidrólise, redução e acetilação foi analisada por CGL/FID para determinar a razão galactose/manose, e o resultado obtido foi de 1:2,85 (ver parte experimental 8.5.3.8, pag. 216; tabela 8.1 (pag. 217) e figura 8.1 (pag. 218) [SING e Colaboradores, 2003]).

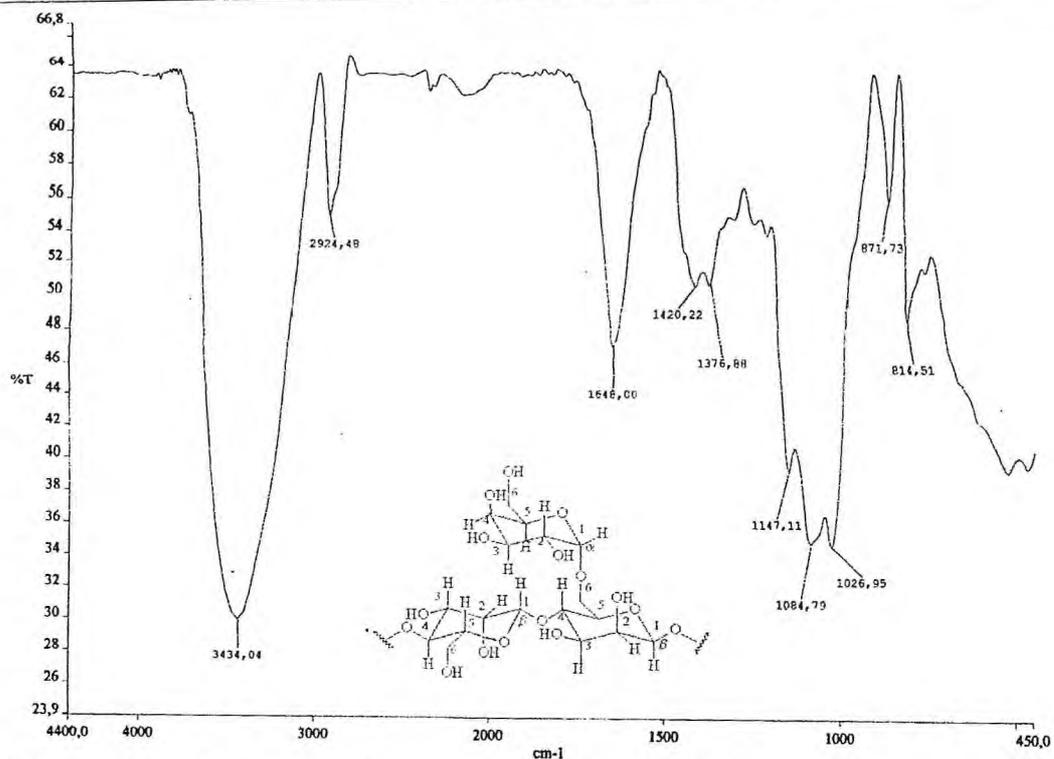


Figura 6.36 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] de desp I .

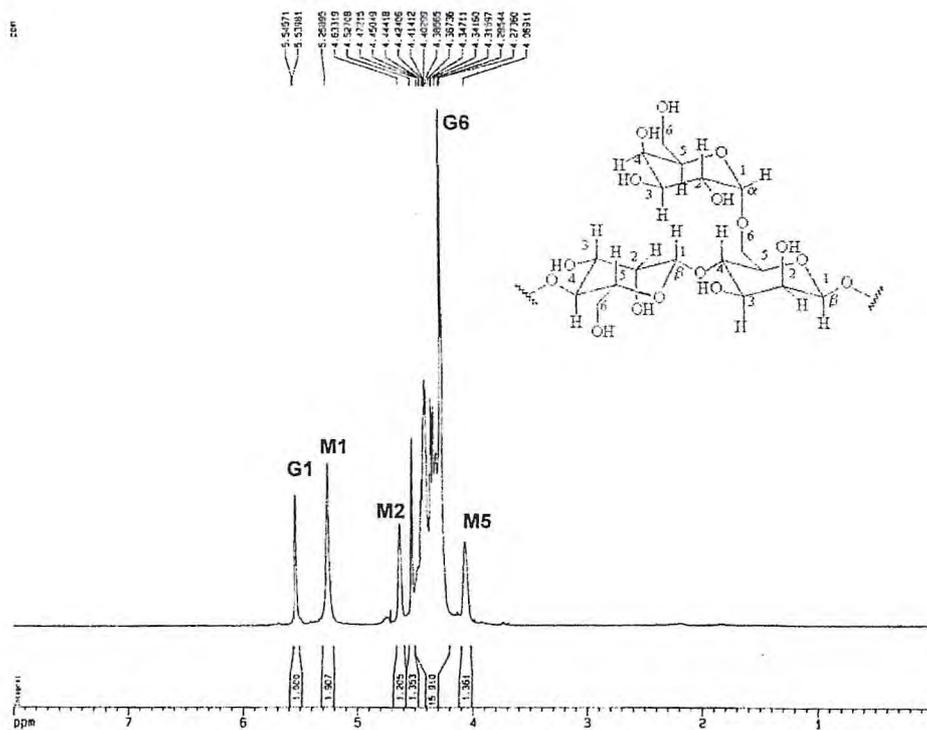


Figura 6.37 - Espectro deRMN ^1H de desp-I[$\delta\text{D}_2\text{O}$;500,13 MHz].

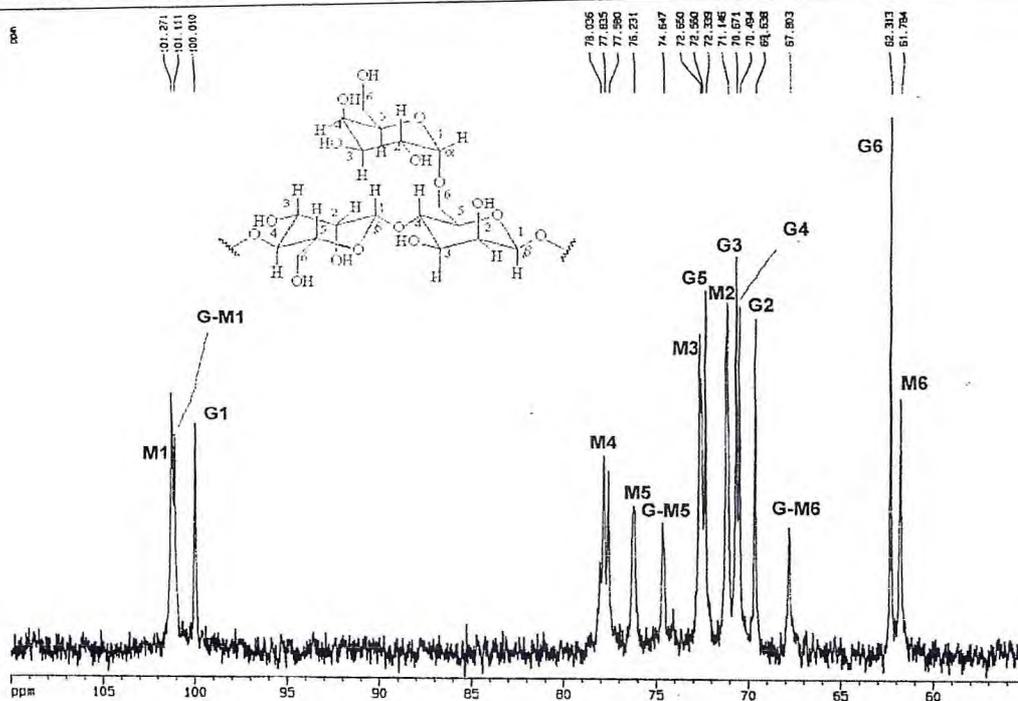


Figura 6.38 - Espectro de RMN ¹³C-BB de desp-I [δ ; D₂O ; 125,77 MHz]

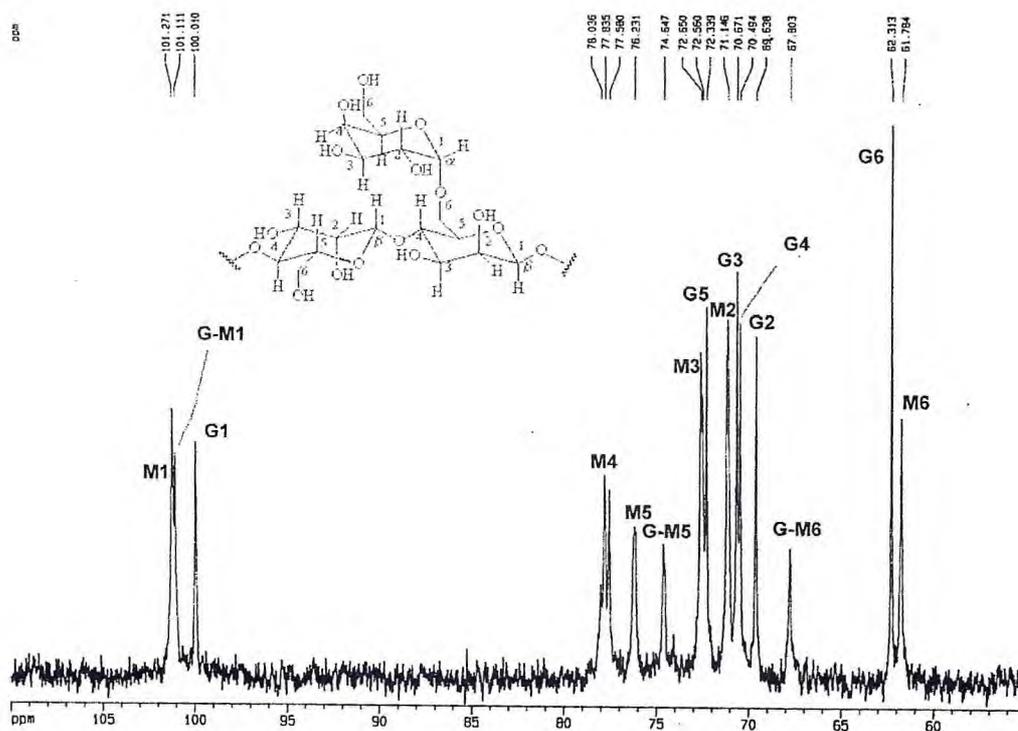


Figura 6.39 - Espectro de RMN ¹³C-BB de desp-I - Expansão de δ 67 a 79 [δ ; D₂O ; 125,77 MHz]

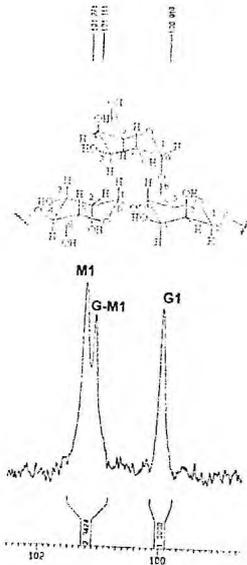


Figura 6.40 Espectro de RMN ^{13}C -BB de desp I- Expansão de δ 98 a 102 [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]

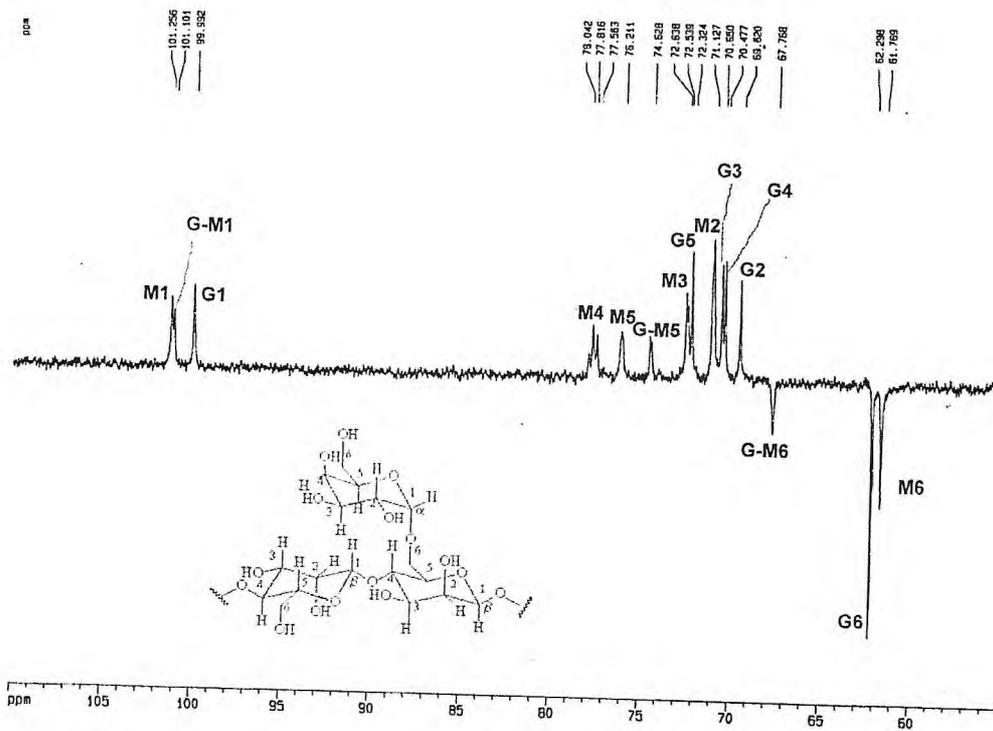


Figura 6.41 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135°) de desp-I [δ ; D_2O ; 125,77 MHz]

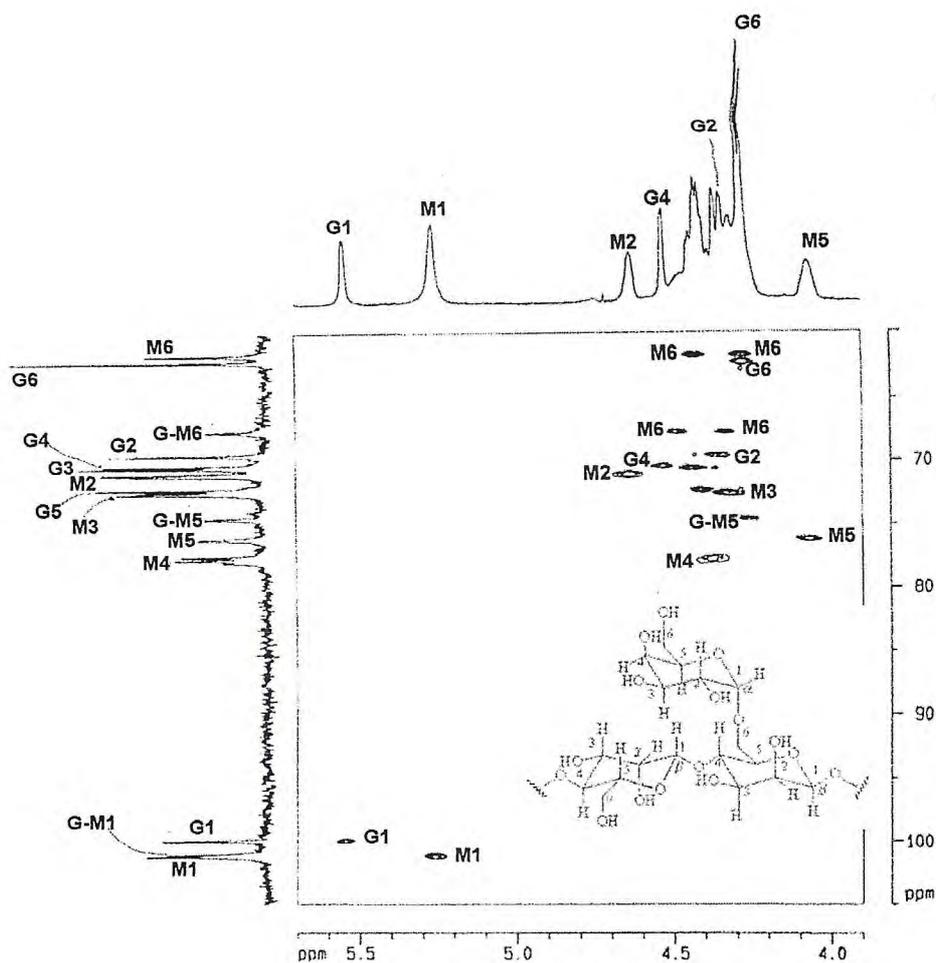


Figura 6.42 - Diagrama de contorno do espectro GS-HMQC de desp-I Expansão entre 4,00 e 5,50 ppm [δ ; D₂O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW = 10 167 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI = 1024 x 512 (F2 x F1)].

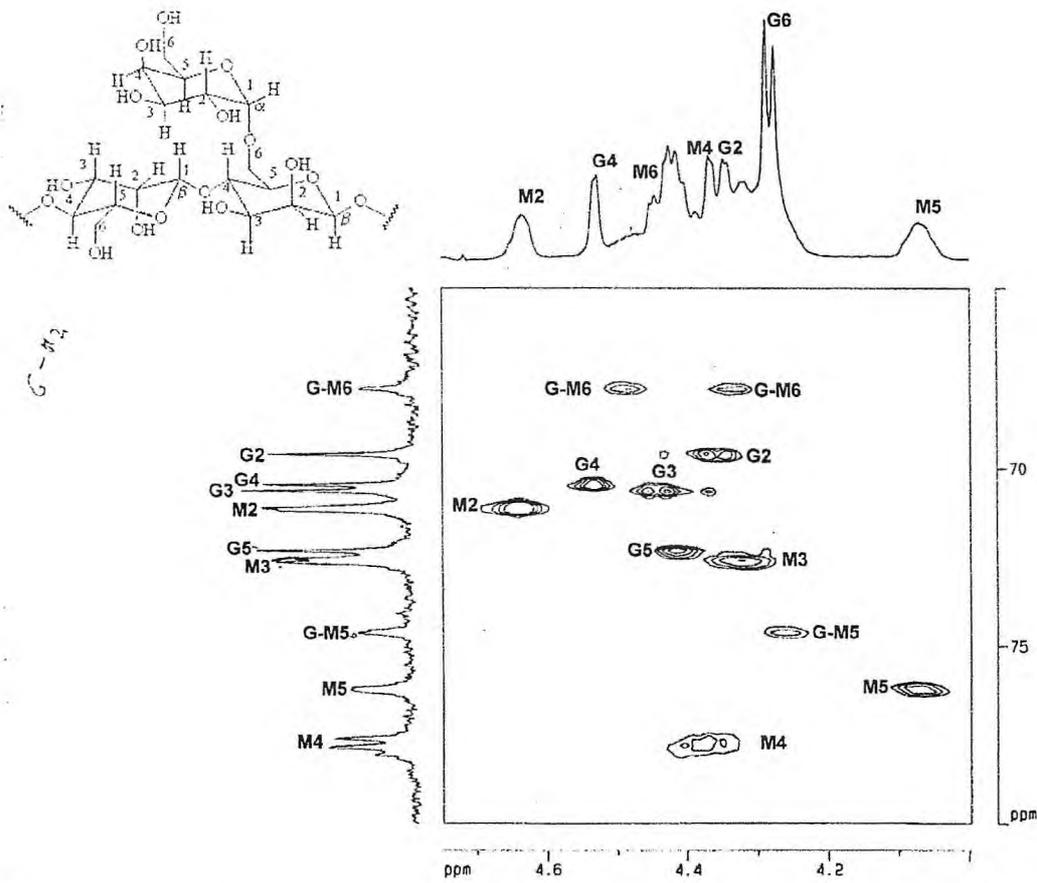


Figura 6.43 - Diagrama de contorno do espectro GS-HMQC de desp-I Expansão entre 4,00 e 4,70 ppm [δ ; D₂O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW = 10 167 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI = 1024 x 512 (F2 x F1) .

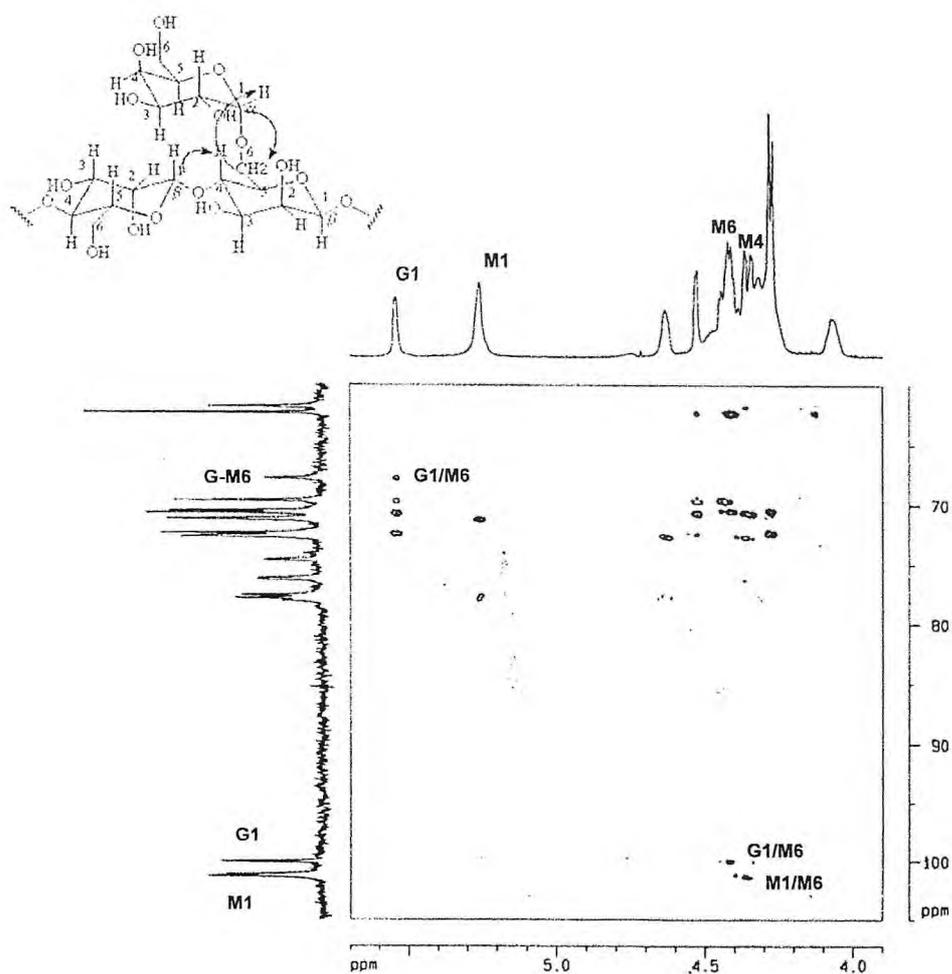


Figura 6.44 - Diagrama de contorno do espectro GS-HMBC de desp-I e Representação dos acoplamentos G1/M6 , M1/M4 e G1/G-M6 do GS-HMBC; Expansão da região 60 a 110 ppm do espectro de desp-I , e Representação dos acoplamentos observados no GS-HMBC. [δ ; D₂O; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW =10 167 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI =1024 x 512 (F2 x F1)].

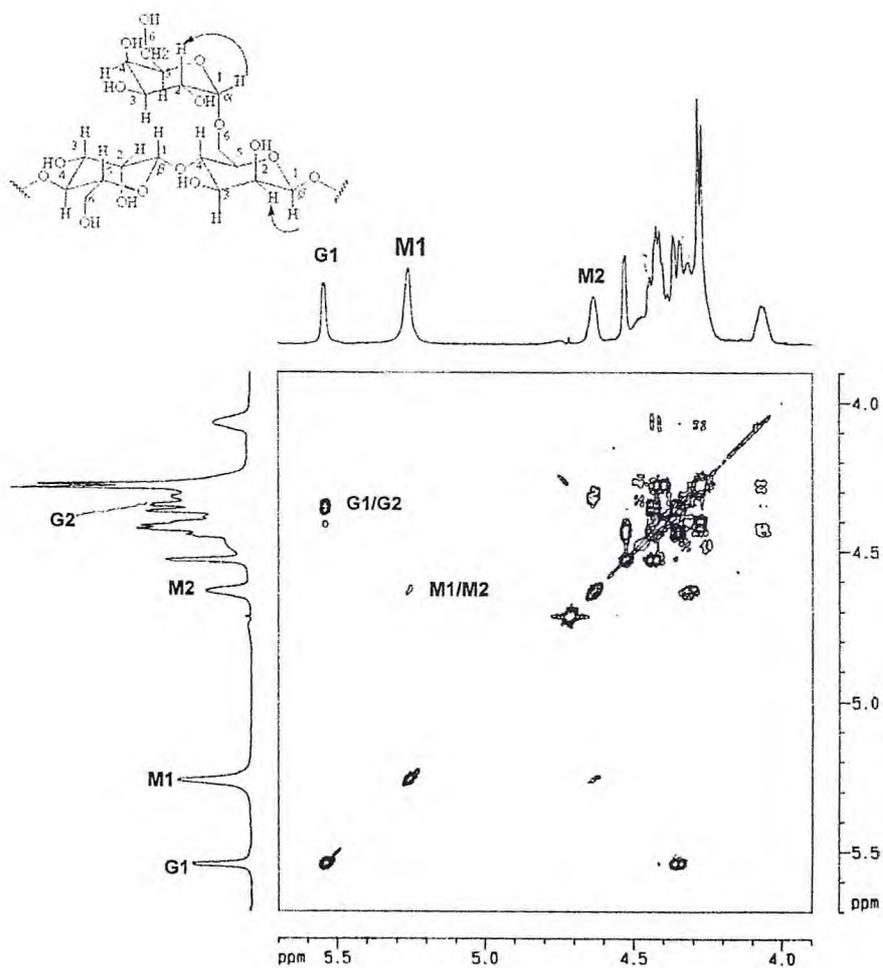


Figura 6.45-Diagrama de contorno do espectro COSY de desp-I [δ ; D₂O ; 500,13MHz x 500,13MHz ; TD = 1024 x 128 ; SW =10x10 ppm (F2 x F1) ; DS = 4 ; ns = 2 (F2)] ; SI =1024 x 256 (F2 x F1)].

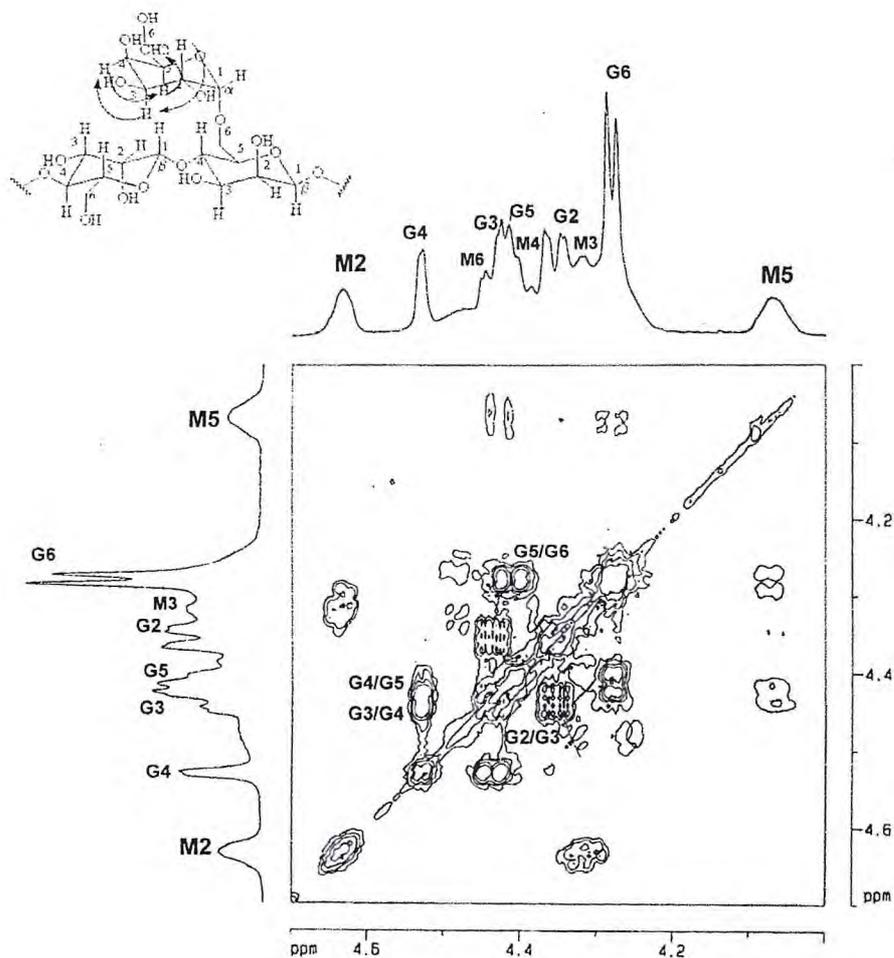


Figura 6.46 - Diagrama de contorno do espectro COSY de desp-I [δ ; D₂O ; 500,13MHz x 500,13MHz ; TD = 1024 x 128 ; SW =10x10 ppm (F2 x F1) ; DS = 4 ; ns = 2 (F2)] ; SI =1024 x 256 (F2 x F1)].

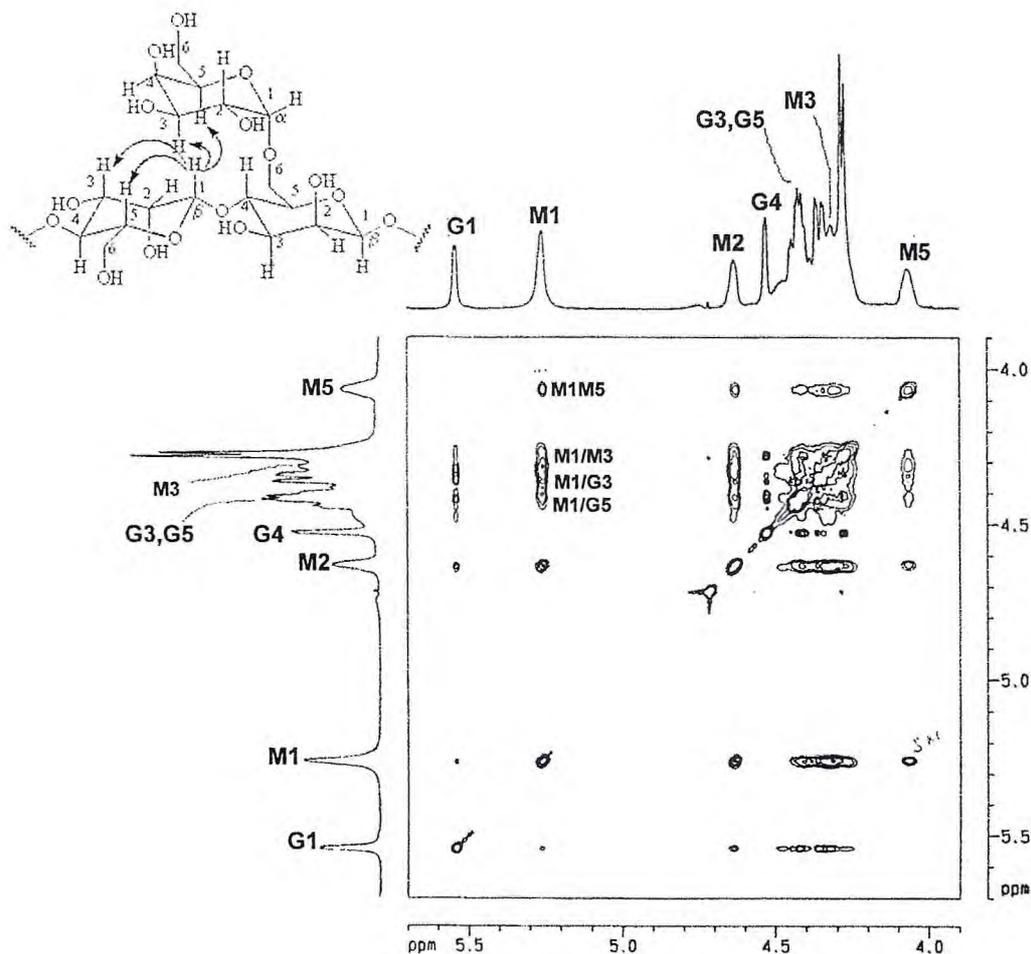


Figura 6.47 - Diagrama de contorno de espectro GS-NOESY de desp-I e Representação dos acoplamentos M1/M5 , M1/M3 e M1/G3 e M1/G5 do GS-NOESY; Expansão da região 3,8 a 5,8 ppm do espectro de desp-I , e representação dos acoplamentos observados do GS-NOESY [δ ; D₂O ; 500,13 MHz 500,13 ; TD = 2048 x 512 ; SW = 6,122 ppm (F2 x F 1) ; DS =16 ; ns = 4 (F2) ; SI = 1024 x 1024 (F2 x F 1)].

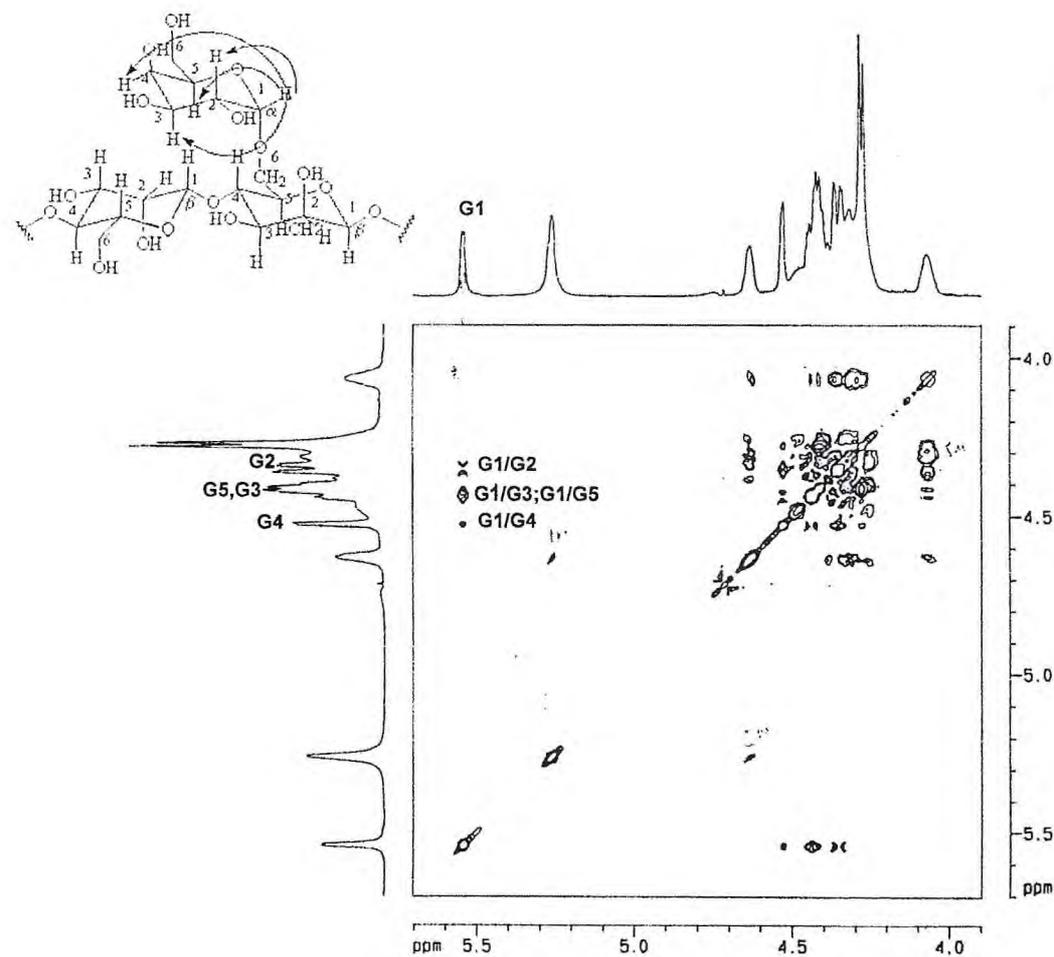


Figura 6.48 -Diagrama de contorno de espectro GS-TOCSY de desp-I, expansão entre 3,9 a 5,2 ppm [δ ; D₂O ; 500,13 MHz x 500,13 MHz ; TD = 2048 x 512 ; SW = 6,127 ppm (F2 x F1) ; DS =16 ; ns = 4 (F2) ; SI = 1024 x 1024 (F2 x F1)].

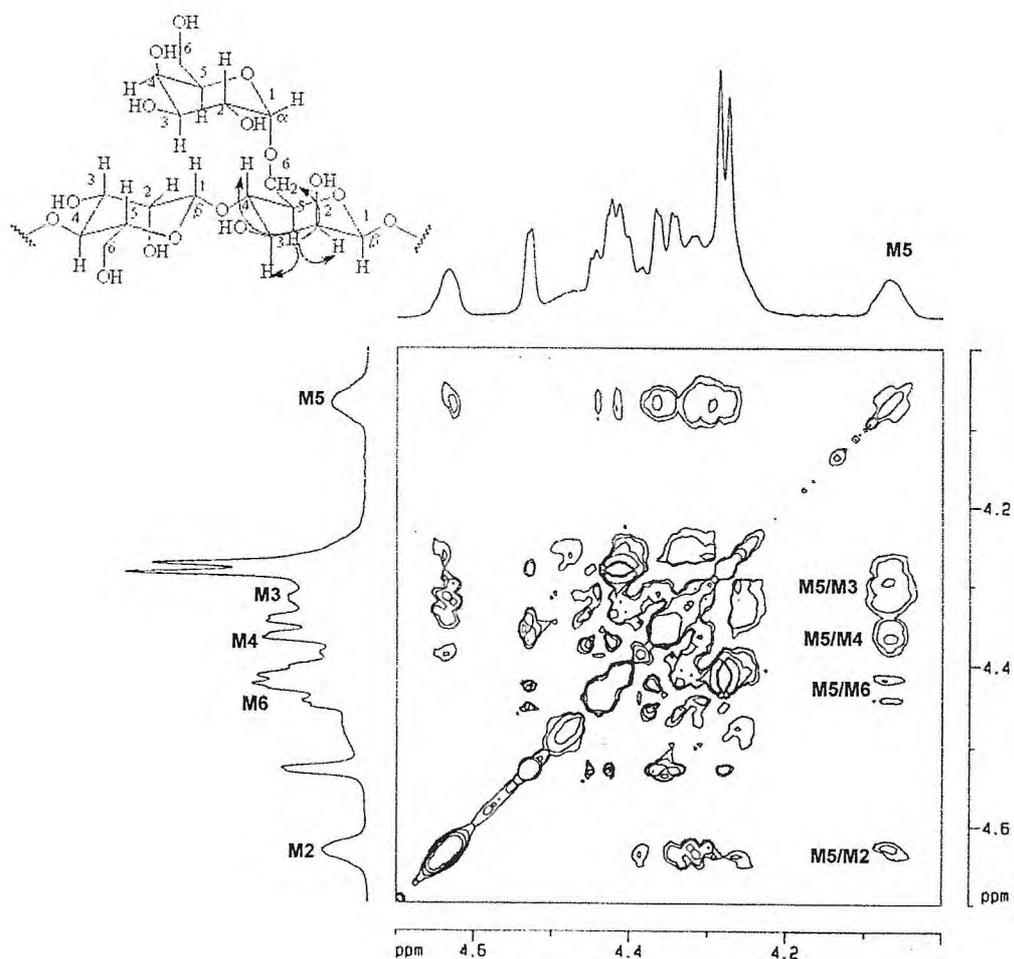


Figura 6.49 - Diagrama de contorno de espectro GS-TOCSY de desp-I, expansão entre 4,0 a 4,7 ppm [δ ; D₂O ; 500,13 MHz x 500,13 MHz ; TD = 2048 x 512 ; SW = 6,127 ppm (F2 x F 1) ; DS =16 ; ns = 4 (F2) ; SI = 1024 x 1024 (F2 x F 1)].

Referências Bibliográficas

ABIQUIF-Associação Brasileira da Industria Farmoquimica. Exportações 2000. Dez 2000 .Disponivel em: <http://www.abiquif.org.br>> acesso em 31 de setembro de 2003.

ABEYGUNAWARDANA, C., BUSH, C.A., Complete structure of the polysaccharide from *Streptococcus sanguis* J22. *Biochemistry*, v. 29, p. 234-248 , 1990.

BAKER, C.W., WHISTLER, R.L., Distribution of D-Galactosyl groups in guaran and locust bean gum , *Carbohydr. Res.*, v. 45 , p. 237-243 , 1975 .

BeMILLER, J.N., WHISTLER, R.L., WISTLER, R.L., (Ed.), *Industrial gums*, Academic Press, New York and London, pp. 675-686 , 1959 .

BOCIEK, S.M., IZZARD, M.J., MORRISON, A., WELTI, D., The ^{13}C -NMR spectra of (1-6)- α D-galactosyl-(1-4)- β -D-mannans. *Carbohydr. Res.*, v. 93 , p. 279-283 , 1981.

BOCK, K., THORGESEN, H., Nuclear magnetic resonance epectroscopy in the study of mono- and oligossaccharides. *Annual Report of NMR Spectroscopy*, v. 13 , p. 1-57 , 1982.

BUCKERIDGE, M., PAVEGASSI, V.R., ROCHA, D.C., DIETRICH, S.M., Seed galactomannans in the classification and evolutions of the Leguminosae, *Phytochemistry*, v.38 , p. 871-875 , 1995 .

CASSELS, F.J., FALES, H.M., LONDON, J., CHARLSON, R.W., Van HALBEEK, H., Structure of a streptococcal adhesion carbohydrate receptor. *The Journal of Biological Chemistry*,. v. 265 , p. 14127-14135 , 1990.

COURTOIS, J.E., Le DIZET, P., Studies on galactomannans.4. Action of some mannaes on various galactomannans , *Bull. Soc. Chim. Biol.*, v. 52 , p. 15-22 , 1970 .

DAAS, P.J.H., SCHOLS, H.A., JONGH, H.H.J., On the galactosyl distribution of commercial galactomannans, *Carbohydr. Reseach*, v. 329 , p. 609-919 , 2000.

DAVIS, A.L., HOFFMANN, R.A., RUSSELL, A.L., DEBET, M., ¹H and ¹³C NMR characterization of the digalactosylmannopentaose liberated by legume seed galactomannan by β -mannanase action. *Carbohydrate Research* , v. 271, p. 43-54 , 1995.

DEA, I.C.M., MORRISON, A., Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 31 , p. 241-312 , 1975.

DORMAN, D.E., ROBERTS, J.D., Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of some pentose and hexose aldopyranoses. *Journal of American Chemical Society*, v. 92 , p.1355-1361, 1970.

European Pharmacopeia, 4 edição, p.1274 , 2002 .

FRANCO, T.T., RODRIGUES, N.R., SERRA, G.E., PANEGASSI, V.R., BUCKERIDGE, M.S, Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legume seeds and formation of aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B.*, v. 680 , p. 255 – 261 , 1996 .

GANTER, J. L. M. S., MILAS, M., CORRÊA, J. B. C., REICHER, F. & RINAUDO, M., Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. *Carbohydr. Polym.*, v. 17, p. 171-175.1992.

GANTER, J.L.M.S., HEYRAND, A., PETKOWICKZ, C.J.O., RINANDO, M., REICHER, F., Galactomannan from Brazilian Seeds: Characterization of the Oligosaccharides Produced by Mild Acid Hydrolysis, *Int. J. Biol. Macromol.* v. 17, p.13-19, 1995.

GANTER, J.L.M.S., MILAS, M., LEITNER, S.C.S., SIERAKOWSKI, M.R., REICHER, F., Structural Studies on Galactomannan from Brazilian Seeds, *J. Carbohydr. Chem.* v.12 (n .6), p. 753-767 , 1993.

GONZALES, J.J., Sequential-analysis by cooperative reactions on copolymers : Structure of locust bean gum and guaran , *Macromolecules*, v. 11 , p. 1074-1085 , 1978 .

GRASDALEN, H., PAINTER, J.T., NMR studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans, *Carbohydr. Res.*, v. 81, p. 59-66, 1980.

GRASDALEN, H., PAINTER, T., NMR studies of the composition and sequence in legume-seed galactomannans. *Carbohydrate Research*, v. 81 , p. 59-66 , 1980.

GUPTA, A.K. , GRASDALEN, H., A D-galacto-D-mannan isolated from *Melilotus officinalis* seeds , *Carbohydr. Res.*, v. 173, p. 159-168 , 1988.

GUPTA, A.K., BOSE, S., Structure of the D-galacto-D-mannan isolated from the seeds of *Melilotus indica* All. , *Carbohydr. Res.*, v. 153 , p. 69-77 , 1986 .

HOFFMAN, J., LINDBERG, B., PAINTER, T.J., Distribution of D-galactose residues in guaran and locust bean legume , *Acta Chem. Scand., Ser. B*, v. 30 , p. 365-366 , 1976 .

HOFFMAN, J., SVENSSON, S., Studies of distribution of D-galactosyl side chain in guaran , *Carbohydr. Res.*, v. 65 , p. 65-71 , 1978 .

IKUTA, K., SHIBATA, N., KANEHIKO, H., KOBAYASHI, H., SUZUKI, S., OKAWA, Y., NMR assignment of the galactomannan of *Candida lypholitica*. *FEBS Letters*, v. 414 ,p. 338-342 , 1997.

KAPOOR, V.P., TARAVEL, F.R., JOSELEAU, J.P., MILAS, M., CHANZY, H., RINAUDO, M., *Cassia epectabilis* DC seed galactomannan: structural, crystallographical and rheological studies. *Carbohydrate Research*, v. 306 , p. 231-241 , 1998.

KATO, K., NITTA, M., MIZUNO, T., Infrared spectroscopy of some mannans , *Agric. Biol. Chem.*, v. 37 , p. 433-435 , 1973.

MANZI, E.A., CEREZO, S.A., Substitution reactions of galactomannans in organic media , *Carbohydr. Res.*, v.6 , p. 349-359 , 1986.

MANZI, E.A., CEREZO, S.A., The galactomanna-like oligossacharides from endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*, *Carbohydr. Res.*, v. 134 , p. 115-131 , 1984.

MANZI, A.E., CEREZO, A.S., SHOOLERY, J.N., High Resolution ¹³C-NMR Spectroscopy of Legume Seed Galactomannans. *Carbohydr. Res.* v. 148, p. 189-197, 1986.

McCLEARY, B.V., MATHERSON, N.K., Galactomannan structure and beta-mannase and beta-mannosidase activity in germinating legume seeds , *Phytochemistry*, v, 14 , p. 1187-1194 , 1975 .

McCLEARY, B.V., Simple assay procedure for beta-mannase , *Carbohydr. Res.*, v. 67 , p. 213-221 , 1978.

McCLEARY, B.V., CLARK, A.H., DEA, I.C.M., REES, A.D., The fine structure of carob and guar galactomannans, *Carbohydrate Research*, v. 139 , 237-260 , 1985.

NOBLE, O., TARAVEL, R.F. , Nuclear Magnetic Resonance evidence of the guarborate interaction , *Carbohydr. Res.*, v. 166 , 1-11 , 1987.

PAINTER, T.J., Structure of guaran , *Acta Chem. Scand.*, v. 29 , p. 137-139 , 1975.

PAINTER, T.J., GONZÁLEZ, J.J., HEMMER, P.C. , Distribution of D-galactosyl groups in guaran and locust bean gum-New evidences from periodate oxidation , *Carbohydr. Res.*, v. 69 , p. 217-226 , 1979.

PETKOWICZ, C L., Biopolímeros da semente de *schizolobium amazonicum* (PINHO CUIABANO): galactomananas e arabinanas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 106 pp., Curitiba, 1993.

PALMER, K.J., BALLANTYNE, M., The structure of some pectin esters and guar galactomannan , *J. Am. Chem. Soc.*, v. 72 , p. 736-741 , 1950 .

PFEIFFER, P.E., VALENTINE, K.M., PARRISH, F.W., Deuterium-induced dofferential isotope shift ^{13}C NMR.1. Resonance reassignments of mono- and disaccharides. *Journal of American Chemical Society*, v. 101 , p. 1265-1274 , 1979.

RAMESH, H.P., YAMAKI, K., ONO, H., TSUSHIDA, T., Teo-dimensioanl NMR spectroscopy studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Galactomanna Whithout Chemical Fragmentation , *Carbohydrate Polymers* , v. 45 , p. 69-77 , 2001.

REID, J.S.G. , EDWARDS, M., GIDLEY, J.M., CLARK, H.A., Enzyme specificity in galactomannan biosynthesis , *Planta*, v.195 , p. 489-495 , 1995.

ROL, F., Locust bean gum. In: "*Industrial gums.*" (R. L. Whistler, ed.), *Academic Press*, New York and London, p. 361-375 , 1959 .

SCHAEFER, J., STESSKAL, E.O., *Topics in carbon- ^{13}C NMR spectroscopy*, levy G.C.ed. v. 13 Wiley-interscience, New York, p. 283 ,1979.

ROBISON, G., ROSS-MURPHY, S. B. & MORRIS, E. R., Viscosity-molecular weight relationships intrinsic chain flexibility and dynamic solution properties of guar galactomannan. *Carbohydr. Res.*, v.107, 17-32, 1982.

SAITO, H., Conformational Dynamics, and gelation mechanism of gel-state (1 \rightarrow 3)-D-glucans revealed by C-13 NMR. *In: Solutions properties of polysaccharides*, New York, ACS, cap. 10, p.125, 1981

SINGH, V., SRIVASTANA, V., PAUDEY, M., SETHI, R., SANGHI, R., *Ipomea turpethum* seeds: A potential source of commercial gum, *Carbohydrate Polymers*, v. 51, p. 357-359, 2003.

ZAWADZKI-BAGGIO, S-F-, SIERAKOWSKI, M.R., CORRÊA, J.B.C., & REICHER, F., A linear (1 \rightarrow 5) α -L-arabinofuranan from the seeds of guapuruvu (*Schizolobium paraybum*) *Carbohydr. Res.*, v. 233, p. 265-269, 1992.

Capítulo 7

RESULTADOS E DISCUSSÃO- Fosfolipídeos , Flavonóides e Complexos

7.1	Preparação da lecitina de soja fracionada LSB-IA	151
7.2	Preparações dos complexos da lecitina de soja fracionada LSB-IA com vários flavonóides.	160
7.3	Flavonóides	168
7.3.1	Rutina	168
7.3.2	Análise comparativa dos flavonóides secundários em amostras comerciais de Rutina de origem diferentes.	175
7.3.3	Hidrólise da Rutina	176
7.3.4	Benzilação da Quercetina	179
7.3.5	Acetilação da Rutina	183
7.3.6	Trioxipropilrutina e Trioxietilrutina	185
7.3.7	Citroflavonóides	191

7. Fosfolipídeos e Complexos

7.1 -Preparação da lecitina de soja fracionada LSB-IA .

Para a preparação dos complexos de flavonóides com fosfolipídeos a literatura cita os seguintes fosfolipídeos:Fosfatidilcolina(95%), diesteroil-fosfadilcolina(99%), mistura de fosfolipídeos de soja(97%), lecitina de soja hidrogenada, fosfadiletanolamina [WIRTZ-PEITZ , 1982; BOMBARDELLI e Colaboradores,1992;BOMBARDELLI e Colaboradores , 1992;BAMBARDELLI e SABADIE,1990].Observamos que a lecitina comercial possui apenas 65-67% de fosfatídeos. Para a preparação da lecitina para ser utilizada nas reações de complexação precisaremos fracionar a lecitina comercial e preparar uma lecitina com teor menor de óleo conforme Tabela 7.1,pag. 151[WITTCOFF, 1951 ; DEVEL , 1951] .

Tabela 7.1 - Composição da lecitina de soja comercial.

Componente	Teor
Fosfatidilcolina	19-21%
Fosfatidiletanolamina	8-20%
Fosfatos de inositol	20-21%
Outros fosfatídeos	5-11%
Óleo de soja	33-35%
Esteróis	2-5%
Carboidratos livres	5%
Água	1%

Para fracionar a lecitina os seguintes métodos estão relatados: fracionamento com acetona [CIRCLE e Colaboradores , 1966; PARDUM, 1962];fracionamento com etanol[CIRCLE, MAEYER,1966]; cromatografia[GUNTHER e RAINER,1991].O Food Chemicals Codex

define lecitina comercial como a lecitina obtida da soja como uma mistura complexa de fosfatídeos insolúveis em acetona conforme mostrado na tabela 7.2 , pag. 153 .

A lecitina refinada pode conter estes componentes em várias proporções diferentes dependendo do tipo de fracionamento utilizado. A composição da lecitina fracionada varia também com a temperatura, solvente, proporção do solvente e outros fatores que determinam o processo. Para aumentar a quantidade de fosfatídeos na lecitina e torná-la livre de óleo de soja, um procedimento utilizado é extrair a lecitina comercial com acetona seguido da separação e secagem produzindo assim uma lecitina purificada com teor de insolúveis em acetona maior que 95%, sendo um produto sólido. Se o fracionamento for realizado com etanol resultará uma lecitina fracionada solúvel em álcool rico em fosfatidilcolina ($\cong 53\%$) que se dispersa em água e rapidamente forma emulsões enquanto a fração insolúvel que é rica em fosfatídeos de inositol , favorece a preparação de emulsões óleo/água .

O fracionamento da lecitina comercial por acetona foi escolhido , principalmente por que quando aplicado à lecitina de soja bruta, a maior parte dos triglicerídeos e ácidos graxos podem ser separados dos fosfatídeos produzindo uma lecitina fracionada em pó livre de óleo de soja, esta lecitina fracionada tem grande hidrofiliçidade e tem sua capacidade emulsificante aumentada .

Para fracionamento de lecitina bruta de soja utilizamos uma adaptação do método de Padun e Cloves(1962), utilizando somente acetona em uma proporção inicial de 1:4 e (1:1,5) x 3 dando uma proporção final de 1:8,5.

Tabela 7.2 -Análise típica da lecitina de soja fracionada com acetona [ULMAN , 2000] .

Composição	Teor
Insolúveis em acetona	97%(min.)
Fosfatidil colina	20-24%
Fosfatidil etanolamina	18-22%
Inositol fosfatídeos	12-15%
Outros fosfatídeos	15%
Óleo de soja	1,5% (max.)
Umidade	2,0%(max.)
Aparência	Sólido
Cor	Amarelada
Solubilidade	
Em óleos	Solúvel
Em água	Despresível
Em álcool	Dispersível
Tipo de emulsão favorecida	Ambos água em óleo e óleo em água

A lecitina de soja comercial foi obtida de capsulas gelatinosas moles contendo 500mg cada e a lecitina fluida obtida foi extraída várias vezes com acetona à quente seguido de precipitação à frio (0°C). O sólido obtido após filtração é novamente tratado com acetona à quente seguido de precipitação à frio e filtração. Este tratamento foi repetido por mais duas vezes e o sólido final obtido foi seco à baixa temperatura, produzindo 49,8% de um sólido amorfo amarelado , denominado de LSB-IA (ver procedimento 8.5.6 , pag. 238, Ver Fluxograma 8.2 ,Pag. 239) .

A lecitina fracionada com acetona , LSB-IA , foi analisada por CCD e observamos a presença de fosfatidiletanolmaina (Rf 0,56) , fosfatidilcolina (Rf 0,33),fosfatidil inositol(0,20),identificados pelos seus Rf característicos [LEA e Colaboradores , 1955 ; MARINETTI ,1956; DIFFENBACHER e BRACCO, 1978] e por comparação com seus respectivos padrões (ver procedimento 8.5.6 , pag. 238) .

A lecitina fracionada com acetona LSB-IA conforme análise por CCD é uma mistura composta de vários fosfatídeos cada qual composto de espécies multimoleculares onde os ácidos graxos variam no tamanho da cadeia e no grau de insaturação. Assim estes compostos não possuem uma absorbância específica, mas podem ser detectadas pelo monitoramento da absorbância da ligação dupla dos seus ácidos graxos substituintes(Vários sistemas para CLAE tem sido relatados na literatura para análise por CLAE utilizando sílica como adsorvente em separações analíticas e preparativa [AMARI e Colaboradores , 1990]).

Patel e Sparrow em 1978, relataram a separação da lecitina obtida da gema do ovo em escala preparativa utilizando coluna de sílica e como fase móvel clorofórmio-metanol-água (60:30:4). Uma desvantagem deste método é que a detecção por UV não poderia ser utilizada, devido o Clorofórmio apresentar grande absorvidade nos comprimento de ondas próximos a 200nm. Separações analíticas foram então desenvolvidas por JUNGAWALA e Colaboradores, em 1976, utilizando como fase móvel acetonitrila:metanol:água (65:21:14). Eluição por gradiente utilizando como fase móvel hexano-isopropanol-água foi também utilizada para estas separações[YANDRASITZ e Colaboradores,1981] e preparativas [ELLINGSON, 1987] .

O uso de sílica gel como adsorvente e uma fase móvel transparente próximo a 200 nm no UV já que alguns fosfolipídeos absorvem na região entre 200 e 210 nm parece ser o sistema mais recomendado para análise de LSB-IA por HPLC.

Santasia, 1987 descreve um sistema para análise de fosfolipídeos na lecitina de soja que utiliza coluna de sílica, e como fase móvel acetonitrila/metanol /85% ácido fosfórico (780/10/9 (v/v/v)), com vazão de 2,0 mL/min e detecção por UV a 205 nm. Utilizando estas condições foi possível determinar o teor dos principais fosfolipídeos na lecitina bruta e na lecitina fracionada com acetona(LSB-IA) produzindo os seguintes resultados (ver procedimento 8.5.6.1 , pag. 239 e figura 8.5 , pag.240 cromatograma da análise de LSB-IA):

	Fosfatidil colina	Fosfatidil etanolamina	fosfatidil Inositol	Outros Constituintes
Lecitina bruta	11,3 %	12,3 %	11,6 %	64,6 %
Lecitina fracionada com acetona (LSB-IA)	25,3 %	22,8 %	15,9 %	36,0 %

Tabela 7.3 – Teor dos principais fosfolipídeos de LSB-IA por HPLC.

A lecitina de soja fracionada com acetona (LSB-IA) foi então analisada de acordo com os métodos da USP [US Pharmacopeia,2000] produzindo os resultados descritos na tabela 7.4 , pag.156 .

Tabela 7.4 – análise da LSB-IA de acordo com a US Pharmacopeia,2000 .

TESTE	ESPECIFICAÇÕES
Cor	Amarelada
Índice da acidez	20,5
Água	0,5%
Insolúveis em acetona	98%
Material insolúvel em hexano	0,1%

Através da análise de LSB-IA por RMN ^1H (Figura 10.1 , pag. 248), RMN ^{13}C (Figura 10.3 , 249) RMN ^{13}C - DEPT (135°) (Figura 10.4 , pag. 249), mostrou tratar-se de uma mistura complexa , confirmando os resultados das análises por CCD e CLAE .

Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 10.1, pag. 248) de LSB-IA mostrou absorções em δ 5,35 relativa a hidrogênio ligados a carbono sp^2 , de δ 1,27 a δ 1,6 relativa aos hidrogênios metilênicos e a δ 0,90 relativo aos hidrogênios do grupo metila. Apresentou ainda absorção em δ 3,29 relativa aos hidrogênios do grupo metila ligado a nitrogênio, absorção e δ 3,5 a δ 4,6 característicos de hidrogênios metilênicos de carbono oxigenados.

Análise do espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 10.3 , pag. 249) de LSB-IA mostrou presença de várias linhas espectrais indicando que LSB-IA é mistura complexa onde podemos destacar as absorções de δ 174,10 a δ 173,55 atribuída a carbonila de éster , absorções de δ 130,59 a δ 130,02 , δ 128,70 a δ 127,51 referentes a carbonos sp^2 , absorções em δ 54,89 referente ao carbono metilado ligado ao nitrogênio, e varias absorções de δ 14,46 a δ 34,67 referentes a carbonos saturados.

A tabela 7.5 foi elaborada à partir da subtração espectral dos espectros de RMN ^{13}C -BB (Figura 10.3 , 249) de LSB-IA do espectro de RMN ^{13}C -DEPT (135°) (FIGURA 10.4).

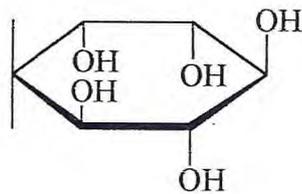
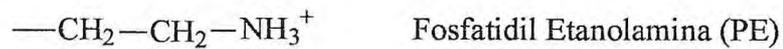
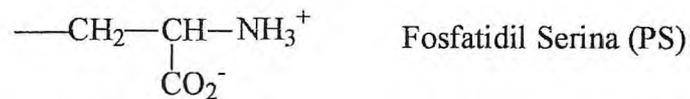
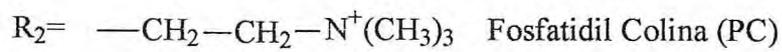
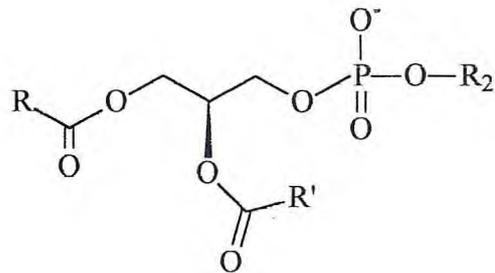
Tabela 7.5 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de LSB-IA com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -BB e DEPT: δ : CDCl_3 , 125,75 MHz).

C	CH	CH ₂	CH ₃
174,10 – 173,55	130,59 – 127,51	22,97 – 34,67	14,46 – 14,49
-	-	62,49 – 70,70	54,89

Através da técnica bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação ($^1J_{\text{C,H}}$) de GS-HMQC de LSB-IA (Figura 10.5 , pag. 250) foi possível observar o acoplamento C-H à uma ligação e relacionar os hidrogênio observados no espectro de prótio a seus respectivos carbonos. Este espectro mostrou o acoplamento $^1J_{\text{C,H}}$ conforme dados da tabela 7.7 , pag. 159 .

A lecitina de soja já fracionada LSB-IA foi caracterizada pela análise do Índice de acidez, insolúveis em acetona e hexano, HPLC, CCD e IV. Utilizando estas informações e através da análise por RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN ^{13}C – DEPT (135°) e GS-HMQC de LSB-IA não podemos fazer uma determinação estrutural completa já que LSB-IA é uma mistura de fosfolipídeos, mas podemos observar as seguintes estruturas parciais descritas a seguir(ver Figura 7.1,pag. 158):

Figura 7.1 Estruturas dos principais constituintes da lecitina de soja (onde R e R' são ácidos graxos cuja as composições estão relacionadas na tabela 7.6,pag. 159)



Fosfatidil Inositol (PI)

Tabela 7.6 - Composição dos ácidos graxos da lecitina de soja bruta.

Re R'	Ácido graxo
C16:0	Palmitico
C18:0	Estearico
C18:1	Oléico
C18:2	Linoléico
C18:3	Linolênico

TABELA 7.7 - Dados obtidos do diagrama de contorno do espectro de RMN GS-HMQC ($^1J_{C,H}$) de LSB-IA (δ ; 500,13Mhz x 125,77 MHz (F_2 x F_1); $CDCl_3$).

HMQC	
δC	δH
174,1-173,55	-
130,59 – 127,51	5,35
70,70 – 62,44	4,6 – 3,3
54,89	3,29
34,67 – 34,51	2,77
32,33 – 31,97	1,31 – 1,27
25,32	2,77
27,65 – 27,58	2,05
26,20 – 25,92	1,59
30,83 – 297,5	1,31 – 1,27
23,03 – 22,97	1,31 – 1,27
14,66 – 14,46	0,90

7.2 -Preparações dos complexos da lecitina de soja fracionada LSB-IA com vários flavonóides.

O método de preparação de complexos entre flavonóides e fosfolipídeos foi descrito em várias patentes[WIRTZ-PEITZ e PROBST, 1982; BOMBARDELLI e SABADIE, 1990; BOMBARDELLI e PATRI, 1991; BOMBARDELLI e Colaboradores, 1992; BOMBARDELLI e Colaboradores, 1992]. Nestas patentes várias condições são descritas como: proporções entre fosfolipídeos e flavonóides, solventes e vários tipos de fosfolipídeos que são utilizados.

Assim resolvemos testar estas condições utilizando como fosfolipídeos o LSB-IA preparado pelo fracionamento da lecitina de soja bruta com acetona e vários flavonóides isolados. Várias condições de reações foram testadas com LSB-IA e rutina(1) . Assim podemos obter os seguintes resultados: o melhor solvente para preparação dos complexos foi o dioxano, já que facilita a dissolução inicial do fosfolipídeo e dos flavonóides.

Apesar das patentes utilizarem também solventes clorado(CH_2Cl_2 , CHCl_3) com e sem pequenas quantidades de metanol, misturas binárias de dioxano: etanol , metanol . Para estas condições descritas nenhuma apresentou vantagem sobre o dioxano puro em termos de tempo de solubilização, facilidade de evaporação, proporção do solvente em relação ao reagente

A proporção dos reagentes com o solvente que produziu o melhor resultado peso/volume foi 1:33, acima de 1:10 a solubilização é rápida. A relação fosfolipídeos:flavonóide foi testada utilizando a relação LSB-IA : Rutina(1) descrita à seguir (Ver tabela 7.8 , pag. 161) .

Tabela 7.8 - Relação fosfolipídeos:flavonóide testada

Proporção Rutina:LSB-IA- peso/peso	Complexo	Formação do complexo	Espectros figura- número
1:0,5	Lipo 08	Não	10.32 -262
1:1,27	Lipo 09	Não	10.34-263
1:1,75	Lipo 10	Sim	10.36-264
1:2,5	Lipo 11	Sim	10.38 - 10.39 265 e 266
1:3,5	Lipo 01	Sim	10.6 - 10.9

Após a preparação do complexo utilizando a proporção Rutina (1):LSB-IA os produtos das reações foram analisados por RMN ¹H, RMN ¹³C e RMN ¹³C- DEPT (135 °) e observamos que na proporção até 1:1,27 (Rutina:LSB-IA) ainda aparecem no espectro do complexo (RMN ¹H, RMN ¹³C) as absorções características da Rutina (Ver numero das figuras correspondentes aos complexos na tabela 7.8 , pag.161).A partir da proporção 1:1,75 nenhuma absorção característica do flavonóide aparece no espectro do complexo lipo 10.(VER FIGURA 10.36 , pag. 265).

Observamos ainda que o caráter lipofílico dos complexos aumenta com o aumento da proporção Rutina (1):LSB-IA. Assim apesar de lipo 8,9 não ocorrer completa complexação a solubilidade de lipo 8 e 9 é diferente de lipo 10 e 11, já que os primeiros só são solúveis em etanol e os lipos 10 e 11 se dissolvem bem em clorofórmio. Assim,tendo em vista este caráter lipofílico dos complexos formados , observamos que eles são solúveis em clorofórmio. No caso de complexação incompleta a mistura formada não é solúvel em clorofórmio.

Observamos que a partir da proporção 1:1,75 (Rutina (1):LSB-IA) ocorre complexação completa da Rutina. Assim concluímos que a proporção(Rutina (1):LSB-IA) ideal para esta complexação seria entre 1:2-3. Para podermos confirmar a formação destes complexos utilizamos a análise por RMN ^1H , RMN ^{13}C -BB, RMN ^{13}C -DEPT (135°) comparando o espectro dos compostos individuais (LSB-IA(figura 10.1-10.5,pag. 248-250), Rutina (figura 10.69-10.71 ,pag.282-283) com o produto da reação. No espectro de RMN ^{13}C dos complexos, as absorções características da Rutina não são observadas, em contraste com as absorções da parte lipídica de LSB-IA . Observamos ainda um alargamento da absorção em δ 2,77 que é relativa a grupo metila ligado a nitrogênio ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$) do fosfatidil colina (indicando seu envolvimento no complexo) .

Quando comparado com o espectro de LSB-IA no espectro de RMN ^{13}C , o valor dos tempos de relaxação dos núcleos envolvidos na formação do complexo são reduzidos de maneira semelhante ao espectro de RMN ^1H , até o desaparecimento de todos os sinais característicos do flavonóide, da colina e dos gliceril do fosfolipideo no espectro de RMN ^{13}C do fosfolipideo. A partir destas informações podemos deduzir que na formação do complexo, o flavonóide está ligado ao fosfolipideo através de sua cabeça polar.

O caráter lipofílico do complexo é devido às cadeias lipídicas, as quais podem se mover livremente no meio, como foi observado através do seu espectro de RMN ^1H , o qual não mostrou nenhuma modificação.

Outra modificação que fizemos na técnica foi o tratamento da reação após a complexação estar completa (completa dissolução) . Nas patentes citadas era recomendado a concentração do solvente utilizado até um certo volume e a precipitação do complexo pela adição de n-hexano , e o precipitado obtido era filtrado a seco e à vácuo . No procedimento

adotado após a complexação , a mistura reacional é resfriada, filtrada para remoção das impurezas e concentrada à vácuo até secagem. Obtendo-se um pó cristalino com ponto de fusão definido.

Após estabelecermos as condições de reação para Rutina e LSB-IA , preparamos vários complexos utilizando outros flavonóides e com a proporção em peso flavonóide:LSB-IA 1:2 (mínimo) que foram isolados ou sintetizados (ver parte experimental item 8.5.7 , pag. 241) utilizamos os flavonóides descritos na tabela 7.9 , pag. 164 .Em algumas reações utilizamos uma proporção maior(em peso flavonóide:LSB-IA) que 1:2 para testar a influência do excesso na formação do complexo e para os casos onde a proporção ideal não houve a complexação para testar se o excesso auxilia na formação do complexo.

Tabela 7.9 – Flavonóides utilizados para preparação dos complexos

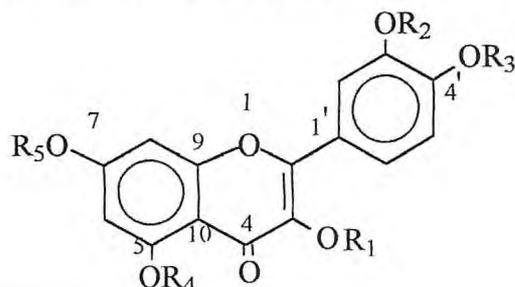
Flavonóide	Relação	PROP*	Formação do complexo	Espectros - figuras (pag.)
Rutina(1)	Lipo 1	1:3,5	Sim	10.6 – 10.9(250-252)
Quercetina(4)	Lipo 2	1:3,5	Sim	10.10–10.13(253-254)
Quercetina(4)	Lipo 12	1:6,2	Sim	10.41–10.44(268-269)
Hesperidina(15)	Lipo 3	1:3,5	Sim	10.14–10.17(254-256)
Benzquercetina(5)	Lipo 5	1:3,5	Não	10.22–10.24(258-259)
Benzquercetina(5)	Lipo 13	1:2,7	Não	10.45–10.46(270)
Extrato de Semente de Uva	Lipo 4	1:3,5	Sim	10.18–10.21(256-258)
Extrato de Semente de Uva	Lipo 6	1:2,5	Sim	10.25–10.27(260-261)
EPFD	Lipo 7	1:3,5	Sim	10.28–10.31(261-263)
Rutina Decaacetilada(6)	Lipo 14	1:2,0	Não	10.47 – 10.48(271)
Rutina Benzoilada(7)	Lipo 15	1:2,0	Não	10.49 – 10.50(272)
Trioxirutina(8)	Lipo 17	1:2,7	Sim	10.52–10.55(273-275)
Trioxipropil Rutina(9)	Lipo 18	1:2,7	Sim	10.56–10.58(275-276)
Rutina Benzilada(10)	Lipo 19	1:2,0	Não	10.59–10.60(277)
Rutina Benzilada hidrolizada(11)	Lipo 20	1:2,9	Não	10.61 – 10.62(278)
Rutina Benzoilada hidrolizada(12)	Lipo 21	1:2,0	Não	10.63 – 10.64(279)
7-O-Benzoil rutina (13)	Lipo 22	1:2,0	Não	10.65 – 10.66(280)
7-O-Benzoil Quercetina(14)	Lipo 23	1:2,0	Não	10.67 – 10.68(281)

Tabela 7.9 – Flavonóides utilizados para preparação dos complexos.

*OBS; Prop = Proporção flavonóide:LSB-IA (peso/peso)

7.2.1 Flavonóides utilizados para preparação dos complexos :

7.2.1.1. Derivados da Rutina

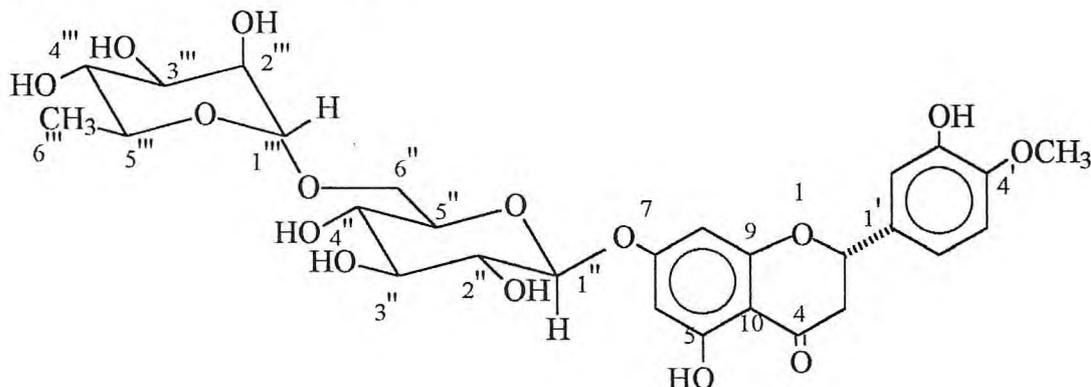


R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nome
Rham-gluc	H	H	H	H	Rutina(1)
H	H	H	H	H	Quercetina(4)
φ-CH ₂	φ-CH ₂	φ-CH ₂	φ-CH ₂	φ-CH ₂	Benzquer- cetina(5)
Rham-gluc	Ac	Ac	Ac	Ac	Rutina Deca- acetilada(6)
Rham-gluc	φ-C=O	φ-C=O	φ-C=O	φ-C=O	Rutina benzoilada(7)
Rham-gluc	CH ₂ CH ₂ OH	Trioxietil Rutina(8)			
Rham-gluc	CH ₂ CHOHCH ₃	Trioxipropil Rutina(9)			
Rham-gluc	φ-CH ₂	φ-CH ₂	φ-CH ₂	φ-CH ₂	Rutina benzilada(10)
H	φ-CH ₂	φ-CH ₂	φ-CH ₂	φ-CH ₂	Rutina benzilada hidrolizada (11)
H	φ-C=O	φ-C=O	φ-C=O	φ-C=O	Rutina benzoilada Hidrolizada (12)
Rham-gluc	H	H	H	φ-C=O	7-O-benzoil Rutina(13)
H	H	H	H	φ-C=O	7-O-benzoil Quercetina (14)

Figura 7.2 – Estruturas dos flavonóides utilizados para preparação dos complexos

7.2.1.2.Outros flavonóides utilizados para preparação dos complexos :

7.2.1.2.1 Hesperidina (15)



7.2.1.2.2 EPFD : EPFD é o extrato purificado da fava d'anta e é constituído por uma mistura de flavonóides (ver 7.3.1 , pag. 168 e parte experimental item 8.5.4 , pag. 221) .

7.2.1.2.3 Extrato de semente de uva :

As leucoantocianidinas constituem uma família de polifenóis naturais pertencentes à classe dos bioflavonóides, largamente distribuída no reino vegetal. São isoladas de uma espécie de uva (*Vitis vinifera*) e constituídas por um número variável de unidades flavan-3-ol. Seu extrato seco é constituído de uma mistura de ácido gálico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, de dímeros (proantocianidinas B1, B2, B3 e B4 na forma livre ou esterificada) e de trímeros e tetrameros (Ver figura 7.3, pag. 167) . O restante é uma fração cujo peso molecular corresponde a unidades heptâmeras. Todos eles são fortes agentes antioxidantes altamente hidrossolúveis.

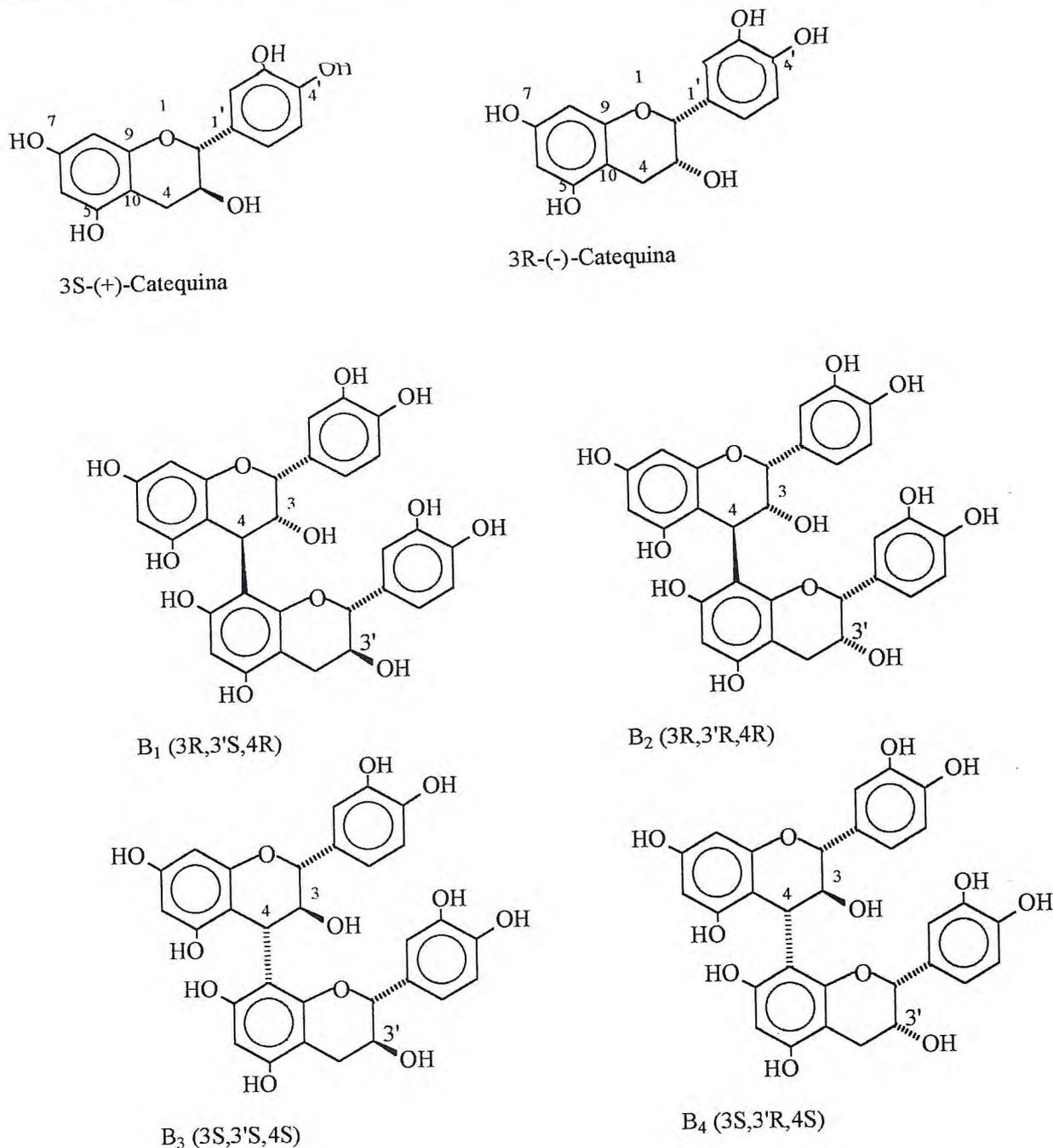


Figura 7.3 – estrutura dos constituintes da Extrato de Semente de Uva

A formação dos complexos foi confirmada pela ausência nos espectros de RMN¹H e RMN¹³C dos produtos da reação de LSB-IA com os flavonoides das absorções características dos flavonóides. Nos produtos da reação de LSB-IA com os flavonóides em que não foi

confirmada a complexação são aquelas reações nas quais o produto obtido após análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C , ainda observamos as absorções características dos flavonóides(Ver Tabela 7.9,pag. 164 a correspondência entre os flavonóides utilizados e o número das figuras dos espectros correspondentes).

Assim podemos concluir que flavonóides com os grupos fenólicos impedidos completamente ou parcialmente não formam complexos com LSB-IA.Flavonóides não glicosilados se complexionam da mesma maneira e que a posição do glicosídeo ou do padrão de hidroxilação não interfere na complexação. Flavonóides com grupos hidroxietil ou hidroxipropil ligados a seus grupos fenólicos formam complexos. Flavonóides com apenas um grupo fenólico protegido, glicosilado ou não também não complexionam. A presença ou ausência da carbonila não interfere na formação do complexo .Estas conclusões são baseadas no procedimento desenvolvido para a rutina,seus derivados e outros flavonóides importantes e utilizando as proporções flavonóide:LSB-IA descritas.Outra observação importante é que os produtos da complexação são sólidos cristalinos com ponto de fusão definidos.

7.3 Flavonóides

7.3.1 – Rutina(1)

O único constituinte relatado na literatura para o extrato da Fava D'anta *Dimorphandra mollis* e *Dimorphandra gardneriana* é a rutina [TOMASSINI e MORS, 1966].

Através da extração de 150 g de fava seca moída(*Dimorphandra gardneriana*) em sohxlet com hexano (EHFD), acetato de etila(EATFD), metanol(EMFD), água(EAFD) foi possível obter os seguintes rendimentos

após a concentração : EHFD : 0,38g(0,25 %);EAFD: 4,47g(2,98 %);EMFD: 47,53g(31,68 %) ; EAFD :8,49g (5,66%) .

Através da comparação dos extratos por CCD(ver parte experimental 8.5.4.4 , pag. 225) observamos que a EAFD e EMFD possuem o mesmo padrão cromatográfico e combinamos estes extratos.Através da análise por CCD utilizando como eluente butanol:água:ácido fórmico:metiletilcetona:acetato de etila (1:2:2:6:10) observamos nestes extratos a presença de três substâncias, com RF de 0,33 , 0,5 e 0,7 . Foi observado ainda grande quantidade de material na origem do cromatofolha . Os extratos combinados foram dissolvidos em água(200 mL) filtrados e secos produzindo 18 g de um pó amarelo que foi denominado de extrato purificado da Fava d'anta (EPFD). Através da análise por CLAE ,(ver procedimento experimental item 8.5.4, figura 8.3, pag. 223), observamos que EPFD apresentava um cromatograma com 3 picos principais. Através da purificação de EPFD utilizando HPLC semi-preparativo (ver procedimento experimental item 8.5.4(pag. 223) , figura 8.4(pag. 224)), foi possível isolar três frações EPFD-1, EPFD-2, EPFD-3.

Após isolamento de EPFD-1 , EPFD-2 e EPFD-3 , foi realizado a determinação do teor de cada pico no cromatograma utilizando padrão externo (ver procedimento experimental item 8.5.4.1(pag. 222) ,figura 8.3 (pag. 223) e os seguintes resultados foram obtidos: EPFD-1 : 69,0% ; EPFD-2 : 29,49% ; EPFD-3 : 1,51%.

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE EPFD-1

O fracionamento cromatográfico do extrato de fava d'anta (*Dimorphandra gardneriana*) permitiu o isolamento de sólido cristalino amarelo com ponto de fusão 194°C (com decomposição), homogêneo em CCD, solúvel em metanol, DMSO, denominado de EPFD-1 (ver procedimento experimental página 221).

O espectro RMN ^{13}C -BB de EPFD-1 mostrou 27 linhas espectrais que após serem comparadas com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT (135°) (Figura 10.71, pag. 283) permitiu identificar 15 absorções referentes a carbonos insaturados que aparecem na faixa de δ 94,44 a 178,22 e 12 absorções referentes a carbonos saturados em δ 102,02 a 18,59 , e possibilitou elaborar a Tabela 7.10 , pag. 171 .

O espectro de RMN ^1H (Figura 10.69 , pag. 282) de EPFD-1 mostrou a presença de 5 absorções referentes a hidrogênios de carbonos insaturados sendo quatro dubletos em δ 7,55 ($J = 2,2\text{Hz}$) , 6,85 ($J=8,0\text{Hz}$) , 6,39 ($J=2,0\text{Hz}$) e 6,20 ($J= 2,0\text{Hz}$) , e um duplo dubleto em δ 7,54 ($J=8,0 \text{ Hz}$, $2,0\text{Hz}$) com integração 1 hidrogênio cada.

A partir dos dados obtidos, foi possível sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ para EPFD-1, e por comparação de RMN ^{13}C de EPFD-1 com os dados encontrados na literatura (Tabela 7.11 , pag. 172) permitiu comprovar que EPFD-1 apresentava a estrutura da rutina(1) .

EPFD-2 e EPFD-3

A partir da análise de EPFD-2 e EPFD-3 por RMN ^1H e RMN ^{13}C , e por comparação com os dados encontrados na literatura [AGRAWAL, 1989;MARKAN e TERNAL,1976] permitiu comprovar que EPFD-2 apresentava a estrutura da isoquercitrina(2) e EPFD-3 apresentava a estrutura do kaempferol-3 rutinosídeo(3) (ver tabela 7.12 e 7.13 , pag. 173 e 174) .

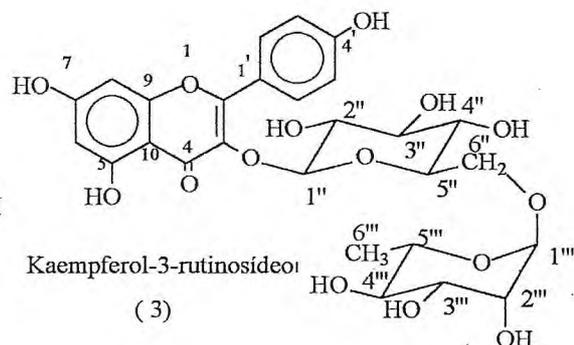
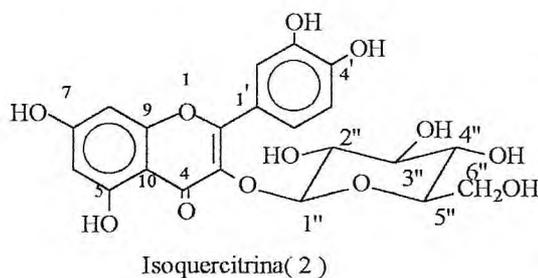
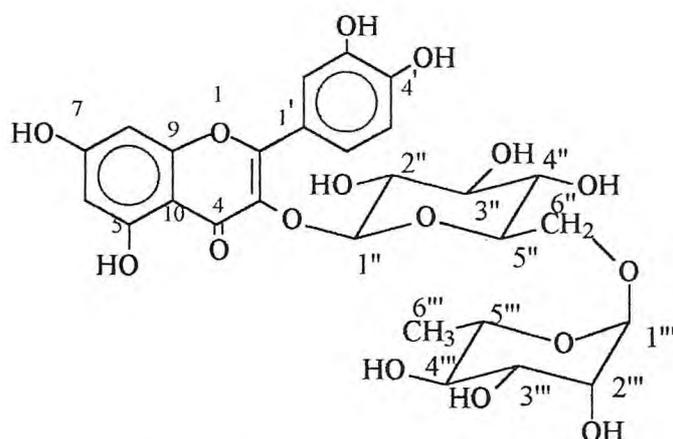


Tabela 7.10 - Deslocamentos químicos de RMN¹³C de EPFD-1 com padrão de hidrogenação (RMN¹³C-BB e DEPT: δ ; DMSO: 125,75 MHz.).

C	CH	CH ₂	CH ₃
178,22	122,45	67,85	18,59
164,92	122,03	-	-
162,07	117,11	-	-
157,47	116,07	-	-
157,28	102,02	-	-
149,25	101,60	-	-
145,59	94,44	-	-
134,15	77,28	-	-
104,82	76,75	-	-
-	74,92	-	-
-	72,66	-	-
-	71,40	-	-
-	71,22	-	-
-	70,85	-	-
-	69,10	-	-
C ₉	C ₁₆ H ₁₆	CH ₂	CH ₃
TOTAL C ₂₇ H ₂₁			



Rutina (1)

Tabela 7.11 - Comparação entre os dados de RMN¹³C do EPFD-1 e rutina [AGRAWAL, 1989; MARKAN e TERNAL, 1976] (δ ; DMSO; 125,75MHz)

C	EPFD-1 (+0,30 DESLOCADO)	Rutina
1	-	-
2	157,47	156,6
3	134,15	133,6
4	178,22	177,4
5	162,07	161,2
6	99,53	98,8
7	164,92	164,0
8	94,44	93,6
9	157,28	156,4
10	104,82	104,2
1'	122,45	121,6
2'	116,07	115,3
3'	145,59	144,6
4'	149,25	148,3
5'	117,11	116,5
6'	122,03	121,6
1''	102,02	101,5
2''	74,92	74,2
3''	77,28	76,8
4''	71,40	70,8
5''	76,75	76,1
6''	67,85	67,1
1'''	101,60	100,7
2'''	71,22	70,4
3'''	70,85	70,4
4'''	72,68	72,2
5'''	69,1	68,2
6'''	18,59	17,2

Tabela 7.12 - Comparação entre os dados de RMN ^{13}C do EPFD-2 e isoquercitrina [AGRAWAL, 1989; MARKAN e TERNAL, 1976] (δ ; DMSO; 125,75MHz)

C	EPFD-1 (+0,80 DESLOCADO)	Isoquercitrina
1		
2	157,34	156,5
3	134,53	133,7
4	178,41	177,6
5	162,14	161,3
6	100,59	99,8
7	164,99	164,2
8	99,41	93,6
9	157,32	156,5
10	104,91	104,2
1'	122,39	121,6
2'	116,03	115,3
3'	144,59	144,8
4'	149,32	148,5
5'	117,12	116,5
6'	122,18	121,4
1''	102,17	101,4
2''	75,05	74,3
3''	78,32	77,5
4''	71,14	70,3
5''	77,61	76,8
6''	62,14	61,3

Tabela 7.13 - Comparação entre os dados de RMN¹³C do EPFD-3 e kaempferol-3-O-Rutosídeo [AGRAWAL, 1989; MARKAN e TERNAL, 1976] (δ ; CD₃OD; 125,75MHz).

C	EPFD-3 (+0,80 DESLOCADO)	Kaempferol-3-Rutinosídeo
1		
2	159,52	158,7
3	136,29	135,5
4	180,18	179,4
5	163,80	163,0
6	100,79	100,0
7	167,0	166,2
8	95,78	95,0
9	160,20	159,4
10	106,36	105,6
1'	123,60	122,8
2'	133,17	132,4
3'	116,90	116,2
4'	162,23	161,5
5'	117,03	116,2
6'	133,20	132,4
1''	105,42	104,6
2''	76,38	75,6
3''	79,12	78,1
4''	72,33	71,5
5''	78,51	77,8
6''	69,38	68,6
1'''	103,46	102,6
2'''	72,88	72,1
3'''	73,10	72,3
4'''	74,16	73,4
5'''	70,46	69,7
6'''	18,70	17,9

7.3.2 .- Análise comparativa dos flavonóides secundários em amostras comerciais de Rutina de origem diferentes.

No Brasil a rutina é produzida comercialmente a partir das favas *Dimorphandra mollis*[SOUSA e COLABORADORES,1991] e *Dimorphandra gardneriana* e na China a partir dos botões florais da *Sophora japonica* [MALYNEUX, 1971].

Como insumo farmacêutico ,segundo as Farmacopéias(Farmacopéia Alemã)rutina só pode ser comercializada de acordo com especificações próprias, inclusive suas impurezas e substâncias relacionadas(seus flavonóides secundários, por exemplo só podem estar presentes em baixos teores,no máximo 5,0 %).Estas especificações são mostradas na tabela 4.2,pag. 57 e o método recomendado pela Farmacopéia é descrito na parte experimental 8.5.4.3 , pag. 225 . De acordo com a técnica descrita na farmacopéia 3 substâncias secundárias podem estar presentes, mas nenhuma pode estar presente individualmente com mais de 2,0% de teor e a soma total das impurezas deve ser menor que 5%.

Ao analisarmos os flavonóides de Fava d'anta (*Dimorphandra gardneriana*) por CLAE (EPFD ver parte experimental item 8.5.4.1(pag.222) ,figura 8.3) observamos a presença de dois flavonóides diferentes além da rutina (tempo de retenção EPFD-2(Isoquercitrina) : 7,7 ,EPFD-3(Kaempferol-3-rutinosídeo): 9,2).

Foi feita uma determinação do teor por CLAE e padrão externo utilizando os flavonóides de *Dimorphandra gardneriana* de duas amostras de rutina comercial obtidas das empresa PROCARIRÍ S.A.(Brasil) e M.D. PHARMA(Republica Tcheca),a primeira produz rutina à partir de *Dimorphandra gardneriana* e a segunda distribui Rutina produzida na China a partir da *Sophora japonica*. Utilizando não a técnica por CCD,

mas a técnica por CLAE (figuras 7.4 e 7.5 , pag. 176)observamos que o flavonóide secundário EPFD-3(Kaempferol-3-rutinosídeo) está presente tanto na Rutina comercial obtida de *Dimorphandra gardneriana* quanto na obtida da *Sophora japonica* . Já EPFD-2(Isoquercitrina) está presente apenas na Rutina comercial obtida da *Dimorphandra gardneriana* .

Figura 7.4 – Cromatograma de rutina comercial obtida de *Dimorphandra gardneriana* (Condições Cromatográficas ver parte Experimental 8.5.4.1 , pag.222) .

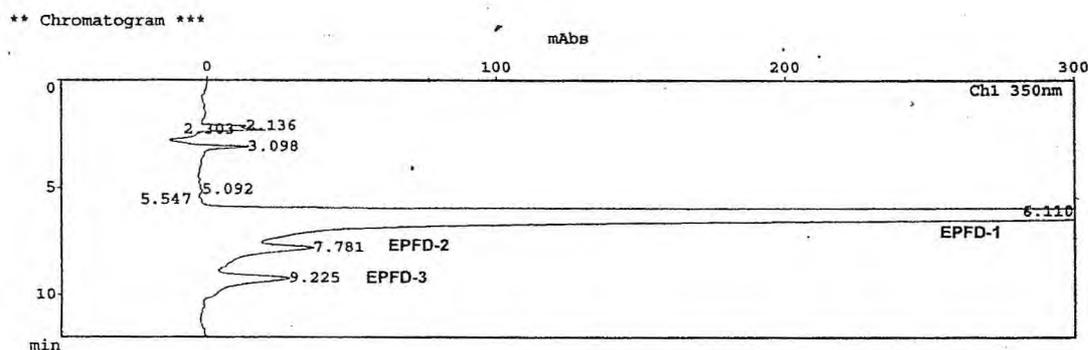
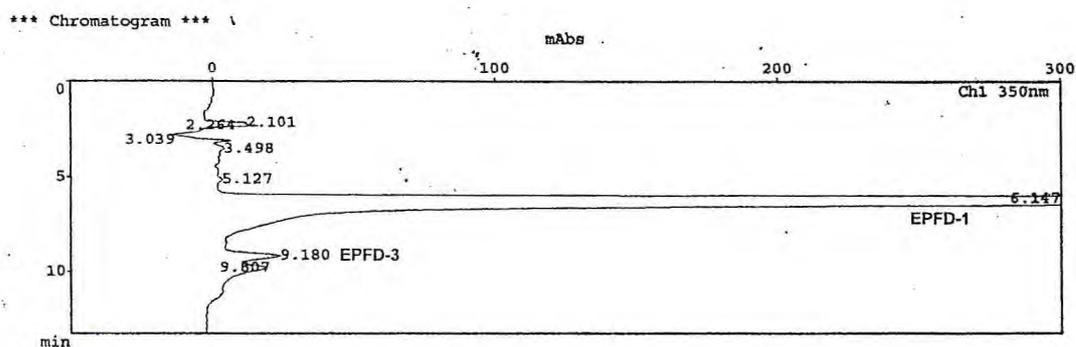
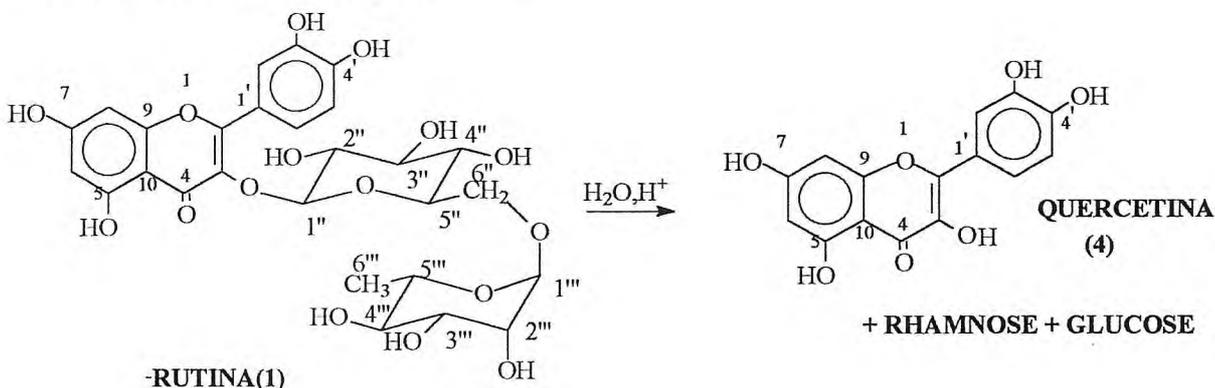


Figura 7.5 – Cromatograma de rutina comercial obtida de *Sophora japonica* (Condições Cromatográficas ver parte Experimental 8.5.4.1 , pag. 222) .



7.3.3 - Hidrólise da Rutina

A quercetina (4) foi preparada através da hidrólise ácida da rutina (1) com ácido sulfúrico 3% e refluxo por 5 horas [TOMASSINI e MORS, 1966;PULLES e LOESECKE,1939;WALTON,1921;KRATKAY e Colaboradores,1991]. Estas condições são suficientes para a hidrólise completa que foi acompanhada por CCD (ver parte experimental 8.5.5.1 , pag. 226). Após a hidrólise da rutina,a quercetina foi obtida como resíduo insolúvel em água e os açúcares rhamnose e glucose presentes na rutina ficaram dissolvidas na água ácida.



O produto obtido após recristalização em etanol produziu um sólido amarelo cristalino com 88,5% de rendimento que foi caracterizado através da análise por RMN ¹H,RMN ¹³C e IV e por comparação com os espectros do material de partida (Rutina;figuras 10.69 –10.72(pag. 282-283) e 10.77 – 10.80 (pag 286-287).

O espectro de RMN ¹³C-BB(Figura 10.78,pag. 286) do produto da hidrólise da rutina mostrou 15 linhas espectrais que ao serem comparados com os espectros de RMN DEPT 135°(Figura 10.79,pag. 287) permitiu confeccionar a TABELA 7.14 (pag.178) que apresenta dez absorções relativas a carbonos não hidrogenados e quatro carbonos metínicos.

Tabela 7.14 - Deslocamentos químicos RMN ^{13}C do produto de hidrólise da rutina com o padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -BB e DEPT 135°: δ ; DMSO; 125,77 MHz.).

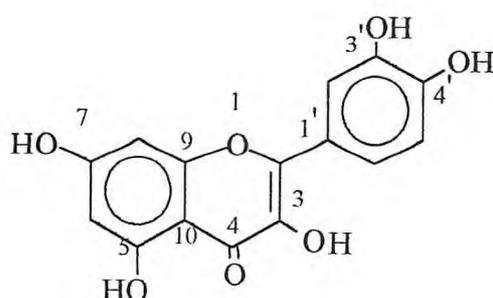
C	CH	CH ₂	CH ₃
176,68	120,82	-	-
164,72	116,45	-	-
161,57	115,91	-	-
156,99	99,03	-	-
148,53	94,20	-	-
147,64	-	-	-
145,89	-	-	-
136,56	-	-	-
122,82	-	-	-
103,87	-	-	-
C ₁₀	C ₅ H ₅	TOTAL C ₁₅ H ₅	

Seu espectro de RMN ^1H (Figura 10.76 , pag. 285) mostrou a presença de cinco absorções referentes a hidrogênios de carbonos insaturados, sendo quatro dubletos em δ 7,65 (J = 2,2Hz) e 6,41(J = 2,0Hz) 6,19 (J = 2,0Hz) e 6,90 (J = 8,5Hz) e um duplo dubleto em δ 7,56 (J = 8,5 Hz, 2,2Hz) e com integração para um hidrogênio cada . Observou-se então o desaparecimento dos sinais correspondentes aos hidrogênios ligados ao carbono 1 da glucose em δ 5,34 e ligados a C-1 e C-6 da Rhamnose (metila) em δ 4,39 e 1,00 respectivamente , além do desaparecimento das absorções entre δ 3,00 e 3,72 correspondentes aos outros hidrogênios metínicos oxigenados do rhamnoglucosil(Ver espectro de RMN ^1H figura 10.69,pag. 282) do material de partida).

Seu espectro de RMN ^{13}C -BB quando comparados ao espectro de RMN ^{13}C -BB da Rutina(Figura 10.70 , pag. 282) mostrou o

desaparecimento das doze linhas espectrais referentes ao grupo rhamnoglucosil confirmando que este foi removido por hidrólise.

Comparação com os dados de RMN ^{13}C -BB descritos na literatura para a quercetina [AGRAWAL, 1989] permitiu elaborar a tabela 7.15 , pag. 180.Observou-se que os deslocamentos químicos dos dois compostos em análise são bastante semelhantes, o que confirma a quercetina como o esperado produto da hidrólise da rutina .



Quercetina(4)

7.3.4 -BENZILAÇÃO DA QUERCETINA

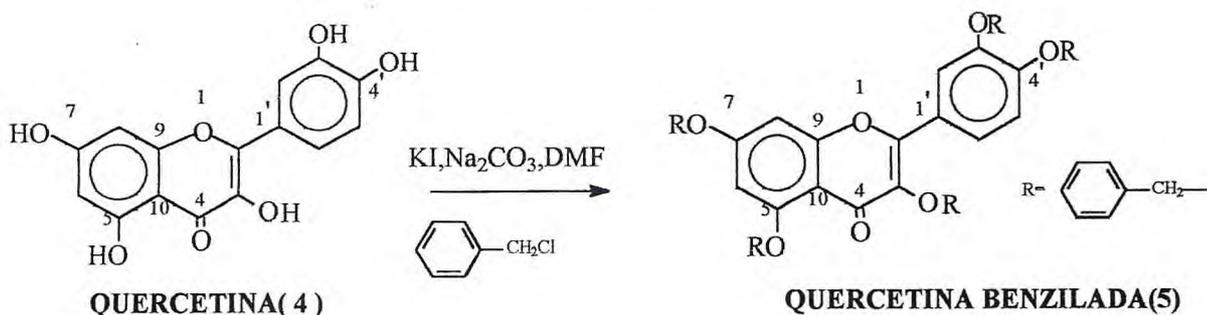
A quercetina benzilada(5) foi sintetizada por reação da quercetina com cloreto de benzila utilizando como catalizador o iodeto de potássio e utilizando ainda um solvente polar aprótico(dimetilformamida) e carbonato de potássio [LEYH, 1972] .

Após a reação e a recristalização a quercetinapPerbenzilada foi obtida com rendimento de 85% (Ver parte Experimental 8.5.5.2,pag. 228) e é um sólido cristalino branco com ponto de fusão 156-158°C, solúvel em clorofórmio e cloreto de metileno, cuja pureza foi verificada por CLAE(ver procedimento experimental tem 8.5.5.2 (pag. 228) ,figura 8.5 , pag.230), que foi então caracterizada pelas análises por RMN ^1H , RMN ^{13}C , IV e

ponto de fusão e por comparação com os espectros do material de partida (Quercetina).

TABELA 7.15 - Comparação entre os dados de ^{13}C do produto da hidrólise da rutina (DMSO, δ , 125MHz) com os dados encontrados na literatura [AGRAWAL, 1989].

C	Produto da hidrólise da Rutina (+0,8)	Quercetina
2	147,64	146,9
3	136,58	135,6
4	176,68	175,7
5	161,57	160,7
6	99,03	98,2
7	164,72	163,9
8	94,20	93,4
9	156,99	156,2
10	130,87	103,0
1'	122,82	122,0
2'	115,91	115,3
3'	145,89	145,0
4'	148,53	147,6
5'	116,45	115,6
6'	120,84	120,0



O espectro de RMN ^{13}C -BB do produto da benzilação(Figura 10.74, pag. 284),apresentou 40 linhas espectrais que ao serem comparadas com os sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135°(Figura 10.75 ,pag 285) permitiu elaborar a TABELA 7.16 (pag. 182), que apresenta 15 absorções relativas a carbono não hidrogênado, 20 absorções relativas a carbono metínicos e 5 carbonos metilênicos.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 10.74 , pag. 284) do produto da benzilação quando comparamos como espectro de RMN ^{13}C -BB do material de partida (Figura 10.78 , pag. 286) podemos observar o aparecimento de 5 absorções com δ 74,54 δ 71,43 , δ 71,29 , δ 71,20 e δ 70,90 relacionados a carbono saturado metilênico oxigenado, indicando a introdução em relação ao material de partida de cinco grupos CH_2 ($\Phi\text{-CH}_2\text{O-}$) ligados a oxigênio .

A análise de seu espectro de RMN ^1H (Figura 10.73 , pag. 284) confirmou a benzilação pelo aparecimento de cinco singletos em δ 5,28 (2H), δ 5,24(2H), δ 5,11(2H), δ 5,09(2H), δ 4,97(2H), característico de hidrogênios metilênicos de carbono oxigenado. Mostrou ainda o aparecimento de varias absorções entre δ 7,43 e δ 7,29(25H) característicos de hidrogênio ligados a carbono sp^2 .

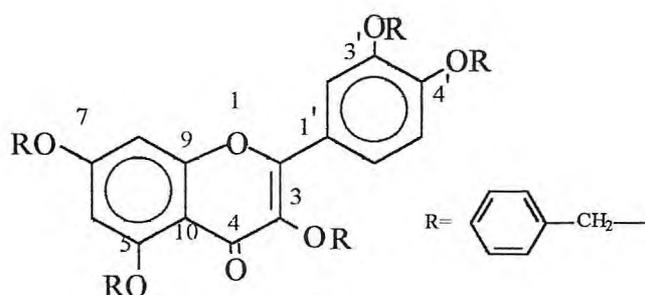
TABELA 7.16 - Deslocamentos químicos RMN ^{13}C da quercetina benzilada com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -BB e DEPT-135°; δ , CHCl_3 , 125,77 MHz).

C	CH	CH ₂
174,32	129,33	74,54
163,10	129,19	71,43
160,19	129,06	71,29
159,10	129,01	71,20
153,59	128,89	70,90
150,91	128,87	-
148,61	128,59	-
140,24	128,42	-
137,47	128,39	-
137,45	128,26	-
137,23	128,10	-
136,86	128,08	-
136,12	127,82	-
122,52	127,62	-
110,46	127,09	-
-	122,52	-
-	115,58	-
-	114,14	-
-	98,52	-
-	94,29	-
C ₁₅	C ₂₀ H ₂₀	C ₅ H ₁₀
TOTAL C ₄₀ H ₃₀		

No espectro de absorção na região do IV ((Figura 10.76 , pag. 285) do produto da benzilação observamos o desaparecimento do estiramento

O-H em ν 3368 cm^{-1} e 3287 cm^{-1} presentes no espectro de absorção na região do IV (Figura 10.80 , pag. 287) do material de partida, indicando que todas as hidroxilas fenólicas foram benziladas.

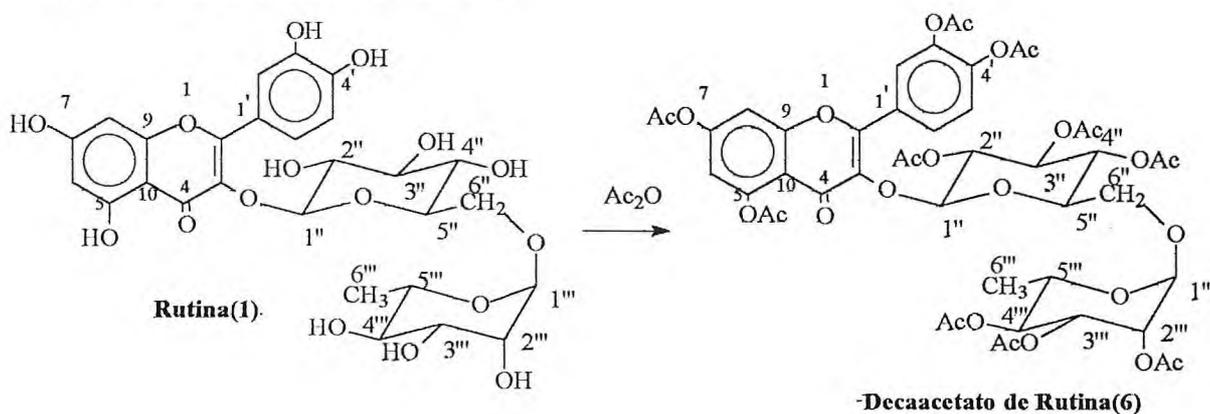
Estas observações estão de acordo com a estrutura mostrada abaixo para o produto da reação de benzilação da quercetina .



Benzquercetina (5)

7.3.5 -ACETILAÇÃO DA RUTINA

A rutina(1) foi acetilada por refluxo por 2 horas com anidrido acético e acetato de sódio, após este período a mistura reacional foi tratada e o produto obtido recristalizado produzindo o decaacetato de rutina(6) puro com rendimento de 76,71% [PESSAR e RAMONVILLE, 1975](Ver parte experimental 8.5.5.3 , pag. 230) .

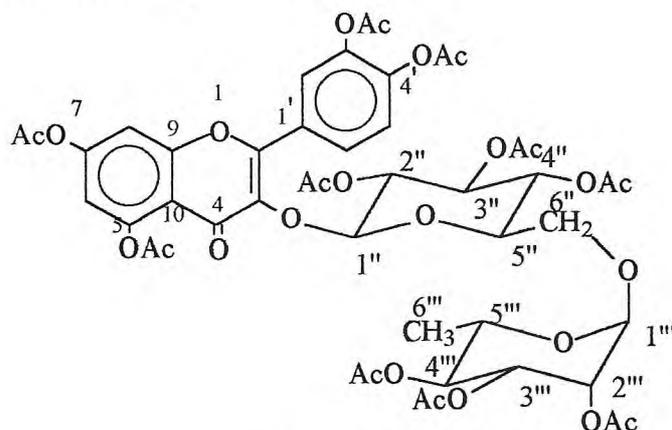


A rutina acetilada purificada é um sólido amarelado com ponto de fusão 148-149°C, solúvel em clorofórmio e acetato de etila homogêneo em CCD. A rutina decaacetilada obtida foi analisada por RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV comparada com os dados obtidos da literatura[TOLOSANI e Colaboradores, 1980] e com os dados do material de partida. A presença dos 10 grupos acetoxílicos foi reconhecida no espectro de RMN ^{13}C C-BB (Figura 10.90 , pag. 292) quando comparado com os espectros de RMN ^{13}C C-BB do material de partida (Figura 10.70 , pag. 282) pelo aparecimento de nove absorções em δ 170,48 , δ 170,41 , δ 170,33 , δ 170,18 , δ 170,08 , δ 169,65 , δ 169,212 , δ 168,97 , δ 168,83 , relacionados a carbono carbonílico. A partir dos dados obtidos, foi possível prever que um dos sinais δ 170,41 era relativo a dois carbonos . Observou-se ainda o aparecimento de oito absorções em δ 21,73 , δ 21,69 , δ 21,34 , δ 21,30 , δ 21,22 , δ 21,20 , δ 21,17 , e δ 21,10 , relacionados aos carbonos metílicos, observando que dois sinais δ 21,30 e δ 21,17 eram relativos a dois carbonos cada um .

Seu espectro de RMN ^1H (Figura 10.89 , pag. 292) quando comparado com o espectro RMN ^1H do material de partida (Figura 10.69 , pag. 282) mostrou o aparecimento de 10 singletos em δ 2,34 (3H), δ 2,33 (3H), δ 2,30 (3H), δ 2,09 (3H), δ 2,05 (3H), δ 2,04 (3H), δ 2,03 (3H), δ 2,01 (3H), δ 1,88 (3H), δ 1,86 (3H) , característicos de hidrogênios metílicos dos grupos acetoxila.

No espectro de absorção na região do infravermelho(Figura 10.91 , pag. 293) do produto da acetilação observamos o desaparecimento do estiramento O-H em 3409cm^{-1} presentes no espectro de absorção na região do IV(Figura 10.72 , pag. 283) do material de partida, indicando que todas as hidroxilas fenolicas foram acetiladas. Observamos ainda o aparecimento do estiramento C=O em 1755cm^{-1} , característicos de ésteres aromáticos

Os dados obtidos nos levam a propor a estrutura abaixo como produto da acetilação da Rutina .

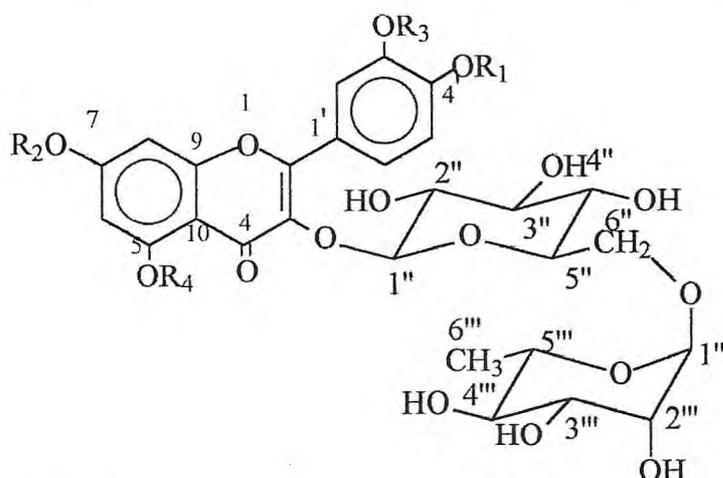


-Decaacetato de Rutina(6)

7.3.6 – TRIOXIETILRUTINA(8) E TRIOXIPROPILRUTINA(9)

A trioxietilrutina(8) é um pó cristalino amarelo, obtido da reação da rutina(1) com vários reagentes como a epiclorigrina ou óxido de etileno [FAVRE, 1957; COURBAT, 1969]. O tratamento de rutina com 3 moles de epiclorigrina produz uma mistura de O- β -hidroxietilrutosídeos solúveis, embora a reação com epiclorigrina seja mais fácil de controlar e ela exige uma quantidade estequiométrica de epiclorigrina e temperatura ambiente, mesmo assim o produto da β -hidroxietilação da rutina é um produto difícil de isolar e purificar e pelo menos cinco O-(β -hidroxietil) derivados de rutina são obtidos.

A preparação de derivados hidroxietil da rutina foi feita utilizando-se excesso de óxido de etileno em solução aquosa . A tabela abaixo mostra os derivados obtidos :



HE = O-Hidroxietyl

Composto	Nomeclatura	R1	R2	R3	R4
A	tetra-O-hidroxietyl-5,7,3',4'-rutosideo	HE	HE	HE	HE
B	tri-O-hidroxietyl-5,7,4'-rutosideo	HE	HE	H	HE
C	tri-O-hidroxietyl-7,3',4'-rutosideo	HE	HE	HE	H
D	di-O-hidroxietyl-7,4'-rutosideo	HE	HE	H	H
E	mono-O-hidroxietyl-rutosideo	HE	H	H	H
F	Rutina	H	H	H	H

No primeiro estágio de reação da rutina com o óxido de etileno, a suspensão formada gradualmente foi se dissolvendo, esta velocidade de dissolução depende da temperatura, do catalizador alcalino e da taxa de introdução do epóxido. Inicialmente se forma o mono-O-(β -hidroxietyl) derivado, e a medida que o pH aumenta os outros derivados di, tri, tetra são produzidos. Assim pelo controle do pH e condições da reação se pode dirigir a reação para que produza um rendimento de 90% de produtos β -hidroxietylado tendo com o principal constituinte os derivados tri-O-(β -hidroxietylados) (ver procedimento experimental 8.5.5.5, pag. 232 e figura 7.6, pag. 187).

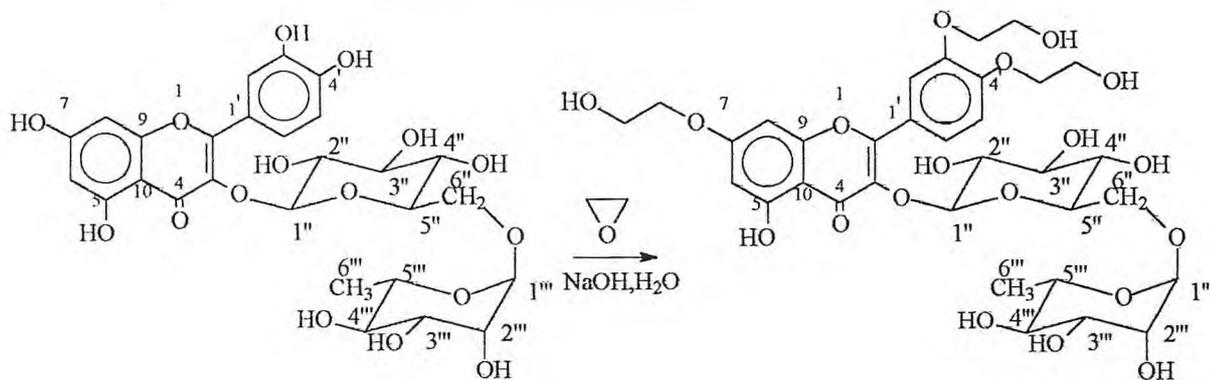


Figura 7.6 Reação de β -hidroxietilação da rutína(1)

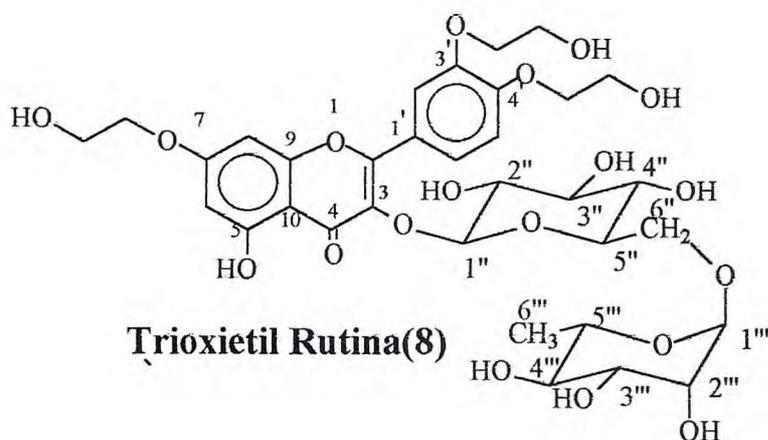
A rutína β -hidroxietilada é um sólido amarelo higroscópico com ponto de fusão 181-182°C, solúvel em água.

O produto obtido contém uma mistura de mono, di, tetra e principalmente trihidroxietil Rutína e foi analisada por RMN ^1H , IV, UV , RMN ^{13}C e comparada com os dados de RMN ^1H , IV , UV da literatura [COURBAT e Colaboradores, 1966 E 1966a] e com os dados do material de partida.

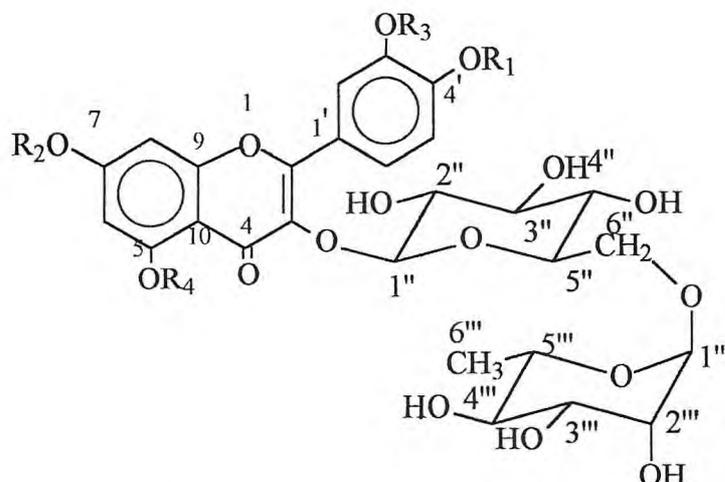
A presença de quatro grupos metilênicos oxigenados de álcoois foi reconhecida no espectro de RMN ^{13}C -BB e DEPT (135°) (ver figura 10.82 – 10.83 , pag. 288 e 289) do produto da β -hidroxietilação quando comparado com o espectro de RMN ^{13}C -BB e DEPT (135) (ver figura 10.70 – 10.71 , pag. 282 e 283) do material de partida mostrou o aparecimento de quatro absorções em δ 60,25 , δ 60,16 , δ 60,12 e δ 59,92 característicos de carbonos metilênicos oxigenados de álcoois (- CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -OH). Foi observado ainda o aparecimento de absorções entre δ 72,36 e δ 68,99 relacionados aos carbonos metilênicos oxigenados de éteres (-O- $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2OH) dos vários produtos da hidroxietilação.

A análise do seu espectro de RMN ¹H (ver figura 10.81 , pag. 288) quando comparado com o espectro de RMN ¹H do material de partida (ver figura 10.69 , pag. 282) mostrou o aparecimento de 4 singletos largos em δ 4,40(4H), δ 4,11(4H), δ 4,07 (4H) e δ 3,76(4H) característicos de hidrogênios metilénicos ligados a carbono oxigenado em sistemas onde os núcleos não são magneticamente equivalentes(sistema AA'BB' / -φ-OCH₂-CH₂OH).

Com os dados obtidos podemos comprovar que na reação da rutína com óxido de etileno uma mistura de compostos O-β-Hidroxietilados foi obtido onde o principal é a Trihidroxietil Rutína(8).



Utilizando esta mesma técnica derivados de β-Hidroxi-propil rutosídeos foram preparados tendo a vantagem de que o epóxido utilizado (óxido de propileno) possui temperatura de ebulição maior que o óxido de etileno e com isto fica mais fácil introduzir o epóxido na forma líquida no balão . Seguindo o mesmo procedimento 92,08% da mistura de β-hidroxi-propil rutína foram obtidos (ver procedimento experimental 8.5.5.6, pag. 233 e figura 7.7 , pag. 190).A tabela abaixo mostra os derivados obtidos :

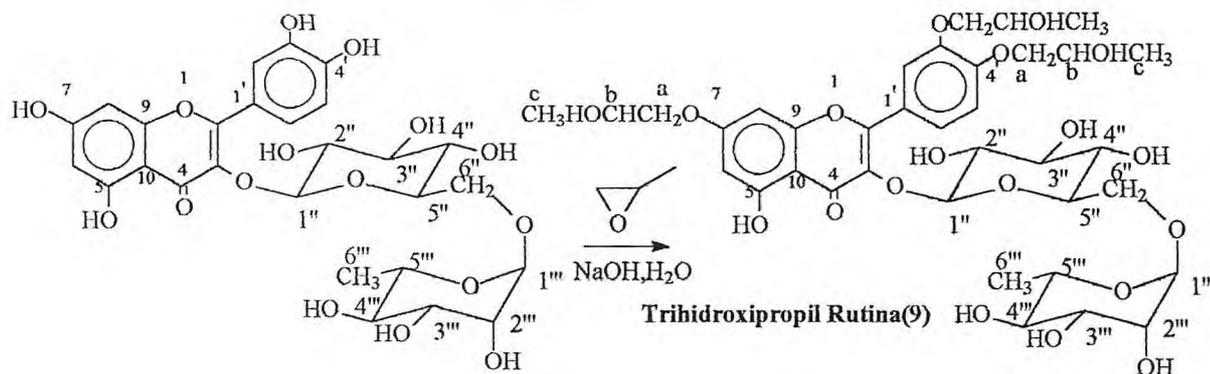


HP = O-Hidroxipropil

	Nomenclatura	R1	R2	R3	R4
A	tetra-O- Hidroxipropil-5,7,3',4'-rutosideo	HP	HP	HP	H
B	tri-O- Hidroxipropil-5,7,4'-rutosideo	HP	HP	H	HP
C	tri-O- Hidroxipropil-7,3',4'-rutosideo	HP	HP	HP	H
D	di-O- Hidroxipropil-7,4'-rutosideo	HP	HP	H	H
E	mono-O- Hidroxipropil-rutosideo (7 ou 4')	HP	H	H	H
F	Rutina	H	H	H	H

A rutina β -hidroxipropilada obtida é um sólido amarelo higroscópico com ponto de fusão 183 °C , solúvel em água.

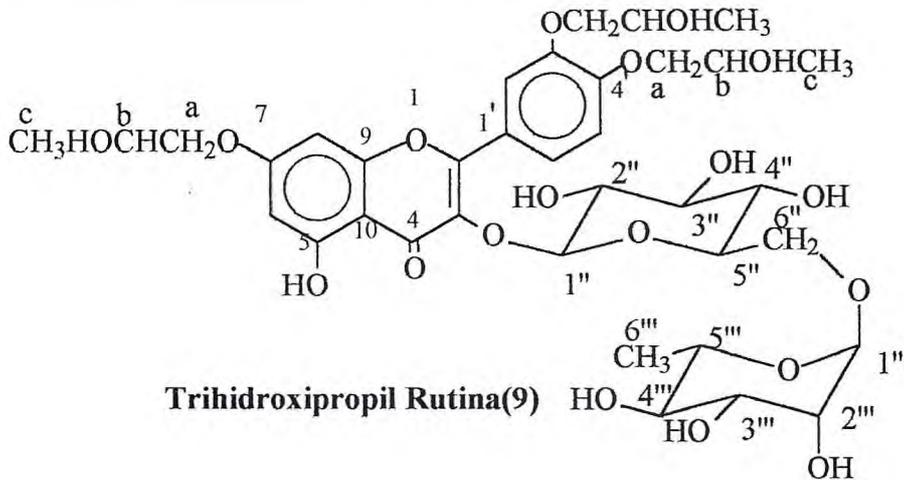
Do mesmo modo que a trioxirutina o produto obtido contém uma mistura de mono, di, tetra e principalmente trihidroxipropil rutina e foi analisada por RMN ^1H , IV , UV , RMN ^{13}C e comparada com os dados de RMN ^1H , IV , UV da literatura [COURBAT e Colaboradores,1966 e 1966a] e com os dados do material de partida .


 Figura 7.7 Reação de β -hidroxipropilação da rutina(1)

A presença de oito grupos metila foi reconhecido pelo aparecimento no espectro de RMN ^{13}C -BB E DEPT (135°) (ver figura 10.86 – 10.87, pag. 290 e 291) do produto da hidroxipropilação da Rutina de várias absorções entre δ 21,19 e δ 18,59 característicos de carbonos metílicos ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$). Foi observado ainda a presença de várias absorções entre δ 64,48 e δ 65,14 característicos de carbono metínico ligado a oxigênio de álcoois ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$), e um sinal em δ 74,97 relacionado aos carbonos metilênicos oxigenados de éteres ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$) dos vários produtos de hidroxipropilação.

Análise do espectro de RMN ^1H (ver figura 10.85 ,pag. 290) do produto da hidroxipropilação (ver figura 10.69) , mostrou o aparecimento de varias absorções entre δ 1,21 e 1,51 característicos dos hidrogênio dos grupos metilas que foram introduzidos .

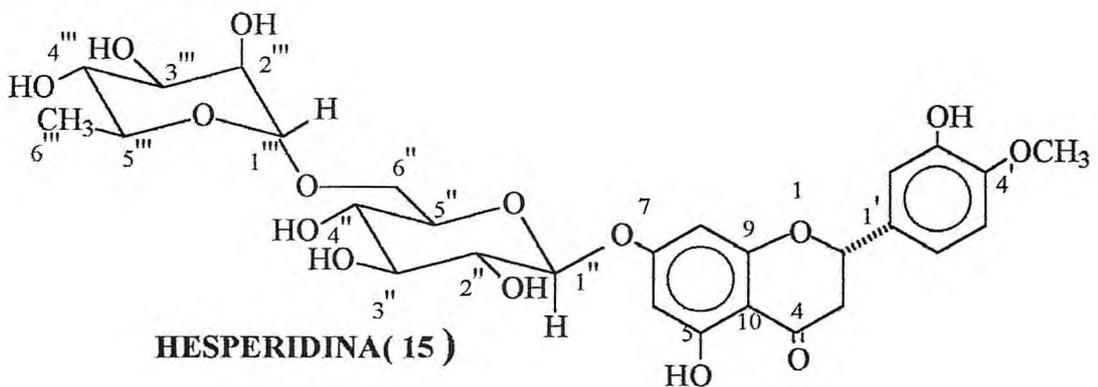
Os dados obtidos corroboram para a obtenção de uma mistura de produtos O- β -Hidroxipropilados foi obtida a partir da reação da Rutina com óxido de propileno



7.3.7 - CITROFLAVONÓIDES

A hesperidina é uma flavanona glicosilada extraída da parte branca da casca da laranja, encontrada também no suco da laranja, folhas e cascas do tronco de arvores cítricas.

Em geral as técnicas descritas na literatura para obtenção da hesperidina na realidade são métodos para produção de glicosídeos de flavanonas a partir principalmente da casca da laranja. Estes glicosídeos de flavanonas são principalmente hesperidina, naringinina, eriodictina (glicosídeo do eriodictiol; ver estruturas dos principais citroflavonóides na figura 4.2, pag. 61) , e o produto obtido possui como principal constituinte a hesperidina (> 85%) e é comercializado com o nome de citroflavonóides [HIGBY, 1947].



Dentre as técnicas citadas para a obtenção dos citroflavonóides da casca da laranja, o método mais empregado é a extração alcalina da casca esmagada com hidróxido de sódio [HIGBY, 1944], hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio [HIGBY, 1947], hidróxido de cálcio [BATER, 1948]. Embora empregados industrialmente estes métodos apresentam um rendimento obtido pequeno (0,53%). Um método mais conveniente é a extração da casca da laranja peletizada (seca), após moagem, com metanol [HOROWITZ, 1964; ARTHUR, 1956] seguido da recristalização produzindo os citroflavonóides purificados com rendimento 3% a partir da casca de laranja seca (ver procedimento experimental 8.5.5.12, pag. 237).

Os citroflavonóides foram então analisados por CCD em sílica gel utilizando a mistura acetato de etila : ácido fórmico : metiletilcetona : água (50 : 10 : 30 : 10) produzindo um RF 0,59, idêntico ao descrito pela literatura para a hesperidina. O produto foi então caracterizado pelas análises por RMN ^1H , RMN ^{13}C , IV, e ponto de fusão (260-261°C; ver procedimento experimental, 8.5.5.12, pag. 237).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 10.93, pag. 294) apresentou 28 linhas espectrais que ao serem comparadas com os sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 10.94, pag. 294), permitiu confeccionar a tabela 7.17 (pag. 193), que apresentam oito absorções relativo a carbonos não hidrogenados, dezessete carbonos metínicos, uma absorção característica de carbono metilênico e duas referentes a carbonos metílicos.

Tabela 7.17 - Deslocamentos químicos RMN¹³C dos citroflavonóides com padrão de hidrogênio (RMN¹³C-BB e DEPT 135 : δ : DMSO : 125,77MHz).

C	CH	CH ₂	CH ₃
197,90	118,57	42,67	56,32
165,76	114,77	66,66	18,45
163,66	112,68	-	-
163,11	101,22	-	-
148,59	100,08	-	-
147,29	97,00	-	-
131,53	96,17	-	-
103,95	78,99	-	-
-	76,16	-	-
-	73,61	-	-
-	72,70	-	-
-	71,33	-	-
-	70,89	-	-
-	70,22	-	-
-	69,94	-	-
C ₈	C ₁₆ H ₁₆	C ₂ H ₄	C ₂ H ₆
TOTAL C ₂₈ H ₂₆			

O espectro de RMN ^1H (Figura 10.92 , pag. 293) dos citroflavonóides mostrou a presença de duas absorções referentes a hidrogênios de carbono insaturados sendo um multiplete , entre δ 6,11 e δ 6,14 com integração para dois hidrogênios e outro multiplete entre δ 6,88 e δ 6,95 com integração para tres hidrogênios . Observamos a presença de dois dubletos em δ 5,40 ($J=9,0$ Hz), em δ 4,98 ($J= 8,0\text{Hz}$) com integração para um hidrogênio cada e um singleto em δ 4,50 com integração para um hidrogênio . De acordo com o trabalho publicado por Ferreira e Colaboradores em 2000 , estas absorções estão de acordo com os dados da literatura para a hesperidina . Observou-se também no espectro de RMN ^1H dos citroflavonóides outras absorções como em δ : 5,52(dd),5,17 (t) , 4,68 (d), 4,61 (d) e 4,48 (d).

A literatura relata[FERREIRA , 2000] a preparação de um derivado acetilado que foi analisado por RMN ^1H , RMN ^{13}H , HMQC , HMBC , NOESY , COSY, que permitiu postular a existência das conformações mostradas abaixo (duas formas topoméricas médias) com interconverção lenta na escala de tempo de RMN, que podem ser justificadas pela reduzida liberdade de rotação em torno da ligação entre o átomo de Oxigênio do carbono-7 e CH-1” na temperatura e concentração usadas para registro do espectro. Apesar destes dados não foi possível comparar os dados de RMN ^1H do produto topomérico acetilado com as outras absorções no espectro de RMN ^1H destes citroflavonóides (descritas acima) .

Estas observações juntamente com a análise dos dados de RMN ^{13}C -BB e DEPT (135°) (Tabela 7.18 , pag. 195) permitiram sugerir que o citroflavonoide(hesperidina(15)) isolado estava em equilíbrio com seu topoisômero (ver figura 7.8 , pag. 196) .

Tabela 7.18 - Comparação entre os dados de RMN¹³C dos Citroflavonóides e Hesperidina [AGRAWAL,1989;FERREIRA e Colaboradores,2000] (δ , DMSO, 125 , 75 MHz) .

C	CITROFLAVONOIDES (0,45 DESLOCADO)	HESPERIDINA
2	78,99	78,4
3	42,67	42,0
4	197,90	196,7
5	163,66	163,0
6	97,00	96,7
7	165,76	165,1
8	96,17	95,8
9	163,11	162,5
10	103,95	103,5
1'	131,53	131,2
2'	114,77	114,3
3'	147,08	146,7
4'	148,59	148,1
5'	112,68	112,7
6'	118,57	117,8
1''	101,22	100,7
2''	73,61	73,3
3''	76,90	76,6
4''	70,22	69,9
5''	76,16	75,8
6''	66,6	66,4
1'''	100,08	99,8
2'''	70,89	70,6
3'''	71,33	71,0
4'''	72,70	72,4
5'''	68,94	68,6
6'''	18,45	18,2
OCH ₃	56,32	56,0

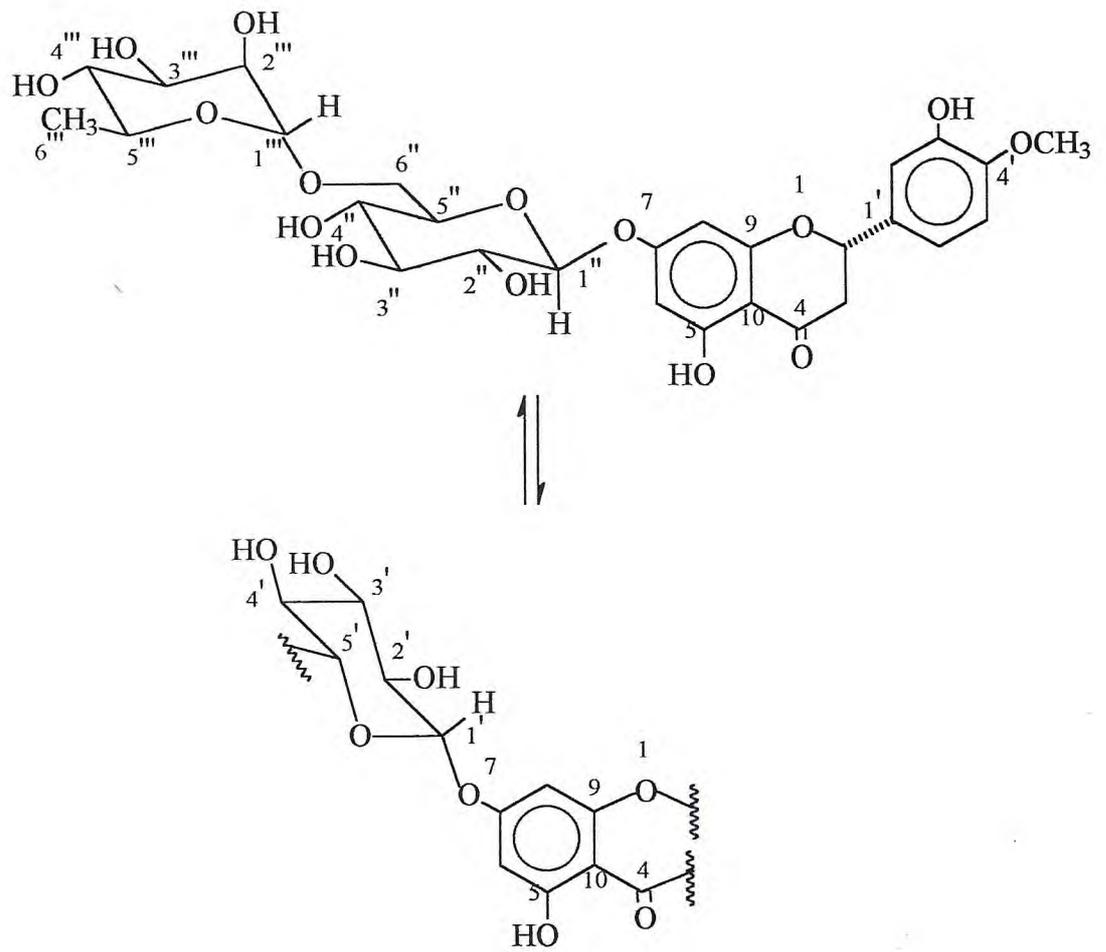


Figura 7.8 Hesperidina(15) e seu topoisômero

Referências Bibliográficas

- AGRAWAL, P.K., BANSAL, M.C., *Carbon-13 NMR of flavonoids* ;
AGRAWAL, P.K., Ed.; Elsevier, Amesterdam, p.283-364 , 1989.
- AMARI, J.V., BROWN, P.R., GRILL,C.M., TURCOFFE, J.G., Isolation
and Purification of Lecithin by Preparative High performance Liquid
Chromatography, *Journal of Chrom.*, v.517, p. 219-228, 1990.
- ARTHUR, H.R., HUI,W.H., MA, C.N., An examination of Rutaceae of
Hong-Kong .1. Flavonoids glycosides from Zanthoxilum species and
occurrence of optically active hesperitin , *J. Chem. Soc.*, p. 632-635
(1956).
- BAIER, W.E., USP 2,442,110 , 1948 .
- BOMBARDELLI, E., PATRI, G., POZZI, R., USP 5,147,859, 1992.
- BOMBARDELLI, E., PATRI, G., PUZZI, R., USP 5,166,139, 1992.
- BOMBARDELLI, E., SABUDIE, M., USP 4,963,527, 1997.
- CICLE, S.J., MEYER, E.W., USP 3,268,335, 1966.
- COURBAT, P., FAVRE,J., GUERNE, R., UHLMANN, G., Contribution a
L'edude D'un produit de β -hidroxyethylation du rutoside Parte 1, *Helv.*
Chim. Acta, v. 49 (N.º161) , p. 1203-1211, 1966.
- COURBAT, P., UHLMANN, G., GUERVEN, R., Contribution A L'etude
D'un Produit de β -hidroxyethylation du Rutoside Parte 2, *Helv. Chim.*
Acta, v. 49 (N.º 161) , p. 1420-1424, 1966.

COURBAT, P.J., VAUD, F., USP 3,420,815 , 1969 .

DIFFENBACHER, A., BRACCO, U., *Analytical the Chimique in Food Emulsifiers*, JAOCS, v. 55, p.642, 1978.

ELLINGSON, J.S., ZIMMERMAN, R. L., Rapid separation of gram quantities of phospholipids from biological menbranes by preparative HPLC , *J. lipid. Res.*, v. 28, p. 1016-1018 , 1987.

FAVRE, J., Swiss Patent. 349614 1957 .

FERREIRA, D.T., ALVARES, P.S.M., HOUGHTON, P.J., BRAZ-FILHO, R., Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre sua impotância medicinal . *Química Nova*, v. 23 n.1 , p. 42-46 , 2000.

Food Chemical Codex, 3ª ed, NAS-NRC, Washington, D.C. 1980.

GUNTHER, B.R., RAINER, L., USP 4,983,327. 1991.

HIGBY, H.R., USP 2,348,215 , 1944 .

HIGBY, H.R., USP 2,421,661 , 1947 .

HOROWITZ, R.M., *Relations Between the Taste and Structure of Some Phenolic Glycosides*, in Harbone, J. B (ed.) *Biochemistry of Phenolic Compounds*. p. 545, Academic Press, 1964.

JUNGALWALA, F.B., EVANS, J.E., McCLUER, R.H., HPLC of phosphatidylcholine and sphingomyelin with detection in region of 200 nm , *Biochem. J.*, v. 155 , p. 55-60 , 1976.

KRATKY, Z., TANDY, J.S., U.S. Patent 5,008,381. 1991.

LEA, C.H., RHODES, D.N., STOLL, R.D., Phospholipids.3. Chromatographic separation of glycerophospholipids , *Biochem. J.*, v. 60, p. 353-363 , 1955.

LEYH, H., German Patent 2,122,514., 1972.

MARINETTI, G. U., STOTZ, E., Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper , *Biochem. e Biophys. Acta* , v. 21, p. 168-170 , 1956.

MARKAN, K.R., CHARI, V.M., *The flavonoids: Advances in Research* ; HARONE, J.B., MABRY, T.J., Eds., Chapman and hall, London, p.19-132 , 1982 .

MARKHAM, K.R., TERNAI, B., ¹³C NMR of flavonoids-II, *test.* v. 32 , p. 2607-2612, 1976.

MARKHAN, K.R., TERNAI, B., ¹³C-NMR of flavonids-II, *Tet.* v.32 , p.2607-2613 , 1976 .

PARDUN, H., CLOVES, G., USP 3,047,597, 1962.

PESSAC, M.C., RAMONVILLE, J.C., USP 3,888,842 , 1975 .

- PULLEY, G.N., LOESECKE, H.W., Prepararion of Rhamnose from Naringin, *J. Am. Chem. Soc.*, v.61, p.175-176, 1939.
- SANTASANIA, C., Phospholipid Analysis in Soy Lecithin by Lc Using Microporasil Column, *Waters Lab. Highlight*, v. 336, p. 87,1987.
- SOUZA, M.P., MATOS, M.E.O., MATOS, F, J, A., *Constituintes Químicos de Plantas Medicinais Brasileiras*. Imp. Universitária/UFC, Fortaleza p. 416.
- TOLOSAN, F.F.C., PESSAC,C.F., JALLES, J.M., LE BOUSCAT, A.T., FONTAINE,C.A., TOLENCE,G.P., USP, 4,211,772 , 1980 .
- TOMASSINI, E., e MORS, W. B.,*Dimorphandra mollis Benth.* e *D. gardneriana Tul.* ,Novas e Excepcionais Fontes de Rutina , *Anais Acad. Bras. Ciênc.* v. 38 , p. 321-323, 1966.
- ULMANN'S *-ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMISTRY* ,V.A 15; p.293-298 ,John Willie e Sons , 6 th. Edition ,2000 .
- US Pharmacopeia, 24^a EDITION, p. 2471,2000
- WALTON ,C.F., The Preparation of Rhamnose, *J. Amer. Chem. Soc.* v. 43, p. 127-131, 1921 .
- WITZ-PEITZ, F., PROBST, M., WINKELMANN, J., USP 4,358,442, 1982.
- YANDRASITZ, J.R., BERRY, G., SEGAL, S., *J Chromatogr.*, v. 255, p. 319, 1981.

Capítulo 8

Parte Experimental

8.1	Obtenção do material	204
8.2	Métodos	204
8.2.1	Métodos cromatográficos	204
8.2.2	Cromatografia de camada delgada (CCD)	204
8.2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	205
8.3	Outras determinações	206
8.3.1	Ponto de Fusão	206
8.3.2	Rotação Óptica	206
8.4	Espectrometricos	206
8.4.1	Espectrometria na região do infravermelho (IV) e ultravioleta (UV) .	206
8.4.2	Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	207
8.5	Estudo dos constituintes das favas de <i>Dimorphandra gardneriana</i> .	209
8.5.1	Separação das sementes das favas	209
8.5.2	Métodos de obtenção dos polissacarídeos das	209

	sementes de <i>Dimorphandra gardneriana</i> .	
8.5.2.1	Poli VIII	210
8.5.2.2	Poli V	210
8.5.2.3	Poli VI	211
8.5.2.4	Desp- I	211
8.5.2.5	Poli X	212
8.5.2.6	Poli XI	212
8.5.3	Análises dos polissacarídeos	213
8.5.3.1	Determinação da umidade	213
8.5.3.2	Determinação do nitrogênio total	214
8.5.3.3	Determinação das cinzas	214
8.5.3.4	Determinação de carboidratos	215
8.5.3.5	Determinação de proteínas	215
8.5.3.6	Hidrólises Ácidas	215
8.5.3.7	Cromatografia em papel e em camada delgada	216
8.5.3.8	Redução e acetilação dos produtos das hidrólises ácidas	216
8.5.3.9	Cromatografia líquido-gasosa	217
8.5.3.10	Viscosidade	218
8.5.3.11	Determinação da massa molar	221
8.5.4	Extração dos flavonóides	221
8.5.4.1	Doseamento por CLAE – analítico	222
8.5.4.3	Isolamento por CLAE– semi - preparativo	223
8.5.4.4	Teste de substâncias análogas	225
8.5.5	Preparação dos flavonóides	226
8.5.5.1	Hidrólise da Rutina	226

8.5.5.2	Benzilação da Quercetina	228
8.5.5.3	Acetilação da Qutina	230
8.5.5.4	Tetrabenzoil Rutina	231
8.5.5.5	Hidroetilação da Rutina	232
8.5.5.6	Hidroxipropilação da Rutina	233
8.5.5.7	Benzilação da Rutina	234
8.5.5.8	Hidrólise da Rutina benzilada	235
8.5.5.9	Tetrabenzoil Quercetina	235
8.5.5.10	7-O-Benzoil Rutina	236
8.5.5.11	7-O-Benzoil Quercetina	237
8.5.5.12	Citroflavonóides	237
8.5.5.13	Extrato de Semente de Uva	238
8.5.6	Fracionamento da lecitina de soja bruta (LSB-IA)	238
8.5.6.1	Análise de LSB-IA	239
8.5.6.2	Índice de acidez	240
8.5.6.3	Material insolúvel em hexano	241
8.5.6.4	Teor de insolúveis em acetona	241
8.5.7	Preparação dos complexos : Método geral e proporções para preparação dos vários complexos (Lipo 1-Lipo 22)	241

8. Parte Experimental

8.1 -Obtenção de material

As favas *Dimorphandra gardneriana* selecionadas para estudo foram coletados na localidade de Jardim - Crato – Ceará, e são amostras de favas comercializadas pelos habitantes daquela região distribuídas pelo comerciante “Zé das Cacimbas”.

O extrato de semente de uva foi obtido da empresa Centroflora e possui a marca Vitavim, e as cascas de laranja peletizada foram obtidas em estabelecimentos que comercializam rações. A lecitina utilizada é o produto comercializado pela empresa Bionatus obtida na forma de cápsulas gelatinosas moles contendo 500 mg cada cápsula.

8.2 – Métodos

8.2.1 -Métodos cromatográficos.

As cromatografias de absorção em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (0,063-0,200 mm ; 70-230 mesh) marca VETEC.

O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e quantidades de adsorvente a serem utilizadas.

Para a eluição foram utilizados os solventes; hexano, éter de petróleo, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e misturas binárias desses solventes em ordem crescente de polaridade.

8.2.2 - Cromatografia de camada delgada (CCD)

Utilizou-se sílica gel (Carlo Erba) para cromatografias em lâminas de vidro e placas de sílica gel com indicador de fluorescência (254 nm) sobre poliéster (2-25 μm , camada de 250 μm) SIGMA .

A revelação das placas de CCD foi feita pela exposição das placas à lâmpadas de irradiação na faixa do ultravioleta (UV), Vilber Lourmat, modelo CN-15LM, com dois comprimentos de onda (312 e 365 nm), pulverização com solução de vanilina e ácido perclórico em etanol, seguido de aquecimento em estufa a aproximadamente 100°C por cerca de 5 minutos, e/ou saturação em cuba de iodo.

8.2.3 -Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

SISTEMA HPLC -ANALITICO

Bomba : LC-10AD SHIMADZU com sistema de duplo pistão

Detetor : PHOTODIODE ARRAY SPD-M10A SHIMADZU.

Injetor : 712 S RHEODYNE com loop 20 μL .

Comprimento de onda : 350 nm.

Temperatura : ambiente

Coluna : HIBAR LICHROSPHER 100RP18 (4,6 x 30).

SISTEMA HPLC – SEMI-PREPARATIVO.

Bomba : LC-10AD SHIMADZU com sistema de duplo pistão

Detetor : PHOTODIODE ARRAY SPD-M10A SHIMADZU.

Injetor : 712 S RHEODYNE com loop 1mL.

Comprimento de onda : 350 nm.

Temperatura : ambiente

Coluna : PREPODS SHIMPACK (10 x 250).

Vazão : 7 mL / min.

8.2.4 - Cromatografia líquido-gasosa

As cromatografias líquido-gasosas(CGL) foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 5890 series II, com detetor de ionização de chamas, utilizando-se como gás de arraste o Nitrogênio e coluna 3% de DB-210 sob " gas chrom Q" de 100-200 mesh, em tubo de aço inoxidável 30 m x 0,25 mm (d.i) com detetor a 250°C, injetor a 250°C e fluxo de nitrogênio a 40,0 mL/min. A temperatura da coluna para os produtos de hidrólise na forma de acetatos de alditóis era de 250°C(ver figura 8.1).

8.3 -Outras determinações

8.3.1 -Ponto de Fusão.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelhos de microdeterminação Mettler provido de placa aquecedora modelo FP-52 e unidade de controle FP-5 .

8.3.2 -Rotação Óptica.

Utilizou-se Polarímetro digital Perkin-Elmer 341 para obtenção da rotação óptica.

8.4 -Espectrométricos

8.4.1 -Espectrometria na região do infravermelho (IV) e Ultravioleta (UV).

Os espectros na região do IV foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT IR Spectrum 1000 da central analítica do

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica-UFC utilizando pastilhas de KBr para análise das amostras sólidas e filmes para os óleos.

Os espectros na região do Ultravioleta foram obtidos em Espectrofotômetro digital UV-VIS QUIMIS MODELO Q-108U Do Parque de Desenvolvimento Tecnológico PADETEC – UFC utilizando cubetas de quartzo para análises das várias amostras em solução .

8.4.2 - Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).

Quantidades variadas de amostras (sólidos , líquidos e resina) dissolvidos em 0,6 mL de CDCl_3 , D_2O , DMSO, CD_3OD e acondicionadas em tubos de RMN de 5mm a 303 k , 323 e 353 e pressão atmosférica. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão(ppm) e referenciados para RMN ^1H pelo pico de hidrogênio pertencente a fração de cloroformio não deuterada (δ 7,24 ; δ 4,63 para o D_2O ; δ 2,49 para o DMSO ; δ 3,30 para o CD_3OD) e para RMN ^{13}C pelo pico central do tripleto em δ 77,0 do cloroformio deuterado (δ 39,5 para o DMSO ; δ 49,0 para o CD_3OD) . Os equipamentos de RMN utilizados nas análises foram os espectrometros Bruker pertencentes à Central Analítica e ao Centro – Nordeste de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear(Cenauremn) da Universidade Federal do Ceará, nos seguintes modelos.

Bruker Avance DPX-300 operando na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz e na frequência do carbono a 75,47 MHz, em um campo de 7.05 tesla. Equipado com sonda inversa multinuclear de 5mm nos experimentos unidimensionais ^1H , ^{13}C foram utilizadas para as aquisições: largura espectrais $\text{SW}_\text{H} = 24$ ppm e $\text{SW}_\text{C} = 230$ ppm, período de relaxação de 1.0s (D_1), pulso de 90° para ^1H de $9.0 \mu\text{s}$ com potência de 6.40 dB e para ^{13}C de $12.0 \mu\text{s}$ com potência de 3,0dB.

Avance DRX-500 operando na frequência de hidrogênio a 500,13 MHz e na frequência do carbono a 125,75 MHz em um campo de 11,7440 tesla, utilizando sonda dual de 5 mm, para experimentos unidimensionais (^1H . ^1H -COSY e NOESY), de correlação heteronuclear (HECTOR e COLOC). Para experimentos bidimensionais de correlação heteronuclear (HMQC e HMBC) e com gradiente (GS-COSY, GS-HMQC e GS-HMBC), utilizou-se sonda inversa multinuclear de 5mm com gradiente no eixo z e unidade de gradiente de 10 A. Nos experimentos unidimensionais ^1H , ^{13}C foram utilizadas para as aquisições: larguras espectrais $\text{SW}_h = \text{SW}_c = 230$ ppm, período de relaxação de 1.0s (D_1), pulso de 90° para ^1H de 10,0 μs com potência de -3,0; 2,0 ou 6,4 dB, dependendo do experimento e para ^{13}C de 6,5 μs com potência de 3,0 dB.

O número de pontos no qual o FID é amostrado e os dados armazenados (TD) foi igual a 32 K para RMN ^1H , enquanto que para ^{13}C variou como o experimento. O número de transientes (ns) geralmente utilizado para ^1H foi 8, enquanto que para ^{13}C variou de acordo com o experimento. Para espectros obtidos com gradiente, utilizou-se pulsos senoidais de gradiente de 1 ms de duração e 400 ms de recuperação. Para processamentos foram utilizados os ajustes padrões para a fase e linha de base SI = 16 ou 32 K e alargamento de linha (l_b) igual a 0,0 Hz para ^1H e variado para ^{13}C . os processamentos de matrizes de dados de 1024 x 512 (HMQC e HMBC) e 1024 x 1024 (COSY e NOESY) ($F_2 \times F_1$) com *zero filling e linear prediction*.

Os experimentos unidimensionais de RMN ^1H foram obtidos usando seqüência de pulsos zg30 e zgpr (para saturação do sinal do solvente).

Os experimentos de RMN¹³C foram efetuados a partir de : seqüência de pulsos zgpg30, desacoplamento por CPD(Composite pulse decoupling) utilizando a sequencia waltz16 e atenuação do desacoplador de 95 µs.

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN¹³C foi determinado a partir da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) variando o ângulo de nutação (0) de 135°, utilizando as seqüências de pulso DEPT 135, respectivamente, desacoplamento por CPD, utilizando a seqüência waltz16 e atenuação do desacoplamento de 100 µs.

As seqüências de pulsos usadas para os experimentos bidimensionais foram:

COSY : cosydftp	HMBC : inv4plrnd
NOESY : noesytp	GS- HMBC : inv4gslplrnd
HMQC : invbtp	HETCOR : hxco
GS-HMQC : inv4gstp	COLOC : colol

8.5 -Estudo dos Constituintes das Favas de *Dimorphandra gardneriana*.

8.5.1 -Separação da sementes das favas – 5 Kg de favas foram moídas em moinho de martelo sem tela. O produto da moagem foi peneirado, produzindo 4,5 Kg de favas (90%) e 275 g de sementes (5,5 %)

8.5.2 -Métodos de obtenção dos polissacarídeos das sementes de *Dimorphandra gardneriana*.

Dos métodos de extração discutidos (Poli I a Poli VIII) para obtenção das galactomananas das favas de *Dimorphandra gardneriana* somente os que

apresentaram os melhores resultados tiveram a sua metodologia detalhada conforme descrito abaixo :

8.5.2.1 - Poli VIII – 50 g de semente de *Dimorphandra gardneriana*. foram aquecidos à fervura com 200 ml de água por 20 minutos e deixados em repouso por 12 horas, a 25°C . Após este período as sementes aumentaram de tamanho e se tornaram macias o suficiente para permitirem uma fácil separação entre o endosperma , a casca , o embrião e o tegumento. O endosperma isolado foi liofilizado produzindo 16,90 g(33,8%) de endosperma(II)seco . 2,5 g do endosperma(II) foram submetidos a extração exaustiva com água à 80°C (100ml) por 4 horas. A solução viscosa (aquecida) foi então filtrada em tela de polyester (20 microns) utilizando funil de buchner. O resíduo foi submetido a nova extração com 100 ml de água à 80°C por 4 horas. O resíduo foi resubmetido ao mesmo processo mais uma vez ou até que todo endosperma tenha se dissolvido ficando apenas as fibra. Os filtrados foram combinados, aquecidos e filtrados em tela de polyester de 5 microns utilizando funil de buchner . O filtrado obtido era um líquido amarelo viscoso límpido, que foi liofilizado, produzindo 1,92 g de galactomanana (76,8% em relação ao endosperma(II),26% em relação às sementes) denominada de poli VIII(ver fluxograma 8.1 , pag.212 e 213).

8.5.2.2 - Poli V – 100 g de sementes de *Dimorphandra gardneriana* foram aquecidos à fervura com 200ml de água por 20 minutos e deixadas em repouso por 12 horas a 25°C. Após este período as sementes aumentaram de tamanho e se tornaram suficientemente macias para permitir uma fácil separação entre o endosperma , a casca, o embrião e o tegumento .O endosperma isolado foi seco em estufa à 100°C produzindo 31,50 g (31,5% de endosperma(I) seco) . 2,5 g do endosperma(I) foram submetidos a extração exaustiva com água á 80°C (100ml) por 4 horas. A solução viscosa (aquecida) foi então filtrada em tela de polyester (20 microns) utilizando funil de buchner. o resíduo foi submetido a nova

extração com 100 ml de água a 80°C por 4 horas . O resíduo foi ressubmetido ao mesmo processo mais uma vez ou até que todo endosperma tenha se dissolvido ficando apenas as fibras. Os filtrados foram combinados, aquecidos e filtrados em tela de polyester de 5 microns utilizando funil de buchner. O filtrado obtido era um liquido róseo viscoso e límpido. O filtrado foi liofilizado produzindo 1,725 g de galactomanana (69% em relação ao endosperma (I) e 21,7% em relação as sementes) denominada de poli V .

8.5.2.3 -Poli VI - 5 g de semente de *Dimorphandra gardneriana* foram aquecidas com 200 ml de água a 80°C por 10 horas. A solução viscosa ainda quente foi então filtrada em tela de polyester (20 microns) utilizando funil de buchner. O resíduo foi submetido a nova extração com 200ml de água por 4 horas. O resíduo foi ressubmetido ao mesmo processo mais uma vez ou até que a semente tenha se dissolvido ficando apenas as fibras, as cascas, o embrião e o tegumento . Os filtrados foram combinados, aquecidos e filtrados em tela de polyester de 5 microns utilizando funil de buchner. O filtrado obtido era um liquido róseo viscoso e límpido. O filtrado foi liofilizado produzindo 1,62 g de galactomanana (32,4% e m relação a semente) denominada de poli VI .

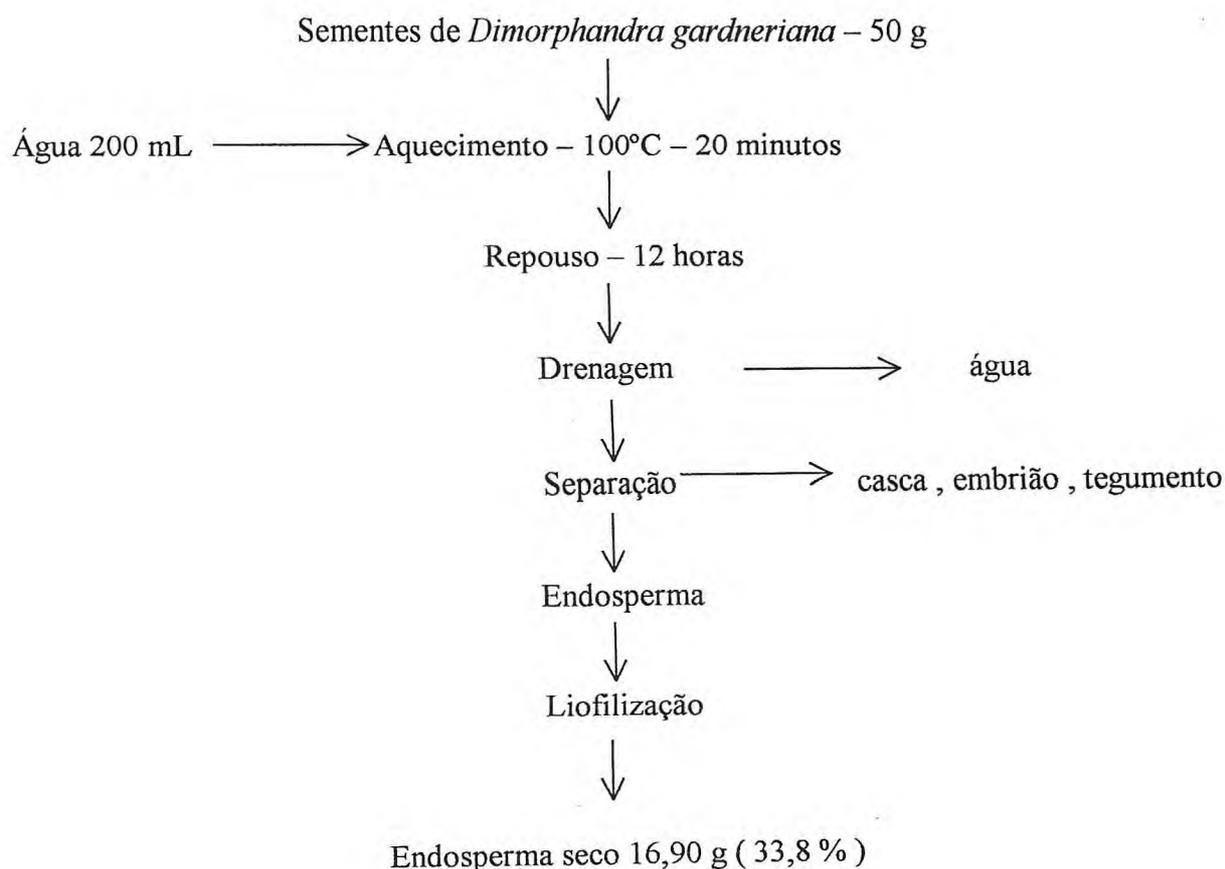
8.5.2.4 -Desp I - 1 g da galactomanana poli V foram dissolvidos por agitação em 100ml de ácido ortofosforico xaroposo (85% p/p) a 20°C em balão de fundo chato por 2 horas. O balão foi lacrado com tampa e colocado em freezer a 4°C por 4 semanas. O balão diariamente foi submetido a agitação por alguns minutos e devolvido ao freezer. Após o período a mistura foi adicionada a 1 litro de éter gelado em um beacker, seguido de vigorosa agitação. O precipitado obtido foi então separado por decantação e lavado com éter gelado (200 ml). Após filtração simples o precipitado foi dissolvido em água 30 mL, os traços de ácido fosfórico foram removidos pelo tratamento com carbonato de bário (pH 7) ,

seguido de filtração à vácuo com camada de celite (buchner). O filtrado neutro foi liofilizado produzindo 0,70 g de galactomanana despolimerizada denominada de Desp I .\

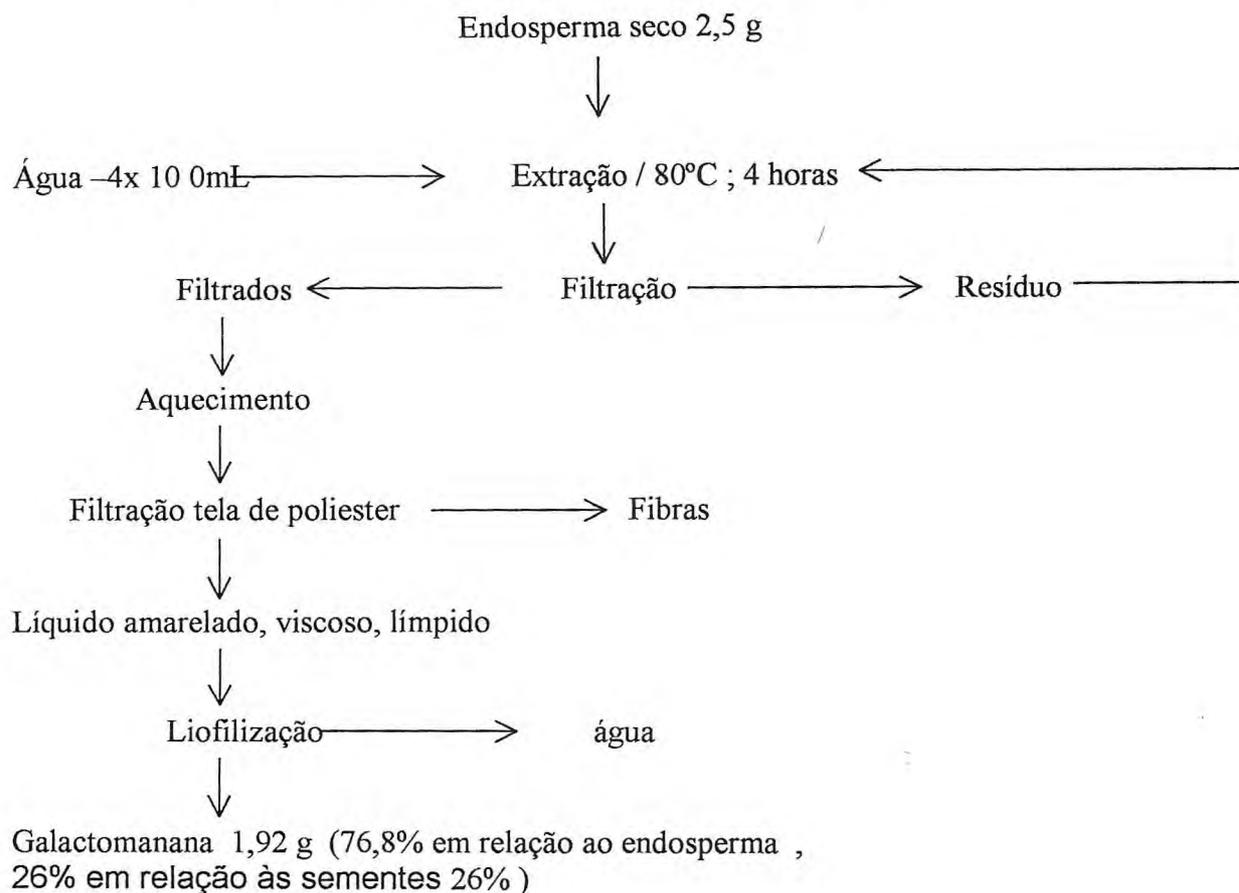
8.5.2.5 - Poli X- Utilizando o mesmo procedimento para o isolamento da galactomanana descrito em poli VIII, 2,5 g de goma guar ALDRICH foram extraídos produzindo 0,60 g (24%) de galactomanana denominada de poli X .

8.5.2.6 -Poli XI- Utilizando o mesmo procedimento para o isolamento da galactomanana descrito em poli VIII, 2,5 g de goma locust bean ALDRICH foram extraídos produzindo 0,66 g (26,4% de galactomanana denominada de poli XI .

Fluxograma 8.1 –Fluxograma utilizado para extração das galactomananas (poli VIII) a partir das Sementes de *Dimorphandra gardneriana*



Fluxograma 8.1 –C ontinuação -Fluxograma utilizado para extração das galactomananas (poli VIII) a partir das Sementes de *Dimorphandra gardneriana*.



8.5.3 -Análise dos polissacarídeos: Todas as galactomananas extraídas foram analisadas para determinação de sua pureza (poli I a poli VIII ,poli X, poli XI e Desp I .

8.5.3.1 -Determinação de umidade : para determinação de umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo amostras de tegumento, cotilédones, goma ou sementes íntegras de *Dimorphandra gardneriana* foram colocados em estufa a 110°C por 24 horas. Em seguida, foram deixados em um dessecador, sobre sílica, até atingir o equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo então pesados , sucessivamente, até que os

pesos permanecessem constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em porcentagem.

8.5.3.2 -Determinação de nitrogênio total

A determinação do teor de nitrogênio total da goma pulverizada foi feita pelo método descrito por BAETHGEN e ALLEY (1989).

Uma amostra de 100mg da goma foram adicionados 1,1g de catalisador (100g de KH_2SO_4 , 10g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1 g de selênio) e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi levada a um mineralizador deixada por pelo menos 30 minutos ou até que uma solução límpida fosse obtida, sendo em seguida diluída para 25L com água destilada. A 100 μl da amostra diluída foram adicionados 0,9 mL de diluente, 5,5 mL de tampão (contendo NaHPO_4 0,1M, tartarato de sódio e potássio 5% e NaOH 5,4%), 4 mL de solução de salicilato de sódio (15%), nitroprussiato de sódio (0,03%) e 2 mL de hipoclorito de sódio a 6%. As amostras foram então colocadas em um banho-maria a 37°C por 15 minutos e a leitura das absorbâncias foi feita a 650 nm em espectrofotômetro (Quimis Q-108U).

O teor de nitrogênio da amostra foi calculado em relação a uma curva padrão obtida com sulfato de amônio e o teor de proteína bruta calculado multiplicando-se o valo de nitrogênio total por 6,25.

8.5.3.3 - Determinação de cinzas

Para determinação do teor de cinzas, cadinhos de porcelana previamente tarados contendo 2 g da amostra foram colocados em mufla a 600°C até incineração completa da mateira orgânica, sendo posteriormente mantido em um dessecador sobre sílica, até atingir a temperatura ambiente. A seguir, os cadinhos foram pesados e o teor de cinzas calculado pela

relação entre o peso do resíduo e o peso inicial da amostra e expresso em percentagem.

8.5.3.4 - Determinação de carboidratos totais

As dosagens de carboidratos total foram realizadas pelo método fenol-sulfúrico [DUBOIS *et al.*, 1956] e açúcares redutores pelo método de SOMOGY (1945) e NELSON (1944) usando como padrão uma solução de D-manose à concentração de 100 µg/mL e efetuando-se leituras a 490 nm.

8.5.3.5 - Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas no endosperma e nas galactomananas foi determinado pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se como padrão albumina bovina (100 µg/mL) e efetuando-se leituras à 595 nm.

8.5.3.6 - Hidrólises ácidas

As hidrólises ácidas totais dos polissacarídeos obtidos das várias técnicas de extração foram feitas em tubos devidamente lacrados, com ácido trifluoroacético ou ácido sulfúrico (H₂SO₄) nas seguintes condições :

a – Uma amostra (50 mg) de poli VIII foi dissolvida em 5mL de H₂O após adição de ácido trifluoroacético 2M, o tubo foi levado a hidrólise por 5 horas em banho-maria fervente. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos: 45 min, 1, 2, 3, 4, e 5 horas e os hidrolizados foram neutralizados com 1 mL de NaOH 1M. os açúcares redutores foram quantificados pelo método de SOMOGY (1945) e NELSON (1944).

b – Ácido trifluoroacético 1M, durante 5 horas em banho à 100°C; ao final da hidrólise, o excesso de ácido era removido por evaporação em capela a temperatura ambiente.

c – Ácido sulfúrico 72% (v/v) , durante 2 horas em banho de gelo e sob agitação ocasional, seguido de diluição para 8% e banho à 100 °C por 5 horas, então o ácido sulfúrico era neutralizado com carbonato de bário , e o sal resultante insolúvel, removido por filtração em algodão sob vácuo.

8.5.3.7 - Cromatografia em papel e em camada delgada

Após hidrólise as galactomananas foram analisadas por CCD para verificar sua composição por comparação com padrões de açúcares (para CCD Rf : galactose 0,35 e manose 0,43).

Para as análises cromatograficas em papel utilizado-se a técnica ascendente, em papel Whatman n.º1, utilizando como solvente o sistema benzeno:butanol:piridina:água (1:5:3:3 v/v fase superior) e como revelador nitrato de prata alcalino.

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em placa de sílica gel Merk (20 x 20 cm), previamente impregnada com ácido bórico a 0,034 M e ativada em estufa a 100°C por uma hora. O sistema solvente empregado foi acetato de metila:propanol:ácido acético: água na proporção de 4:2:2:1 (v/v) e como revelador foi usado orcinol/ácido sulfúrico.

Cromatografia em papel do hidrolizado revelou a presença de galactose (RF 0,15) e manose (RF 0,21).

R8.5.3.8 - Redução e acetilação dos produtos das hidrólises ácidas

Os Polissacarídeos resultantes das várias técnicas de extração foram hidrolisados, e os monossacarídeos obtidos foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4) por 2 horas a temperatura ambiente e, em seguida foi efetuada a remoção de íon Na^+ pela adição de resina LEWATIT S-100 (forma H^+). Após filtração, as soluções foram concentradas, em evaporador rotatório a vácuo, com temperatura de no máximo 50°C , até a secura. Lavagens sucessivas com 2 mL de metanol (3 vezes) eram feitas a fim de eliminar o ácido bórico formado por co-destilação com o metanol, na forma de éster volátil de borato de trimetila.

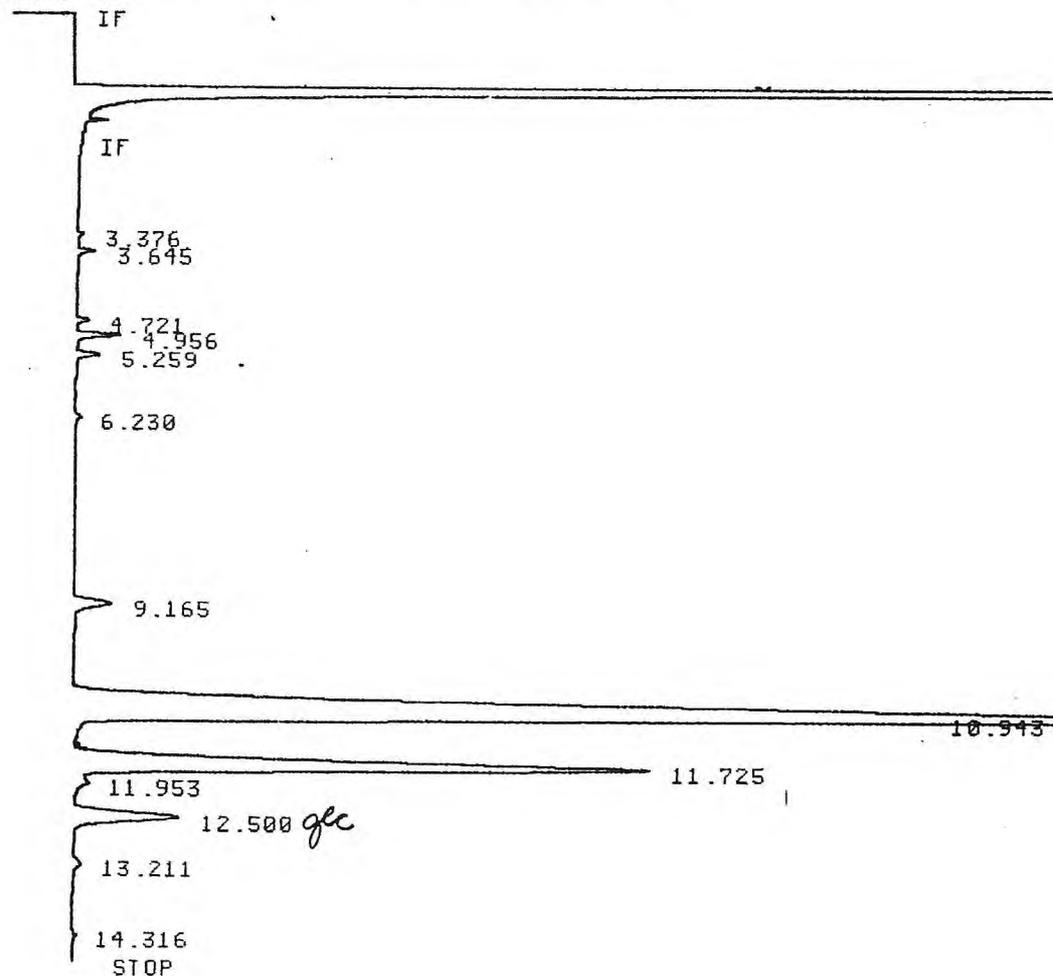
Os alditóis resultantes foram então acetilados a temperatura ambiente, com uma mistura de anidrido acético:piridina 1 : 1 (v/v), por 16 horas. O processo de esterificação foi interrompido pela adição de gelo moído e os produtos acetilados extraídos com 21 mL de clorofórmio. A piridina residual da fase clorofórmica foi removida por sucessivas lavagens com solução de CuSO_4 5% e água destilada. Os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por CGL (Tabela 8.1, pag. 217; figura 8.1, pag. 218).

Tabela 8.1 – Dados cromatográficos obtidos dos alditóis acetatos de POLI VIII hidrolizado (Ver Figura 8.1)

Padrão	Tempo de Retenção	Área (%)
Rhamnose	43,09	-
Fucose	45,09	-
Arabinose	53,02	-
Manose	10,943	67,65
Galactose	11,725	23,66
Glucose	12,500	4,19

Figura 8.1 – Cromatograma dos acetatos de alditóis de POLI VIII hidrolizado

* THRSH 4 @
 *DELIA GALACTO/MAN BREAK
 * RUN # 880 NOV 4, 2002 15:07:11
 START



8.5.3.10 - Viscosidade

Os tempos de escoamento das soluções foram determinados em viscosímetro capilar UBBELOHDE, 0,55 mm (d.i.), imerso em banho termostatzado modelo FANEN-UNITEMP a 30°C.

As viscosidade relativas, específicas e reduzidas foram calculadas utilizando-se amostras em concentração de até 0,1834 g/dL. A variação da viscosidade reduzida extrapolada para a concentração zero forneceu a viscosidade intrínseca ($[\eta]$)

A viscosidade (η_{rel}) corresponde à relação entre a viscosidade da solução (η) e a viscosidade do solvente (η_o), onde o tempo de fluxo da solução (t) e do solvente ($t_o = 232,65$ Seg.) foram cronometrados. As viscosidades relativas das soluções aquosas de Poli VIII, à temperatura de 30°C, foram determinadas utilizando-se a seguinte equação:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_o} = \frac{t}{t_o}$$

As determinações das viscosidade específicas das soluções foram feitas de acordo com a equação:

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1$$

As viscosidade reduzidas (η_{red}), que correspondem à relação entre a viscosidade específica e a concentração da solução, foram determinadas para as soluções acima mencionadas, a diversas concentrações, conforme a equação:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{esp}}{C}$$

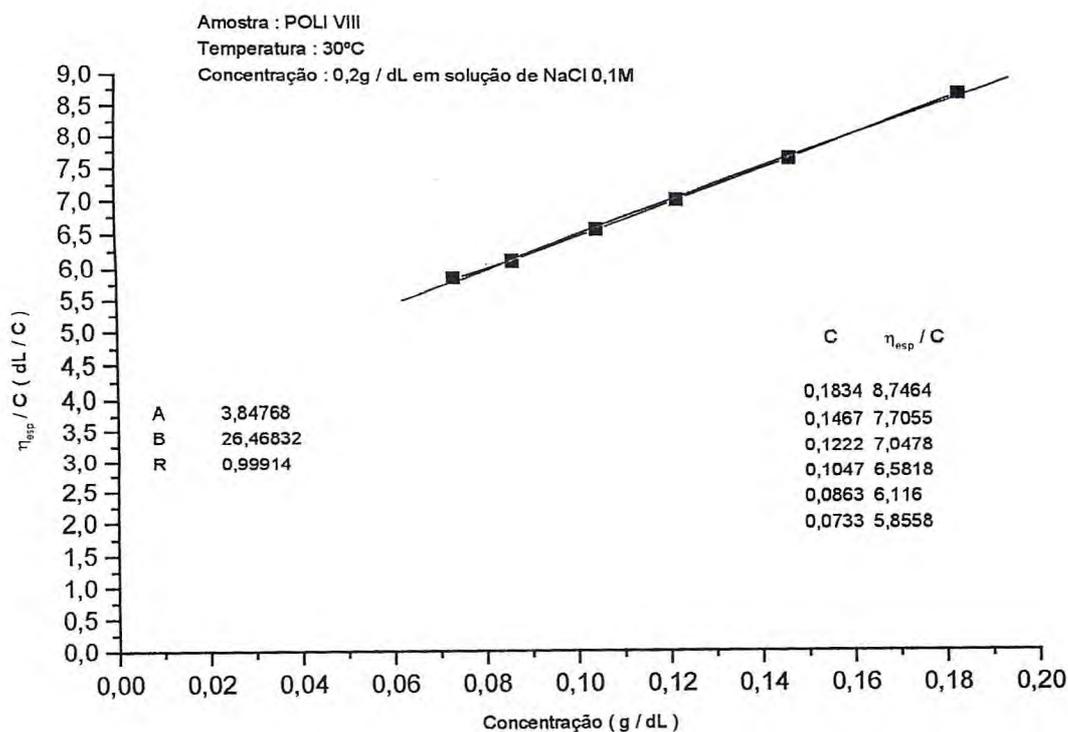
As viscosidade intrínsecas ($[\eta]$) foram determinadas em gráficos, na interseção do eixo os valores de η_{red} contra a concentração do polissacarídeo (mL/g), onde $c \rightarrow 0$. O valor da viscosidade para a concentração zero é determinado de viscosidade intrínseca, segundo a equação:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}$$

Os polissacarídeos obtidos através do método de extração poli VIII apresentaram viscosidade intrínseca $[\eta]$ com o valor de 3,85 dL/g(ver figura 8.2) .

A viscosidade intrínseca é determinada a partir de uma solução em regime diluído considerando a concentração nula, isto é, sem interferência de outras cadeias e/ou do solvente .

Figura 8.2 - Determinação da viscosidade intrínseca de poli VIII



8.5.3.10 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR

A massa molar média foi estimada através de Cromatografia de Permeação em Gel, utilizando um equipamento Shimadzu acoplado a dois detectores, um Índice de refração e outro de ultravioleta à 280nm, a partir de uma solução de polissacarídeos (0,004 g dissolvidos em 2mL de solução de NaNO_3 0,1M).

Foi utilizada uma coluna Ultrahydrogel de 7,8 x 300mm, com fase móvel NaNO_3 0,1M e fluxo de 0,5 mL / min.. O volume das amostras e dos padrões foram de 50 μL . Para construção da curva de calibração foram utilizadas pululanas de diferentes massas molares.

A equação obtida na calibração com as pululanas foi a seguinte:

$\text{Log Mw} = 12,88988 - 0,86905 \text{ Ve}$, onde: Ve é o volume de eluição em mL ($\text{Ve}=8,9163$ mL):

O coeficiente de correlação linear foi de 0,99854.

8.5.4 -EXTRAÇÃO DOS FLAVONÓIDES

Em um extrator de sohxlet foram adicionados 150 g das favas moídas de *Dimorphandra garneriana*, o material foi extraído com hexano, acetato de etila, metanol e água. Após concentração dos solventes em evaporador rotativo à vácuo os seguintes extratos foram obtidos:EHFD; 0,38 g (0,25 %) ; EAFD:4,47 g (2,98 %);EMFD:47,53 g (31,68 %) ; EAFD :8,49 g (5,66%) .

Através da análise dos extratos por CCD, EAFD e EMFD foram reunidos, e dispersos em 200 mL de água fria. Após agitação, a mistura foi filtrada em funil de Buchner, o resíduo obtido foi lavado com mais 100mL de água, após a filtração o resíduo foi seco em estufa (100°C), produzindo 18,0 g de um pó amarelo denominado (EPFD) extrato purificado de Fava d'anta.

Através da análise por CLAE analítico (ver procedimento 8.5.4.1, figura 8.3 , pag. 223) , e comparando com CCD observamos a presença de 3 picos principais, que foram isolados por CLAE semi-preparativo (ver procedimento 8.5.4.2 , figura 8.4 , pag.225) , produzindo 3 substancias codificadas como EPFD-1 , EPFD-2 e EPFD-3, que foram analisadas por RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV. Por CLAE analítico chegamos a conclusão que EPFD possui as seguintes quantidades (ver figura 8.3 , pag.223) EPFD-1: 69,0% , EPFD-2 : 29,49% , EPFD-3 : 1.51% .

8.5.4.1 -DOSEAMENTO POR CLAE-ANALÍTICO

Para determinar o teor dos constituintes de EPFD utilizamos o seguinte sistema de CLAE :

Bomba : LC-10AD SHIMADZU com sistema de duplo pistão

Detetor : PHOTODIODE ARRAY SPD-M10A SHIMADZU.

Injetor : 712 S RHEODYNE com loop 20 μL .

Comprimento de onda : 350 nm.

Temperatura : ambiente

Coluna : HIBAR LICHROSPHER 100RP18 (4,6 x 30).

Vazão : 1mL / min.

Fase móvel : Solvente A : água acidificada (pH 2,8) com ácido fosfórico .

Solvente B : acetonitrila .

Gradiente :

Tempo (min..)	%A	%B
0	80	20
12	80	20 (gradiente linear)
17	60	40
23	60	40 (gradiente linear)
25	80	20

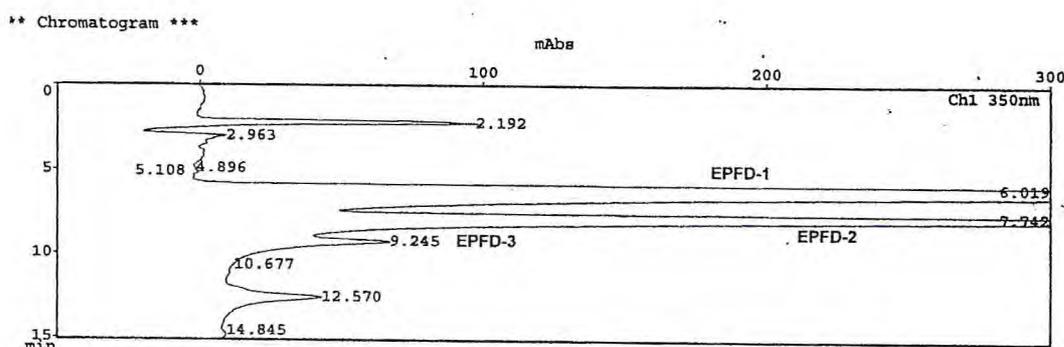
Obs.: A quantidade de B e o pH do eluente devem ser ajustados às condições específicas de cada coluna para produzir uma resolução entre os picos observados maior que 1.1.

Preparação da amostra - 10 mg de EPFD, precisamente pesados , foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e diluídos com metanol .

Procedimento – 20 µL da solução da amostra foram injetados para cromatógrafo. Os cromatogramas foram impressos e as respostas relativas para todos os picos foram determinadas .

Três picos foram obtidos no cromatograma de EPFD e foram codificados como EPFD-1, EPFD-2 e EPFD-3 e os seus teores calculados a partir das suas áreas (ver figura 8.3), obtendo-se o seguinte resultado : EPFD-1 : 69,0% ; EPFD-2 : 29,49% ; EPFD-3 : 1,51% .

FIGURA 8.3 – cromatograma de EPFD- analítico



8.5.4.3 - ISOLAMENTO POR CLAE –SEMI- PREPARATIVO.

Utilizando condições semi-preparativas foi possível isolar os constituintes de EPFD utilizando o seguinte Sistema CLAE :

Bomba : LC-10AD SHIMADZU com sistema de duplo pistão

Detetor : PHOTODIODE ARRAY SPD-M10A SHIMADZU.

Injetor : 712 S RHEODYNE com loop 1mL.

Comprimento de onda : 350 nm.

Temperatura : ambiente

Coluna : PREPODS SHIMPACK (10 x 250).

Vazão : 7 mL / min.

Fase móvel :

Solvente A : água acidificada pH 2,8 com ácido fosfórico .

Solvente B : acetonitrila .

Isocrático :

Tempo (min..)	%A	%B
0	78	22

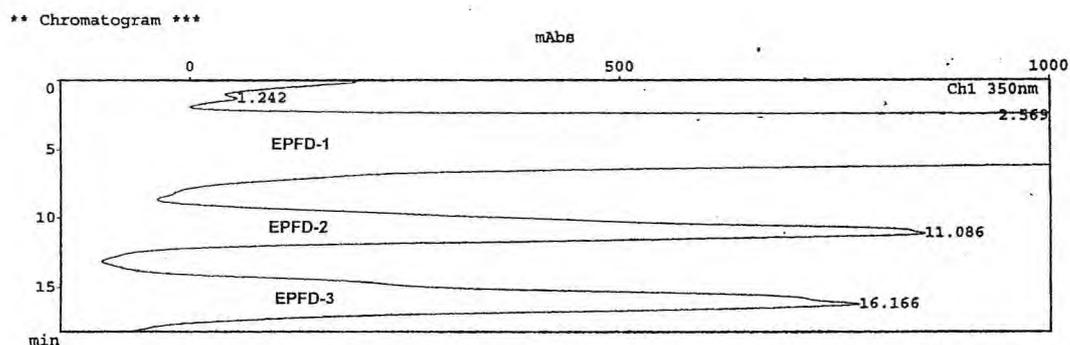
Preparação da amostra - 300 mg de EPFD, precisamente pesados, foram transferidos para um balão volumétrico de 5 mL e diluídos com metanol .

PROCEDIMENTO : 1mL da amostra foi injetada no cromatógrafo e a respostas dos picos foram obtidos, cada pico foi coletado e numerado como uma fração correspondente (conforme o cromatograma - figura 8.4).

- EPFD-1 primeiro pico (2,56 min.).
- EPFD-2 segundo pico (11,08 min).
- EPFD-3 terceiro pico (16,16 min).

Após remoção do tampão por tratamento por resina trocadora de íons cada fração foi concentrada e foram obtidos: 144,9 mg de EPFD-1; 61,76 mg de EPFD- 2; 3,17 mg de EPFD- 3, por amostra de 300 mg de EPFD que foi submetida à separação , e várias separações foram realizadas .

Figura 8.4 – cromatograma de EPFD-semi- preparativo .



8.5.4.4 – Teste para substâncias análogas

Para a Rutina, de acordo com Farmacopéia Alemã 10ª Edição.

A análise foi realizada utilizando cromatografia de camada delegada, com uma camada de sílica Gel G .

Solução a ser examinada: 0,10 g da amostra foram dissolvidas em metanol R em balão volumétrico de 10 ml .

Solução de referência: 2,0 ml da solução a ser examinada foram diluídos em balão volumétrico de 100 ml com metanol . Sobre a camada da cromatoplaça de 20 x 20cm foram aplicados separadamente 10 μ l de

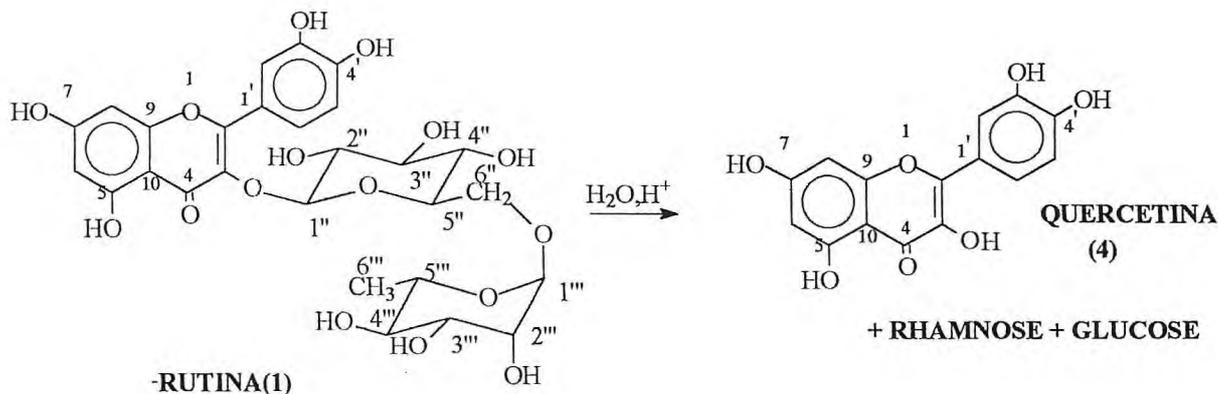
cada solução. A cromatografia foi desenvolvida até uma distância de 15cm com a mistura de eluentes descrita a seguir : butanol : água : ácido fórmico : metiletilcetona : acetato de etila (1 : 2 : 2 : 6 : 10).

Após a eluição a placa foi seca à temperatura ambiente e o cromatograma foi analisado utilizando luz ultravioleta à 365nm.

O cromatograma da solução problema deve apresentar uma mancha principal ao lado da qual no máximo, podem aparecer 3 manchas secundárias, nenhuma das manchas secundárias deve ser maior ou ter fluorescência mais forte que a mancha principal obtida no cromatograma solução de referência , que deve ser nitidamente visível.

8.5.5 – Preparação dos Flavonóides

8.5.5.1 - HIDRÓLISE DA RUTINA(1)



A hidrólise ácida foi realizada utilizando ácido sulfúrico em pequenas quantidades. 0,9 g de Rutina(1) e 9,0 mL de uma solução 3% de ácido sulfúrico em peso foram adicionados para um balão 25 mL adaptados com um condensador de refluxo. Após vigorosa agitação, a mistura reacional foi refluxada por 5 horas. Após este período, a mistura reacional foi resfriada (60°C) e em seguida foi filtrada em funil de Buchner. A quercetina obtida foi lavada ainda no funil de Buchner com água quente até pH neutro e seca.

A quercetina bruta seca obtida(0,46 g) foi purificada pela dissolução à quente (78°C)em 7,2 mL de uma solução de etanol a 75°GL.

Após a completa dissolução, a solução foi filtrada à vácuo e resfriada até a temperatura de 25°C para a cristalização da quercetina. O produto cristalizado foi filtrado em funil de Buchner e os cristais obtidos foram secos em estufa à vácuo na temperatura de 50-55°C por um periodo de 5 horas, produzindo 0,441 g (88,5%) de quercetina dihidrato puro(4) .

Acompanhamento da reação de hidrólise por CCD :A análise foi realizada utilizando cromatografia de camada delegada, com uma camada de sílica Gel 60F .

Preparação do teste: 0,1 g da substância ser examinada foi pesada em balão volumétrico de 10 mL e dissolvida em etanol (96%) ..

Preparação da referência "A": 0,1 g de Quercetina padrão foi pesada em balão volumétrico de 10 mL e dissolvida em etanol (96%) .

Preparação da referência "B": " : 0,005 g de Rutina padrão foi pesada em balão volumétrico de 10 mL e dissolvida em metanol .

Este cromatograma foi desenvolvido utilizando sílica gel F e como fase móvel uma mistura 5 volumes de butanol, 10 volumes de água, 10 volumes de ácido fórmico, 30 volumes de metil etil cetona e 50 volumes de acetato de etila.

Para a cromatoplaça foram aplicados separadamente 10 µl da preparação do teste e da preparação de referência "A" e "B" .

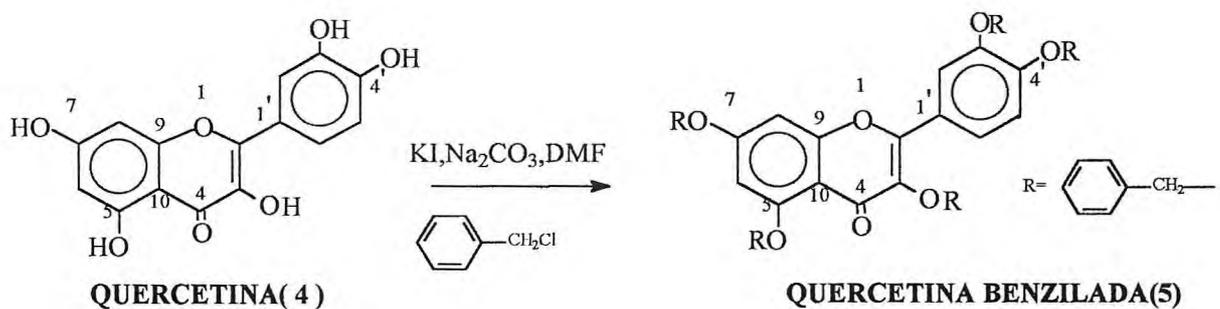
Após a eluição a cromatoplaça foi removida e seca em corrente de ar quente e pulverizada com solução de cloreto de alumínio (1,0%) em etanol. A cromatoplaça foi aquecida em estufa a 110°C por 5 minutos e examinada sob luz ultravioleta (254 a 365nm).

Os spots das substâncias relacionadas obtidos no cromatograma na preparação do teste não podem ser maiores nem mais intensos que os spots obtidos na preparação da referências "A" e "B" . A posição dos

spots obtidos no cromatograma com a preparação das referências devem ser coincidentes com a preparação do teste:

- Quercetina (Rf~0,9)
- Rutina (Rf~0,27)

8.5.5.2 - BENZILAÇÃO DA QUERCETINA (Benzquercetina(5))



Em um balão de fundo redondo de 10 mL adaptado com condensador de refluxo foram adicionados 0,2 g de quercetina(4)(0,615 mmoles), 0,36 g de cloreto de benzila (2,8 mmoles), 0,02 g de iodeto de potássio e 1,0g de carbonato de potássio (7,25 mmoles) e 2 mL de dimetilformamida (DMF).

A mistura reacional foi refluxada por 2 horas. A seguir a reação foi resfriada e filtrada para recuperação dos sais (0,9 g de K_2CO_3 , 90%) e o excesso de DMF foi destilado (1,6 mL , 83%).

O resíduo da destilação foi lavado com água quente 3 x 2 mL, até a mistura resinosa se transformar em um pó escuro. Que foi tratado com solução de hidróxido de sódio 1N e filtrado .Após a neutralização o material foi colocado em água gelada, agitado e filtrado. O filtrado foi novamente lavado com 10mL de acetona, filtrado em funil de Buchner produzindo a benzquercetina bruta como pó amarelo escuro (0,475 g).

Assim a Benzquercetina (0,475 g) foi dissolvida em benzeno (3 mL) a quente e filtrada. O filtrado foi resfriado produzindo após a

filtração e secagem em estufa a vácuo a 100°C por 8 horas a benzquercetina pura (5) , 0,425 g , 85% ; figura8.5 , pag.230).

8.5.5.2.1 -DOSEAMENTO POR CLAE -ANALITICO

Para determinar o teor de quercetina benzilada (benzquercetina) utilizamos o seguinte sistema de CLAE .

Bomba : LC-10AD SHIMADZU com sistema de duplo pistão

Detetor : PHOTODIODE ARRAY SPD-M10A SHIMADZU.

Injetor : 712 S RHEODYNE com loop 20 μ L.

Comprimento de onda : 260 nm.

Temperatura : ambiente

Coluna : HIBAR LICHROSPHER 100RP18 (4,6 x 30).

Vazão : 1,5 mL / min.

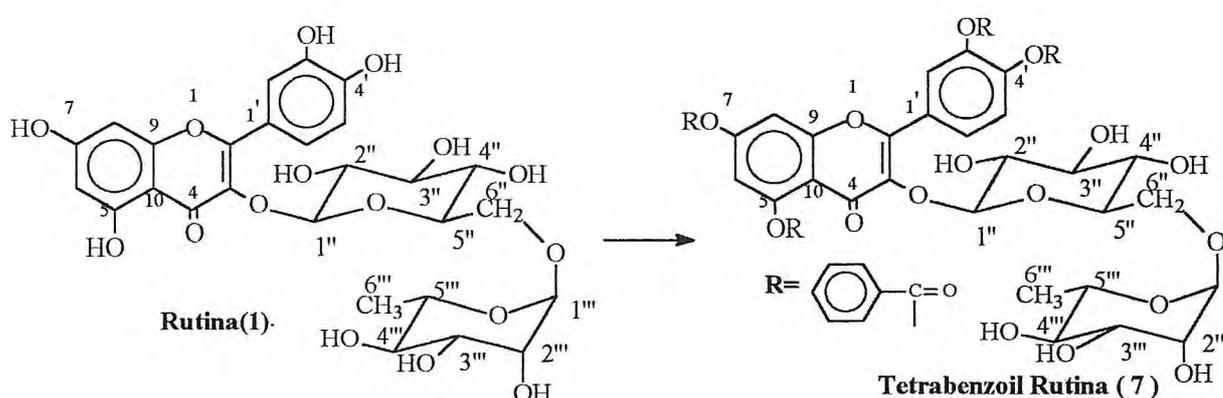
Fase móvel : Acetonitrila:Agua-90/10

Preparação da amostra-10 mg de benzquercetina, precisamente pesados, foram adicionados para um balão volumétrico de 100 mL e diluídos com diclorometano .

Procedimento – 20 μ L da solução da amostra foram injetados para cromatógrafo . Os cromatogramas obtidos foram impressos e as respostas relativas para todos os picos foram determinadas .

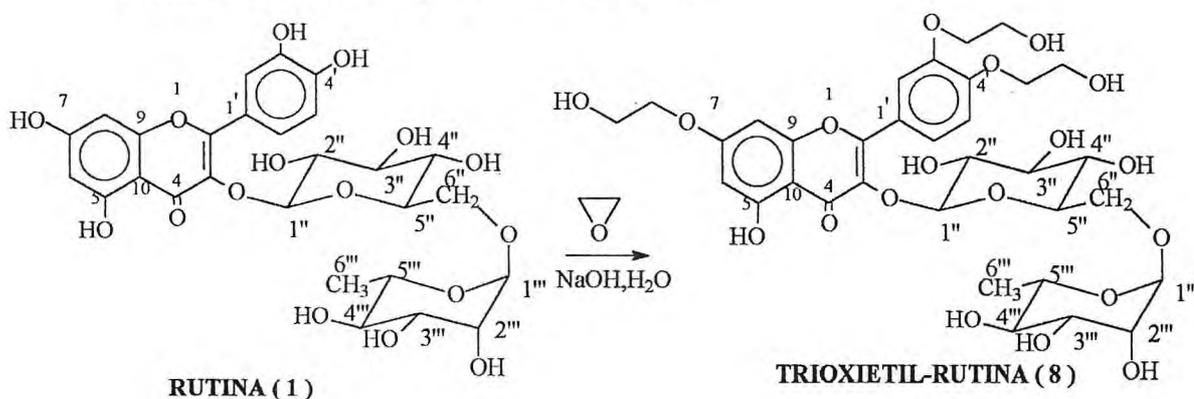
lavado com 50ml água. O resíduo da filtração foi dissolvido em álcool anidro à quente(5mL) e precipitado pela adição de água(15mL).Após filtração, e secagem a rutina deca-acetilada (6) foi obtida 0,152 g (76,71% ; ponto de fusão 148-148,5°C).

8.5.5.4 - TETRABENZOIL RUTINA (7) [JURD,1972]



Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,4 g de rutina(1) 30 mL de água e 3,2 g de carbonato de sódio. Após a completa dissolução a mistura foi resfriada (10°C)e foram adicionados gota a gota 1,8 mL de cloreto de benzoila . Após concluída a adição de cloreto de benzoila a mistura reacional foi agitada por mais 1 hora. O precipitado formado foi filtrado em funil de buchner dissolvido em Etanol anidro quente (10,0 mL) filtrado e cristalizado pela adição de água (100 mL). O precipitado foi filtrado e seco (80°C) produzindo 0,54 g (84,4 %) de tetrabenzoil rutina(7) .

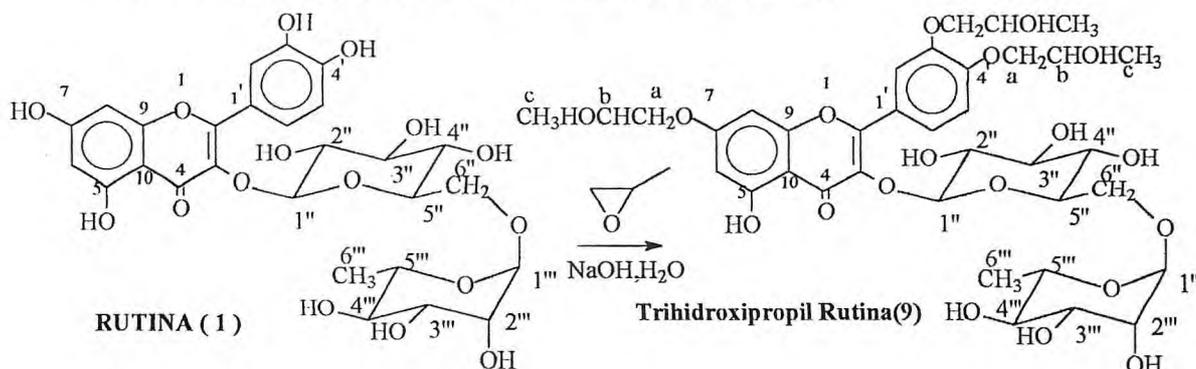
8.5.5.5 - Hidroxietilação da Rutina (1) .



Em balão de 3 bocas de 10 mL com agitação magnética e conectado a um cilindro de óxido de etileno foram adicionados 0,1 mL de solução 1N de NaOH (0,1 mmoles) e uma suspensão de 0,61 g (1 mmol) de rutina (1) e 1,5 mL de água aquecidos a uma temperatura de 80-85°C.. O óxido de etileno foi então adicionado (0,2 g) (4,5 mmoles) por um período de 6 horas a vazão de 0,3 mL/min.. Quando o pH da mistura reacional atingiu 9,5 , o balão foi despressurizado, resfriado e o pH ajustado para 4,5 com solução de Ácido clorídrico (1:2).

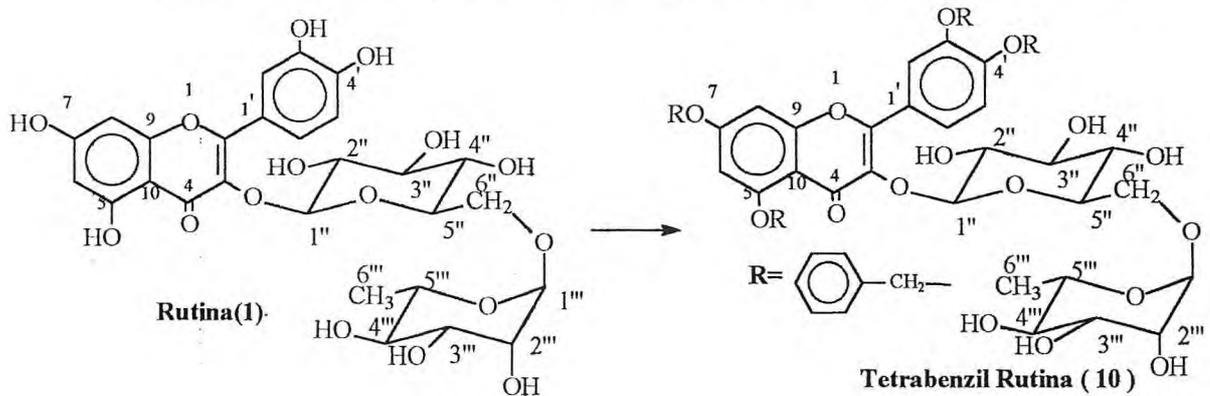
A mistura reacional foi então filtrada em camada de celite, concentrada em evaporador rotativo à vácuo até um resíduo xaroposo. O resíduo obtido foi agitado com 6 mL de acetato de etila à quente. O acetato foi separado do resíduo, e esta lavagem foi repetida (3 vezes) até que um pó amarelo tenha sido obtido. O pó foi filtrado em Funil de Buchner e seco em estufa à vácuo a 70°C produzindo 0,67 g de hidroxietilrutósídeos ((8) ; 90% ; ponto de fusão 181-182°C).

8.5.5.6 - HIDROXIPROPILAÇÃO DA RUTINA (1)



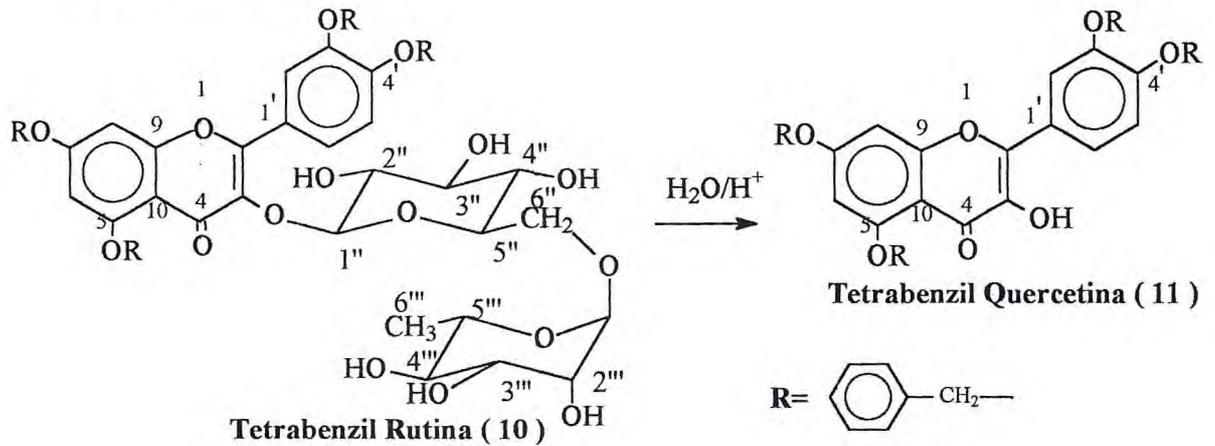
Em um balão de 3 bocas de 10 mL com agitação magnética foram adicionados 0,1 mL de solução de hidróxido de sódio 1N, 0,336 g de rutina ((1) 0,6 mmoles) e 2,1 mL de água. A mistura reacional foi aquecida a uma temperatura de 80-85°C e 0,336 g (5,78 mmoles) de óxido de propileno foram adicionados a uma vazão de 0,36 mL/min por um período de 6 horas . Quando o pH da mistura reacional atingiu 9,5 , o balão foi despressurizado, resfriado e o pH ajustado para 4,5 com solução de ácido clorídrico (1:2). A mistura reacional foi filtrada em camada de celite concentrada em evaporador rotativo à vácuo até um resíduo xaroposo. O resíduo obtido foi agitado com 6 mL de acetato de etila à quente. O acetato foi separado do resíduo, e esta lavagem foi repetida (3 vezes) até que um pó amarelo tenha sido obtido. O pó foi filtrado em Funil de Buchner e seco em estufa à vácuo a 70°C. produzindo a hidroxipropilrutina 0,432 g (92,08%) como um pó amarelado higroscópico . A rutina β-hidroxipropilada (9) é um sólido amarelo higroscópico com ponto de fusão 183-184°C, solúvel em água.

8.5.5.7 - BENZILAÇÃO DA RUTINA[PESSAC e RAMONVILLE,1975]



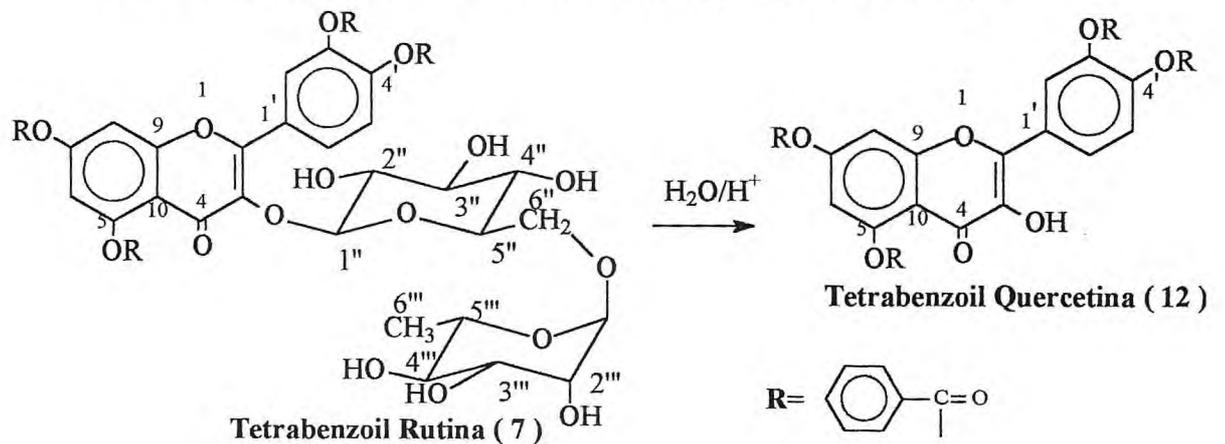
Em um balão de 25 mL adicionados 0,88 g de rutina(1), 0,99 de cloreto de benzila, 0,04 g de iodeto de potássio, 2,0 g de carbonato de potássio. A mistura reacional foi agitada por 24 horas a temperatura ambiente. Após este período 10 mL de água quente foi adicionado à mistura reacional, a água foi descartada e ao resíduo obtido foram adicionados 10 mL de solução de hidróxido de sódio 1N. a solução alcalina de lavagem foi descartada e ao resíduo foram adicionados 10 mL de solução de ácido clorídrico 1N, seguido de filtração em funil de buchner e lavagem com água até pH neutro. O resíduo da filtração foi seco em estufa à vácuo(80°C) produzindo 1,05 g (80 %) de rutina benzilada(10).

8.5.5.8 -Hidrólise da Rutina Benzilada(11)[PESSAC e RAMONVILLE,1975]



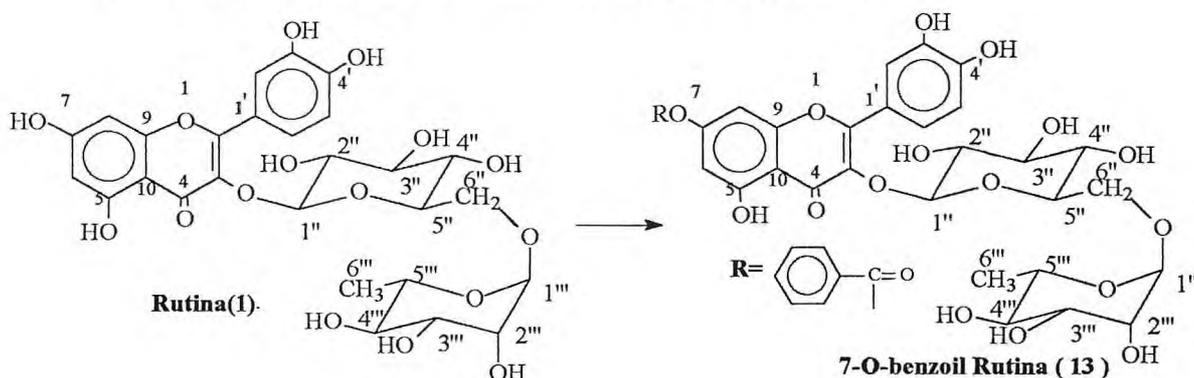
Em um balão de 25 mL adaptado com condensador foram adicionados 0,3g de rutina benzilada(10), 9 mL de etanol 95% e 0,3 de ácido clorídrico concentrado. A mistura foi refluxada por 4 horas. Após este período a mistura foi resfriada e o precipitado formado foi filtrado à vácuo em funil de Buchner . O resíduo da filtração foi lavado com etanol 95%, seguido de lavagem com água até pH 5. O resíduo foi filtrado e seco á vácuo (80°C). O produto obtido foi recristalizado em acetato de etila (5 mL) e o resíduo após filtração e secagem produziu 0,184 g (87,6%) de quercetina tetrabenzilada(11).

8.5.5.9 - TETRABENZOIL QUERCETINA (12) [JURD,1972].



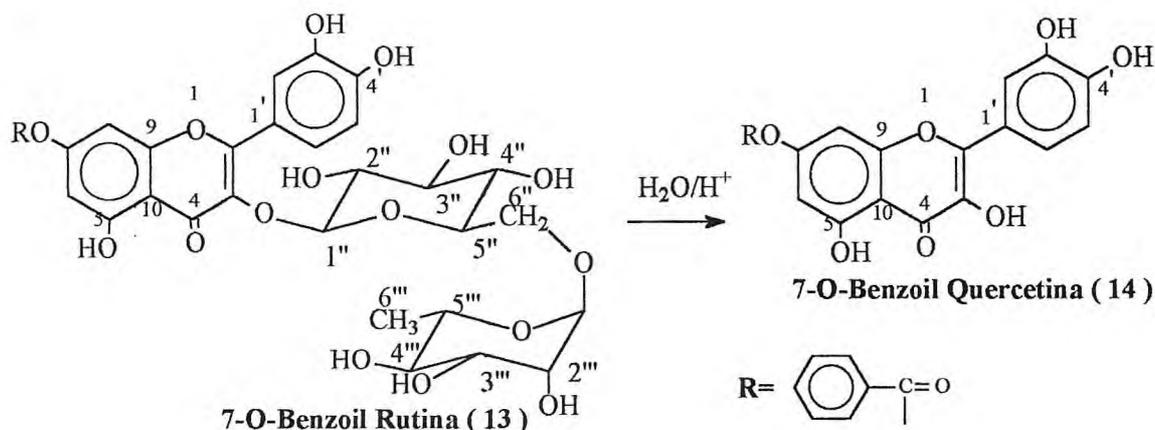
Em um balão (25 mL) adaptado com condensador de refluxo foram adicionados 25 mL de etanol anidro, 0,25 g de tetrabenzoil rutina(7) e 0,8 mL de ácido clorídrico concentrado. A mistura reacional foi refluxada por 1 hora, após a qual foi resfriada e 8 mL da água foram adicionados. Após filtração à vácuo o resíduo foi lavado com água até pH 5 e seco (80°C) produzindo 0,17 g de tetrabenzoil quercetina ((12) , 89,36% ; ponto de fusão 126-130°C).

8.5.5.10 - 7-O-BENZOIL RUTINA (13) [JURD,1972].



Em um balão de 25 mL foram adicionados 1,0 g de rutina(1), 20 mL de água, 1,5 g de borax. Após completa dissolução a mistura foi resfriada (10°C) e foram adicionados gota a gota 1,5 mL de cloreto de benzoila . Após 15 minutos o ácido benzoico precipitado foi removido por filtração à vácuo em funil de Buchner e o filtrado foi acidificado com ácido clorídrico concentrado até pH 5. O precipitado formado foi filtrado, lavado com 10mL de água e seco em estufa produzindo 0,49 g (39,51%) de 7-0-benzoil rutina(13) .

8.5.5.11 - 7-O-BENZOIL QUERCETINA (14) [JURD,1972].

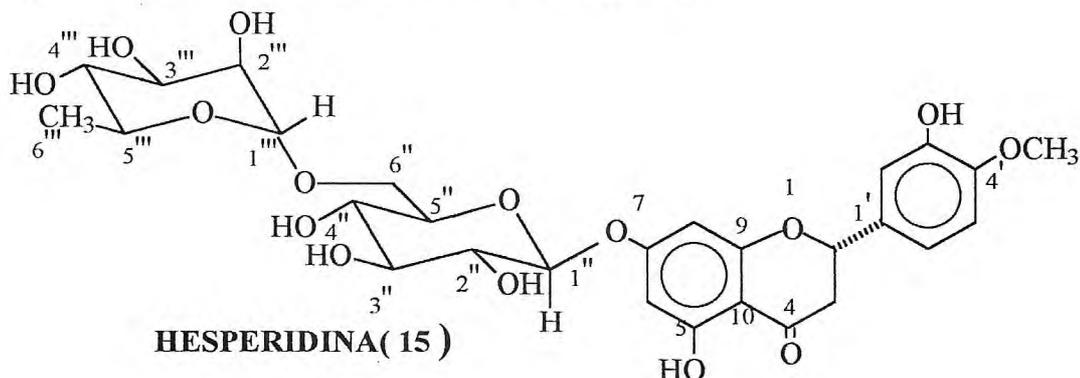


Em um balão de 10 mL adaptado com condensador de refluxo foram adicionados 0,25 g de 7-O-benzoyl rutina(13), 2 mL de solução de ácido clorídrico 20%. A mistura foi refluxada por 1 hora, resfriada e o precipitado formado foi filtrado, lavado com água até pH 5 e recristalizado com dissolução em acetona (1 mL) à quente e precipitado pela adição de metanol (1mL). O 7-O-benzoyl quercetina(14) precipitou como um cristal amarelo 0,188 g (73,6%) com ponto de fusão 231-231°C.

8.5.5.12 - Citroflavonóides

200 g de laranja peletizada fora trituradas em desintegrador. O pó foi colocado em um extrator de sohxlet de 1 litros e foi extraído por 4 horas com éter de petróleo. O extrato etéreo foi retirado e o resíduo foi extraído por 4 horas com metanol. Após este período o extrato metanólico foi retirado, filtrado e concentrado em evaporador rotativo à vácuo produzindo um resíduo xaroposo, o qual foi após adição de solução de ácido acético diluído (10%) produzindo cristais brancos, que após filtração, secagem produziu 10g de um material cristalino com ponto de fusão 250-252°C.

Os cristais foram purificados por dissolução em 100 mL de solução de hidróxido de sódio 10%, seguido de filtração e acidificação com ácido clorídrico diluído até pH 5, o produto da acidificação foi filtrado, lavado com água, seco em estufa produzindo 6 g (3%) de produto cristalino com ponto de fusão 260-261°C (Hesperidina (15))



8.5.5.13- Extrato de Semente de Uva : O extrato que foi utilizado foi obtido da empresa Centroflora sendo uma amostra denominada comercialmente de Vitavim .

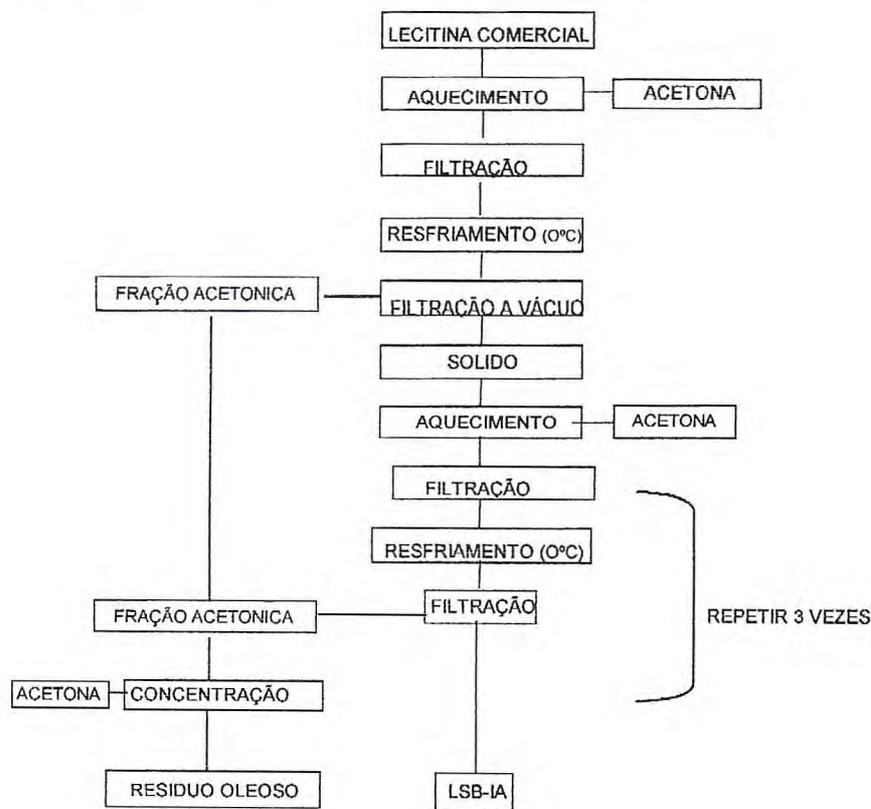
8.5.6 - Fracionamento da lecitina de soja bruta (LSB-IA)

30 g de lecitina de soja bruta marca Bionatus foram misturados com aquecimento com 120 mL de acetona. A mistura foi filtrada, e o filtrado resfriado (0°C). O material insolúvel obtido foi filtrado, e dissolvido novamente em 40 mL de acetona, por aquecimento. A mistura foi filtrada, resfriada (0°C), e o precipitado filtrado. O sólido obtido foi submetido à purificação como descrito acima com 40mL de acetona por mais 2 vezes. O resíduo final foi então após filtração seco à vácuo produzindo 14,95 g de um sólido amarelado. (49,8% rendimento) que recebeu a denominação LSB-IA (Ver fluxograma 8.2 , pag. 239).

A lecitina fracionada com acetona , LSB-IA foi , analisada por CCD utilizando papel Watman impregnado com ácido silícico e tendo como

eluente uma mistura Di-isobutilcetona/álcool/água (40/30/7) e como revelador o reagente rodamina B e luz ultravioleta, produzindo um cromatograma onde observamos a presença de fosfatidiletanolmaina (Rf 0,56), fosfatidilcolina (Rf 0,33), fosfatidil inositol (0,20), identificados pelos seus Rf característicos e por comparação com seus respectivos padrões.

Fluxograma 8.2 Fracionamento da lecitina comercial com acetona.



8.5.6.1-Análise de LSB-IA : LSB-IA foi analisado para verificação da sua pureza e composição utilizando :

8.5.6.1.1 - Análise de LSB-IA por CLAE

Sistema Shimadzu

Bomba LC-IOAD-SHIMADZU

Data Processor: Photodiode Array SPD-M10A

Coluna: Luna 3 µm Sílica (2) 30 x 4,0 – Phenomenex

Temperatura: 28°C

Injetor: 712 S Rheodyne com Loop de 20µL

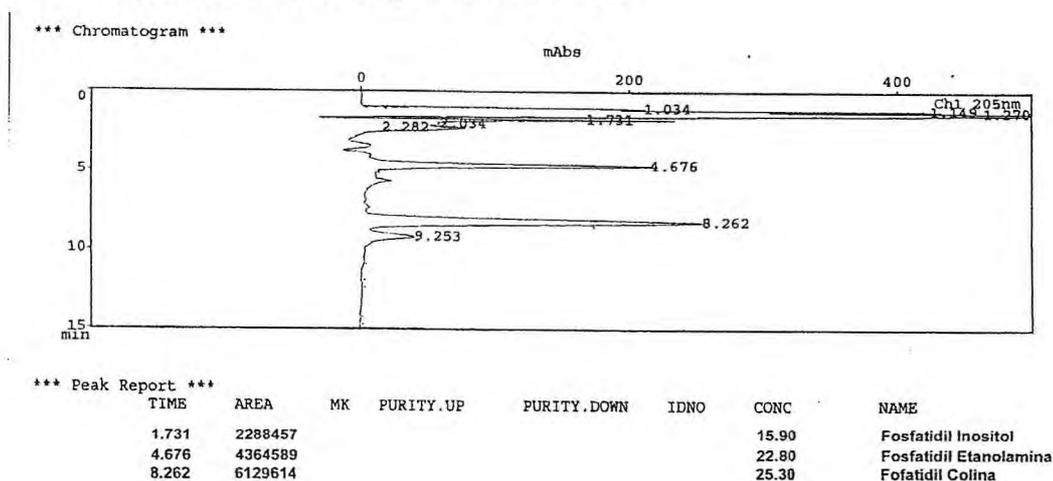
Comprimento de onda: 205 nm

Vazão: 2,0 mL/min.

Fase Móvel: CH₃CN / CH₃OH / 85% H₃PO₄ - : 390 / 5 / 4,5

Preparação Amostra LSB-IA : 52,8mg / 10mL (EtOH :MeOH – 1:1).

Figura 8.6 Cromatograma de LSB-IA



8.5.6.1.2 - Índice de acidez de LSB-IA

- 2,0 g da amostra foram pesados em um erlemeyer de 250 mL e 50 mL de hexano foi adicionado. Após a dissolução 50 mL de álcool previamente neutralizado com NaOH 0,1N foram adicionados tendo como indicador uma solução de fenolftaleína. Algumas gotas de solução de fenolftaleína foram adicionadas e a mistura foi titulada com solução 0,1N de NaOH até a coloração rósea aparecer. O Índice de acidez foi calculada com a equação abaixo : $IA = \frac{V \times 40}{P}$

9

Onde: P= peso da amostra

V= volume da solução de NaOH gasto

Especificação: menor que 36

8.5.6.1.3– Determinação do material insolúvel em hexano no LSB-IA :

10g da amostra foram pesados em erlemeyer de 250 mL e 100 mL de hexano foram adicionados, e a mistura foi agitada até completa dissolução. A mistura foi filtrada em funil de placa porosa previamente tarado a 100°C por 1 hora . O funil foi lavado com 25 mL de hexano, e seco à a 100°C por uma hora . O funil foi pesado e o resíduo obtido calculado ,e não deve ser maior que 0,3% .

8.5.6.1.4-Teor de insolúveis em acetona no LSB-IA :

2 g da amostra foram pesadas em um tubo de centrifuga de 40 mL previamente tarado. 15 mL de acetona foram adicionadas e a mistura foi aquecida em banho maria até dissolução,o tubo foi então resfriado a 0°C e centrifugado a 2000rpm por 15 minutos . O sobrenadante foi decantado e o procedimento repetido mais 2 vezes. Após a última decantação o resíduo obtido foi evaporado para remoção da acetona residual .O tubo foi aquecido inicialmente com soprador térmico, seguido de secagem a 100° em estufa até peso constante . O peso do resíduo foi determinado e não pode ser menor que 50% .

8.5.7 – Preparação dos Complexos

Procedimento Geral:

0,1 g de Rutina e 0,35 g de LSB-IA foram adicionados para um balão de fundo chato (25,0 mL) com 15,0 mL de dioxano e aquecidos até completa dissolução da mistura. Após dissolução a mistura foi refluxada por mais de 2 horas, resfriada, filtrada e concentrada a vácuo produziu

0,393 g de Lipo 1. Um sólido cristalino amarelo com ponto de fusão 105-106 °C, solúvel em clorofórmio e hexano.

A diferença entre as várias preparações dos complexos está no tipo de flavonóide utilizado e na proporção entre LSB-IA : Flavonóide conforme descrito na tabela abaixo. As condições reacionais e procedimento para tratamento da reação estão descritos no procedimento geral.

Lipo	Flavonóide (g)	LSB-IA (g)	Dioxano (mL)	Produto obtido (g)	Característica do produto obtido
1	Rutina (0,1 g)	0,35 g	15	0,393	sólido cristalino amarelo com ponto de fusão 105-106 °C , solúvel em clorofórmio e hexano.
2	Quercetina (0,1 g)	0,35 g	15	0,399	sólido cristalino amarelo escuro com ponto de fusão 108-110°C, solúvel em clorofórmio e hexano.
3	Hesperidina (0,1 g)	0,35 g	15	0,401	sólido cristalino amarelo com ponto de fusão 107-108°C , solúvel em clorofórmio e hexano.
4	Extrato de semente de uva (0,1 g)	0,35 g	15	0,391	sólido cristalino escuro com ponto de fusão 106-107 °C , solúvel em clorofórmio e hexano.
5	Quercetina Benzilada (0,1 g)	0,35 g	15	0,32	sólido amorfo amarelado.
6	Extrato de semente de uva (0,1 g)	0,25 g	12	0,319	sólido cristalino escuro com ponto de fusão 108-109°C, solúvel em clorofórmio e hexano.
7	EPFD (0,1 g)	0,35 g	15	0,419	sólido cristalino amarelo com ponto de fusão 105-106 °C , solúvel em clorofórmio e hexano.
8	Rutina (0,5 g)	0,25 g	25	0,66	pó amorfo amarelado solúvel em Metanol.
9	Rutina (0,5 g)	0,64 g	38	0,98	sólido cristalino insolúvel em clorofórmio e solúvel em metanol
10	Rutina (0,25 g)	0,43 g	23	0,60	sólido cristalino amarelo com ponto de fusão 108-109°C, solúvel em clorofórmio
11	Rutina (0,25 g)	0,62 g	30	0,76	sólido cristalino amarelo com ponto de fusão 106-107 °C, solúvel em CHCl3

Lipo	Flavonoide (g)	LSB-1A (g)	Dioxano (mL)	Produto obtido (g)	Característica do produto obtido
12	Quercetina (0,1 g)	0,62 g	23,1	0,62	sólido cristalino amarelo com ponto de fusão 107-109 °C solúvel em clorofórmio
13	Quercetina Benzilada (0,2 g)	0,54 g	25	0,65	resíduo sólido resinoso amarelo
14	Decaacetato de Rutina (0,1 g)	0,20 g	10	0,26	resíduo sólido resinoso amarelo
15	Rutina Benzoilada (0,1 g)	0,20 g	10	0,29	resíduo sólido resinoso amarelo
17	Trioxietil Rutina (0,1 g)	0,27 g	13	0,34	sólido cristalino amarelado, higroscópico ,solúvel em clorofórmio
18	Trioxipropil Rutina (0,1 g)	0,27 g	13	0,33	sólido cristalino amarelado, higroscópico , solúvel em clorofórmio
19	Rutina Benzilada (0,1 g)	0,20 g	10	0,29	resíduo sólido resinoso amarelo
20	Rutina Benzilada Hidrolizada (0,1 g)	0,29	13	0,36	resíduo sólido resinoso amarelo
21	Rutina Benzoilada Hidrolizada (0,1 g)	0,20 g	10	0,27	resíduo sólido resinoso amarelo
22	7-O-Benzoil Rutina (0,1 g)	0,20 g	9,9	0,26	sólido cristalino amarelado solúvel em clorofórmio
23	7-O-Benzoil Quercetina (0,1 g)	0,20 g	9,9	0,27	sólido amorfo escuro solúvel em clorofórmio

Referências Bibliográficas

BAETHGEN, W. E., ALLEY, M. M., A manual colorometric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant kjeldahl digests. *Commun. in Soil Sci. Plant. Anal.*, 20 (9 e 10) : 961-969, 1989.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J .K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28, p. 350-356, 1956

JURD, L., USP3,661,890,1972.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, v. 153, p. 375-380, 1944.

PESSAC, M.C., RAMONVILLE, J.C., USP 3,888,842,1975.

SOMOGY, M., A new reagent for determination of sugars. *J. Chem. V.* 160, p. 61-68, 1945.

Capítulo 9

Conclusão

9. Conclusão

O presente trabalho relata o isolamento de três flavonóides glicosilados dos frutos de *Dimorphandra gardneriana*, que foram identificadas como a Rutina (EPFD—1), Isoquercitrina (EPFD—2), Kaempferol-3-Rutosídeo (EPFD—3).

Do levantamento bibliográfico feito, concluímos que EPFD—2 e EPFD—3 estão sendo descritos pela primeira vez para os frutos de *Dimorphandra gardneriana*.

O isolamento dos referidos flavonóides foi realizado através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa, a qual destacamos sua relevância porque é uma técnica de alta reprodutibilidade e o método utilizado permite o isolamento de flavonóides com estruturas semelhantes. Com o auxílio de padrões externos utilizados na CLAE, foram determinados os teores dos três flavonóides no extrato EPFD- : 69,00% de EPFD—1 ; 29,49% de EPFD—2 e 1,51% de EPFD—3.

A partir da Rutina, vários derivados foram preparados e caracterizados : Quercetina, Benzquercetina, Rutina decaacetilada, Rutina benzoilada, Trioxietilrutina, Trioxipropilrutina, Rutina benzilada, Rutina benzilada hidrolisada, 7-O-benzoil Rutina, 7-O-benzoil Quercetina.

Os fosfolipídeos da lecitina de soja (LSB-IA) foram isolados e caracterizados a partir da lecitina de soja comercial (49,80% de rendimento), enquanto que a hesperidina foi isolada e caracterizada a partir da casca de laranja peletizada (3,00% de rendimento).

Com a Rutina e seus derivados, vários novos complexos foram preparados utilizando fosfolipídeos da lecitina de soja (LSB-IA), incluindo o extrato da semente de uva e a hesperidina (Lipo 1-23). Através da análise dos produtos da complexação podemos concluir que flavonóides com os grupos fenólicos impedidos completamente ou parcialmente não formam complexos com LSB-IA. Flavonóides não glicosilados se complexam da mesma maneira e que a posição do glicosídeo ou do padrão de hidroxilação não interferem na complexação. Flavonóides com

grupos hidroxietil ou hidroxipropil ligados a seus grupos fenólicos formam complexos. Flavonóides com apenas um grupo fenólico protegido, glicosilado ou não também não complexionam. A presença ou ausência da carbonila não interfere na formação do complexo. Estas conclusões são baseadas no procedimento desenvolvido para a rutina, seus derivados e outros flavonóides importantes e utilizando as proporções flavonóide:LSB-IA descritas. Outra observação importante é que os produtos da complexação são sólidos cristalinos com ponto de fusão definidos e que a formação dos complexos envolve a parte polar dos fosfolipídeos.

Com as sementes de *Dimorphandra gardneriana* foi desenvolvida uma nova técnica de extração de galactomananas. Com este método foi possível a obtenção de galactomanana pura com um bom rendimento (26,00%). A determinação estrutural da galactomanana obtida foi feita por RMN ^1H e RMN ^{13}C uni e bidimensional sem a necessidade de hidrólise parcial, precipitação, complexação ou purificação cromatográfica. Através dos resultados obtidos com a técnica poli VIII foi possível descrever uma metodologia geral para produção de industrial de galactomananas a partir das sementes de *Dimorphandra gardneriana*. Esta metodologia não está descrita na literatura e produz uma galactomanan que atende as especificações exigidas pela Farmacopéia Européia(2002).

Durante os estudos de RMN ^{13}C a amostra de poli VIII não apresentou nenhum problema para dissolução e apenas aquecimento foi utilizado para sua dissolução. Assim a amostra poli VIII foi analisada diretamente e nenhum tipo de hidrólise parcial foi utilizada para redução da viscosidade durante os estudos de poli VIII por RMN ^1H e RMN ^{13}C . Nenhum tipo de precipitação, complexação ou purificação cromatográfica foi utilizado, também relatado pela primeira vez.

CAPÍTULO 10

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

Espectros dos Fosfolípidos , Flavonóides e Complexos

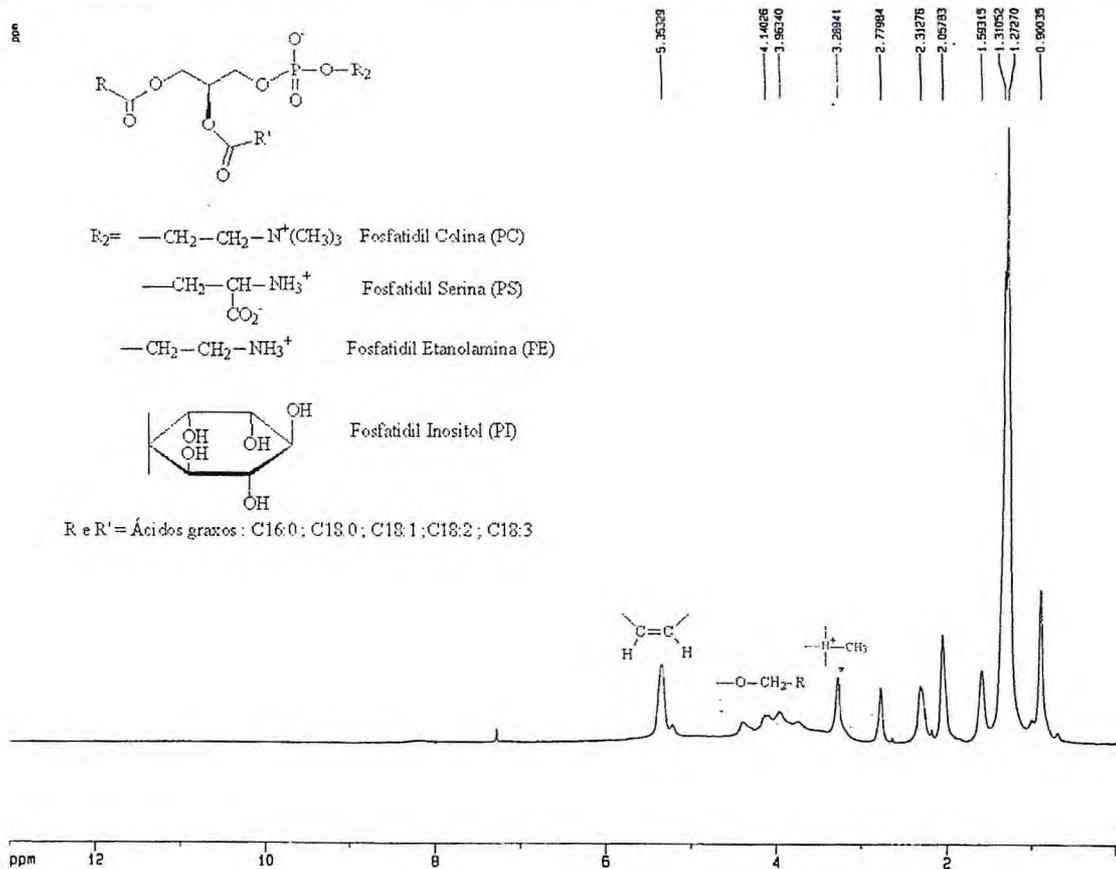


Figura 10.1 Espectro de RMN ¹H de LSB-IA [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

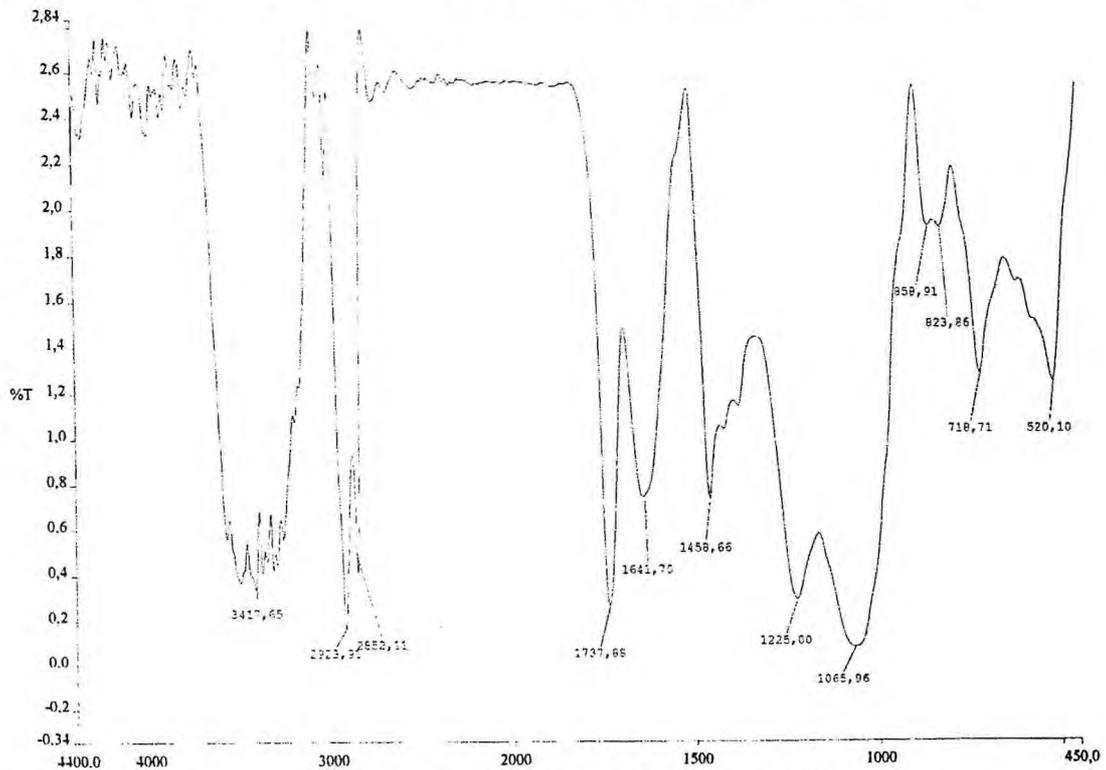


Figura 10.2 Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de LSB-IA

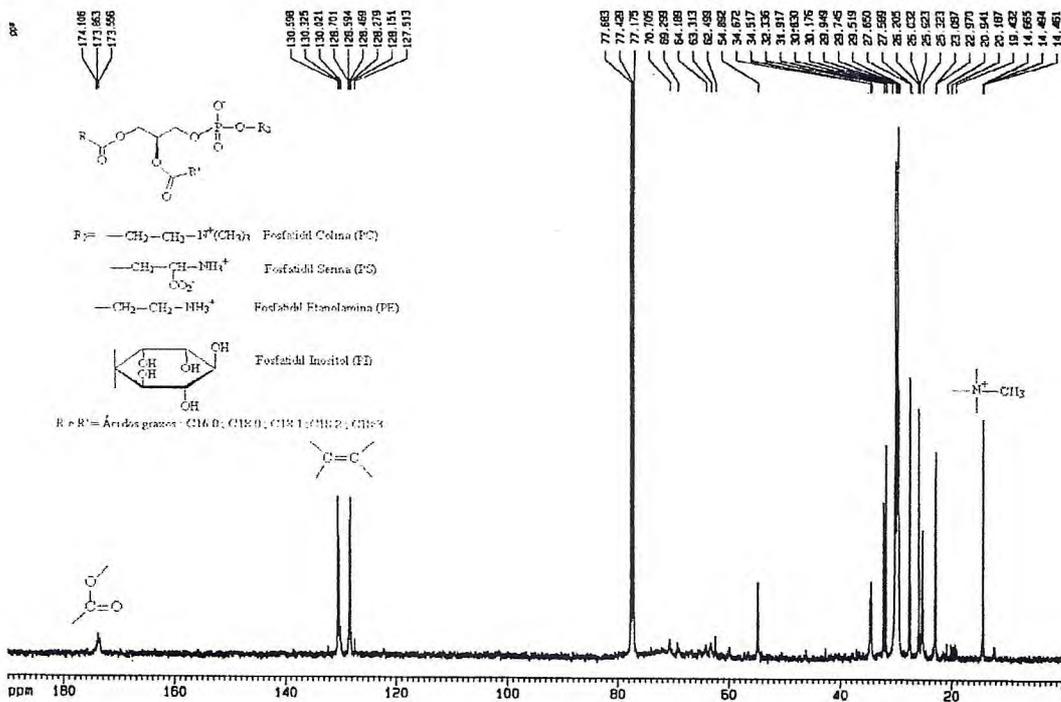


Figura 10.3 Espectro de RMN ¹³C-BB de LSB-IA [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

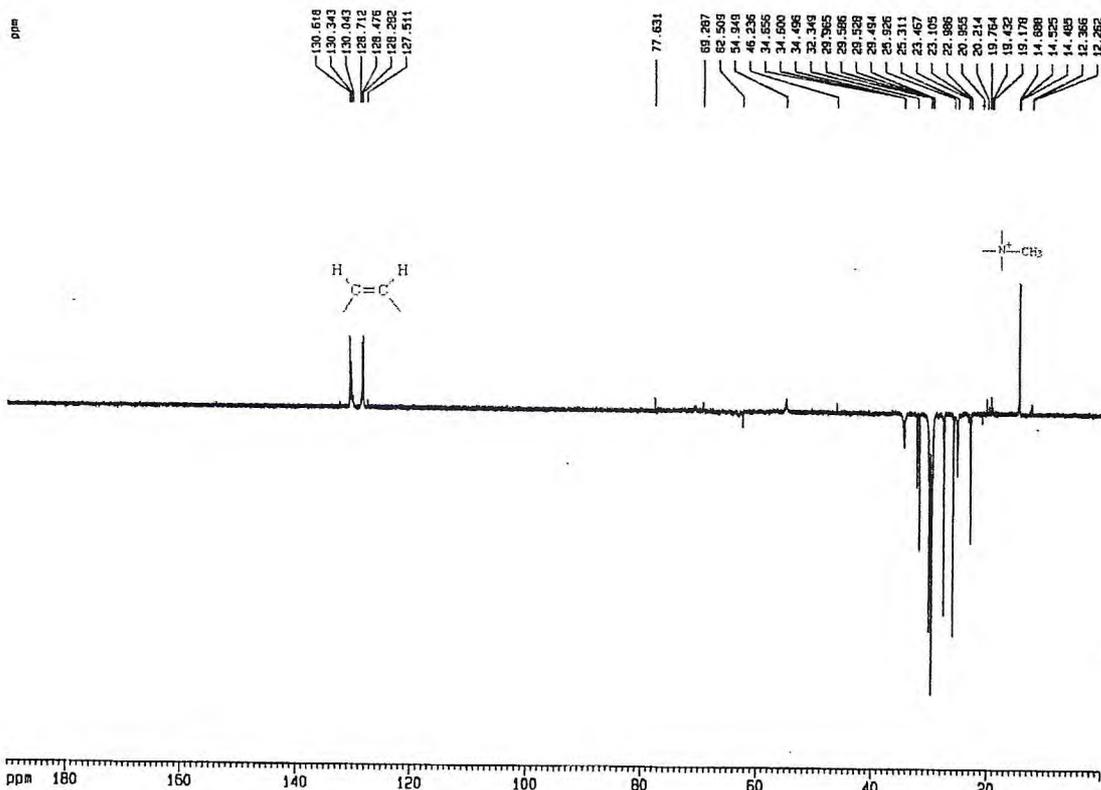


Figura 10.4 Espectro de RMN ¹³C-DEPT(135°) de LSB-IA [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

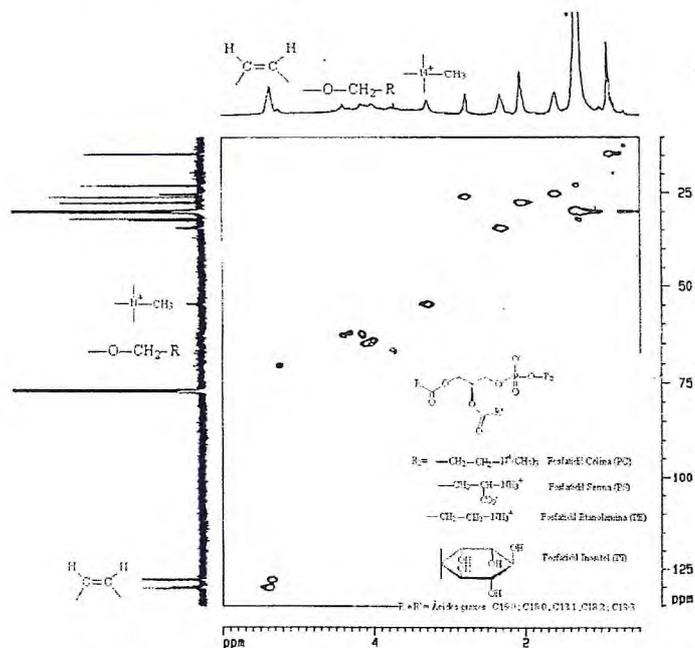


Figura 10.5 Diagrama de contorno do espectro GS-HMCQ DE LSB-IA Expansão entre 0,00 e 4,00 ppm [δ ; CDCl_3 ; 500,13MHz x 125,75; TD = 1024 x 128 ; SW = 10 167 ppm (F2 x F1); DS = 4; ns = 2 (F2)]; SI = 1024 x 512 (F2 x F1)].

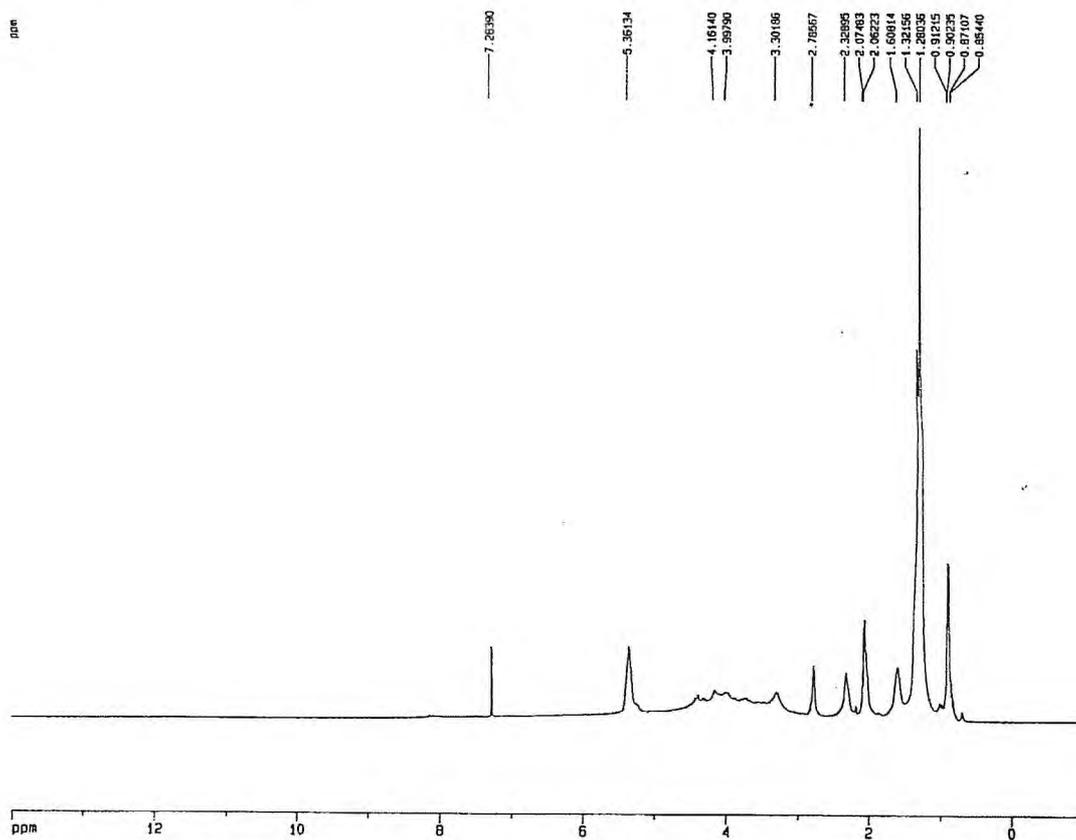


Figura 10.6 Espectro de RMN ^1H de Lipo 1 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]

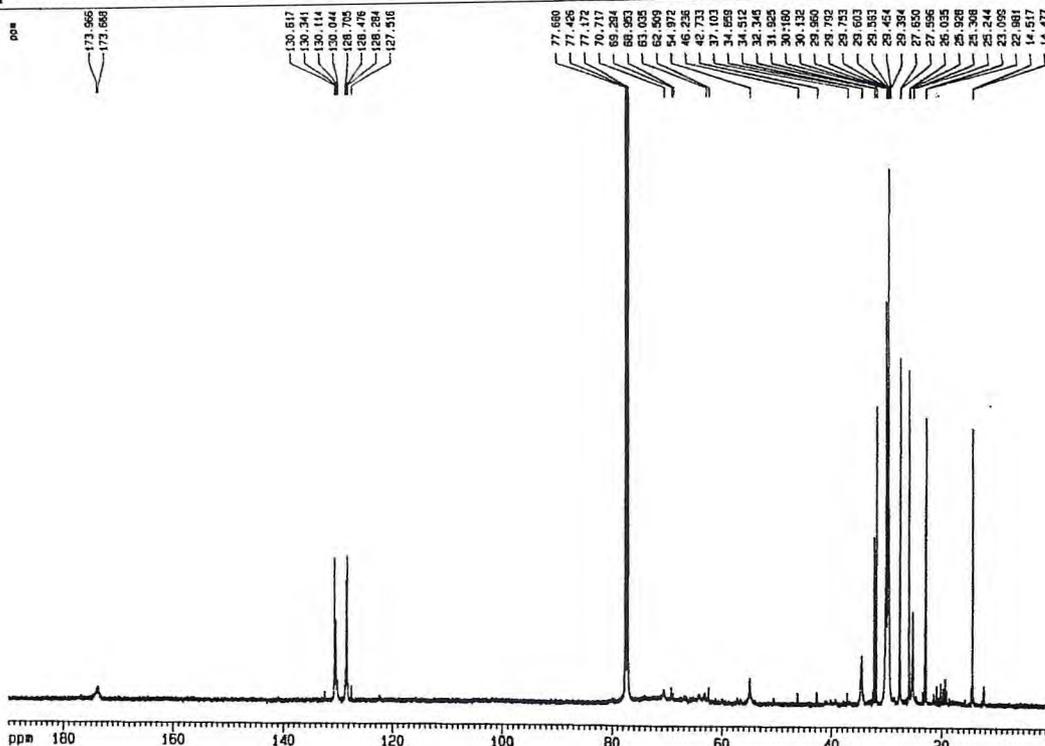


Figura 10.7 Espectro de RMN ¹³C-BB de Lipo 1 [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

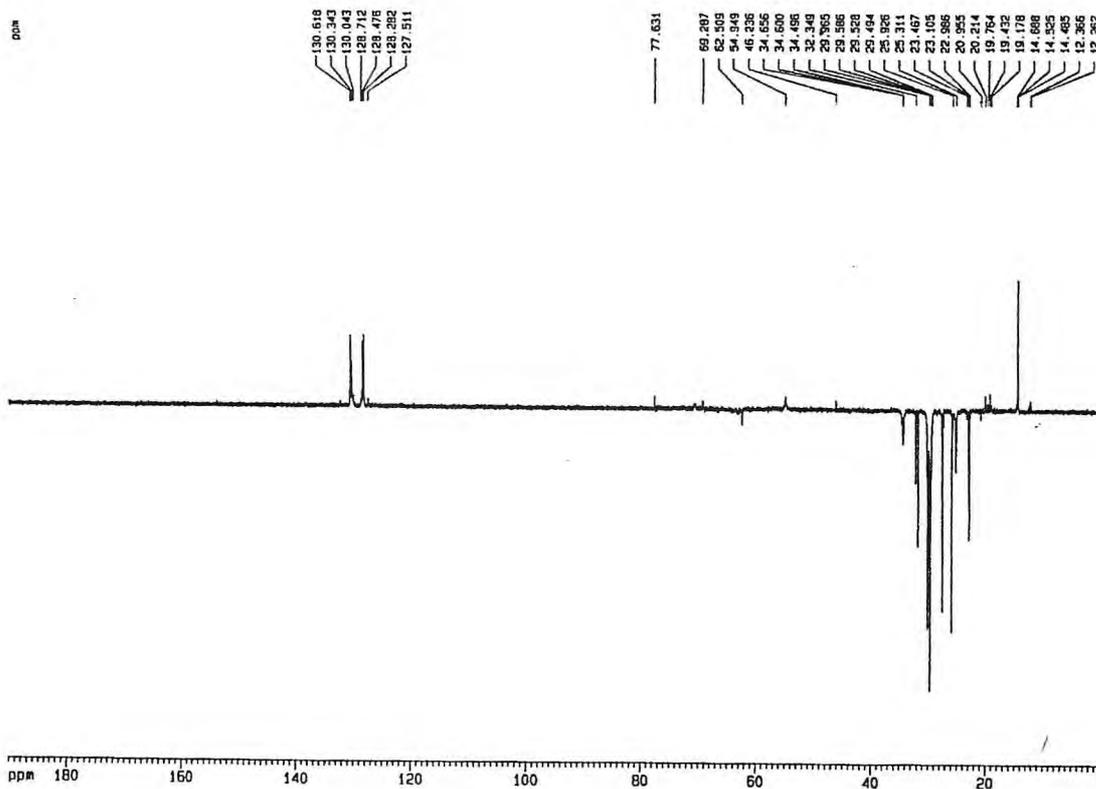


Figura 10.8 Espectro de RMN ¹³C-DEPT(135°) de Lipo 1 [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

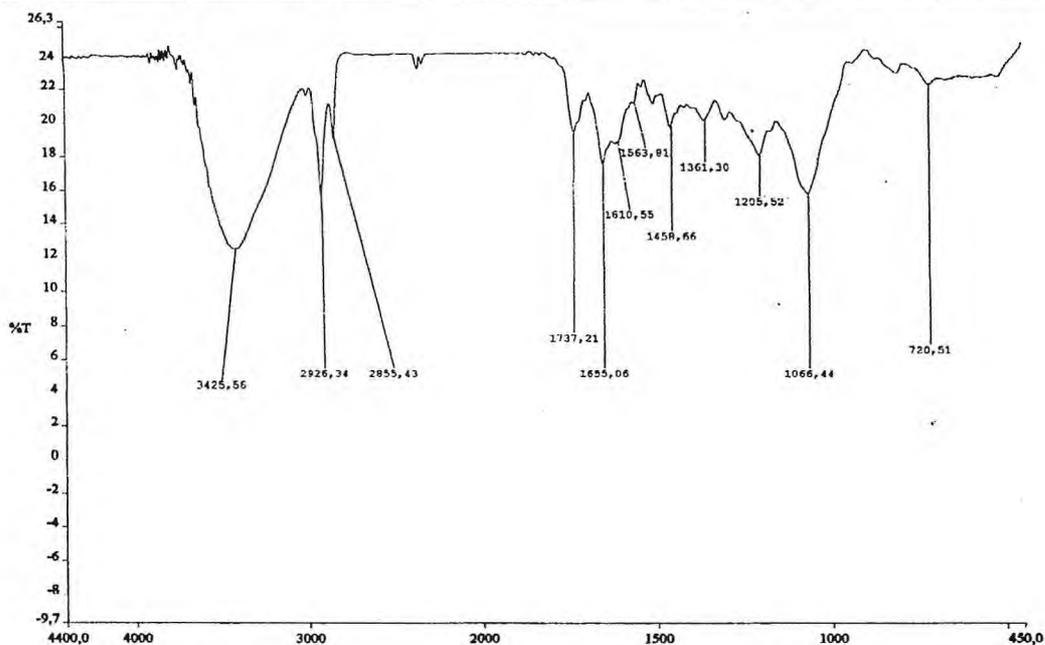


Figura 10.9 Espectro na região do IV[cm⁻¹,KBr] de Lipo1.

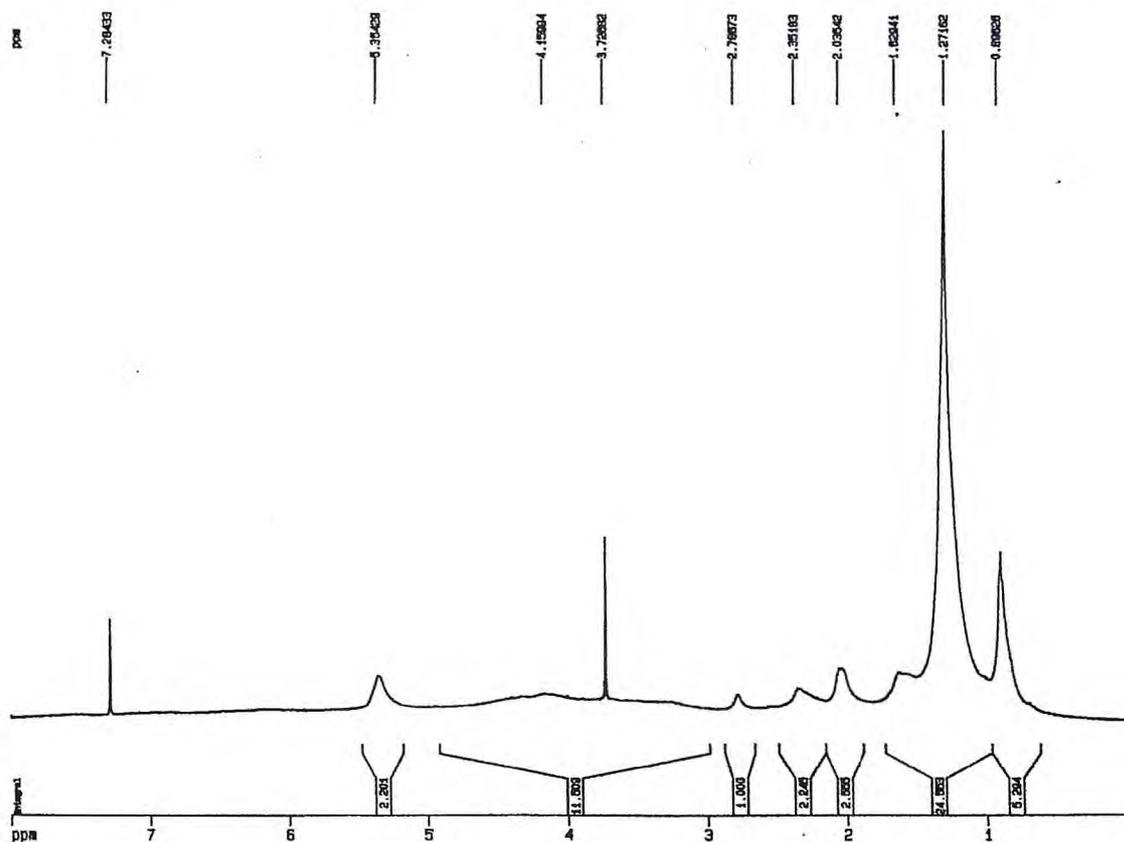


Figura 10.10 Espectro de RMN ¹H de Lipo 2 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

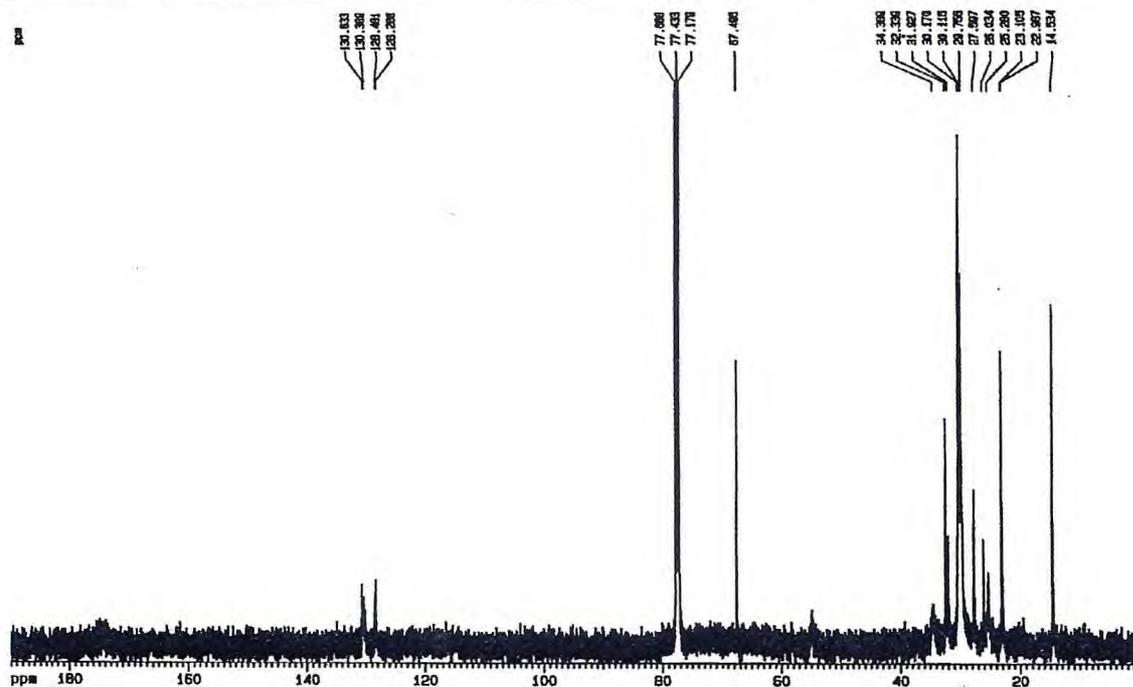


Figura 10.11 Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 2 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]

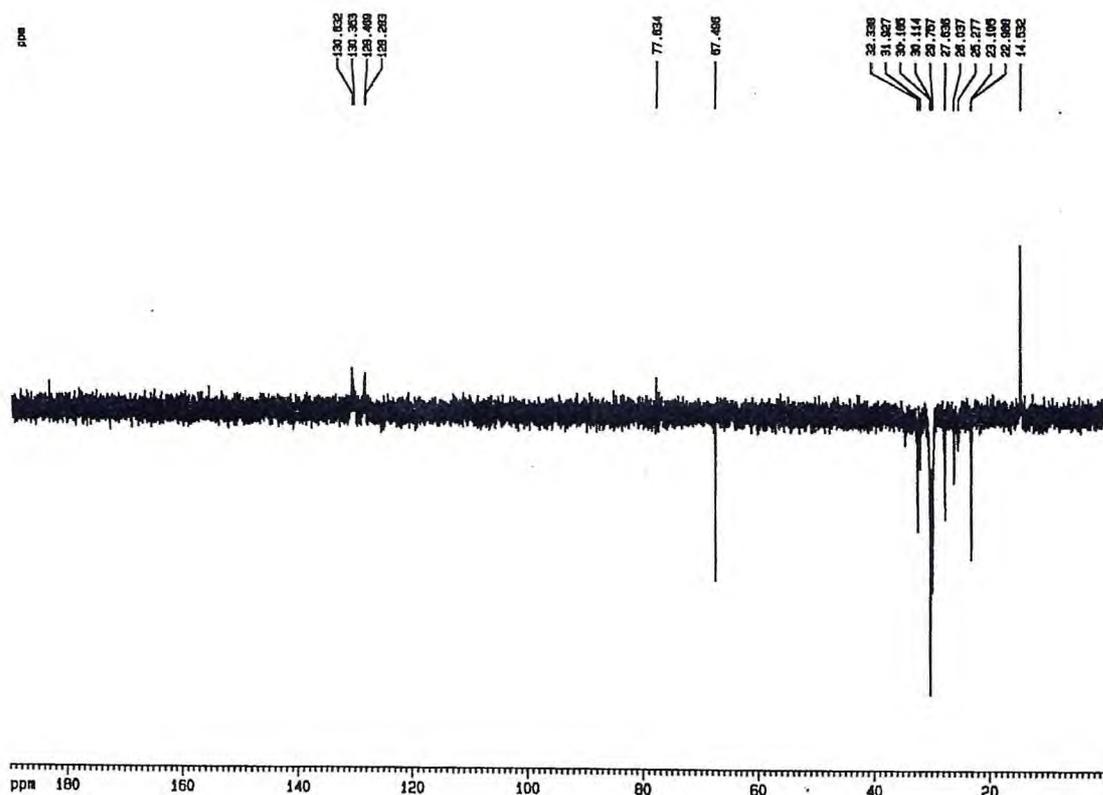


Figura 10.12 Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (135°) de Lipo 2 [δ ; CDCl_3 ; 125,77MHz]

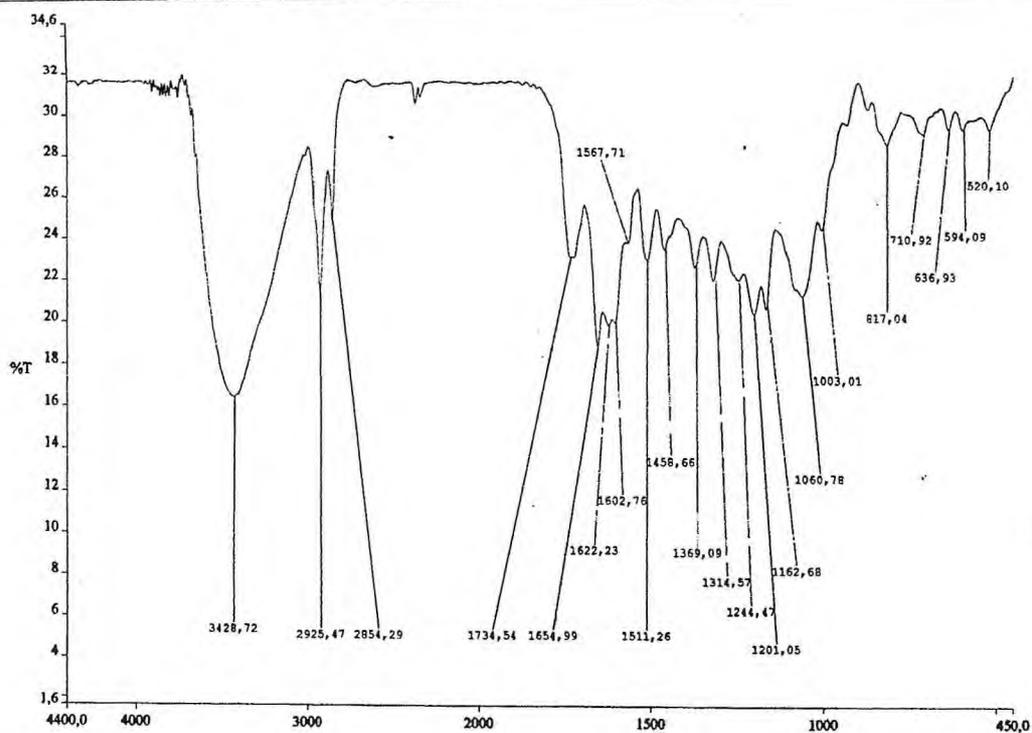


Figura 10.13 Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 2

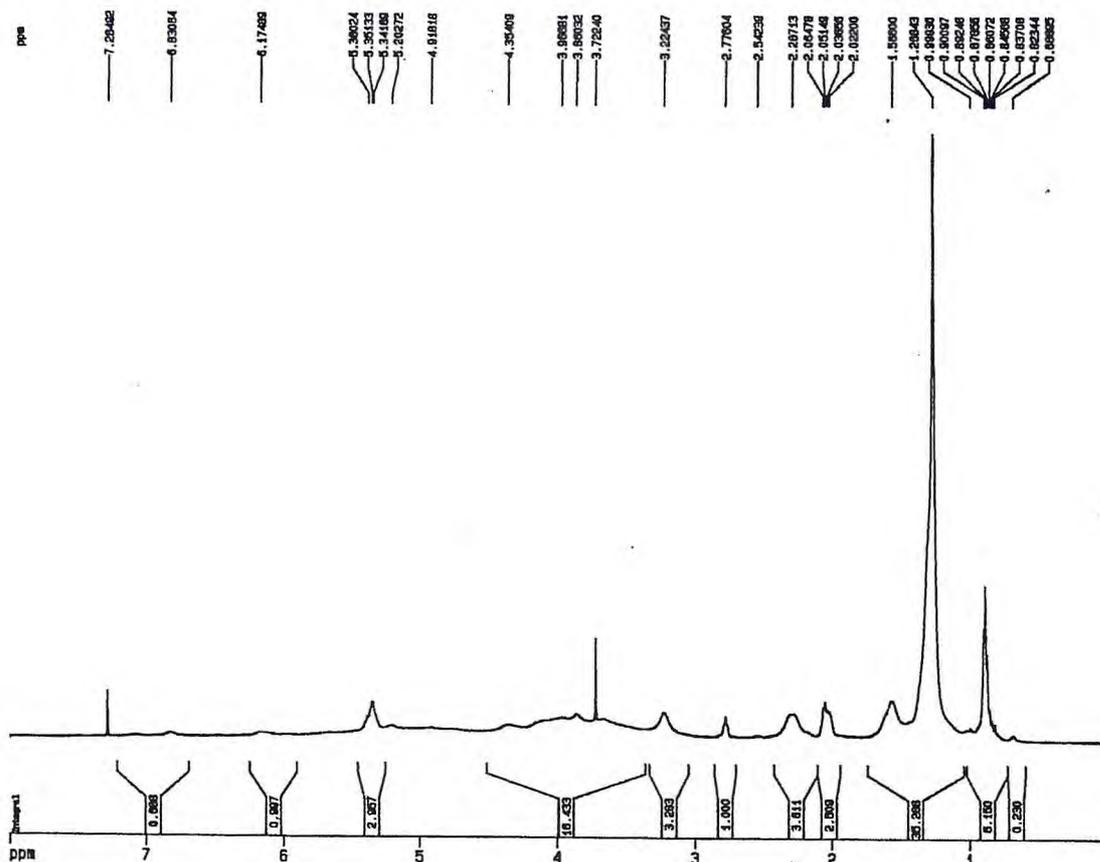


Figura 10.14 Espectro de RMN ¹H de Lipo 3 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

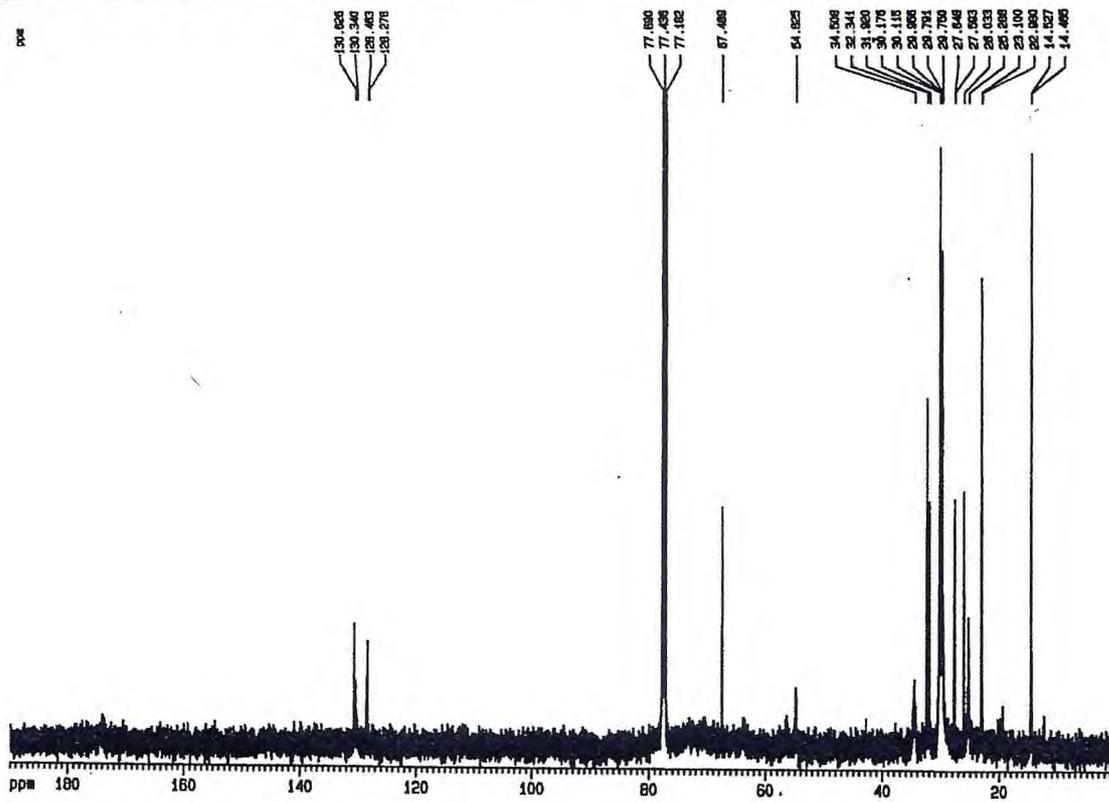


Figura 10.15 Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 3 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]

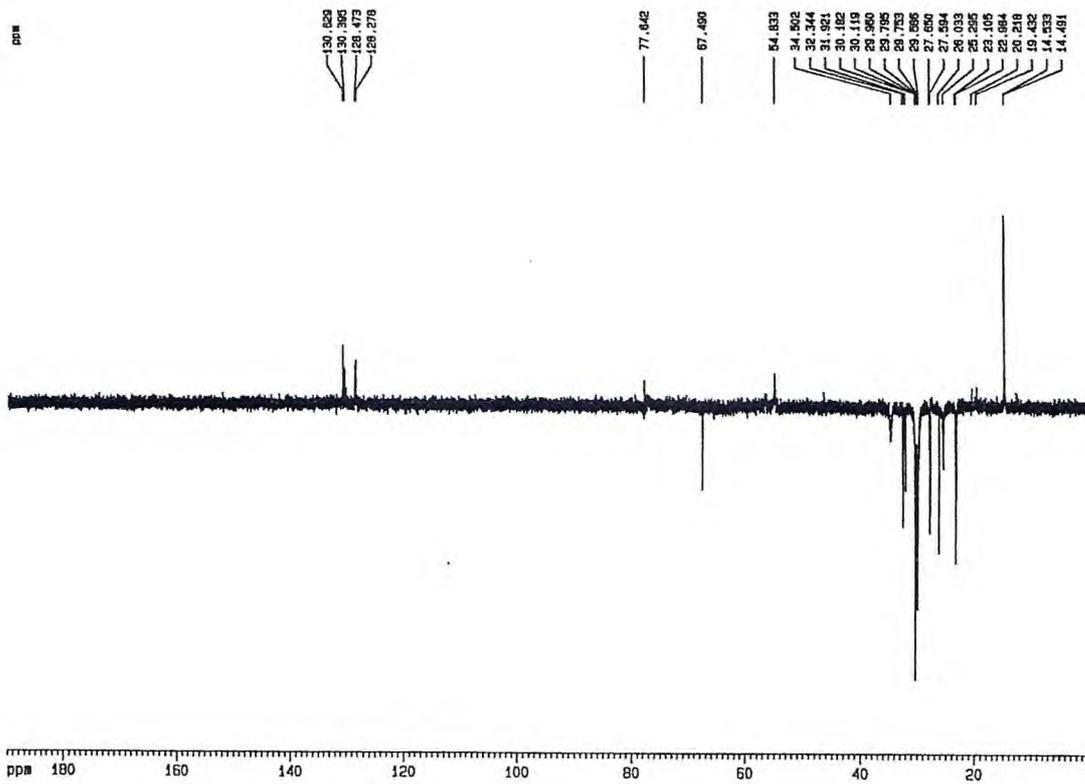


Figura 10.16 Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (135°) de Lipo 3 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]

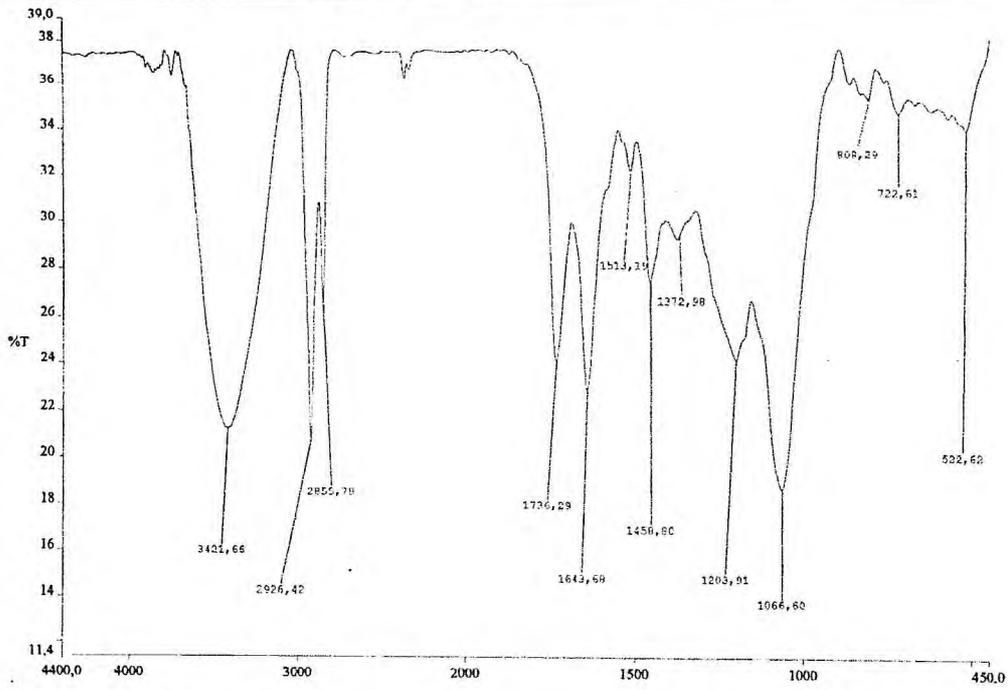


Figura 10.17 Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 3

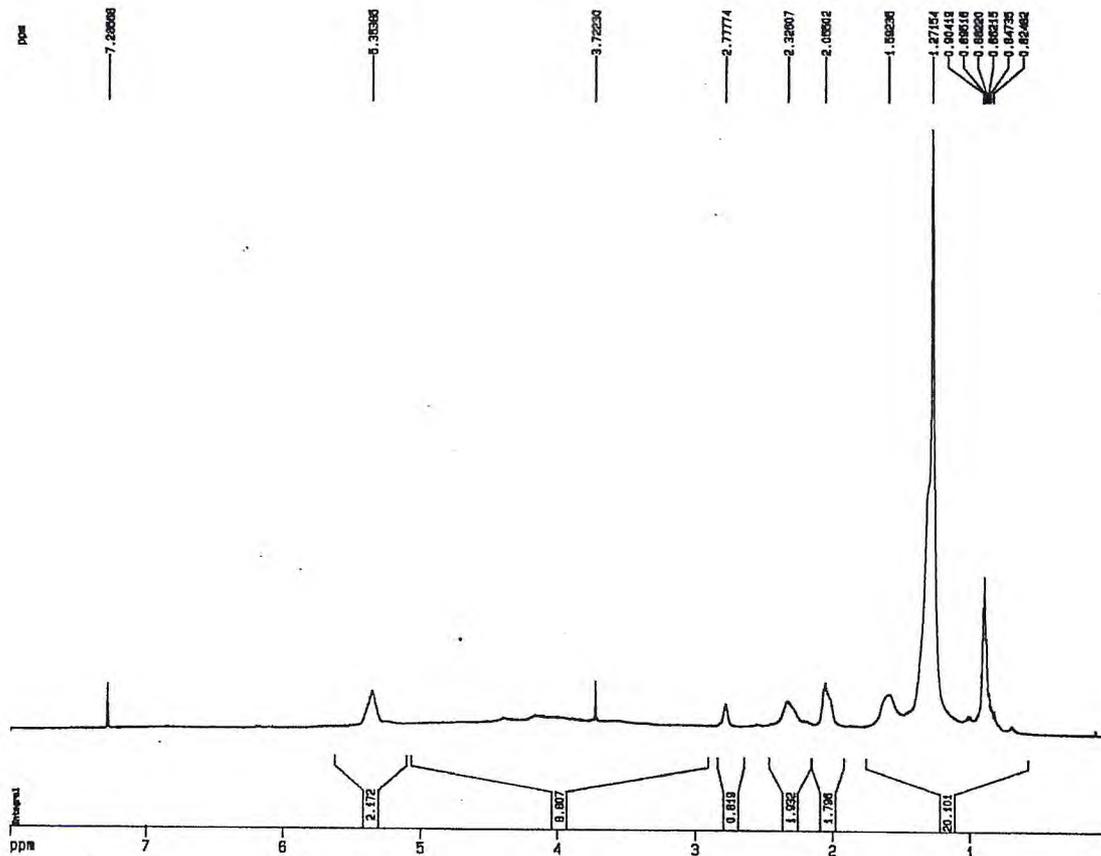


Figura 10.18 Espectro de RMN ¹H de Lipo 4 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

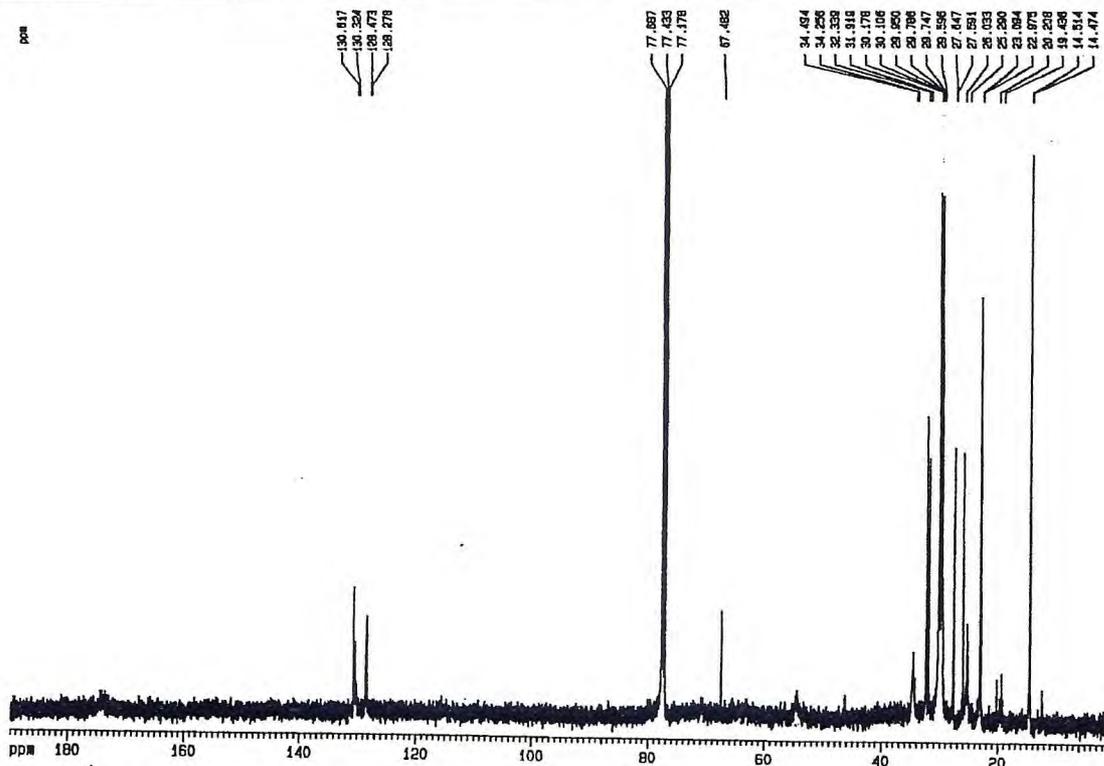


Figura 10.19 Espectro de RMN ¹³C-BB de Lipo 4 [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

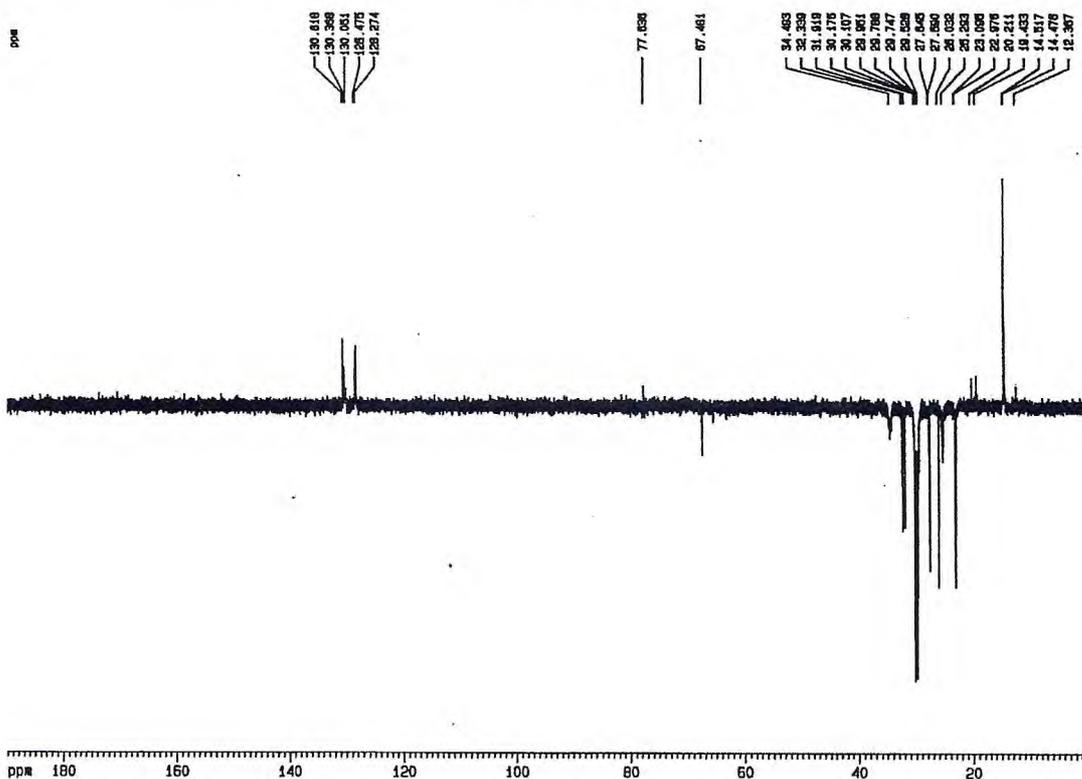


Figura 10.20 Espectro de RMN ¹³C-DEPT(135°) de Lipo 4 [δ ; CDCl₃; 125,77 MHz]

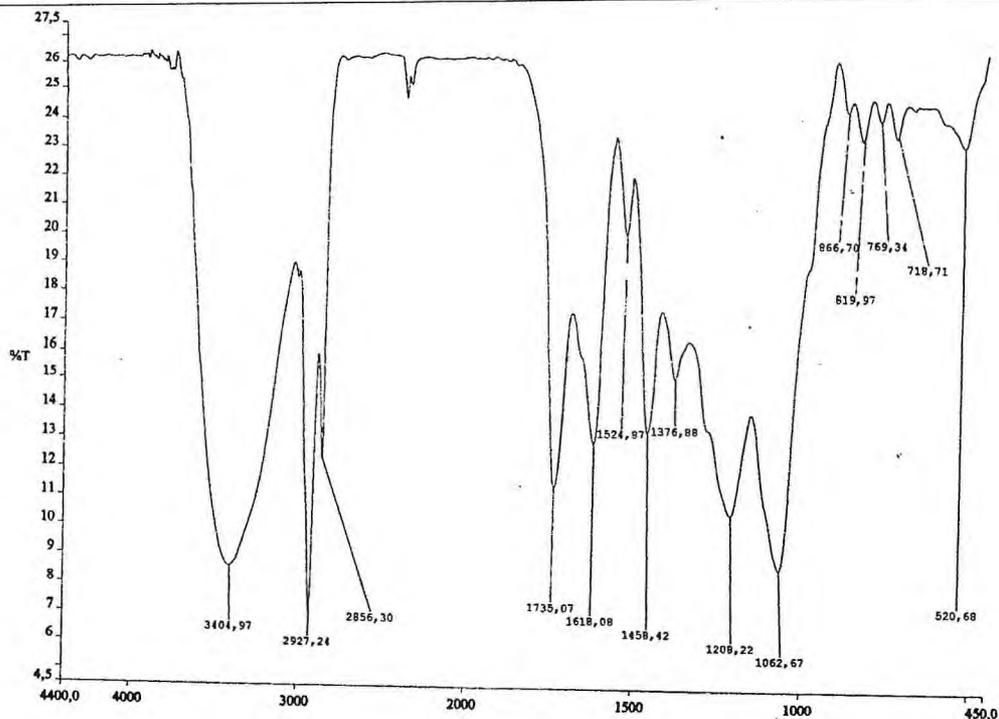


Figura 10.21 Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 4

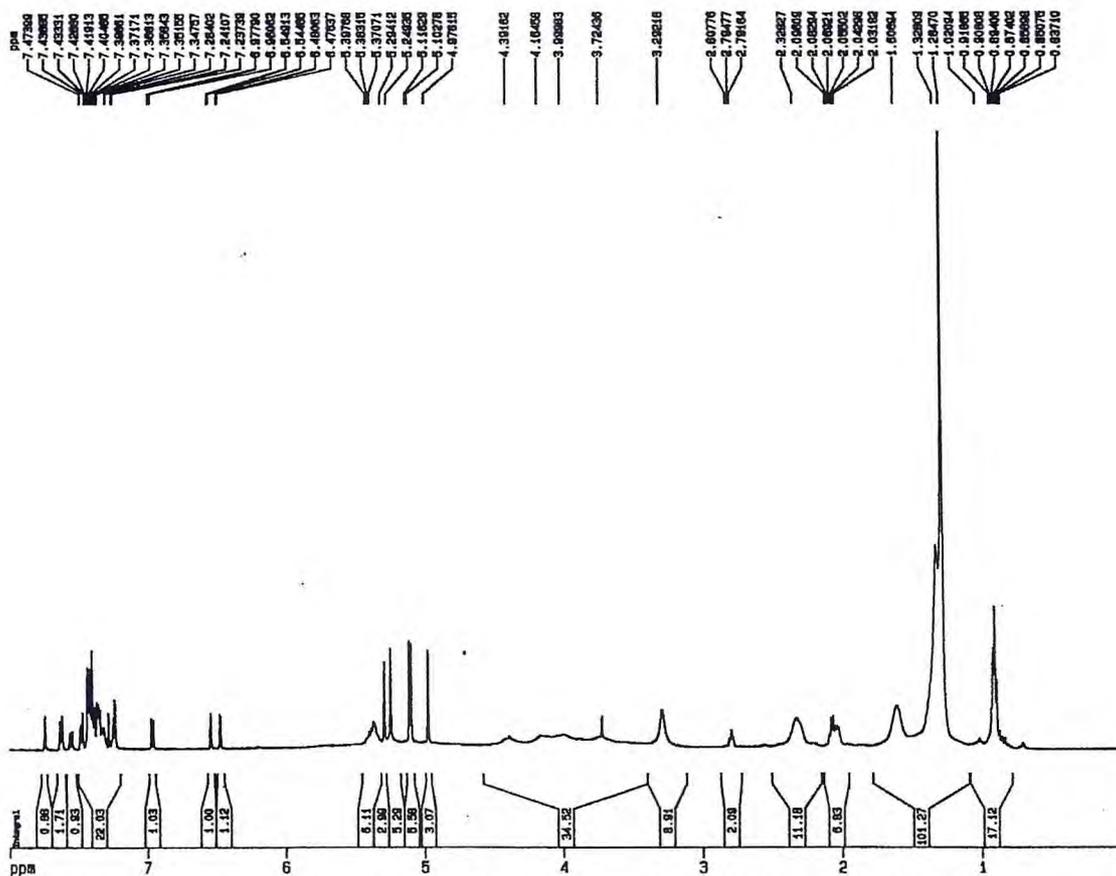


Figura 10.22 - Espectro de RMN ^1H de Lipo 5 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]

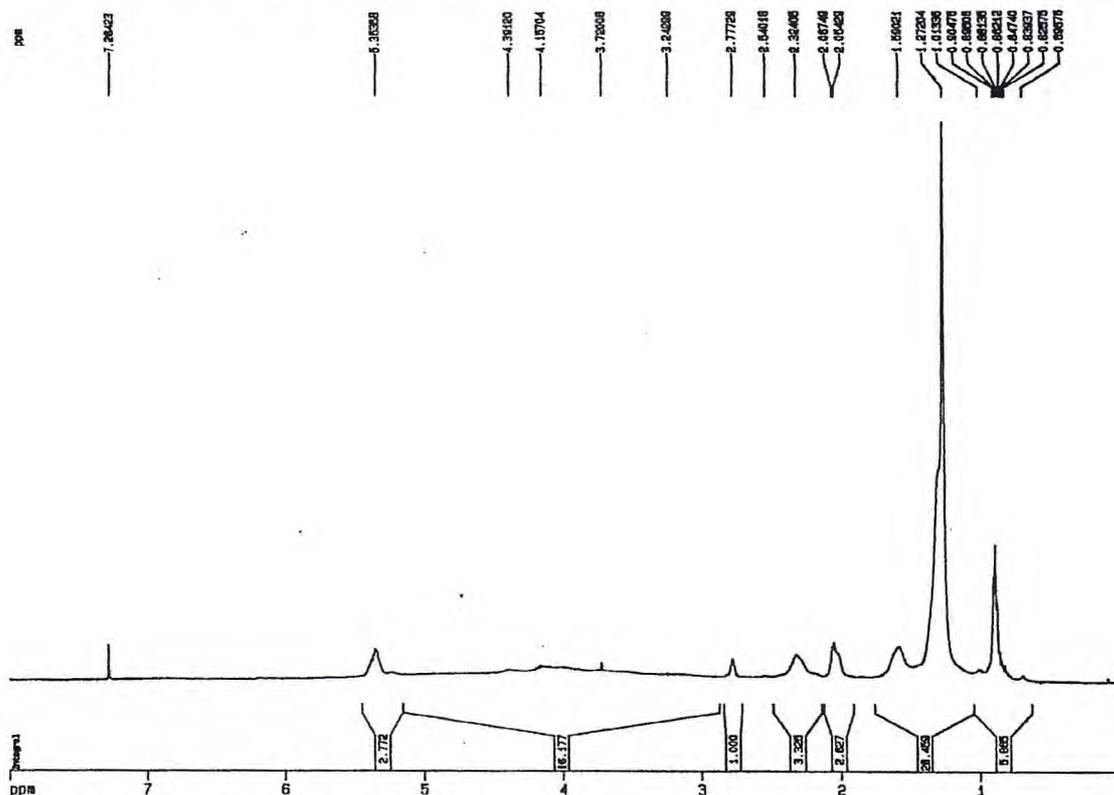


Figura 10.25 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 6 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

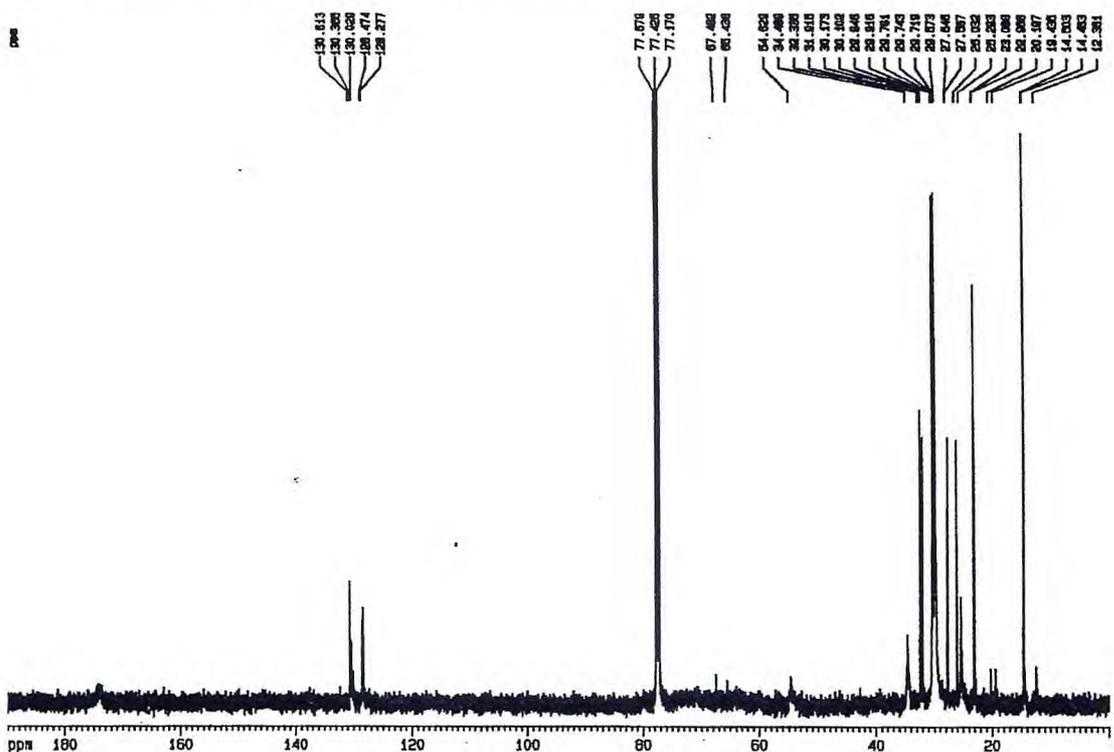


Figura 10.26 - Espectro de RMN ¹³C-BB de Lipo 6 [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

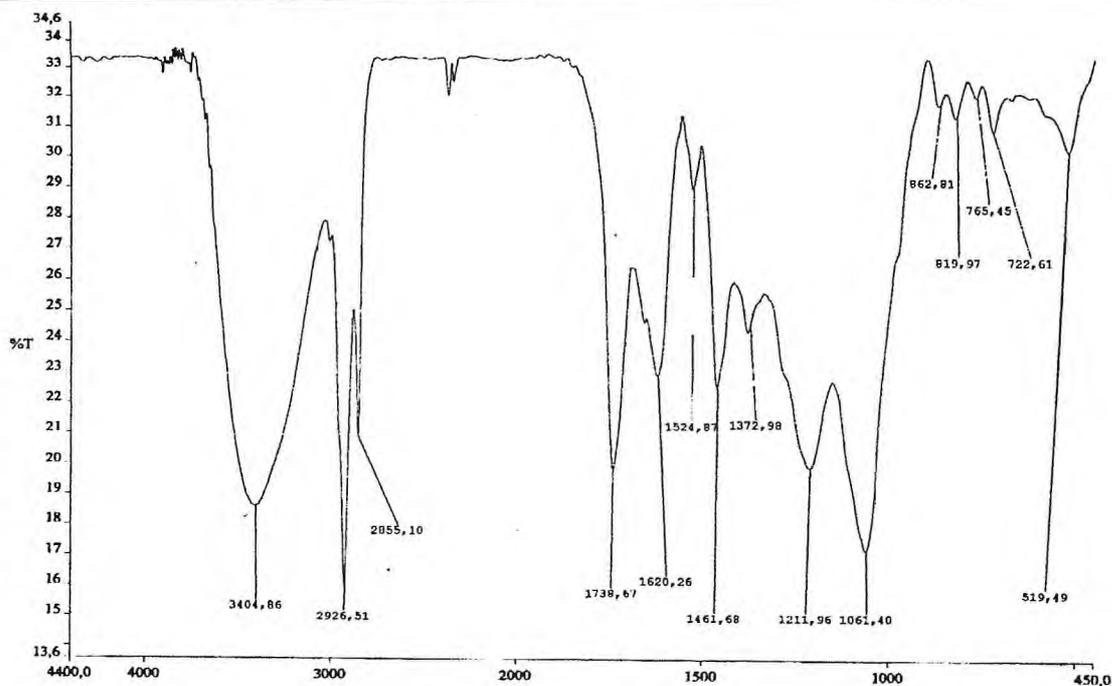


Figura 10.27 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 6

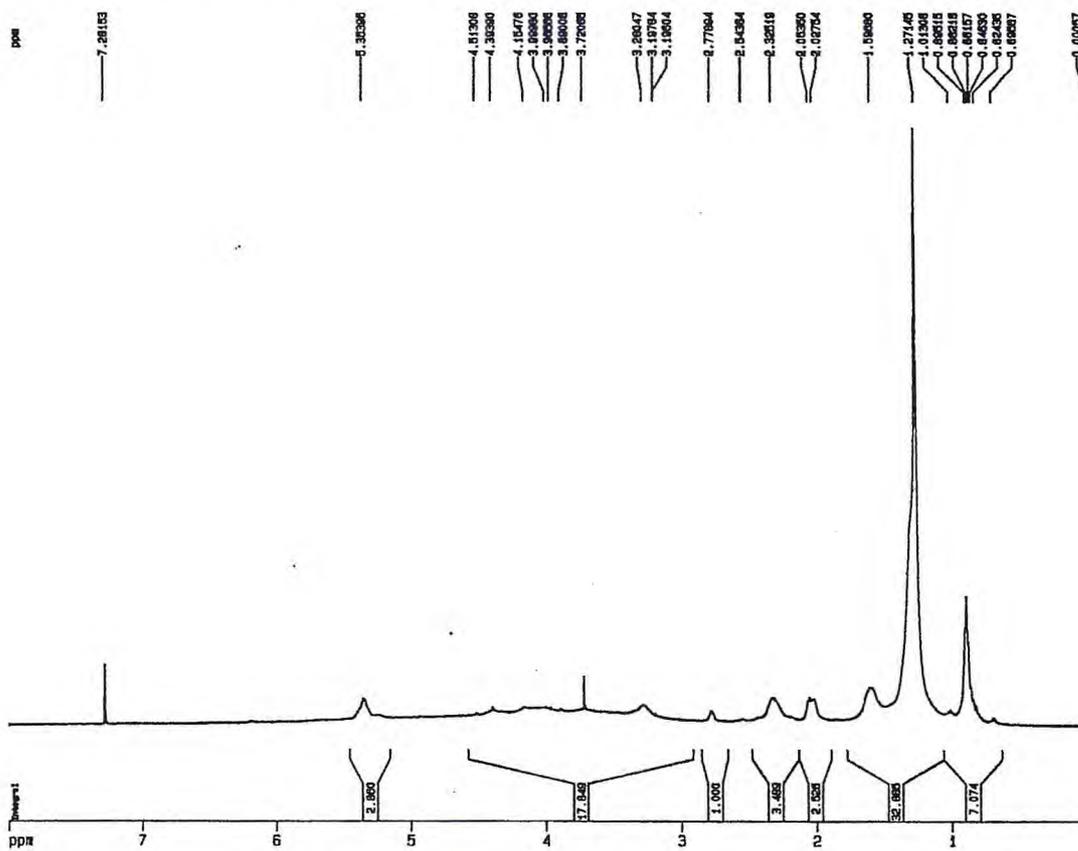


Figura 10.28 - Espectro de RMN ^1H de Lipo 7 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]

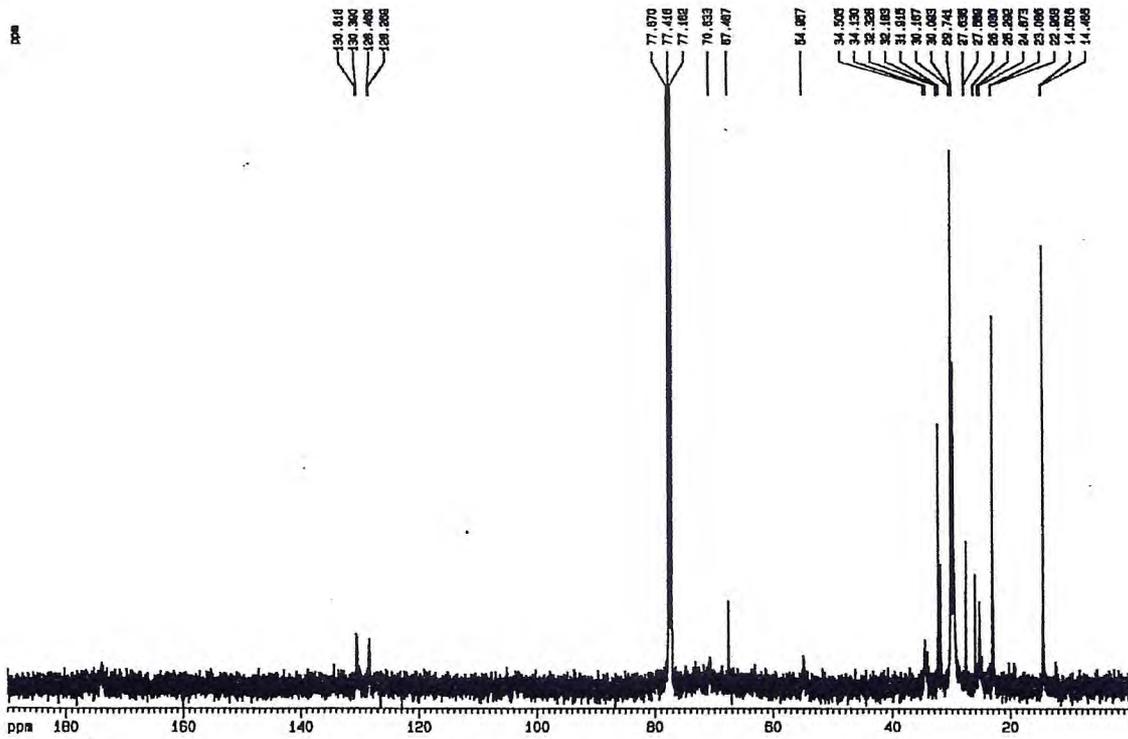


Figura 10.29 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 7 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]

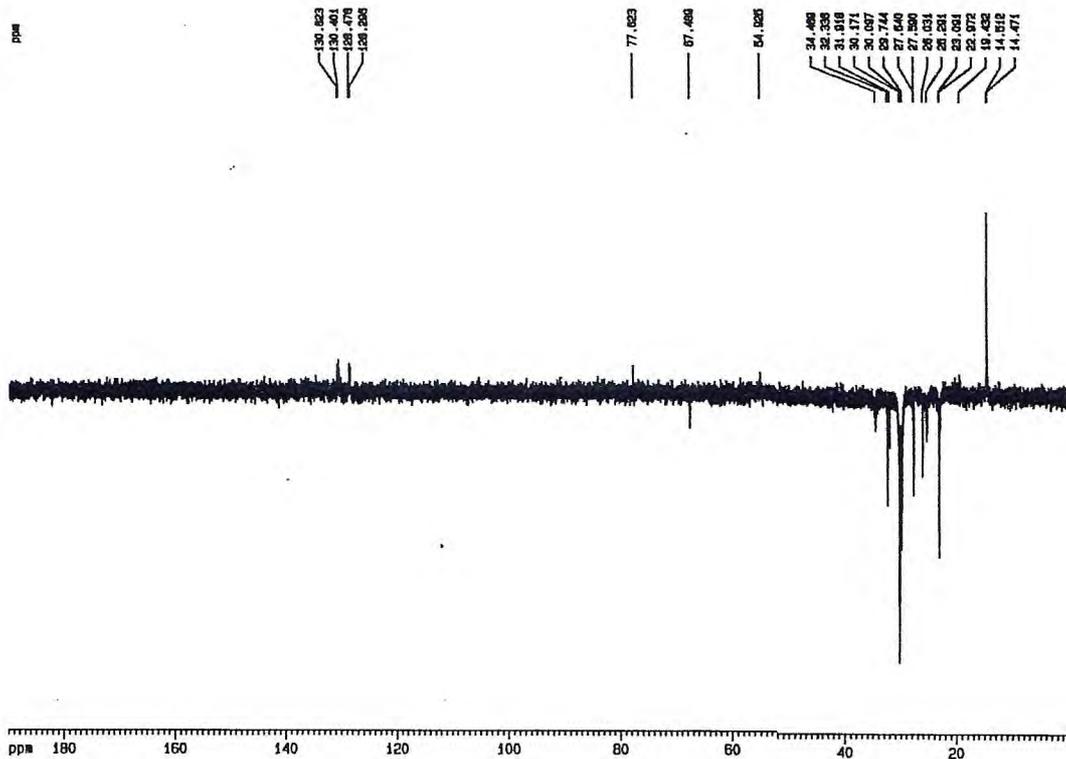


Figura 10.30 - Espectro de RMN ^{13}C -DEP (135 °) de Lipo 7 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]

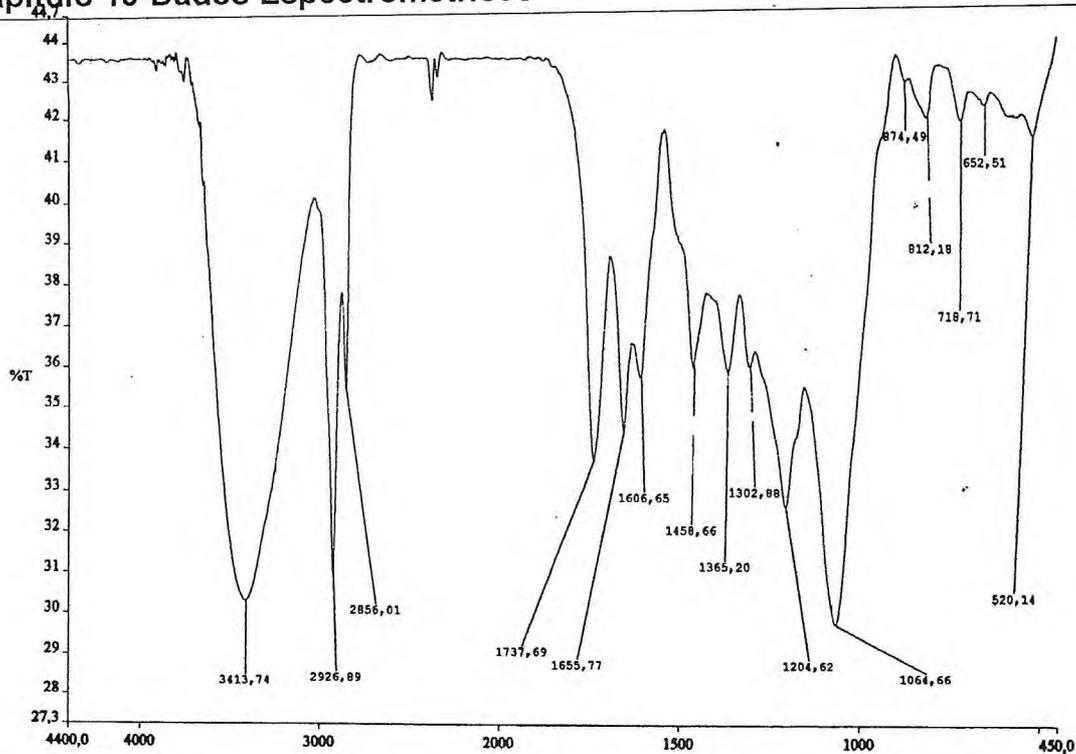


Figura 10.31 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 7

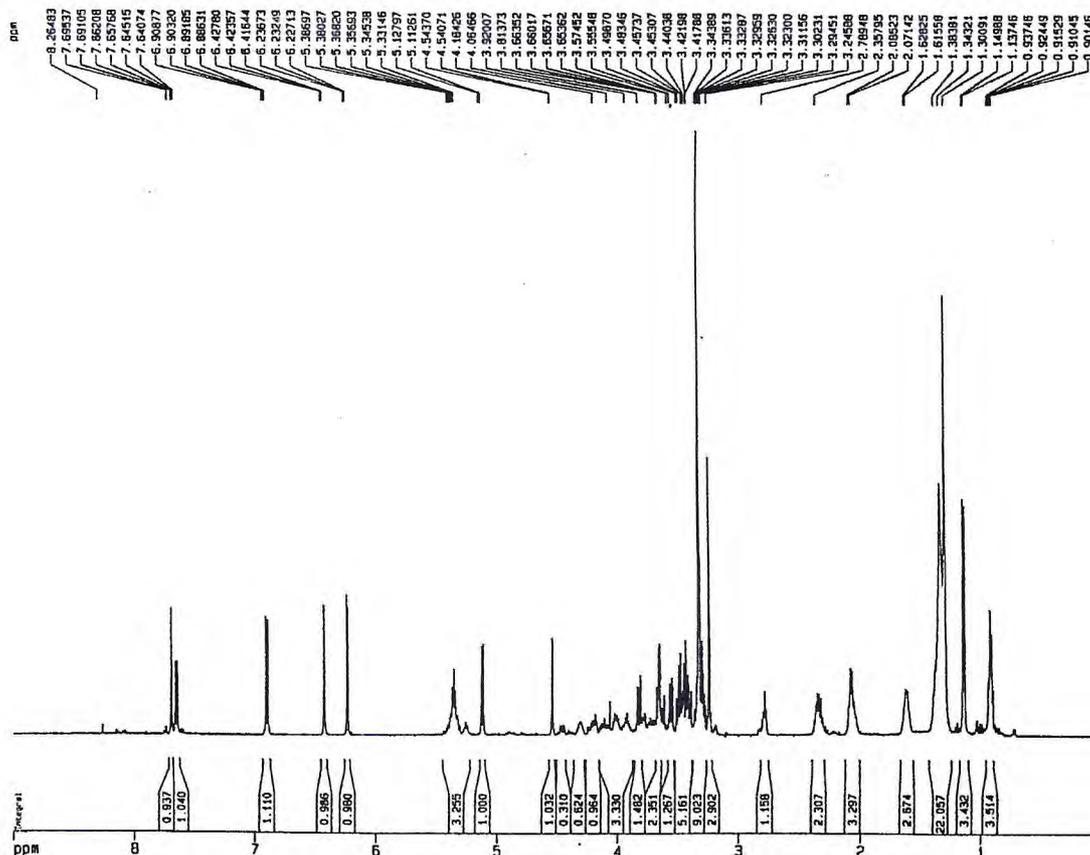


Figura 10.32 - Espectro de RMN ^1H de Lipo 8 [δ ; CD_3OH ; 500,13 MHz]

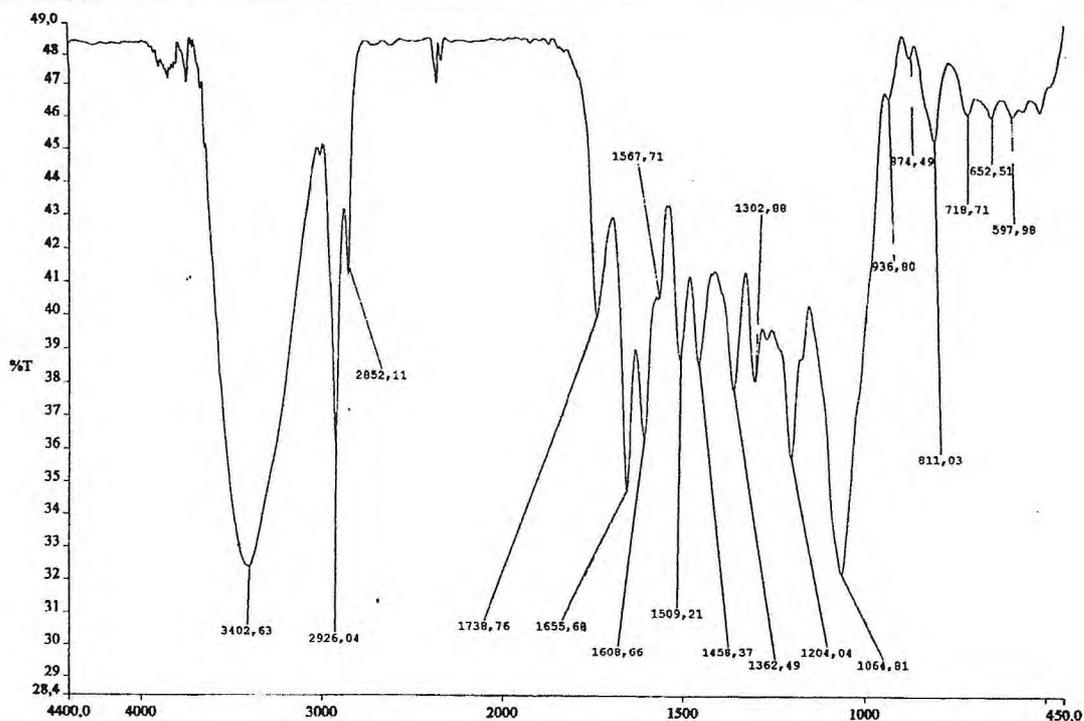


Figura 10.33 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 8

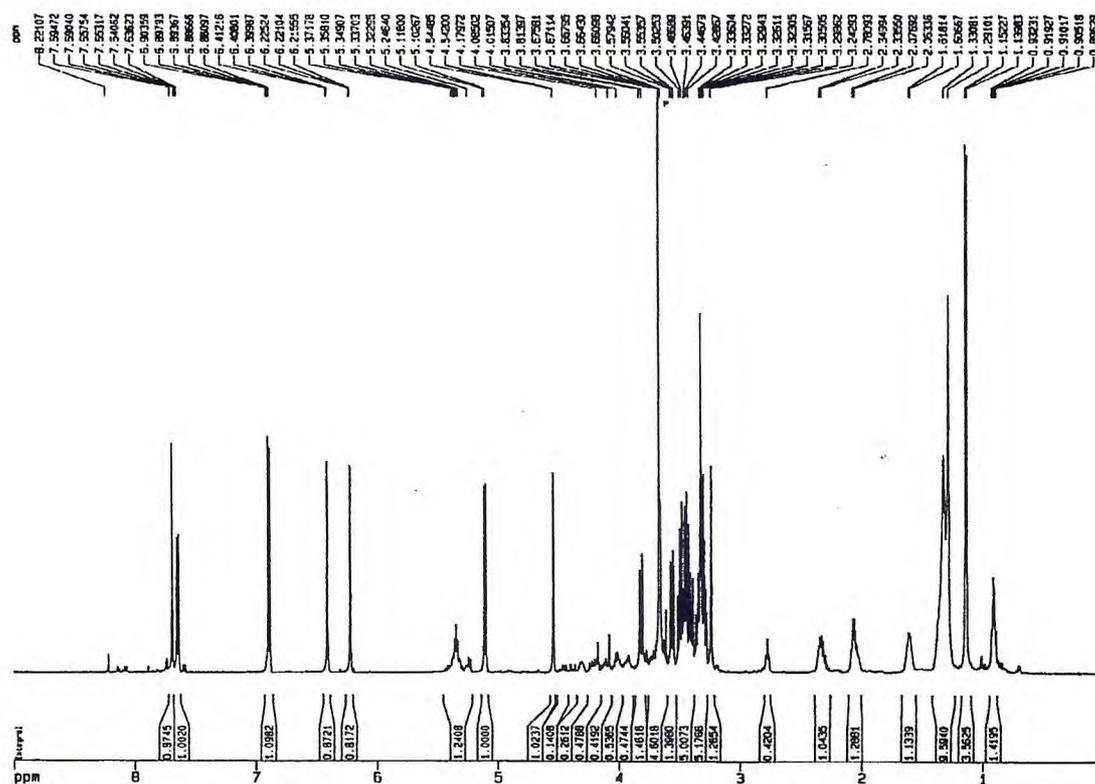


Figura 10.34 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 9 [δ ; CD₃OH; 500,13 MHz]

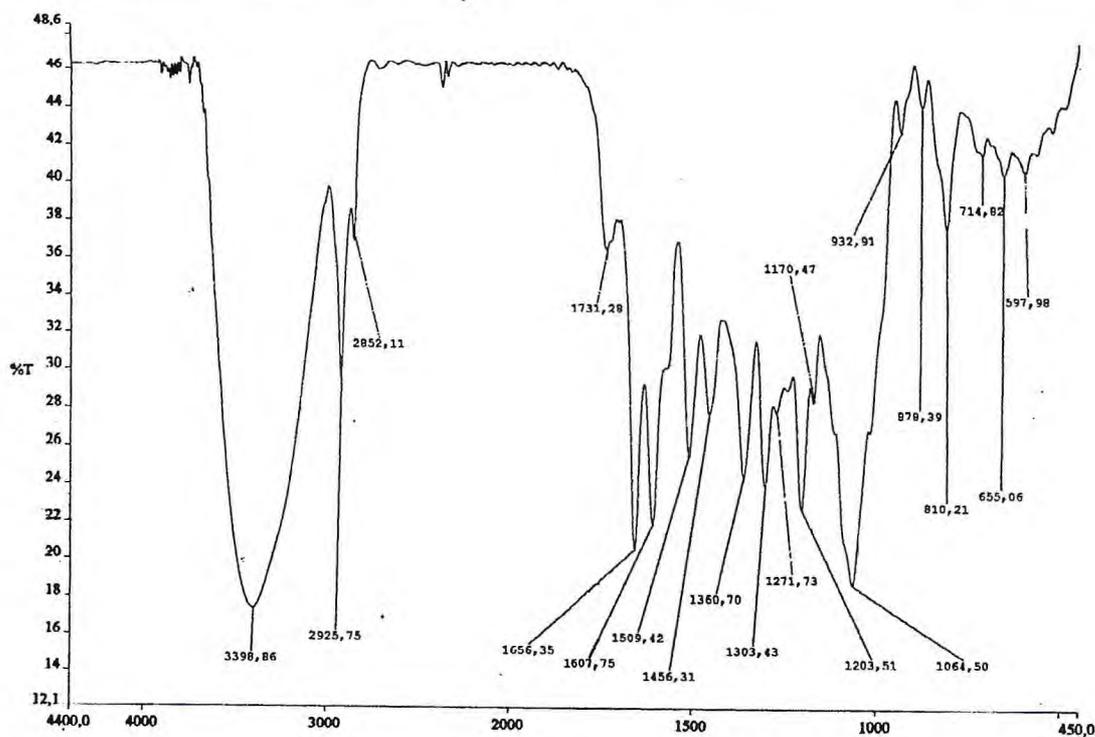


Figura 10.35 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 9

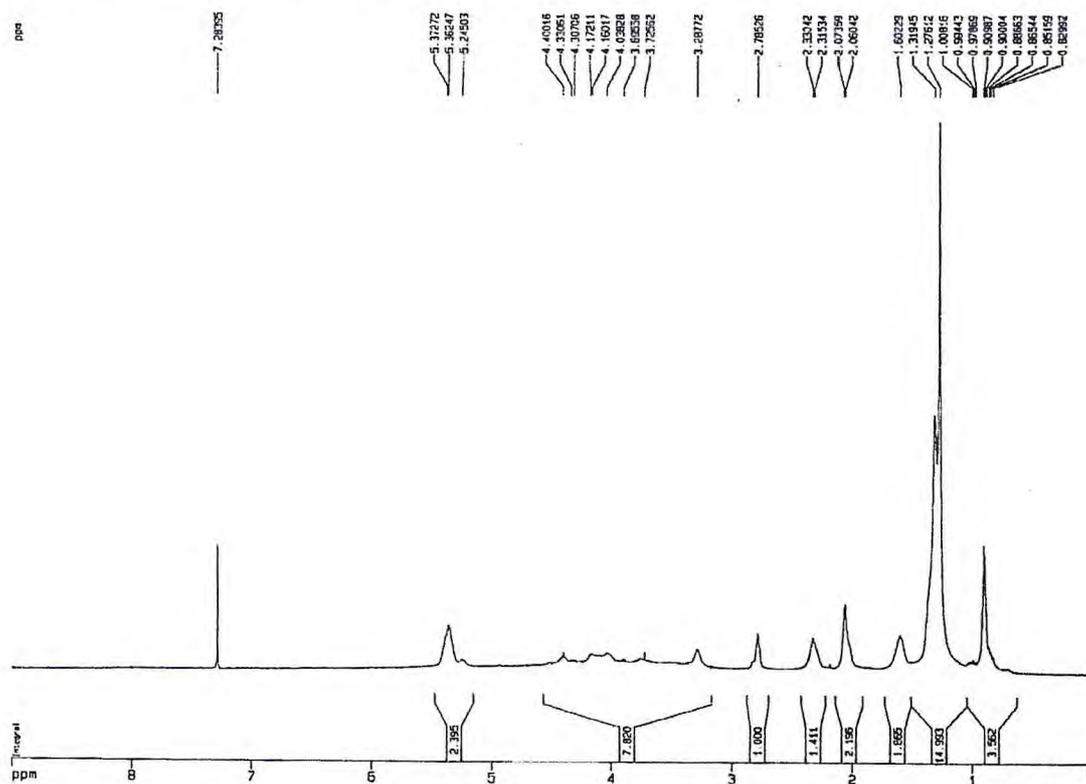


Figura 10.36 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 10 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

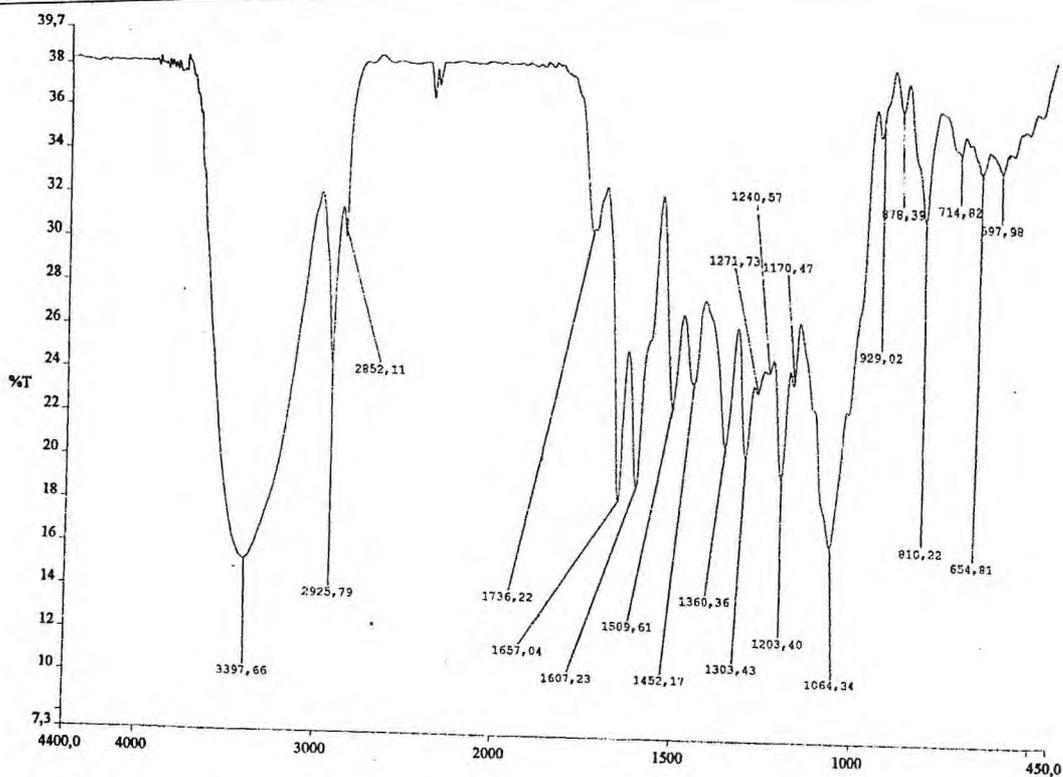


Figura 10.37 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 10

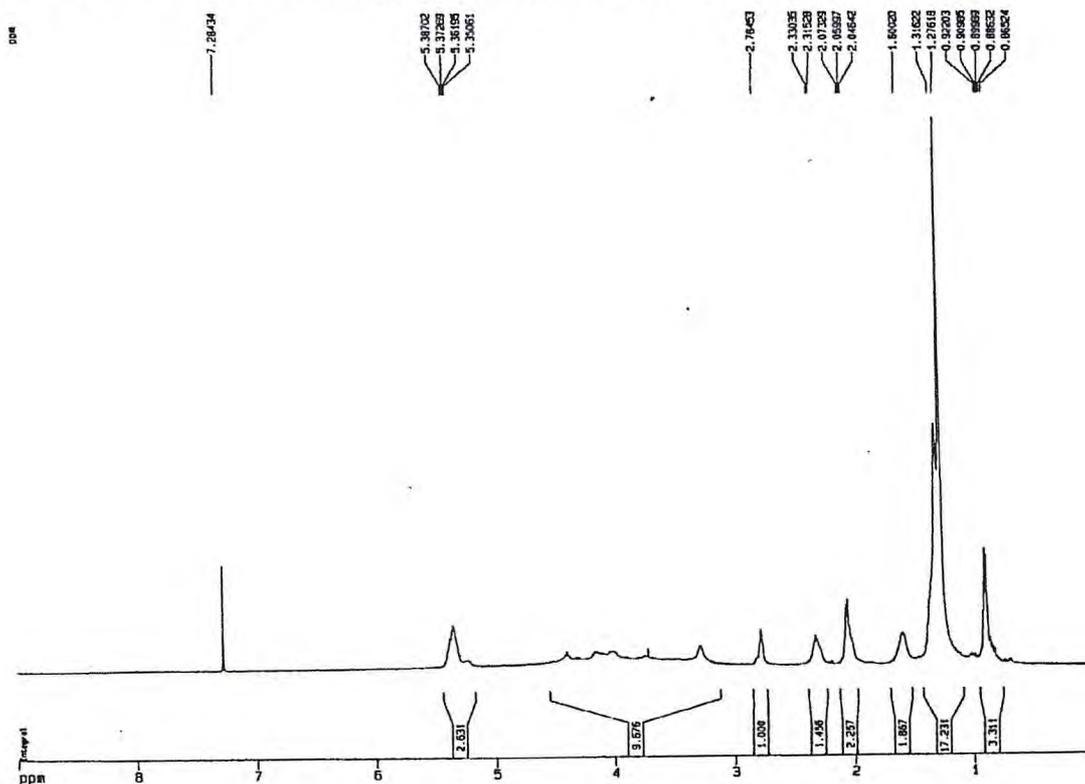


Figura 10.38 - Espectro de RMN ^1H de Lipo 11 [δ ; CDCl_3 ; 500,13 MHz]

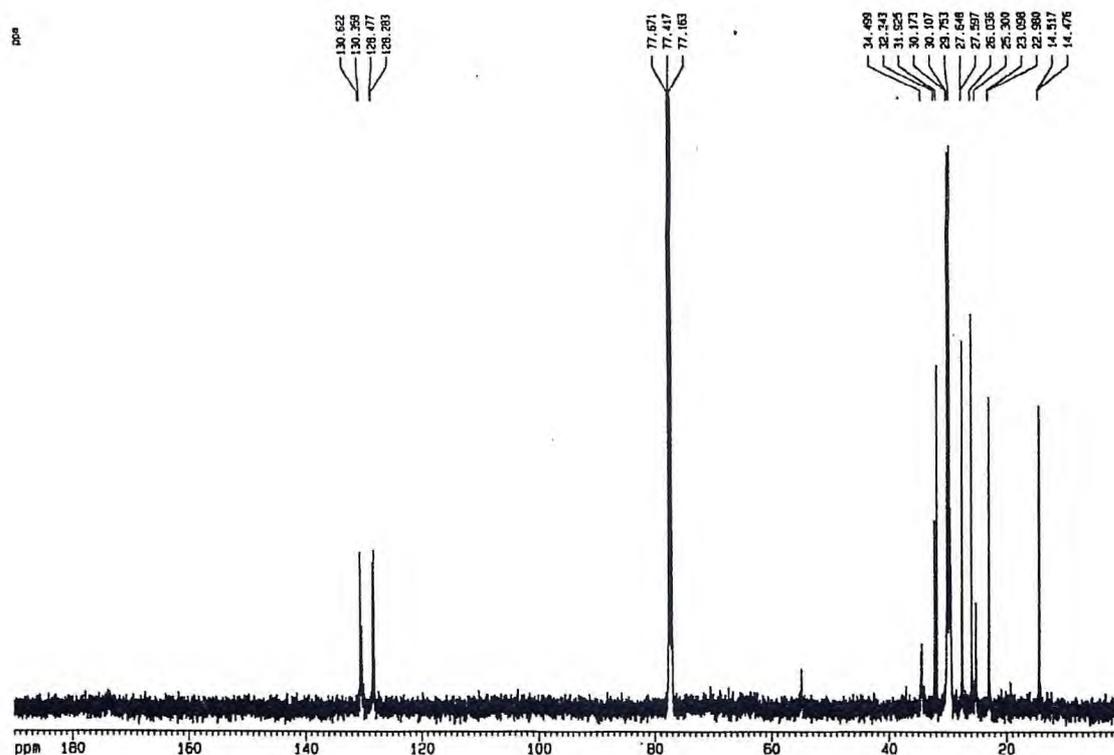


Figura 10.39 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 11 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]

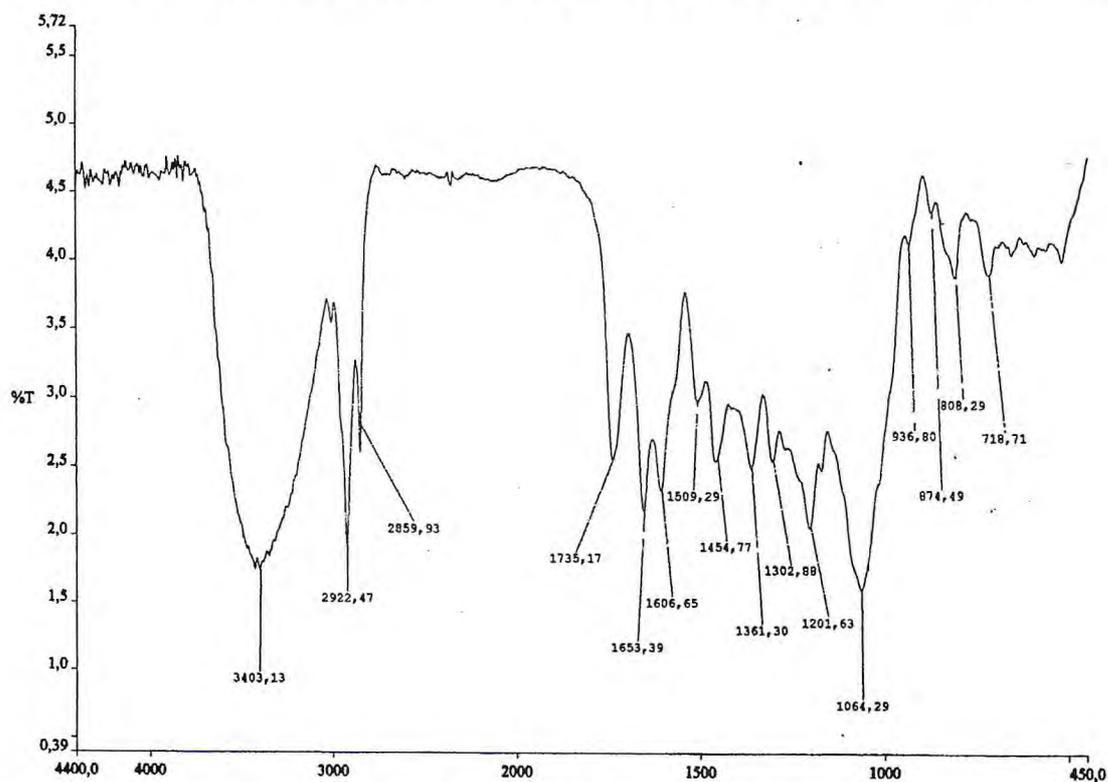


Figura 10.40 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 11

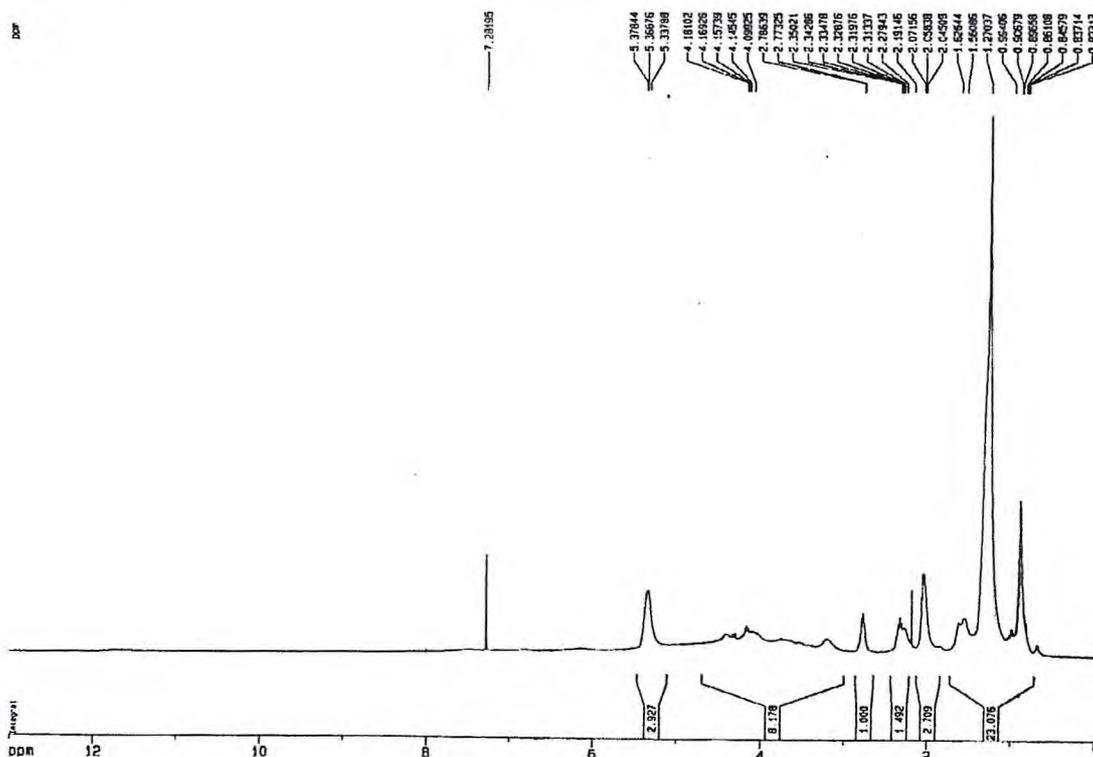


Figura 10.41 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 12 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

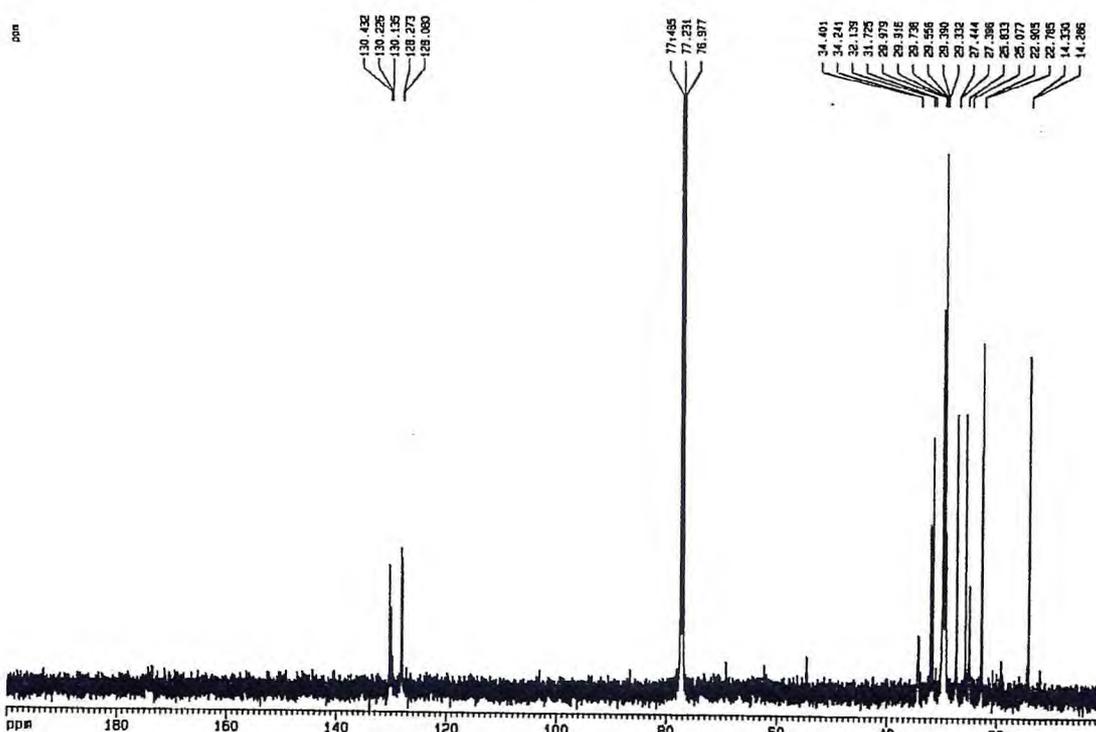


Figura 10.42 - Espectro de RMN ¹³C-BB de Lipo 12 [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

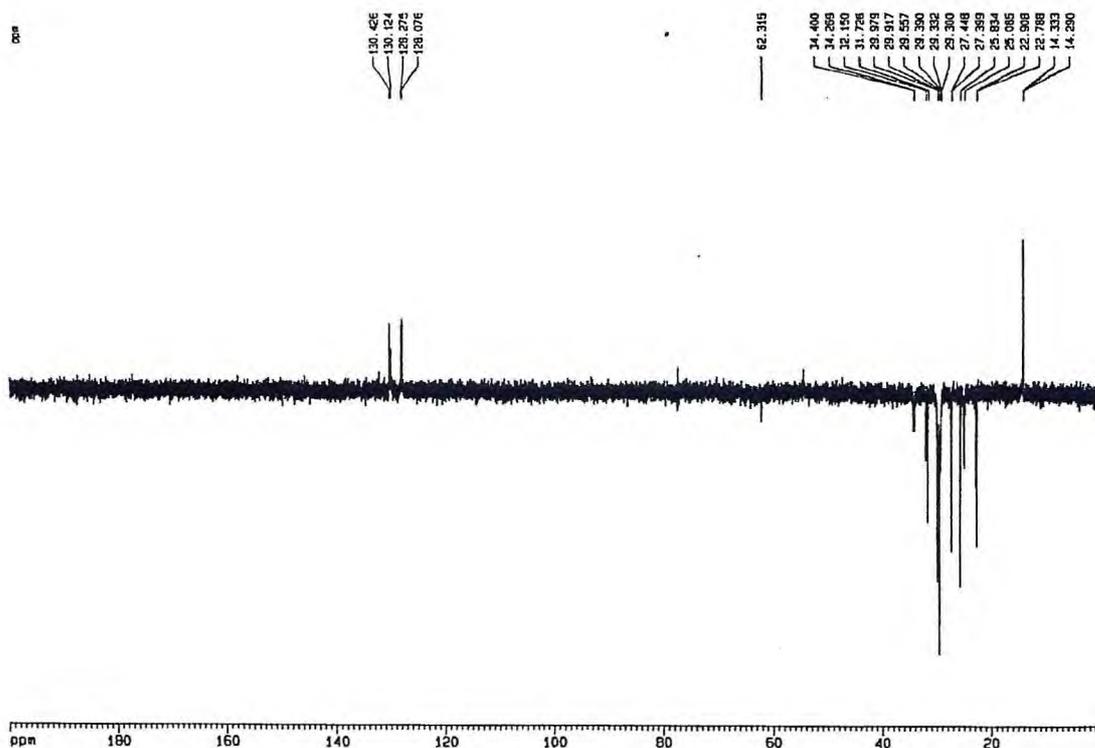


Figura 10.43 -Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135°) de Lipo 12[δ ; CDCl_3 ;125,77 MHz]

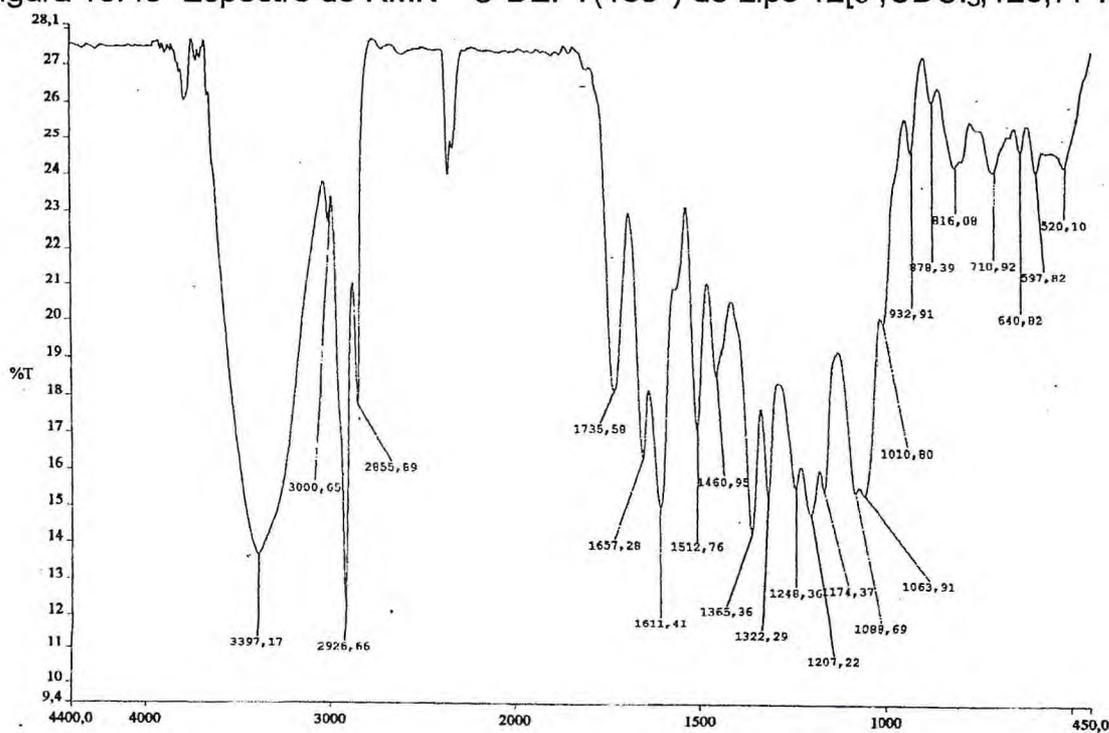


Figura 10.44 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] de Lipo 12

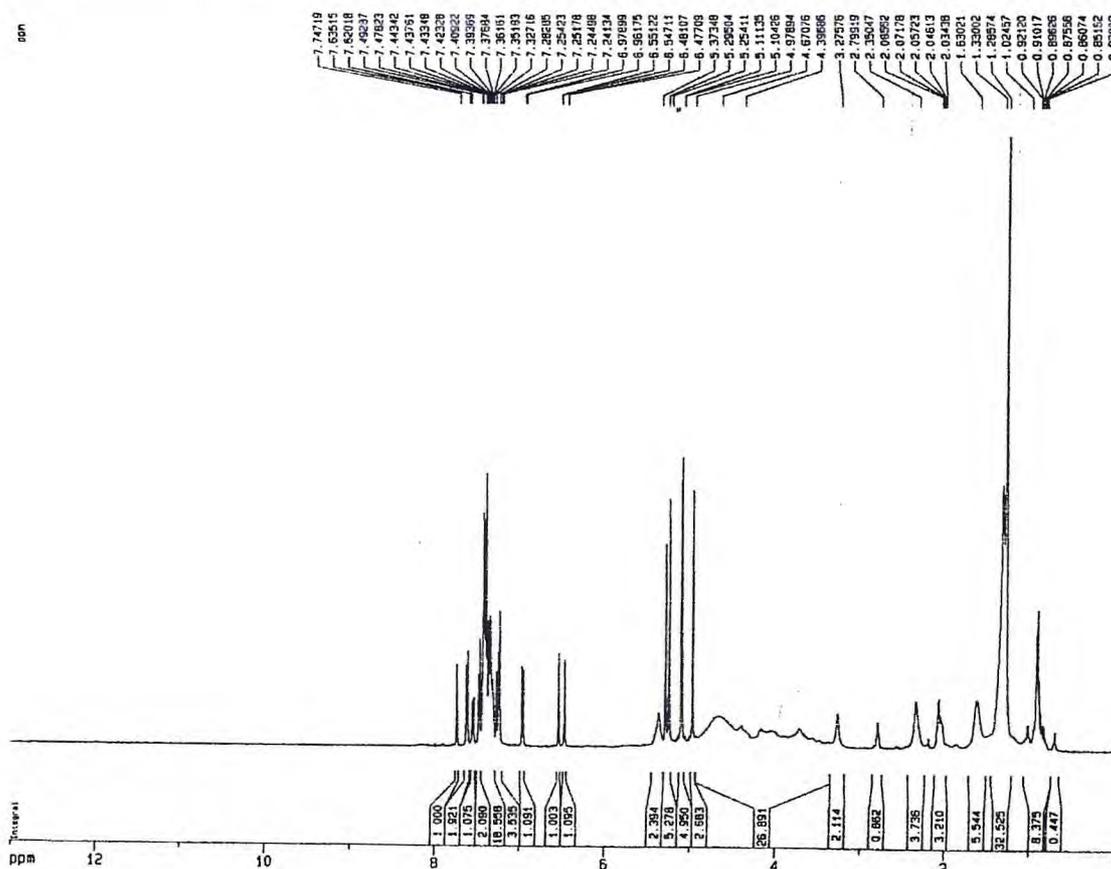


Figura 10.45 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 13 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

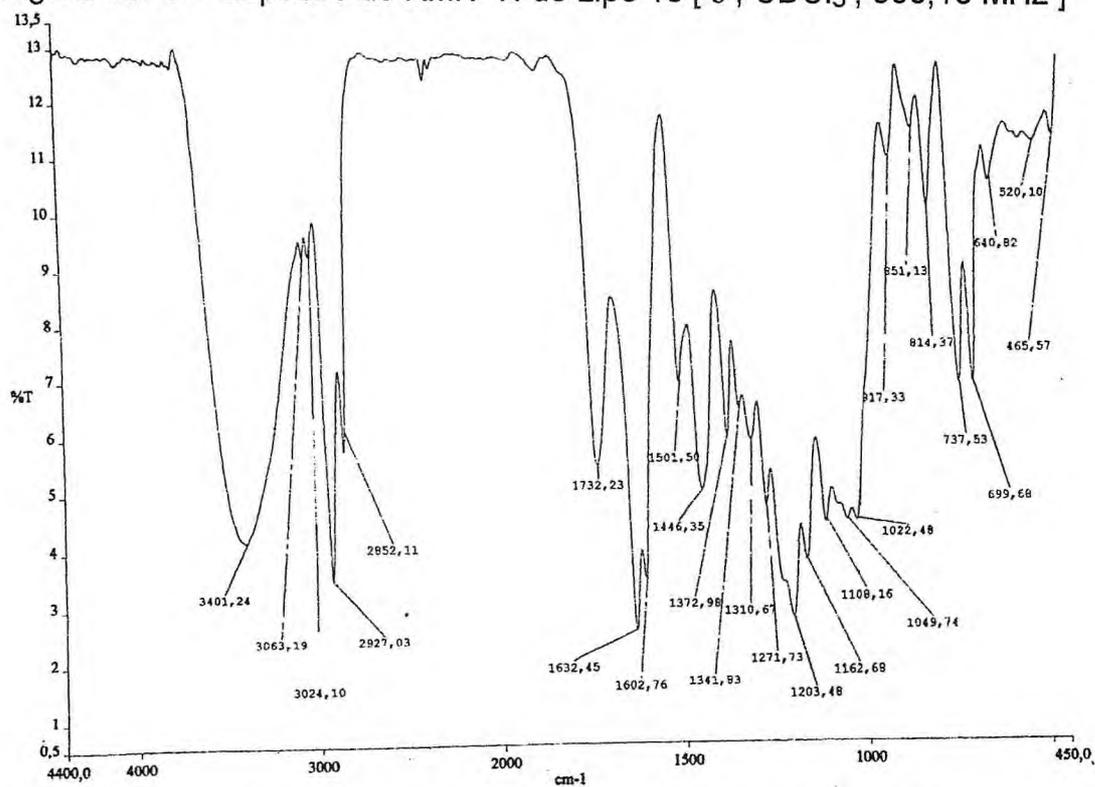


Figura 10.46 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 13

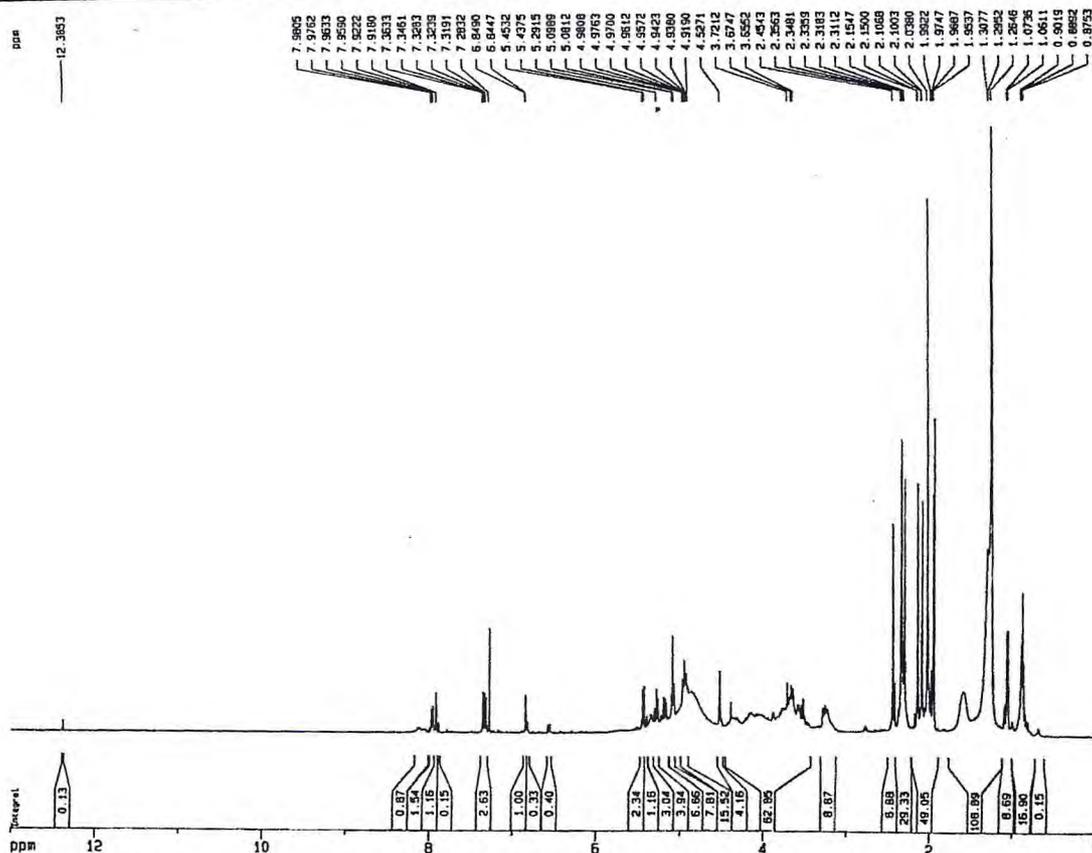


Figura 10.47 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 14 [δ ; CDC₁₃ ; 500,13 MHz]

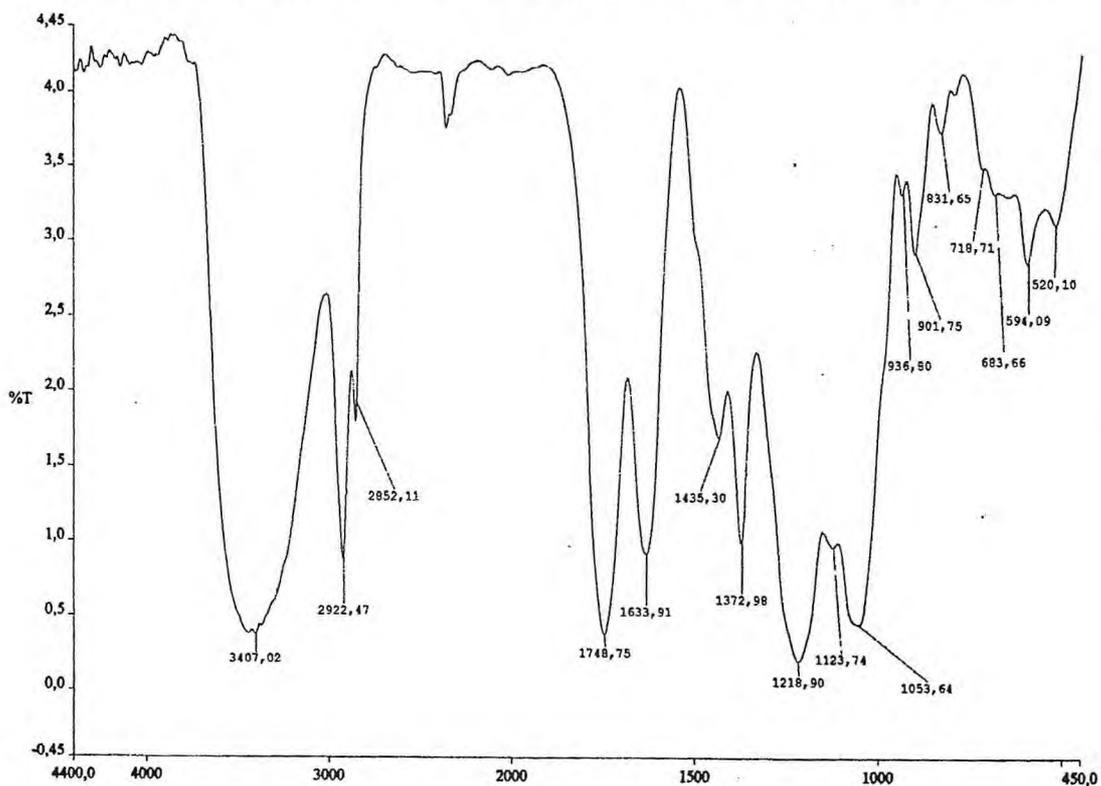


Figura 10.48 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 14

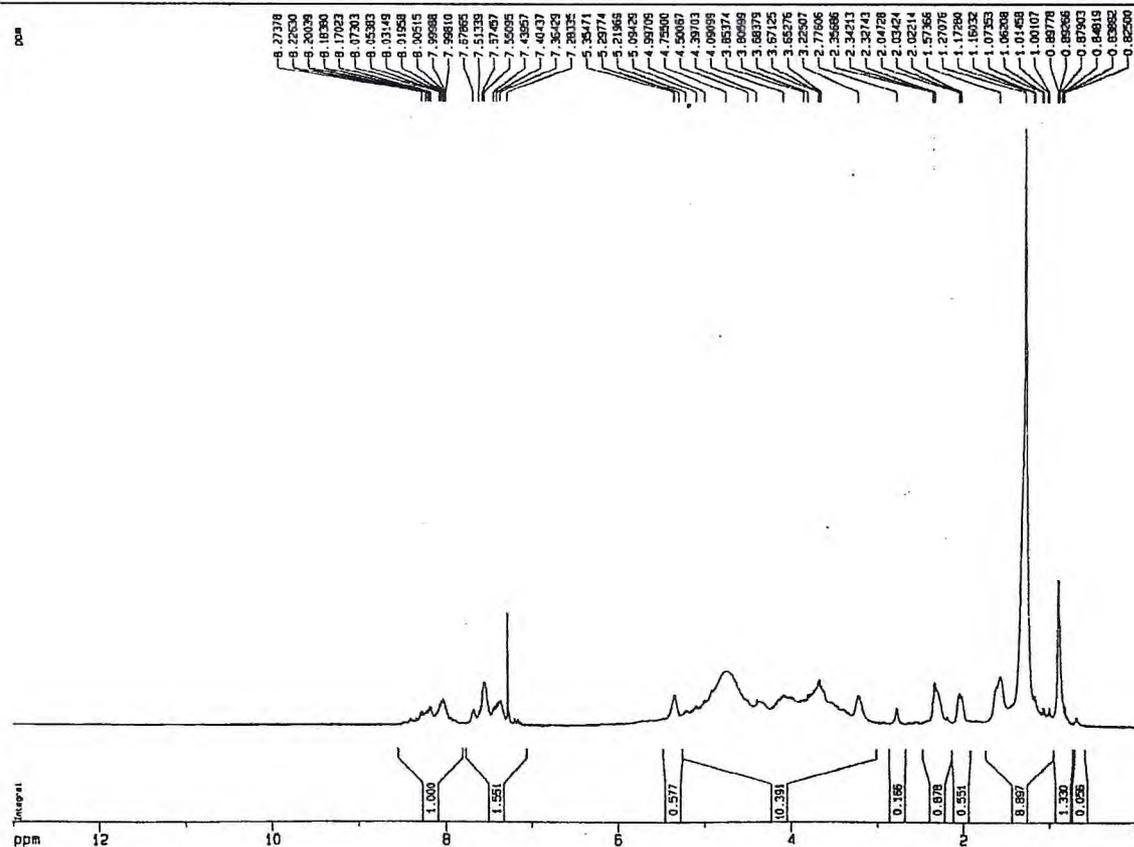


Figura 10.49 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 15 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

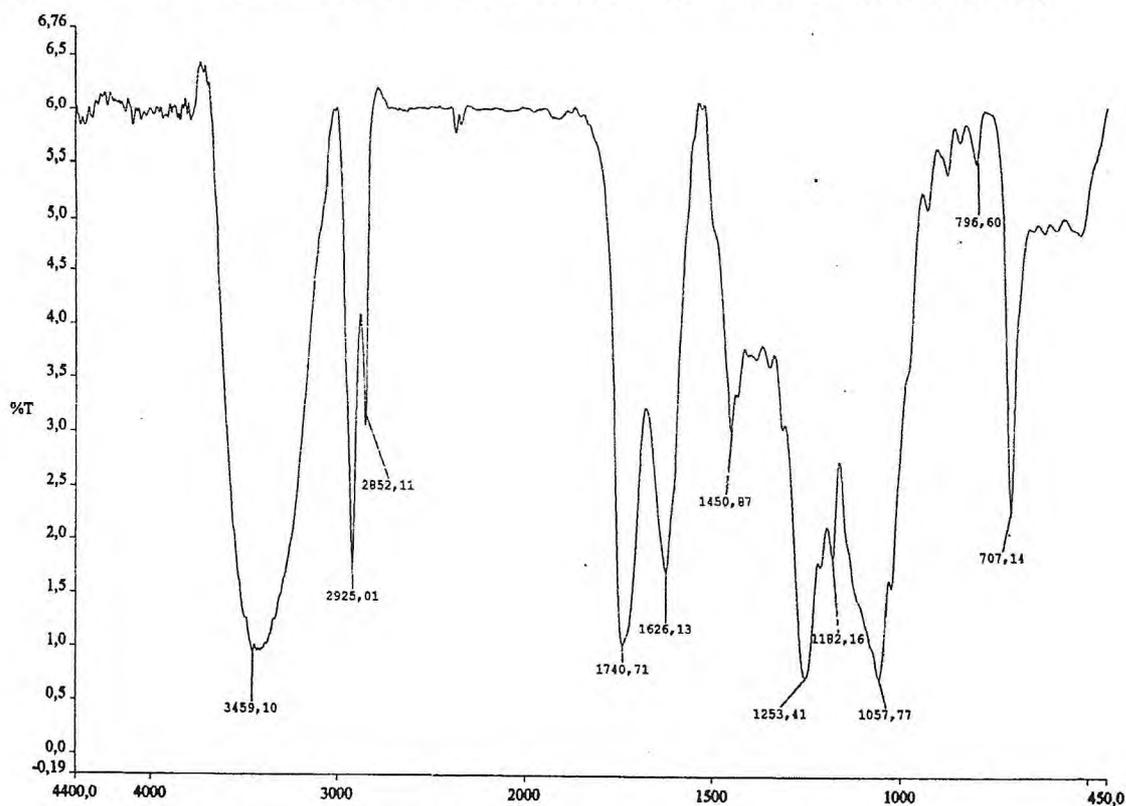


Figura 10.50 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 15

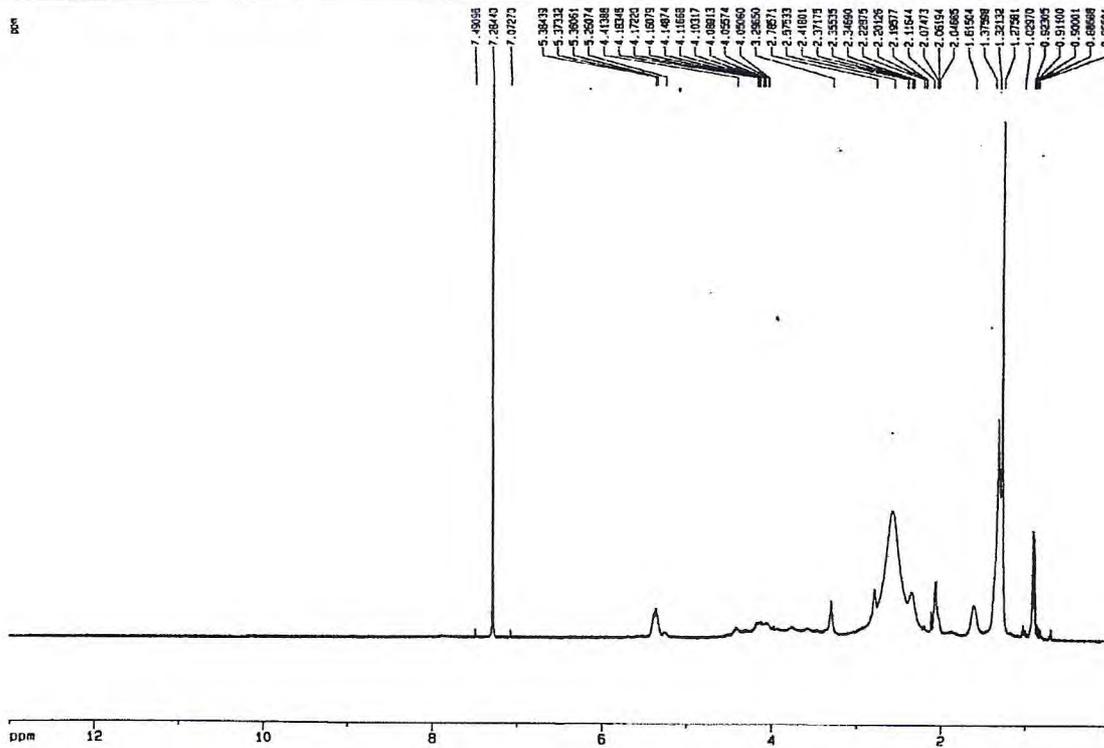


Figura 10.51- Espectro de RMN ¹H de Lipo 16 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

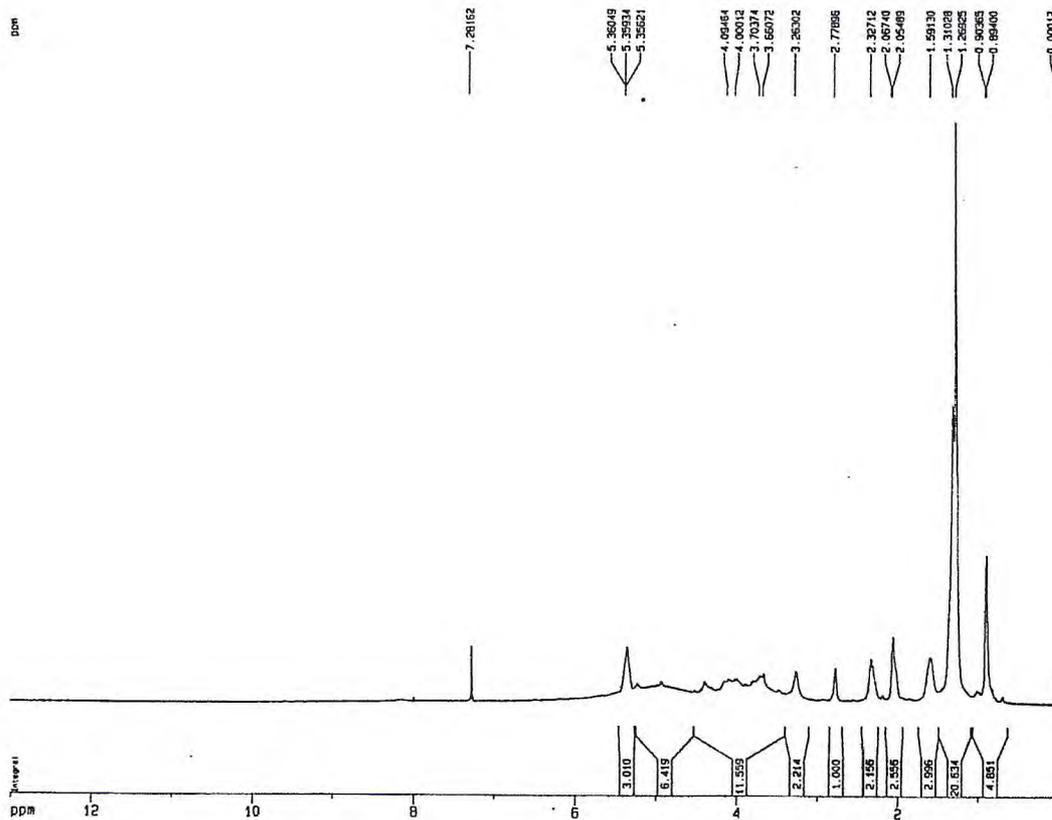


Figura 10.52 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 17 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

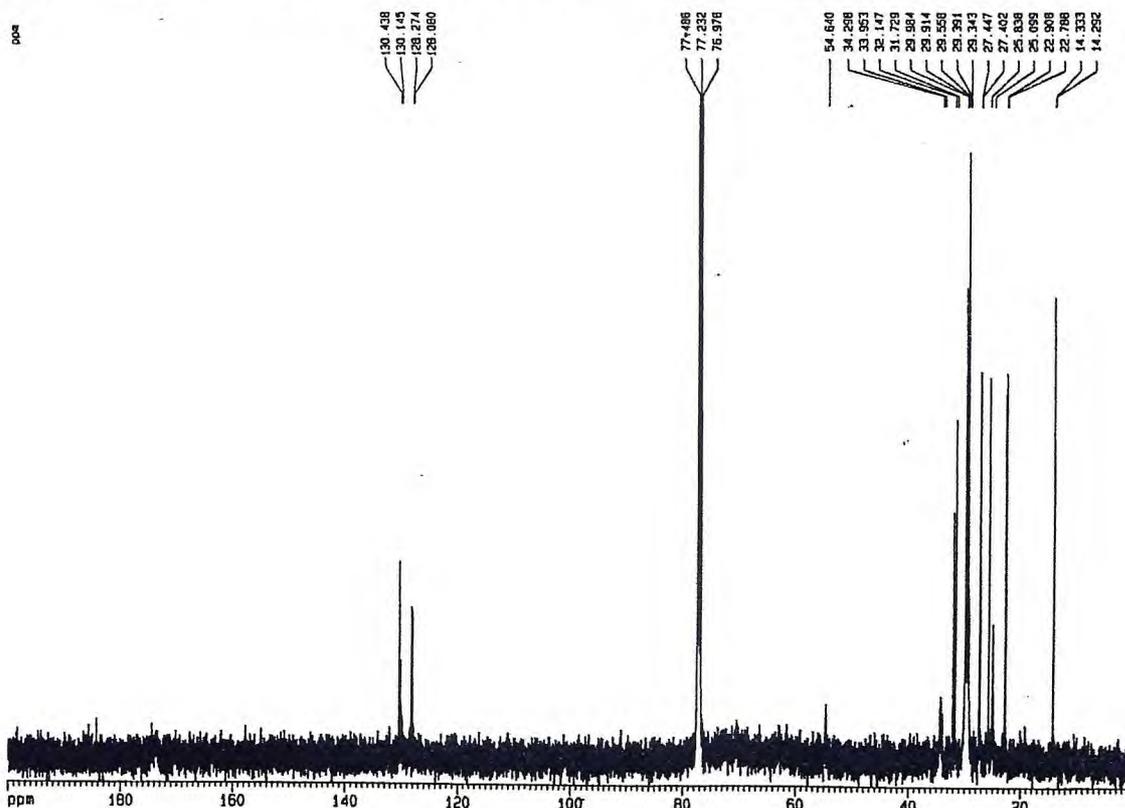


Figura 10.53 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de Lipo 17 [δ ; CDCl_3 ; 125,77 MHz]

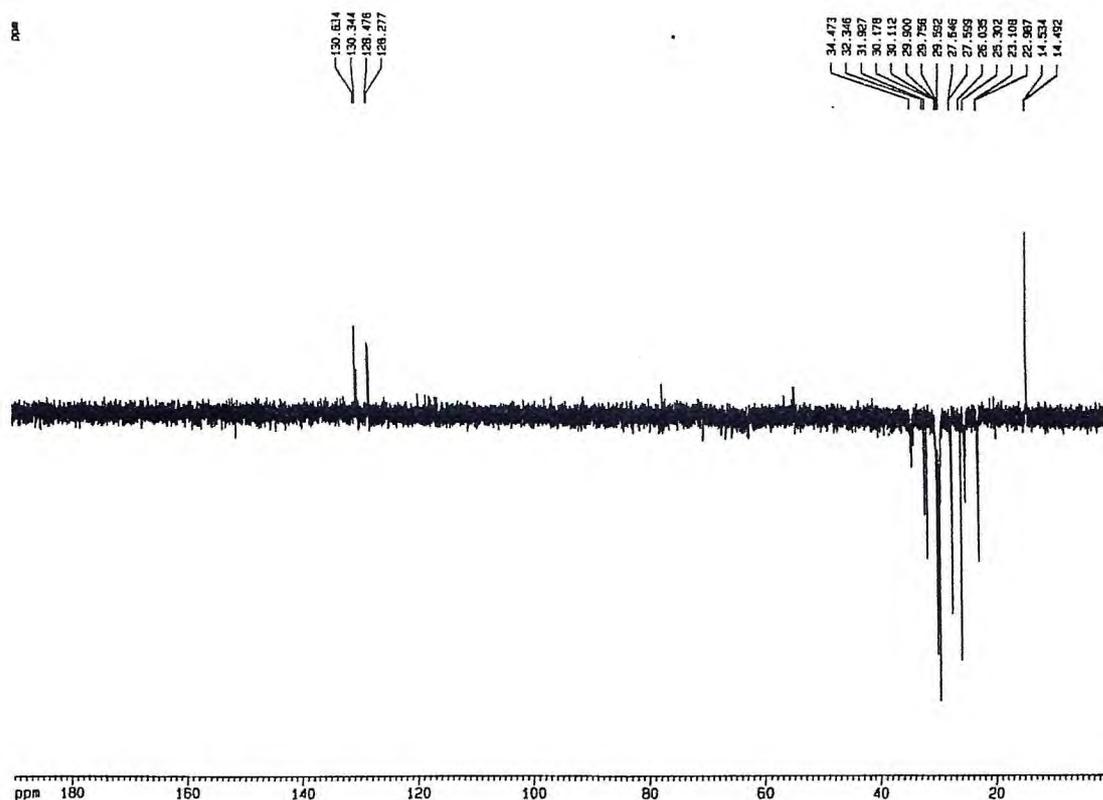


Figura 10.54-Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135°) de Lipo 17[δ ; CDCl_3 ; 125,77MHz]

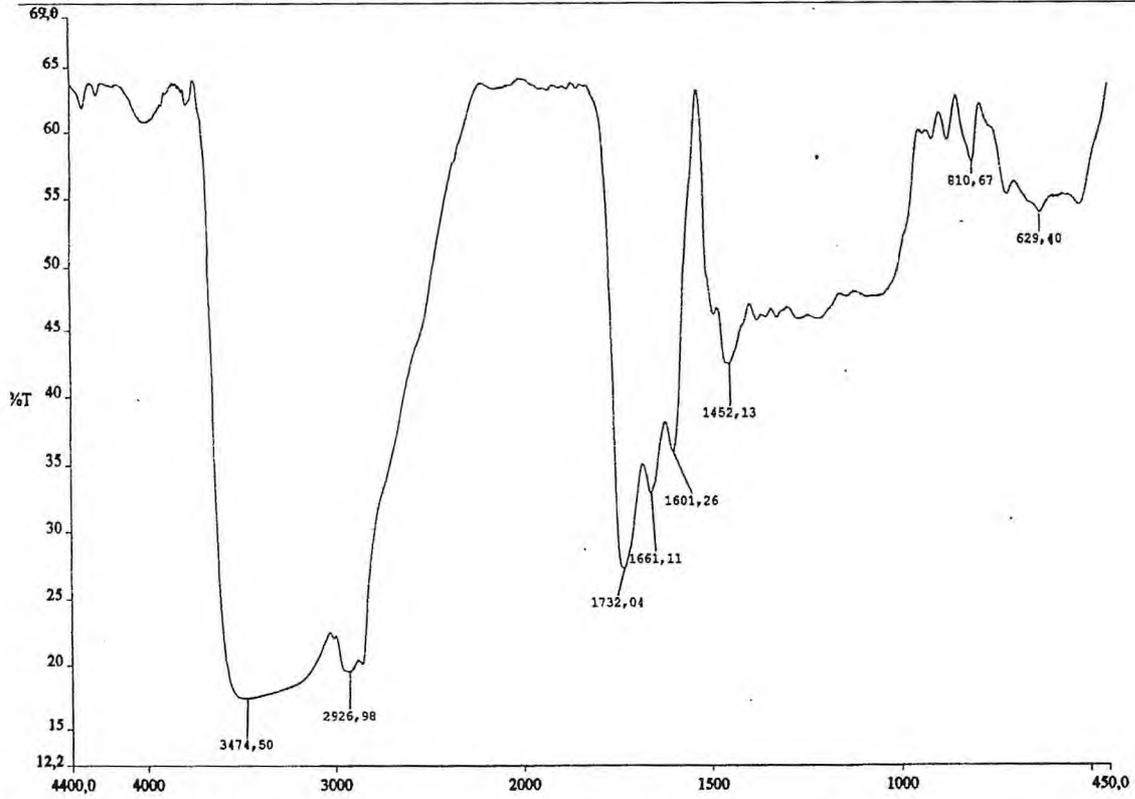


Figura 10.55 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 17

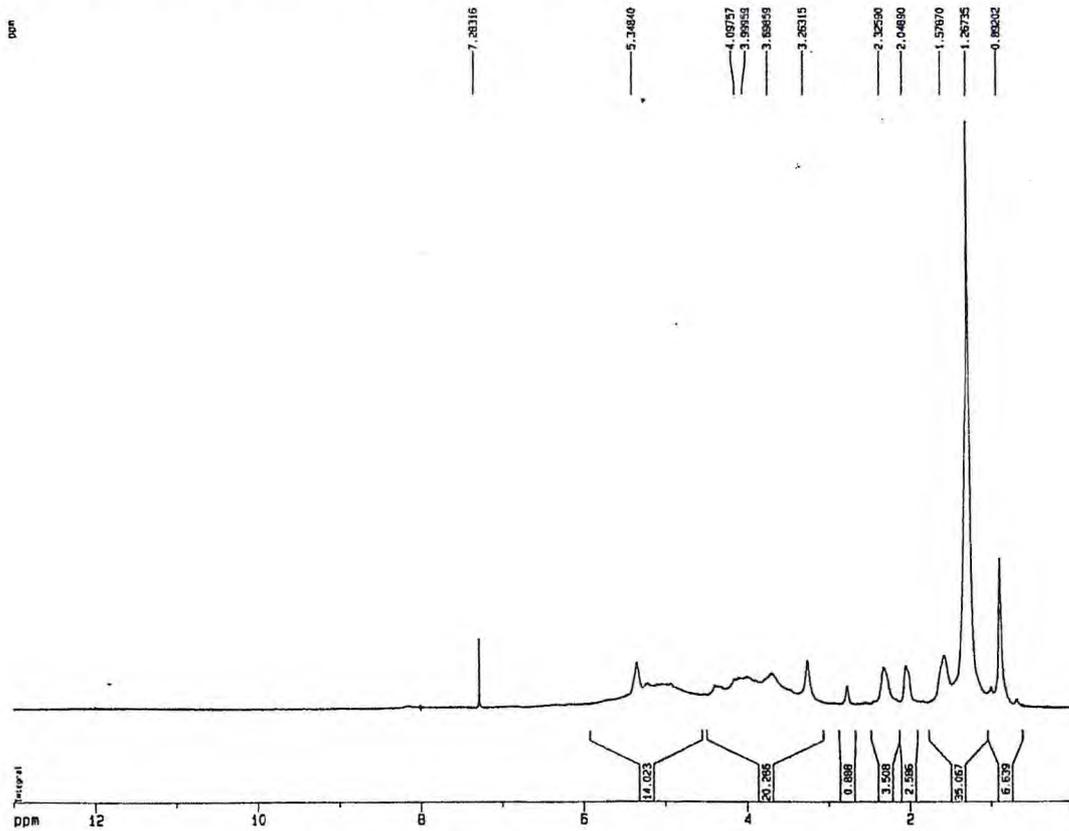


Figura 10.56 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 18 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

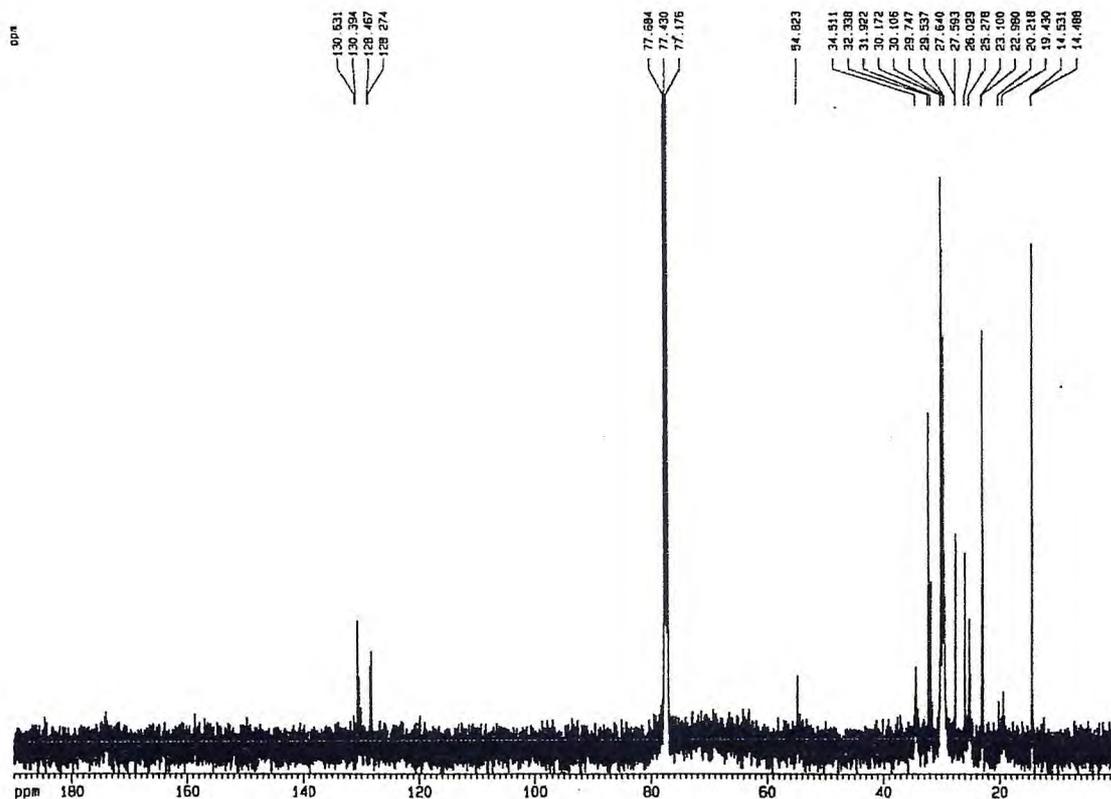


Figura 10.57 - Espectro de RMN ¹³C-BB de Lipo 18 [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

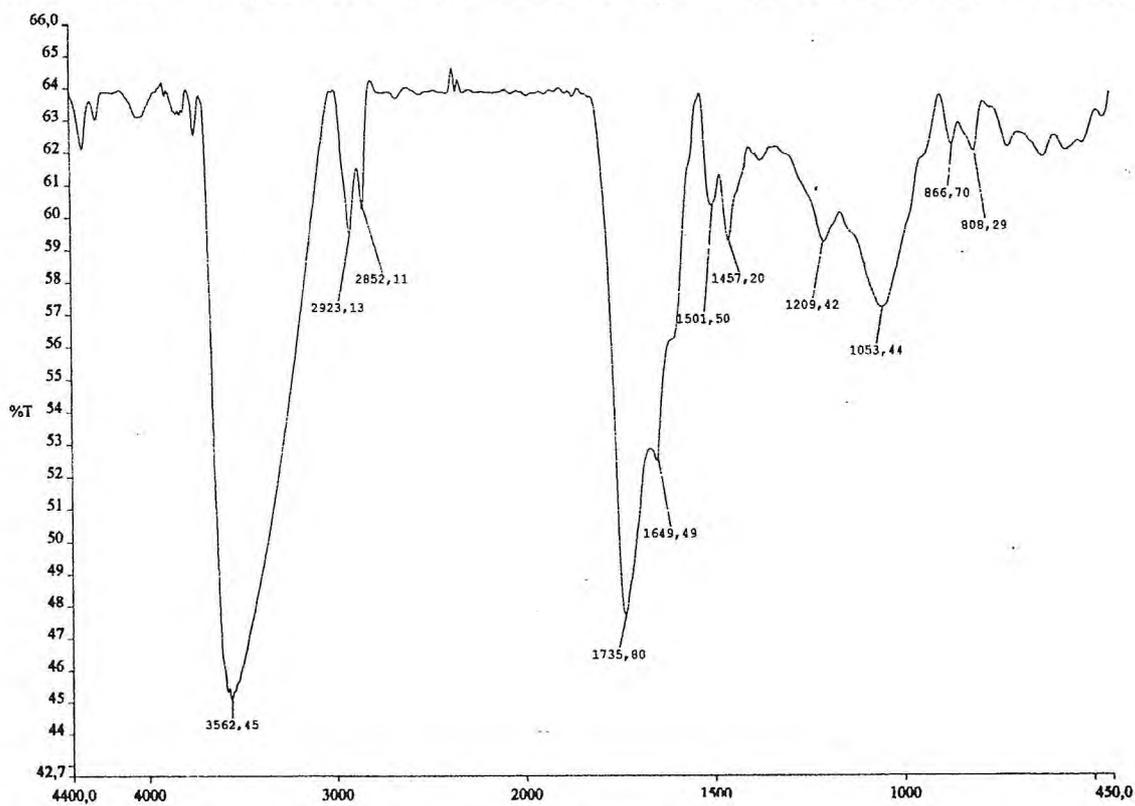


Figura 10.58 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 18

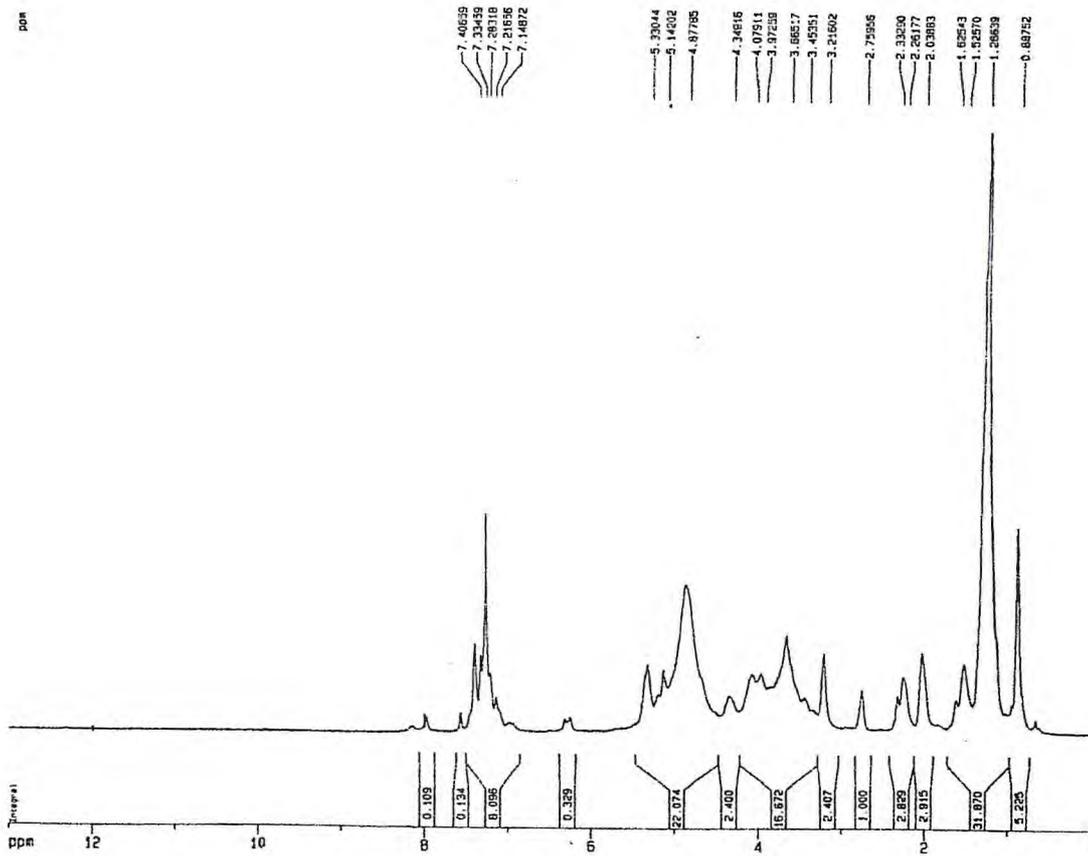


Figura 10.59 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 19 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

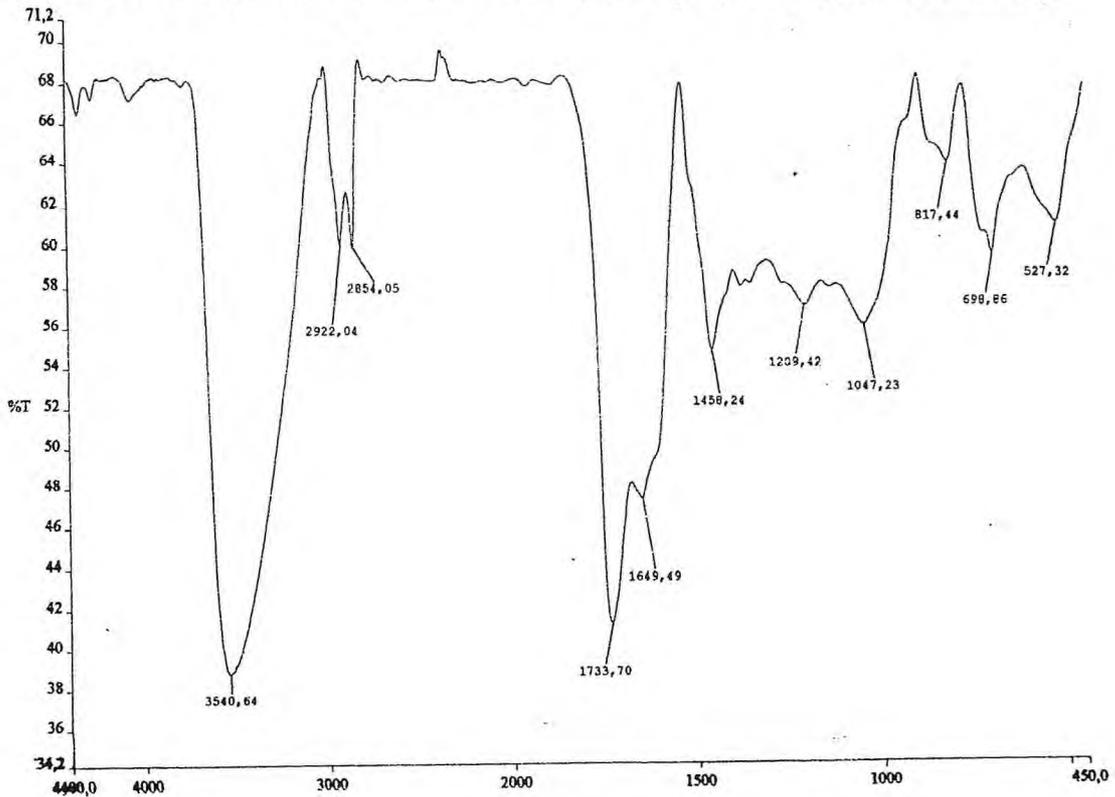


Figura 10.60 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 19

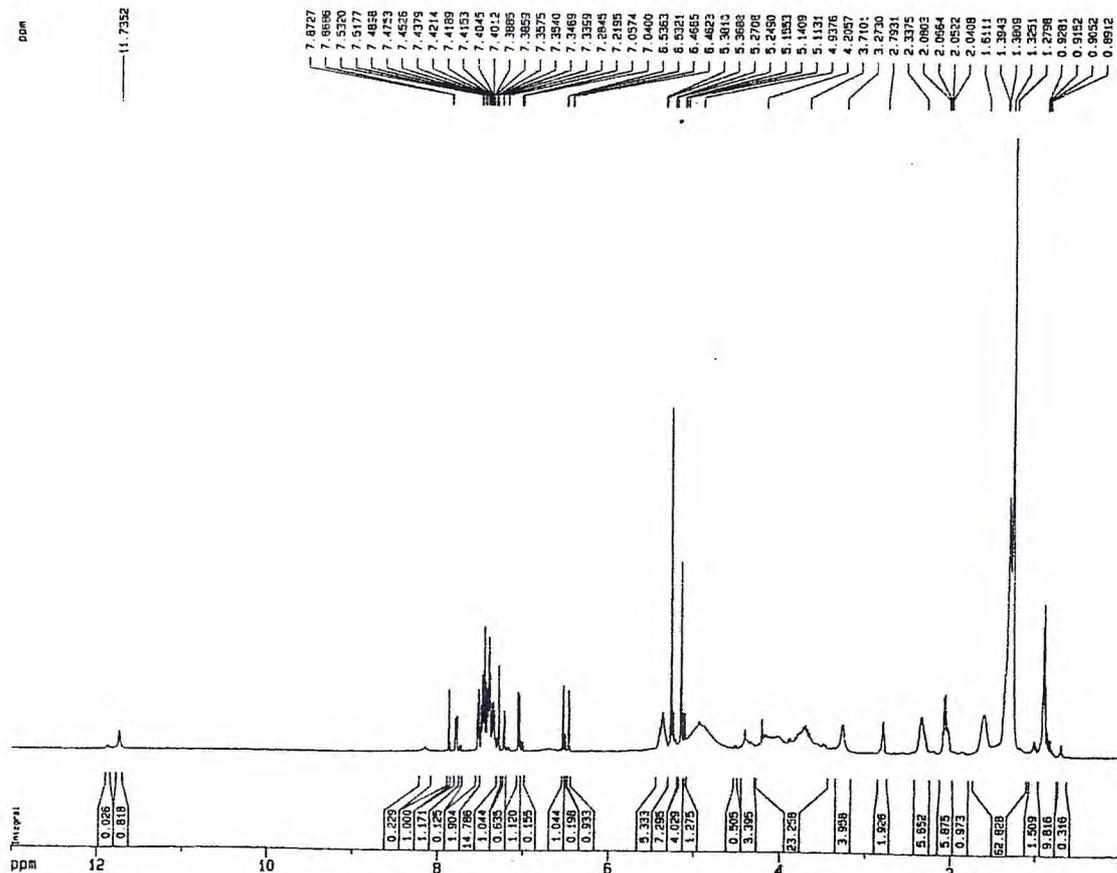


Figura 10.61 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 20 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

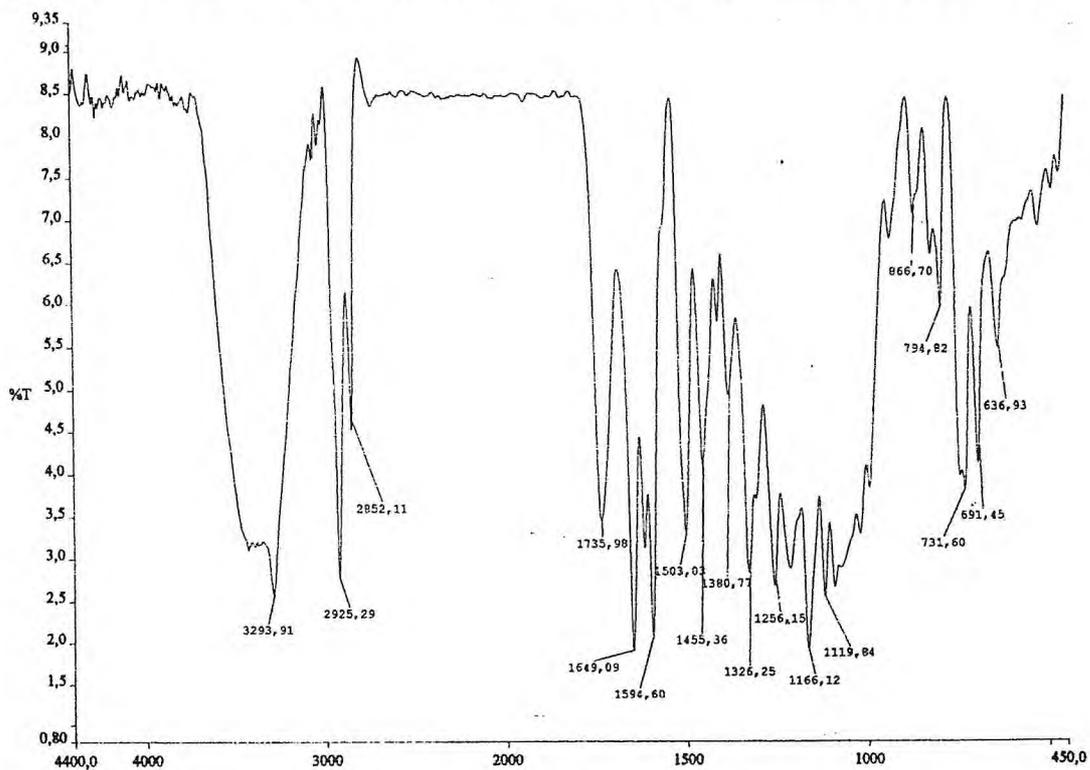


Figura 10.62 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 20

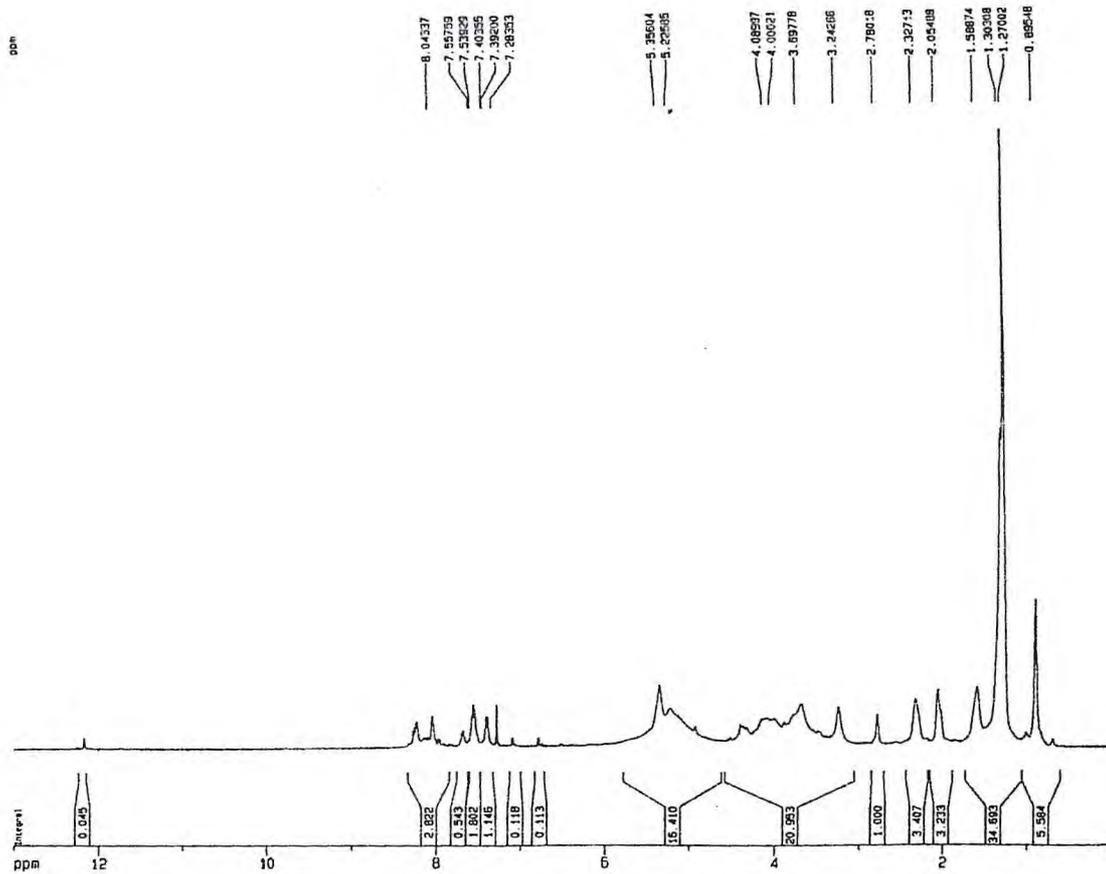


Figura 10.63 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 21 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

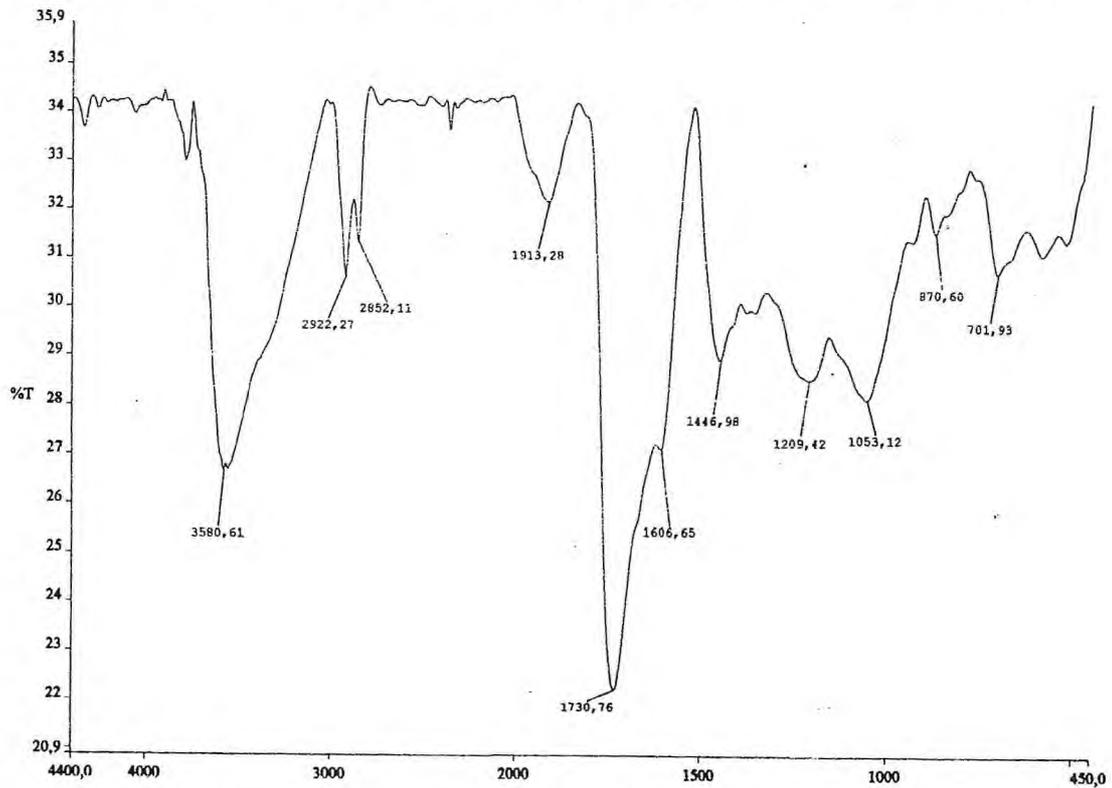


Figura 10.64 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 21

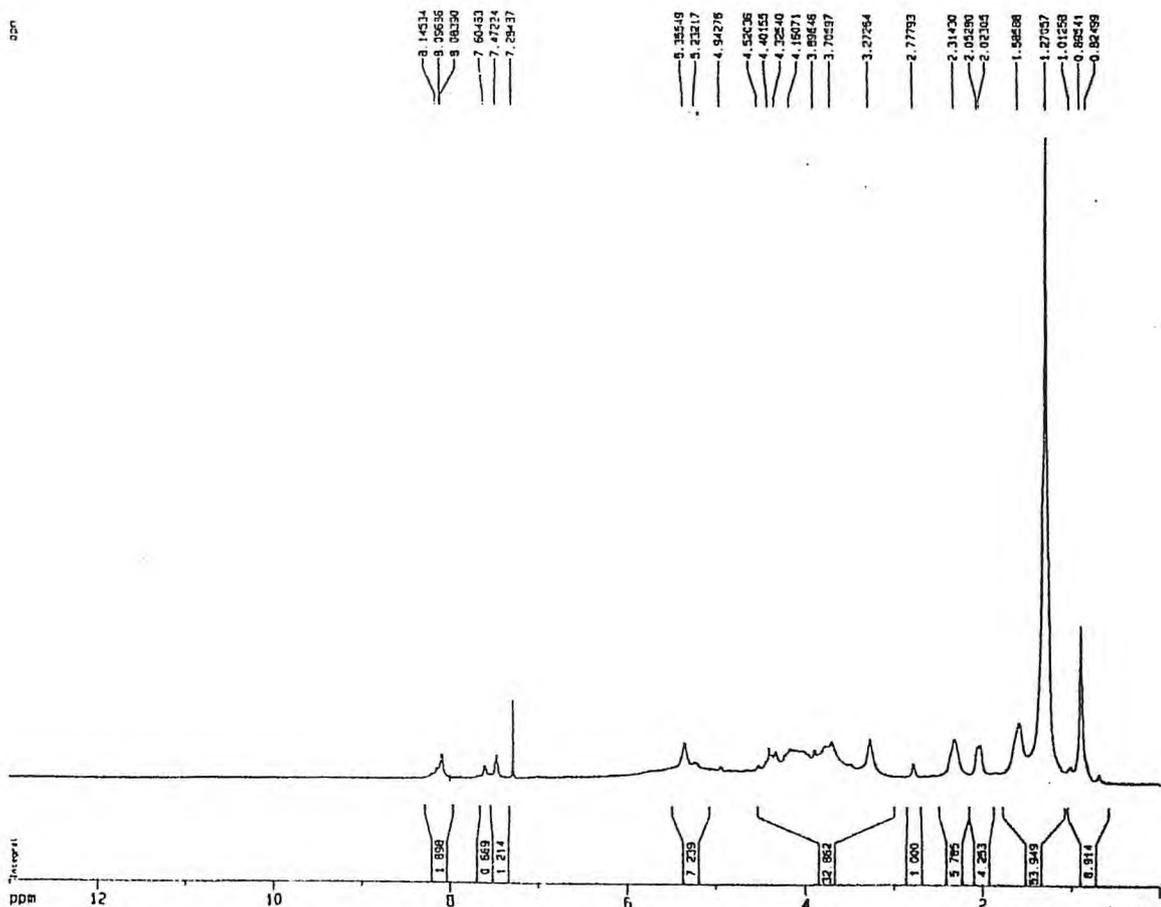


Figura 10.65 - Espectro de RMN ¹H de Lipo 22 [δ ; CDCl₃ ; 500,13 MHz]

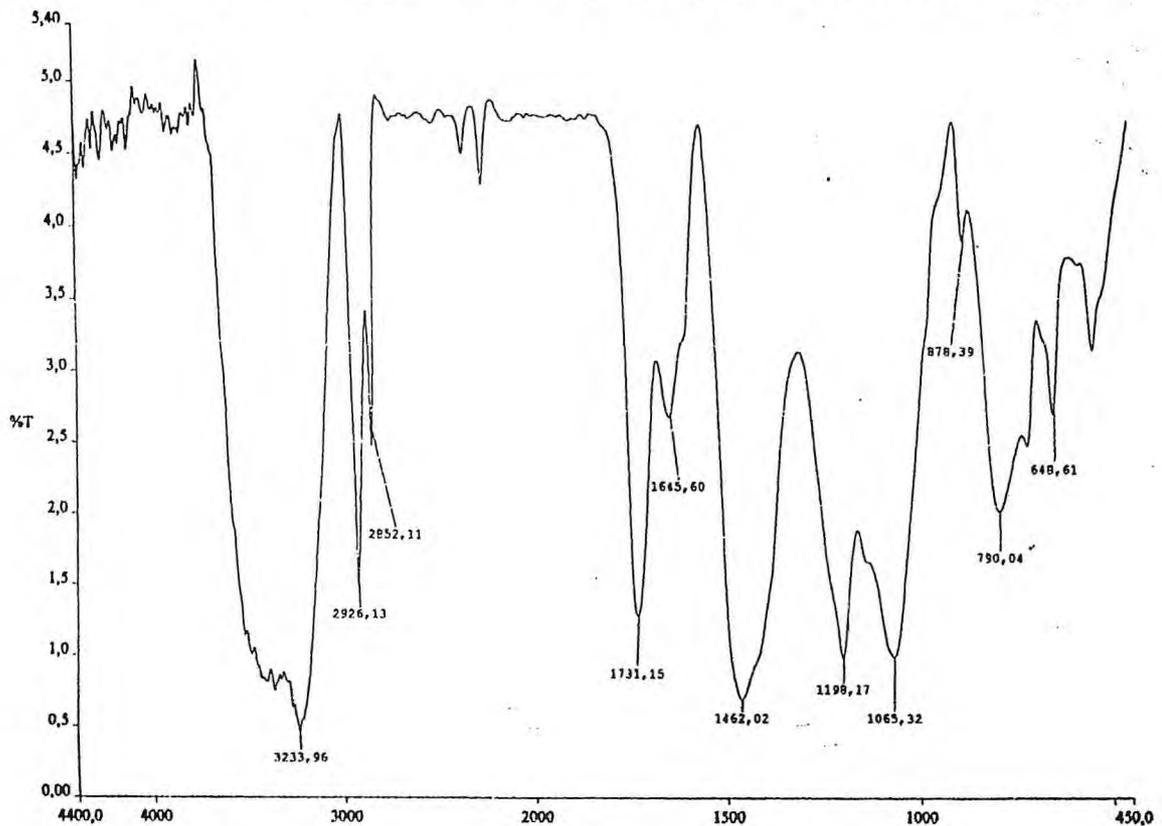


Figura 10.66 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] de Lipo 22

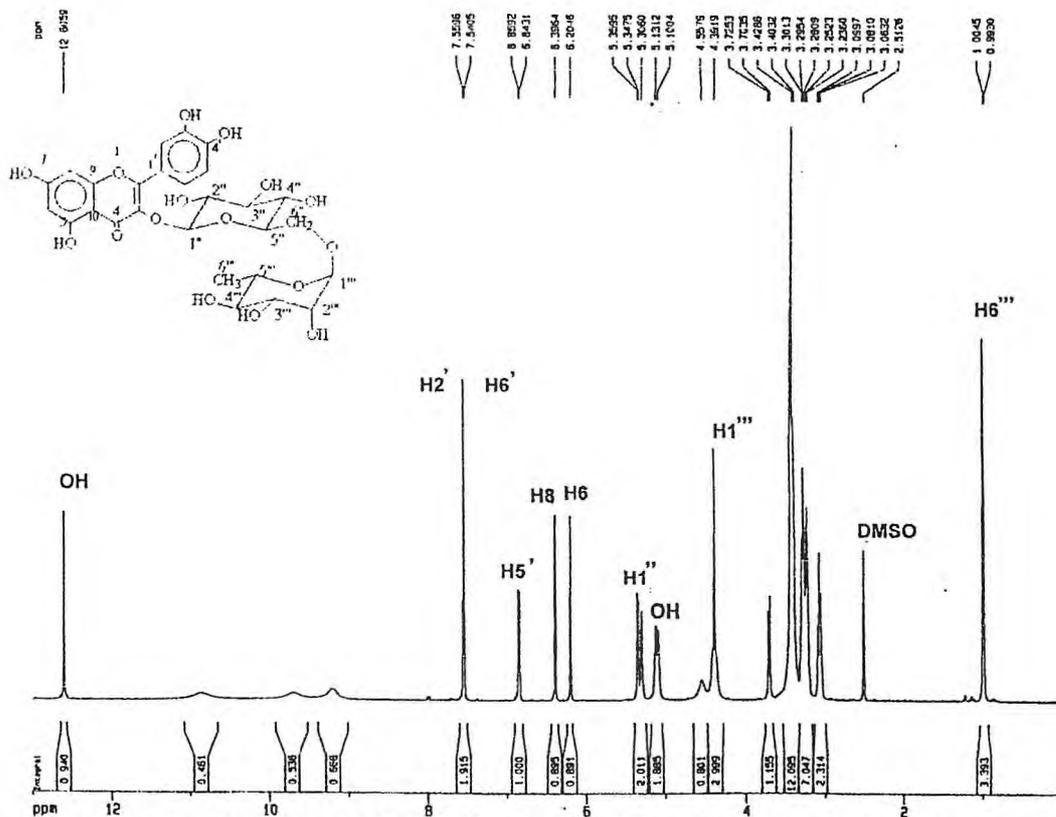


Figura 10.69 - Espectro de RMN ¹H da Rutina [δ ; DMSO ; 500,13 MHz]

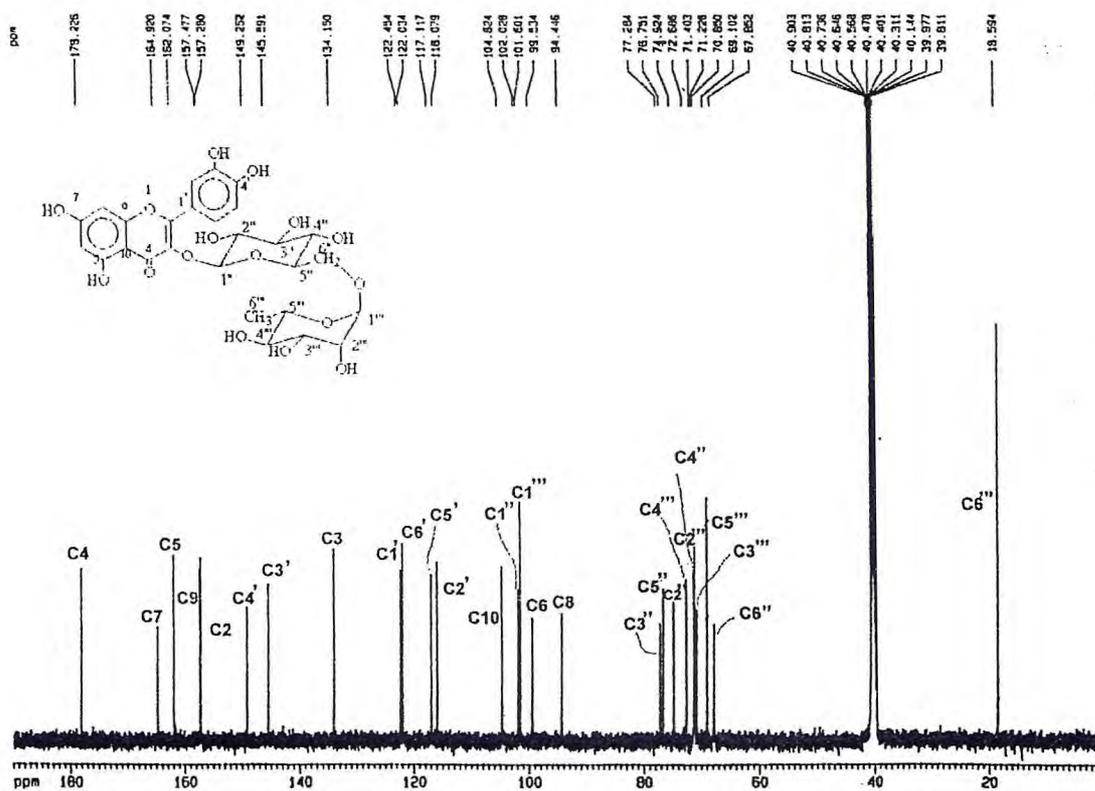


Figura 10.70 - Espectro de RMN ¹³C-BB da Rutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]

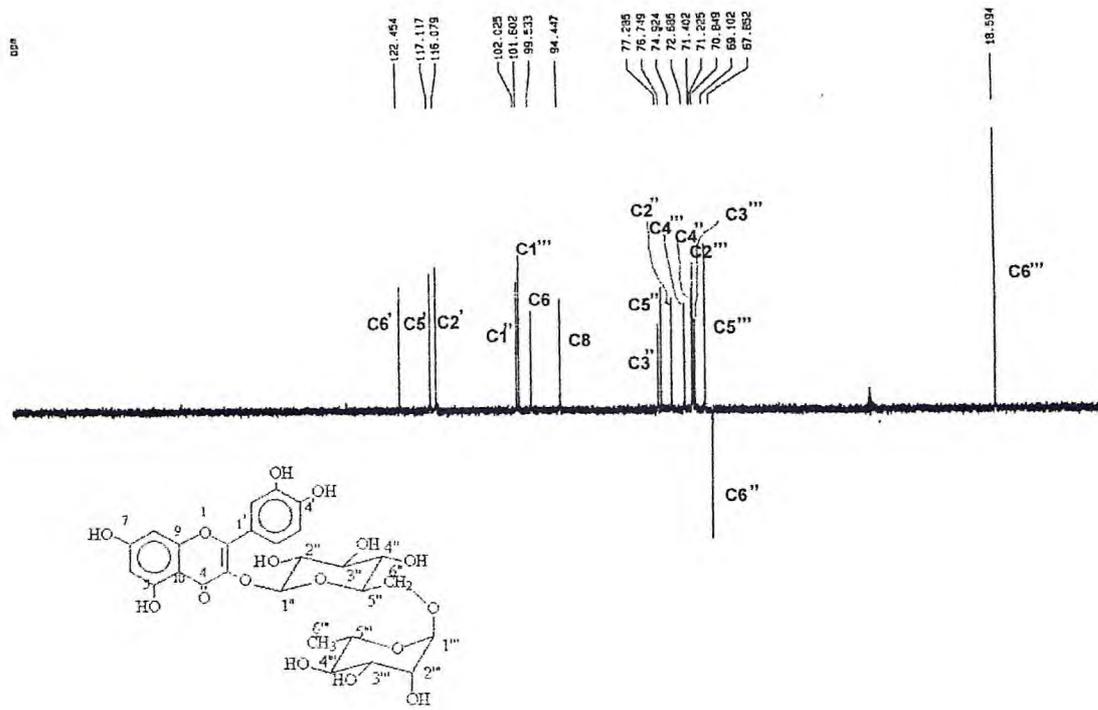


Figura 10.71 Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135°) da Rutina [δ ; DMSO; 125,77 MHz]

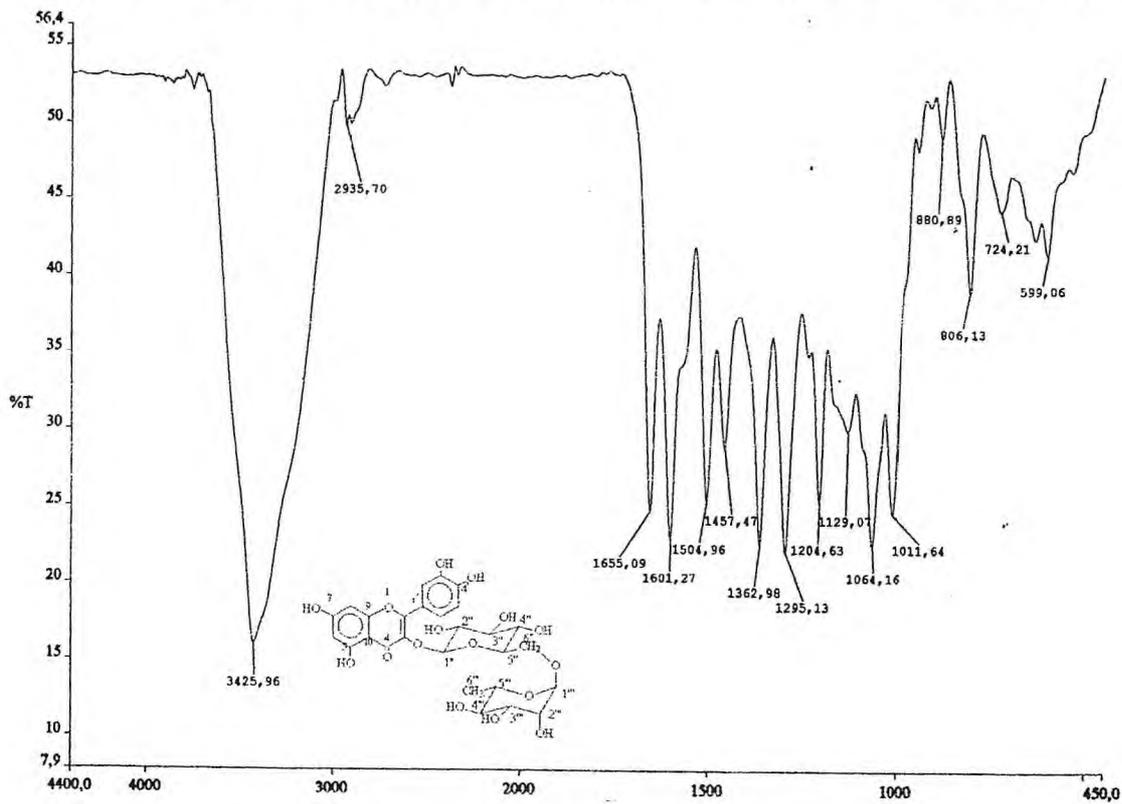


Figura 10.72 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] da Rutina

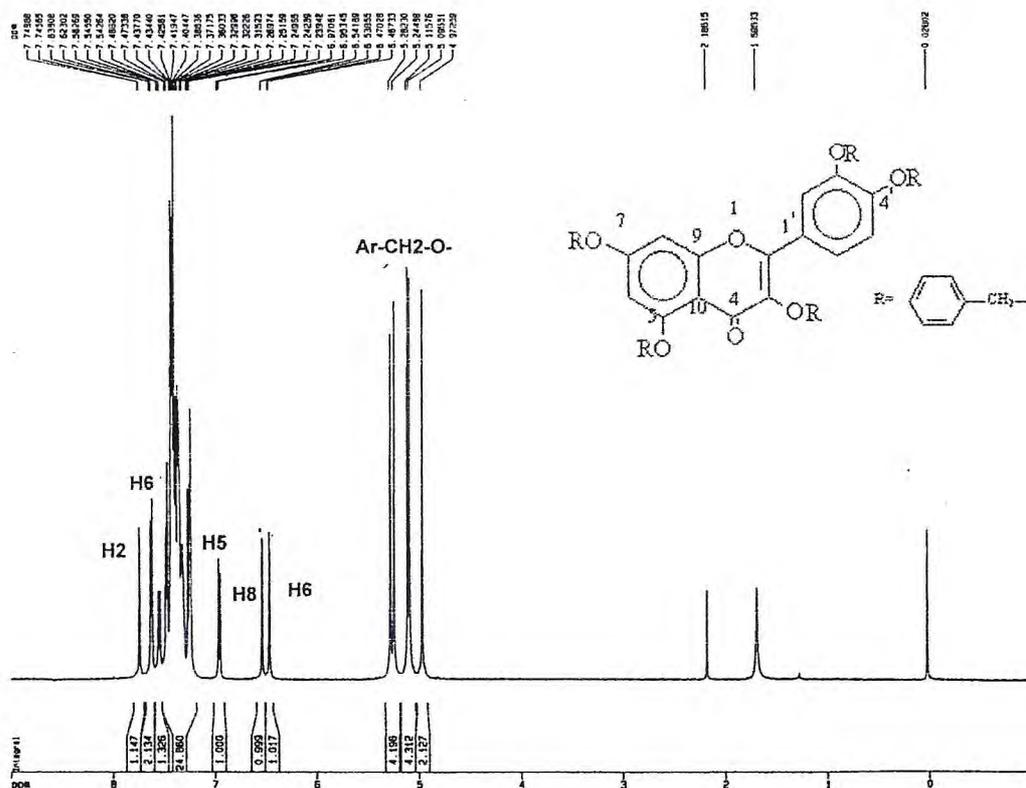


Figura 10.73 - Espectro de RMN ¹H da Quercetina Benzilada [δ ; CDCl₃; 500,13 MHz]

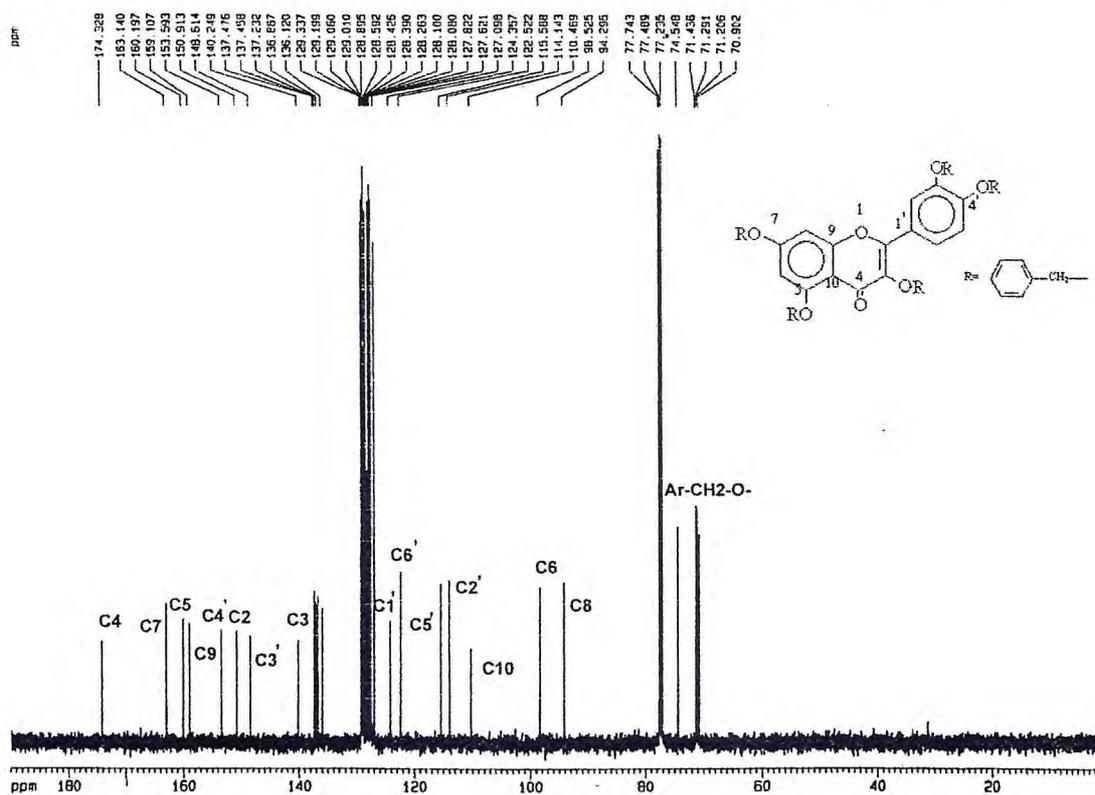


Figura 10.74 - Espectro de RMN ¹³C-BB da Quercetina Benzilada [δ ; CDCl₃ ; 125,77 MHz]

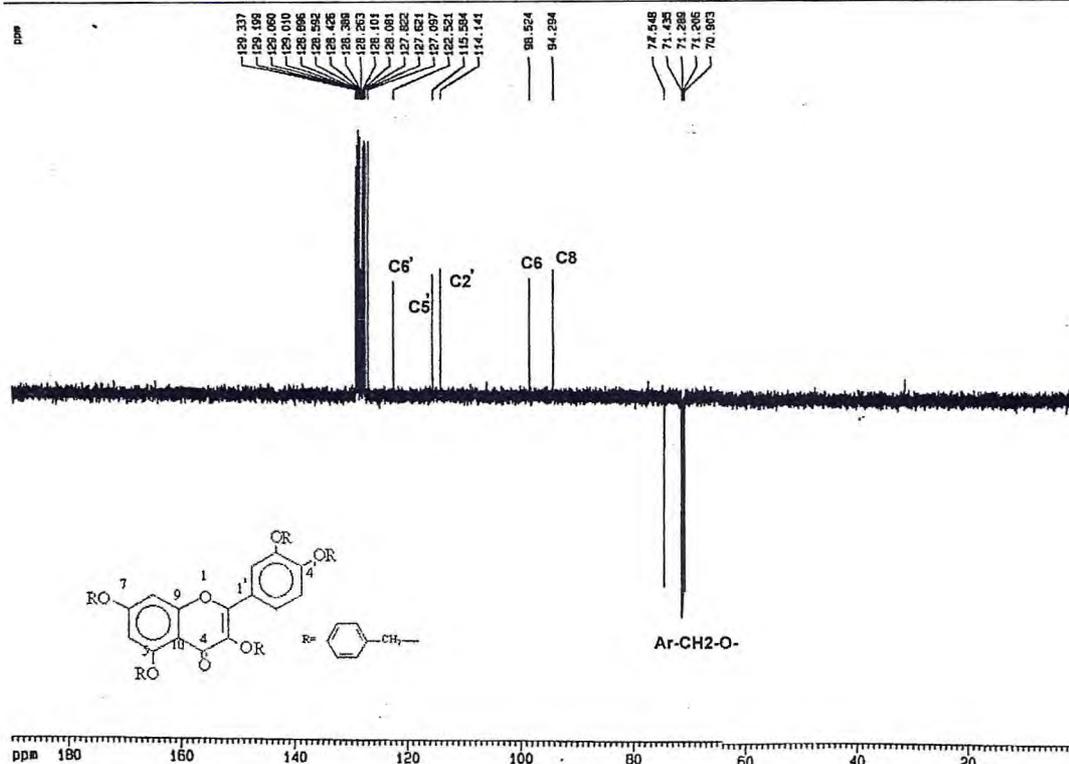


Figura 10.75 Espectro de RMN¹³C-DEPT(135°) da Quercetina Benzilada [δ ; CDCl₃; 125,77 MHz]

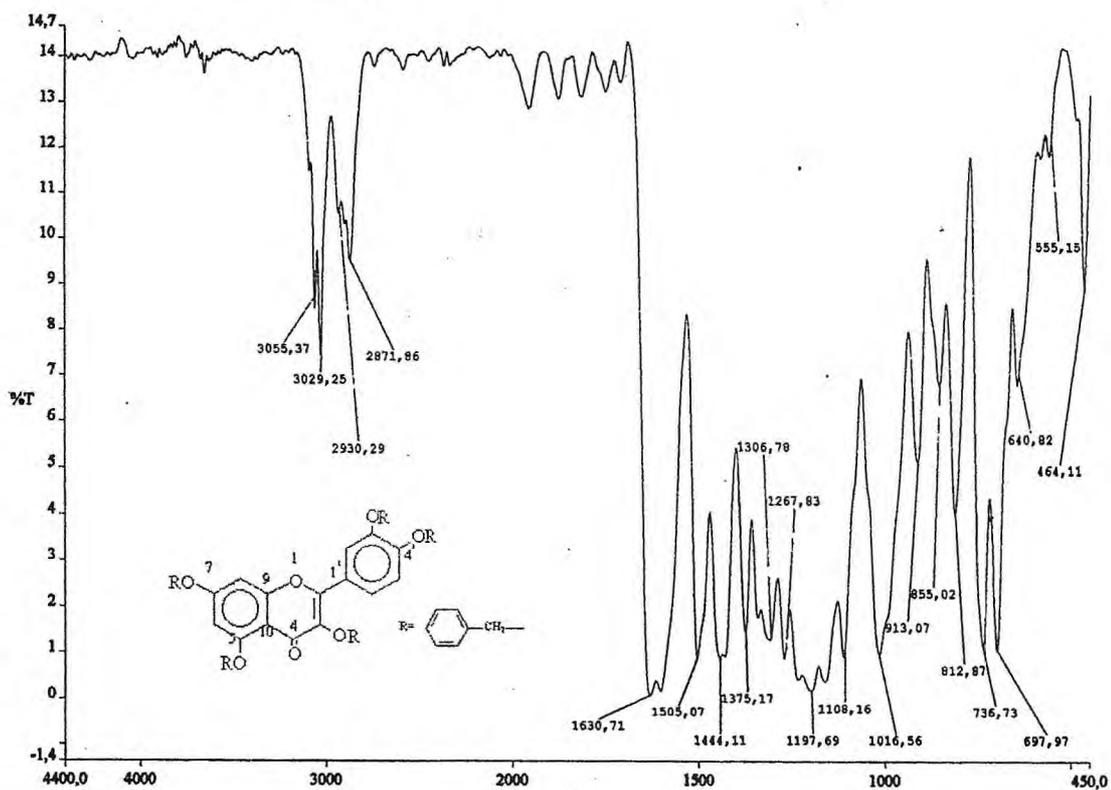


Figura 10.76 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] da Quercetina Benzilada

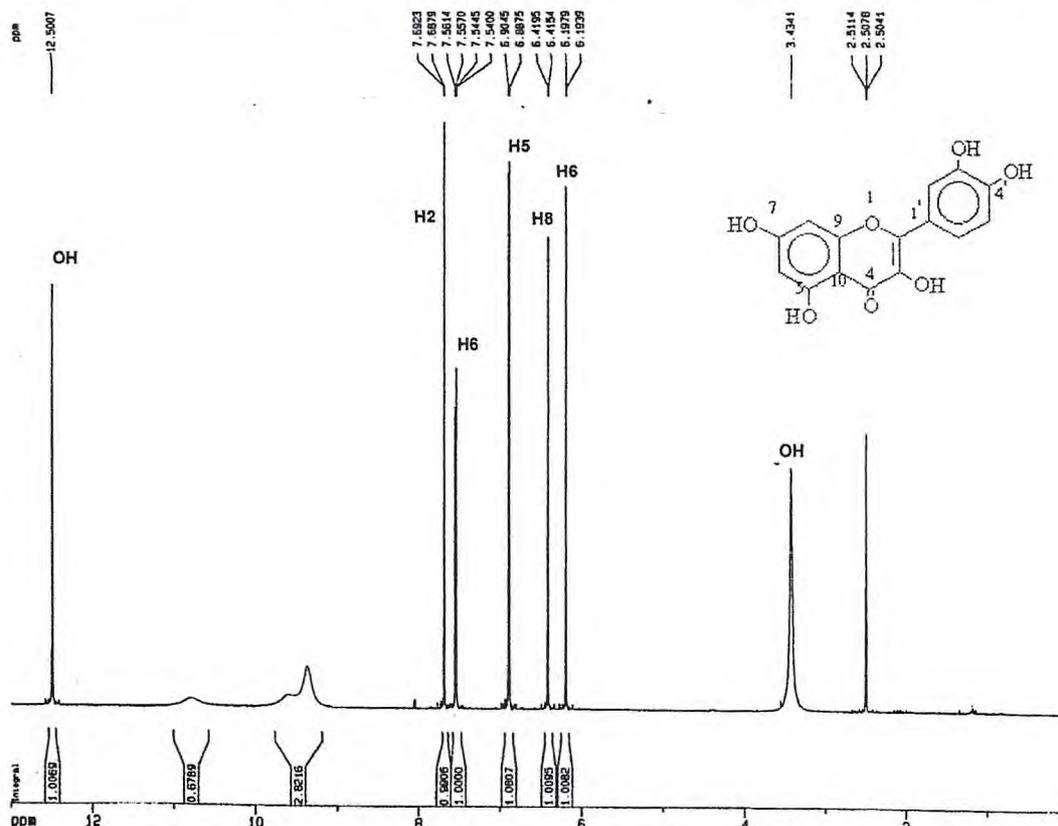


Figura 10.77 - Espectro de RMN ¹H da Quercetina [δ ; DMSO; 500,13 MHz]

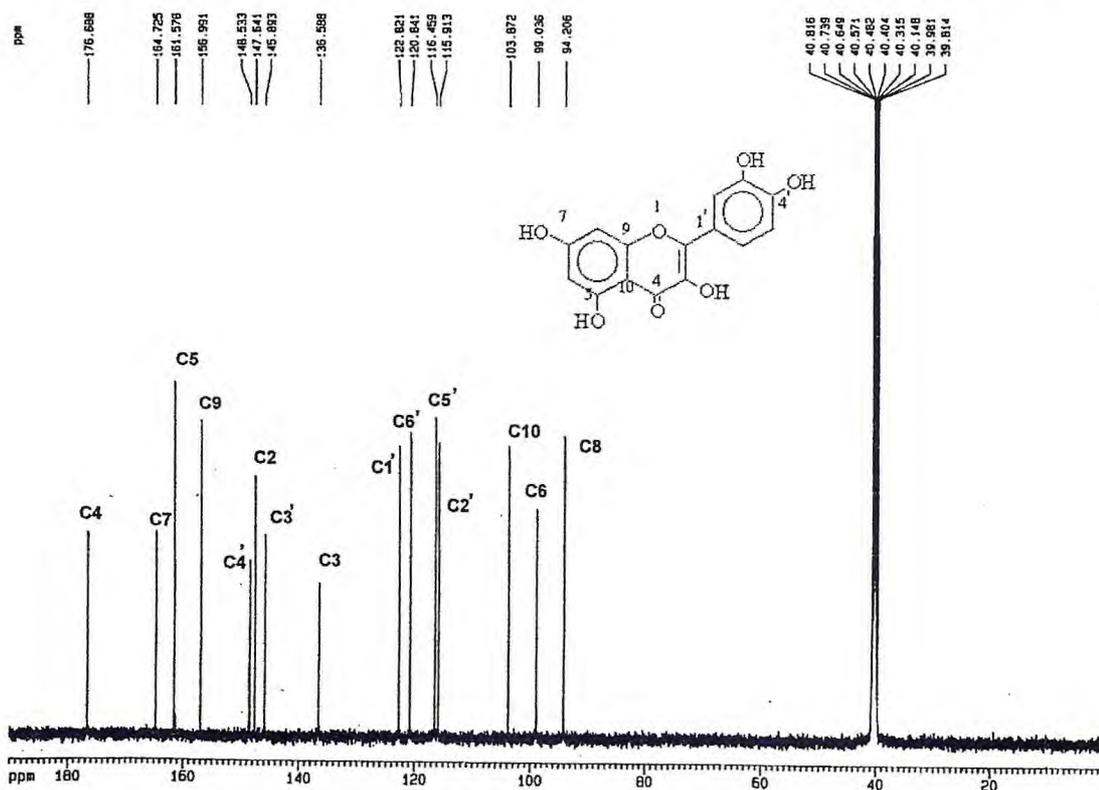


Figura 10.78 Espectro de RMN ¹³C-BB da Quercetina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]

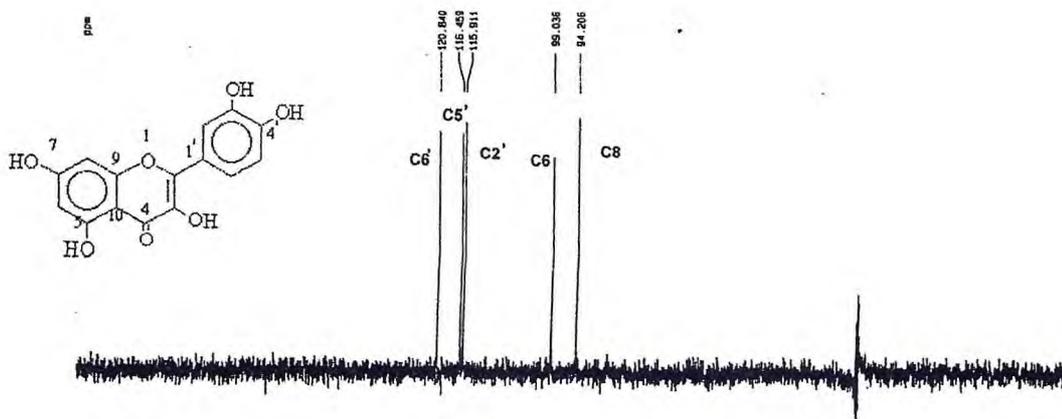


Figura 10.79 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT(135°) da Quercetina [δ ; DMSO; 125,77 MHz]

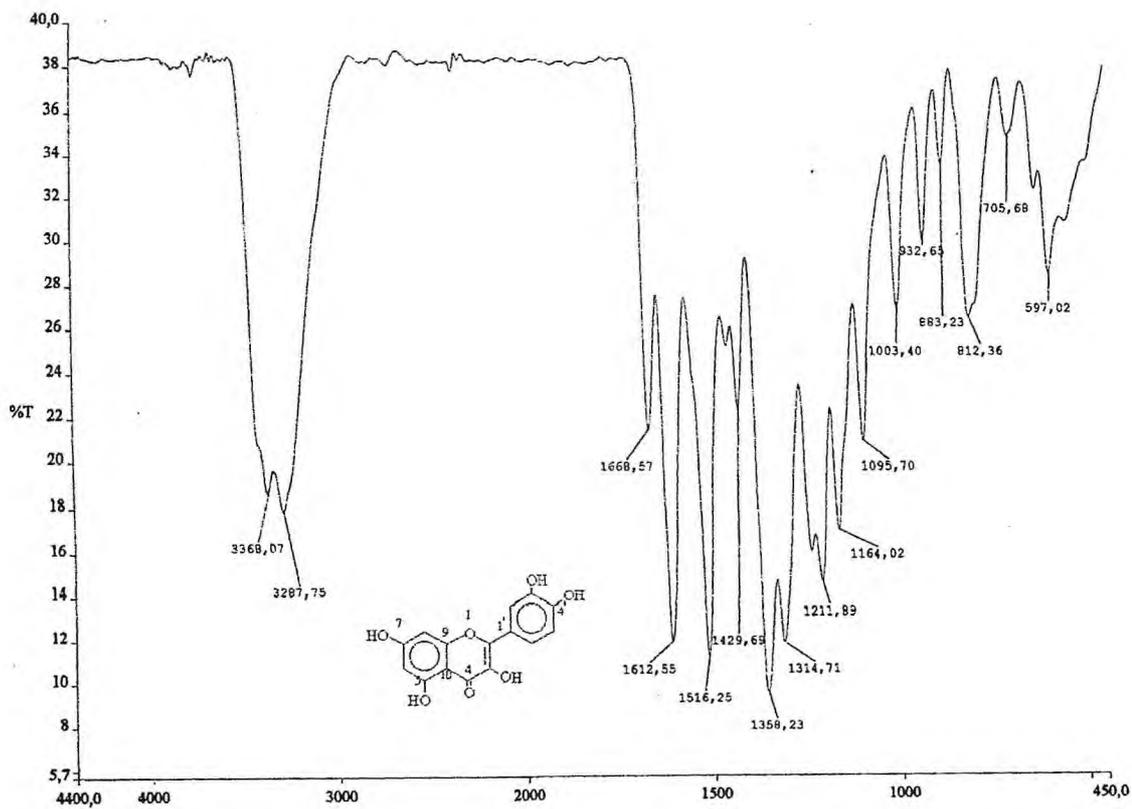


Figura 10.80 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] da Quercetina

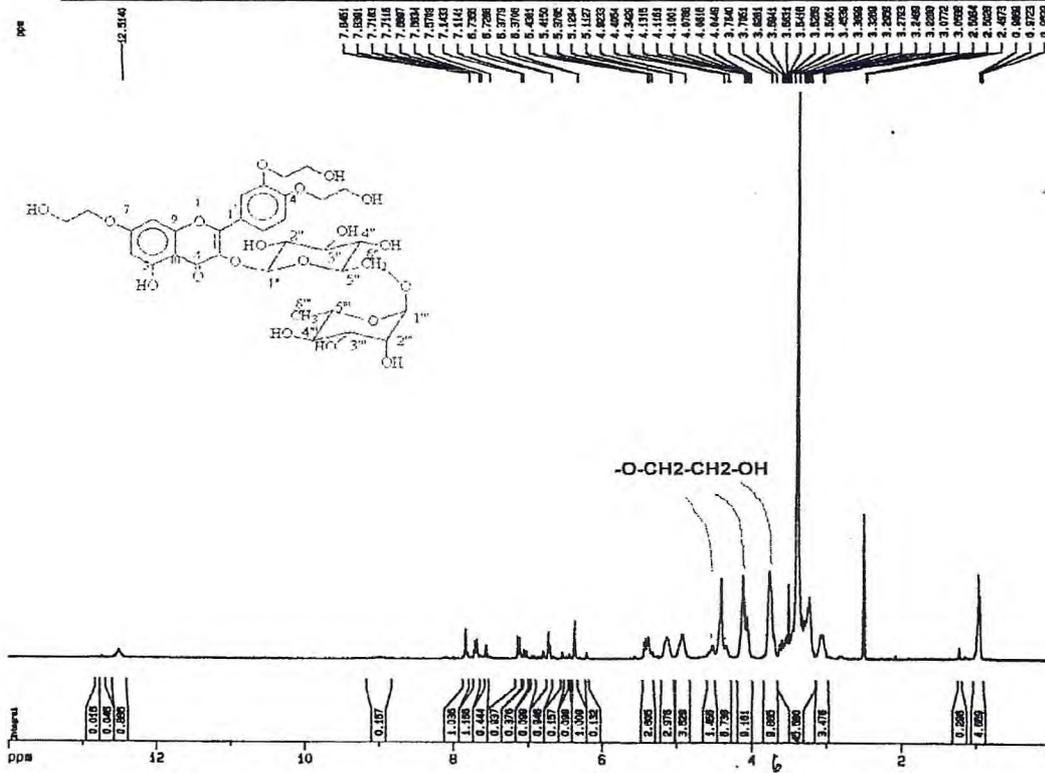


Figura 10.81 - Espectro de RMN ¹H da Trioxietilrutina [δ ; DMSO; 500,13 MHz]

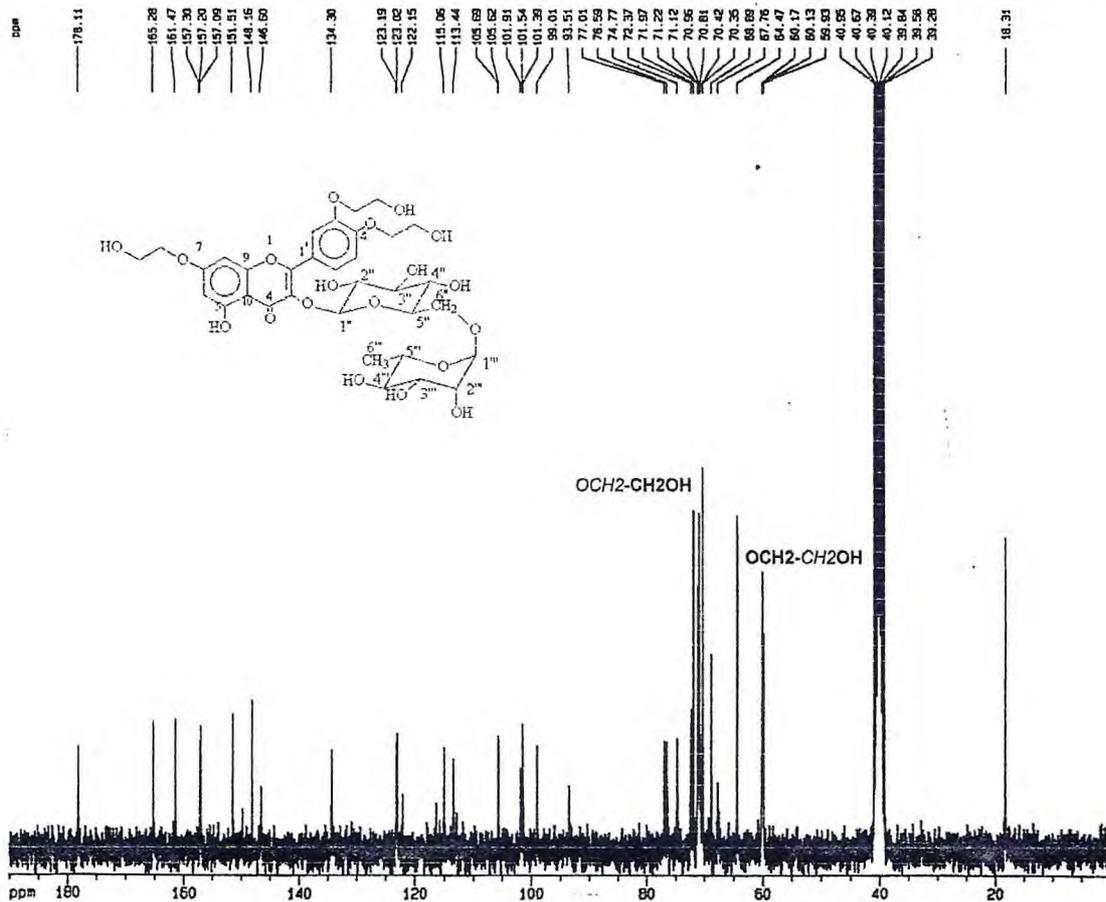


Figura 10.82 - Espectro de RMN ¹³C-BB da Trioxietilrutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]

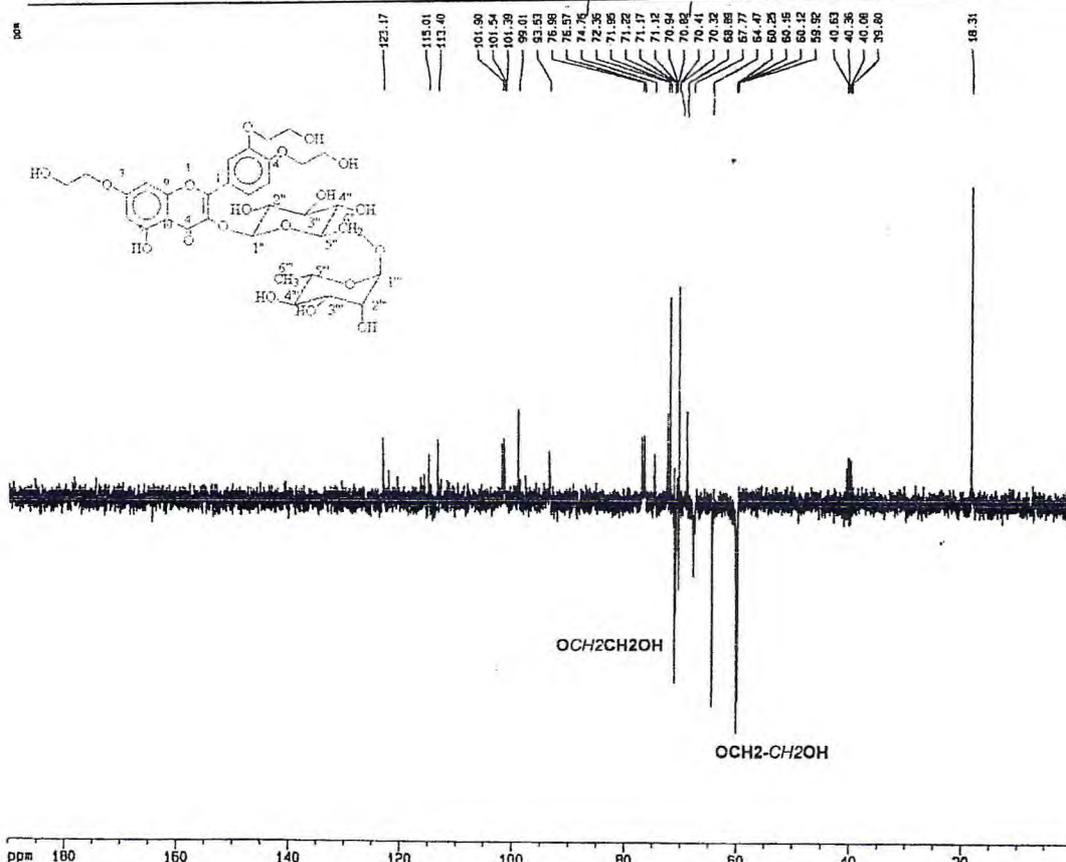


Figura 10.83 - Espectro de RMN ¹³C-DEPT(135°) da Troxirutina [δ ; DMSO; 125,77 MHz]

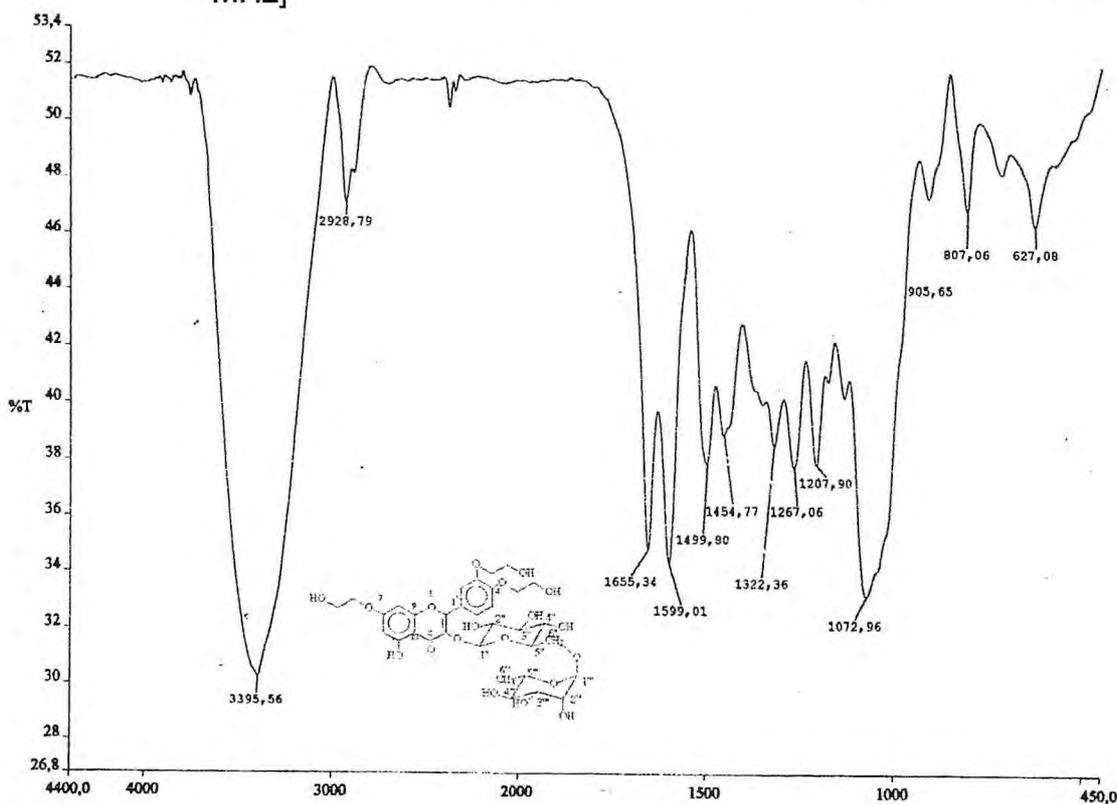


Figura 10.84 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] da Trioxietilrutina

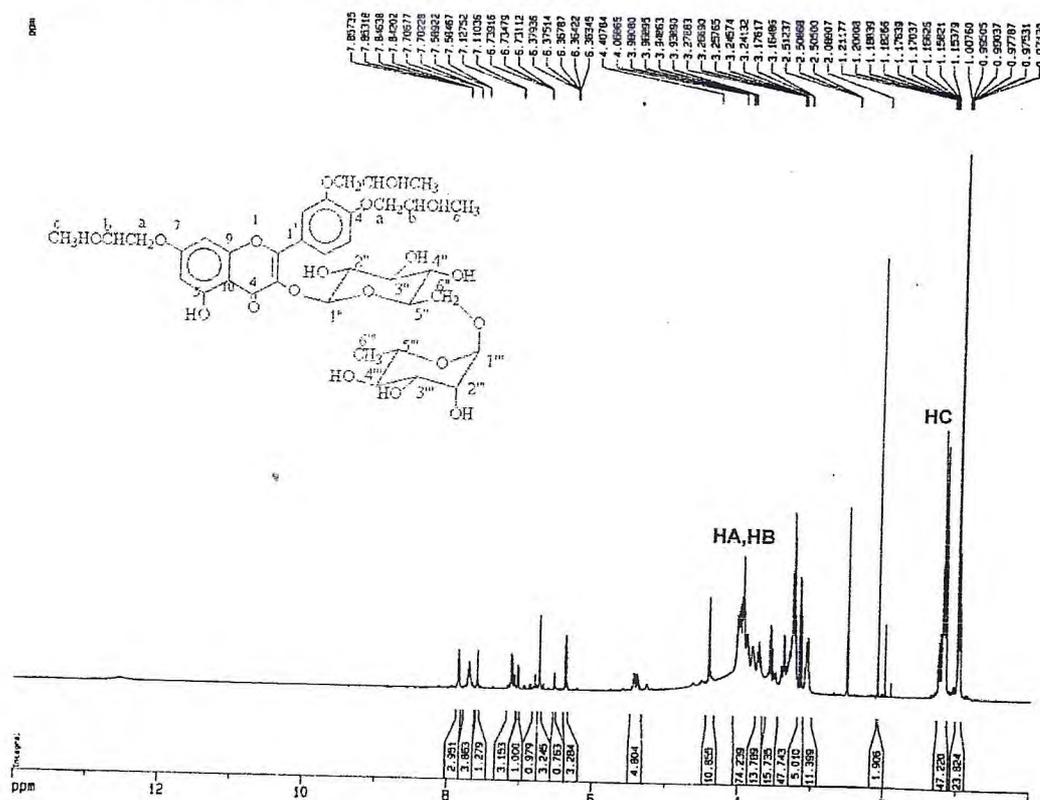


Figura 10.85 - Espectro de RMN ¹H da Trioxipropilrutina [δ ; DMSO; 500,13 MHz]

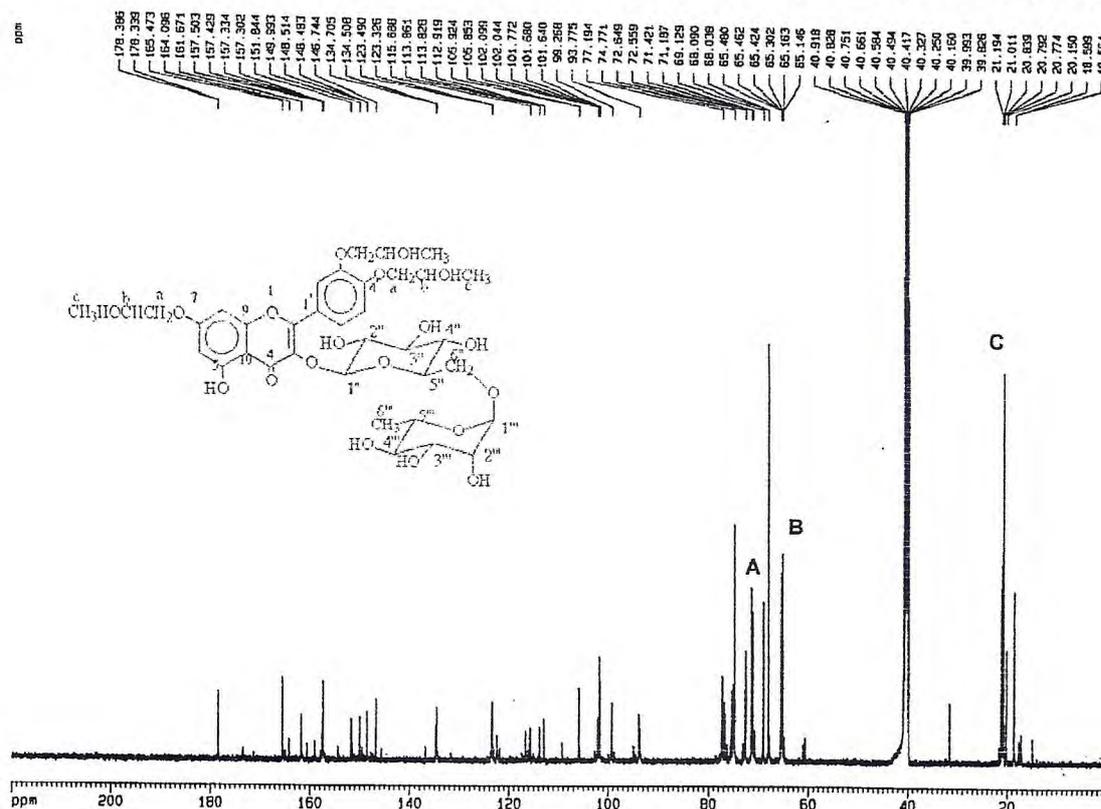


Figura 10.86 - Espectro de RMN ¹³C-BB da Trioxipropilrutina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]

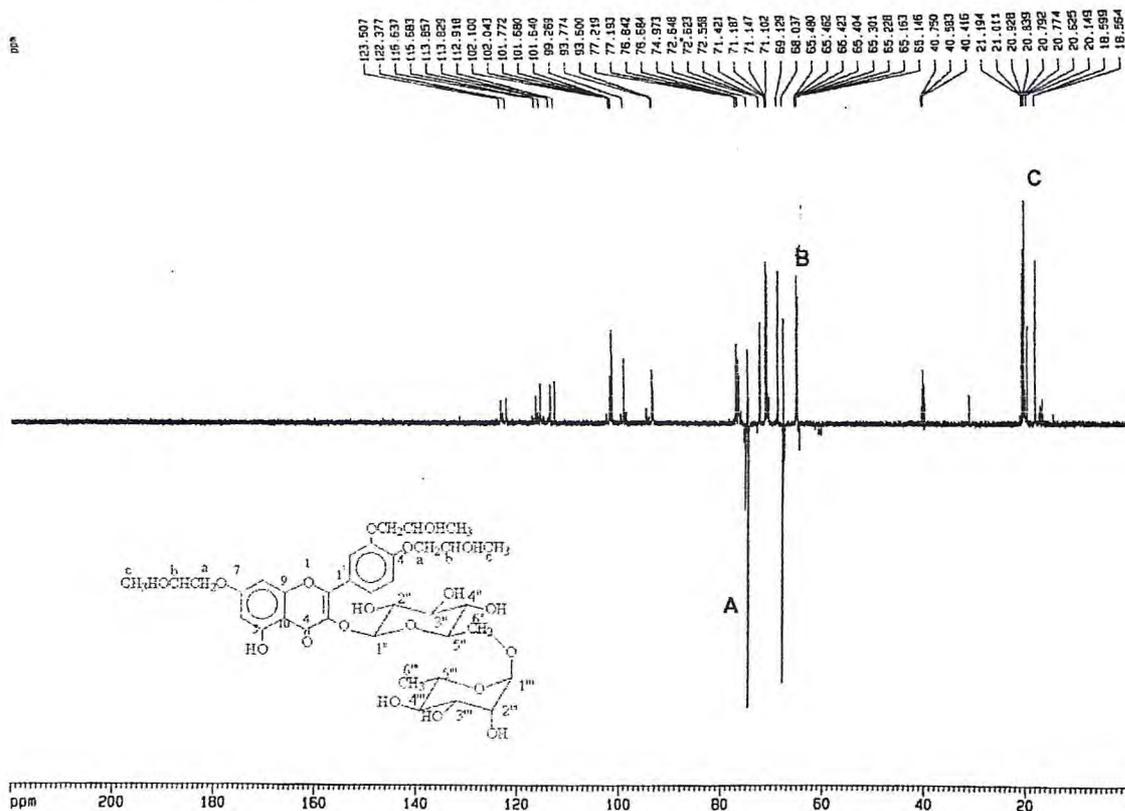


Figura 10.87 - Espectro de RMN¹³C-DEPT(135°) da Trioxipropilrutina [δ ; DMSO; 125,77 MHz]

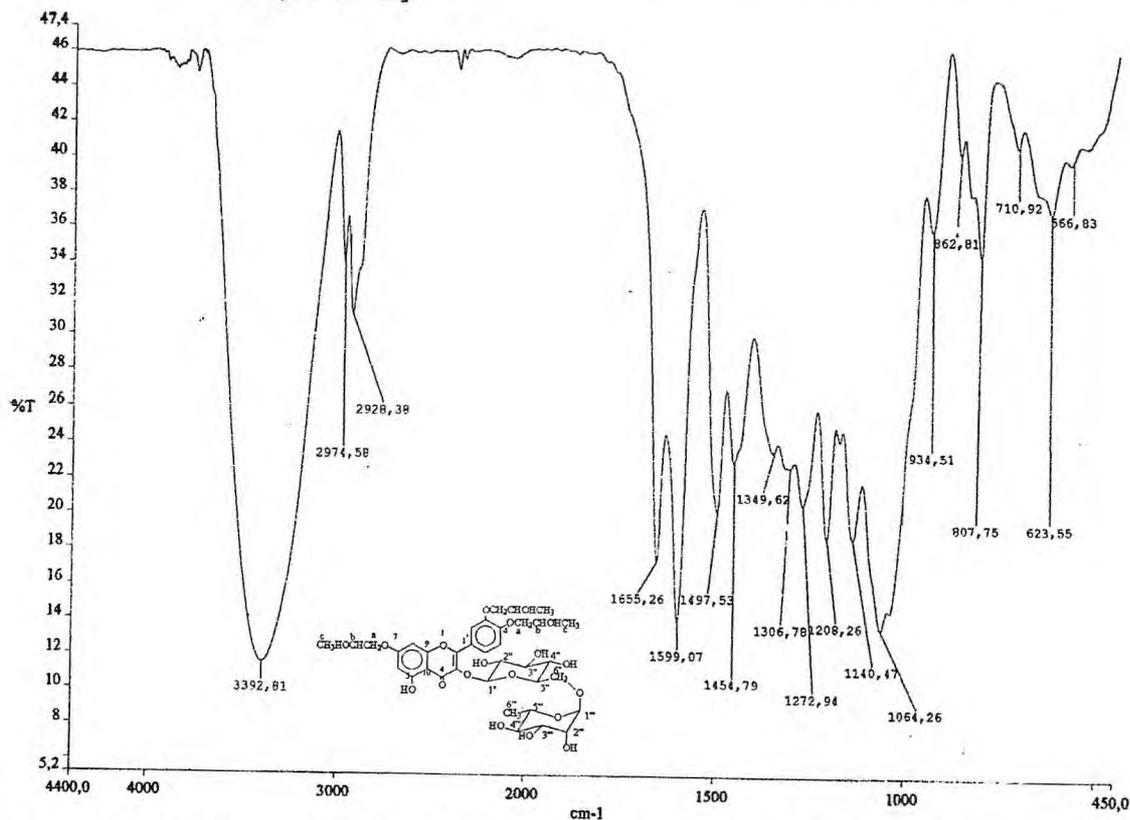


Figura 10.88 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] da trioxipropilrutina

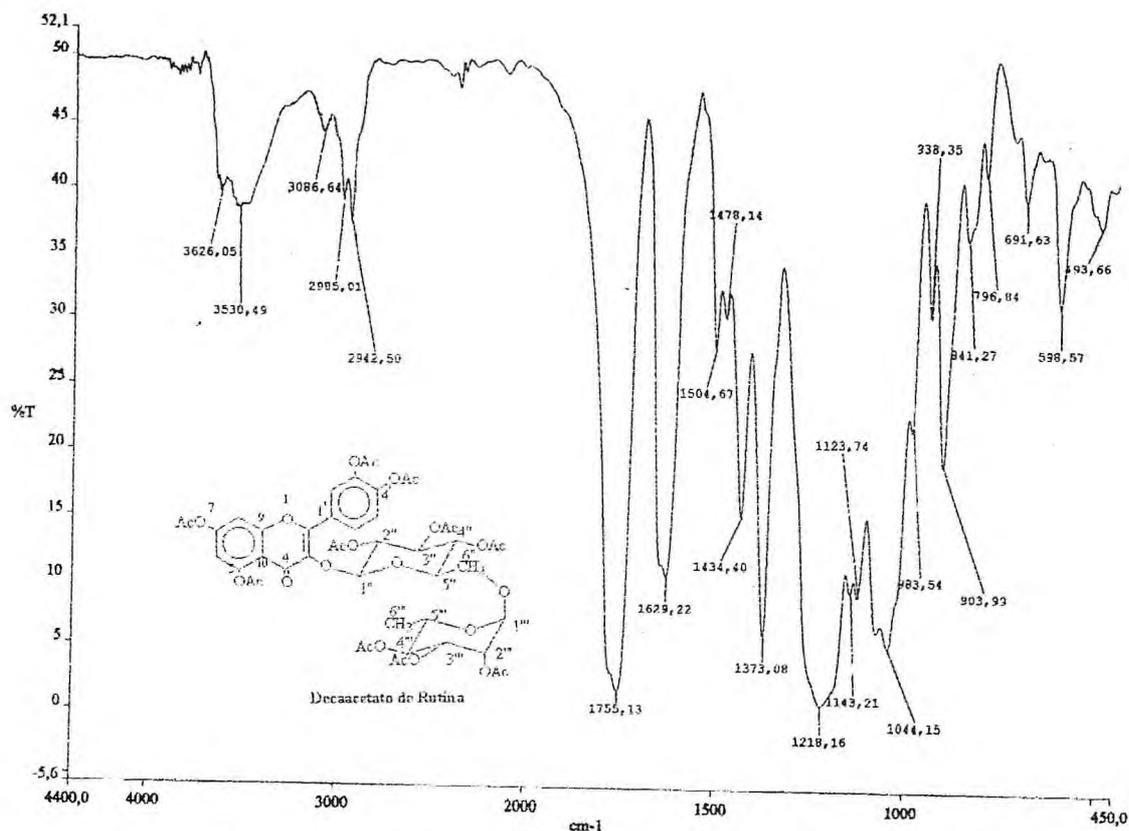


Figura 10.91 - Espectro na região do IV [cm^{-1} , KBr] do Decaacetato de Rutina

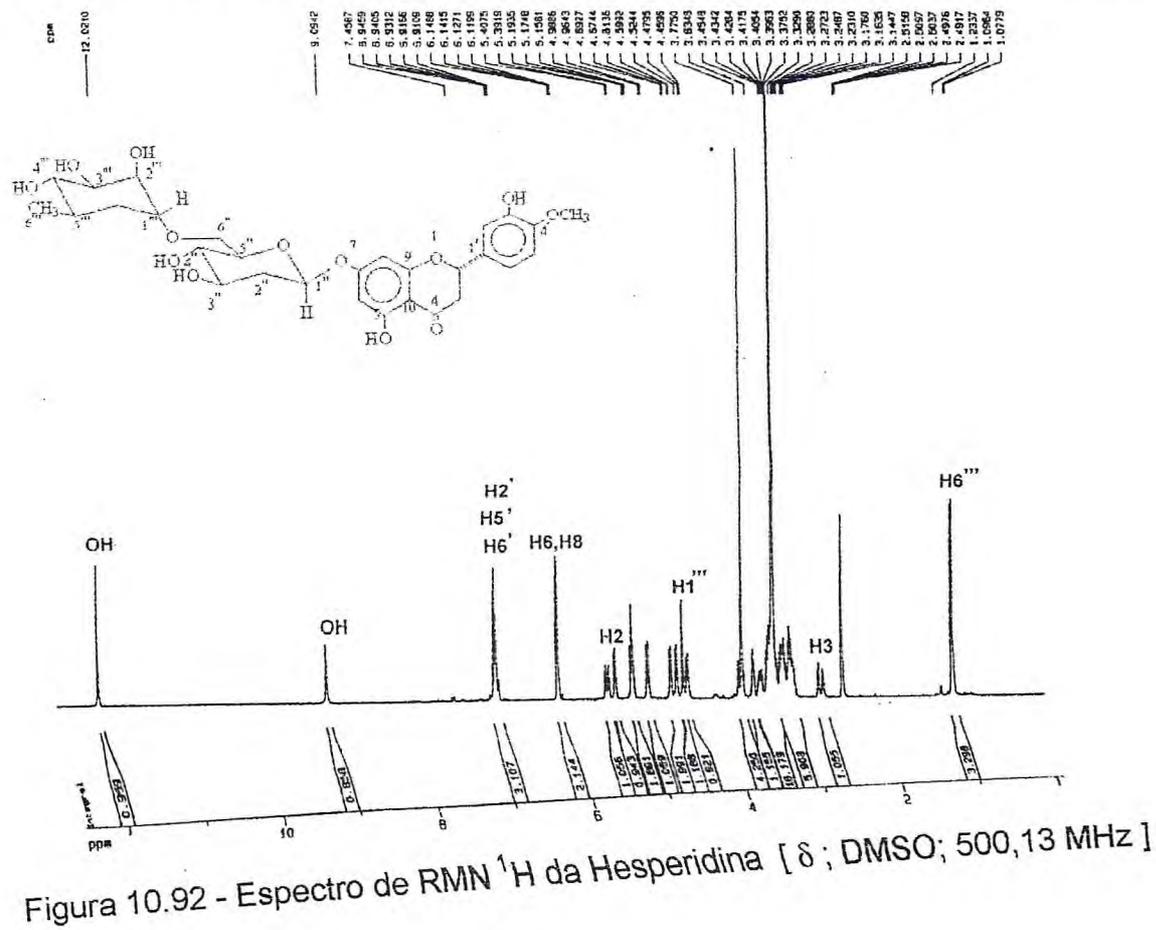


Figura 10.92 - Espectro de RMN ^1H da Hesperidina [δ ; DMSO; 500,13 MHz]

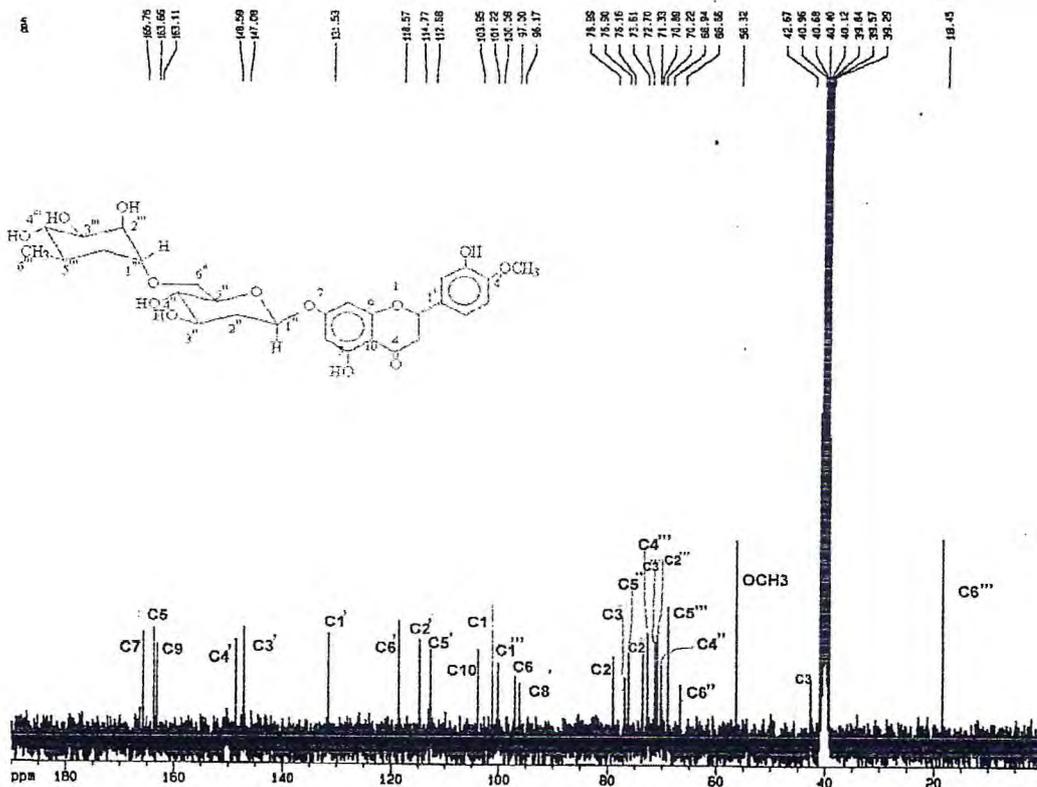


Figura 10.93 - Espectro de RMN ¹³C-BB da Hesperidina [δ ; DMSO ; 125,77 MHz]

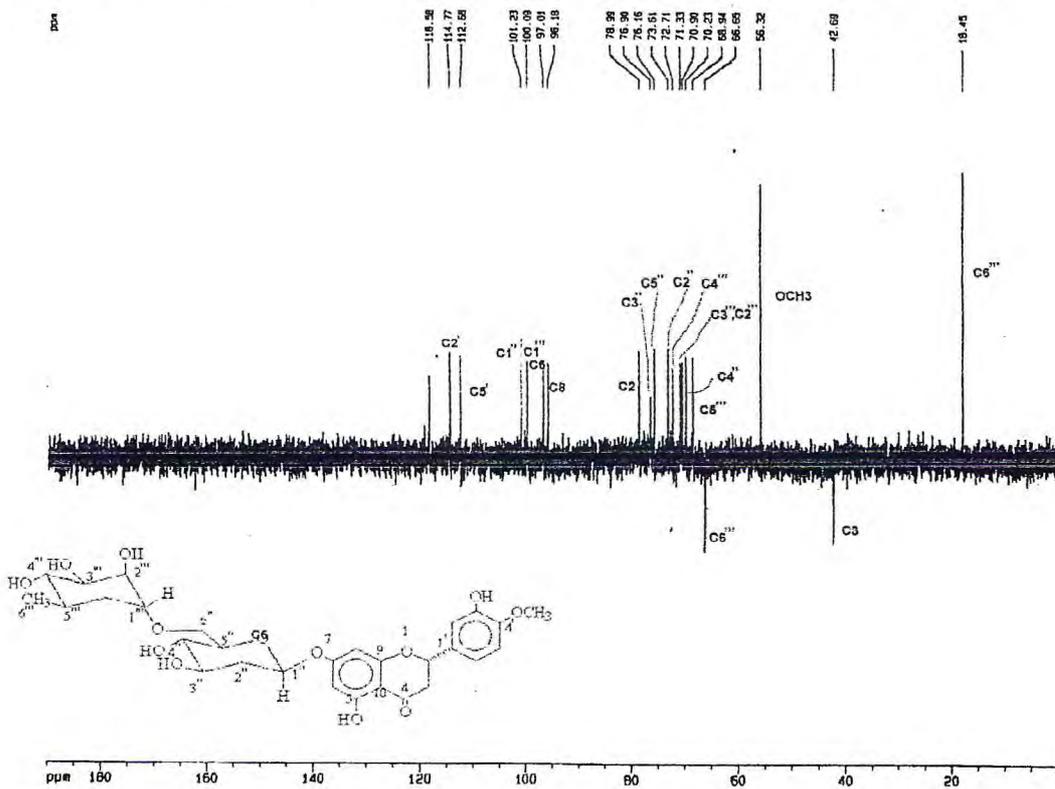


Figura 10.94 - Espectro de RMN¹³C-DEPT(135°) da Hesperidina [δ ; DMSO; 125,77 MHz]

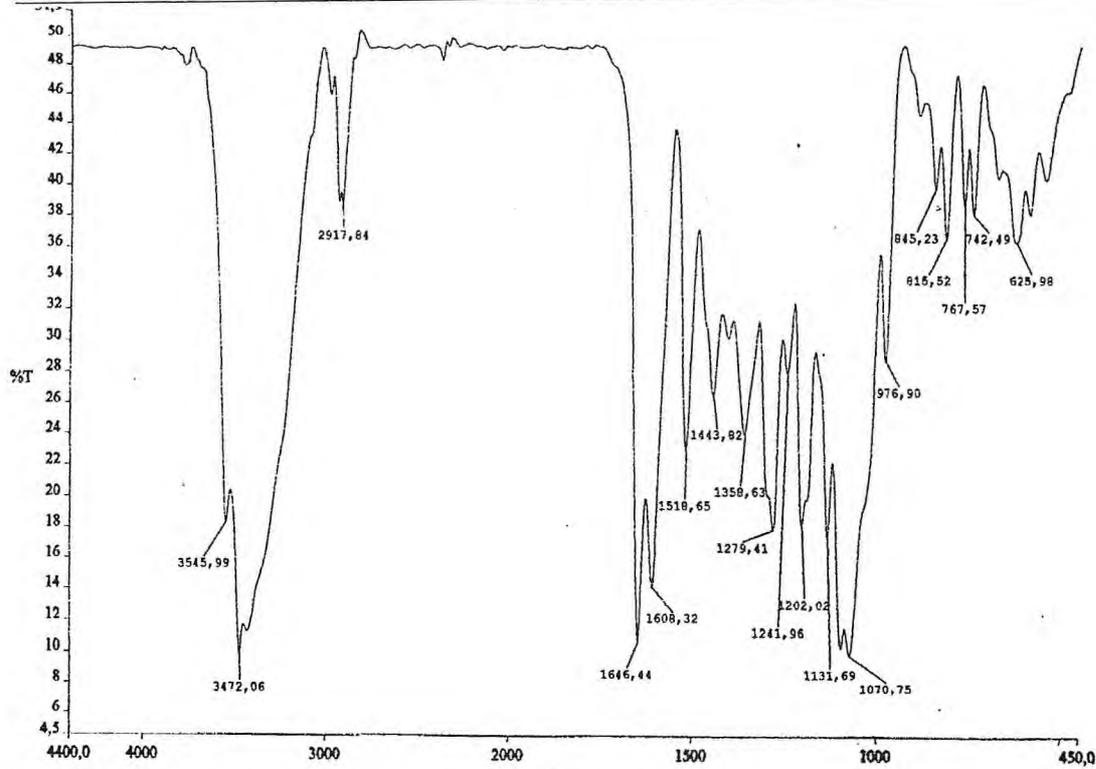


Figura 10.95 - Espectro na região do IV [cm⁻¹, KBr] da Hespridina

Anexo I- Revisão de métodos de extração de galactomananas de várias matérias primas.

Anexo I- Revisão de métodos de extração de galactomananas de várias matérias primas.

A goma guar é o produto obtido pela moagem e peneiramento da mucilagem encontrada na semente da planta *leguminosa Cyamopsis tetragonoloba*. A sementes de guar é composta de um par de endosperma conhecido como "guar splits", além do germe e da casca. O endosperma contém 78-82% de galactomanana e pequena quantidade de proteína, sais inorgânicos, gomas insolúveis, membranas celulares, como também resíduos de casca e germen. Ele é duro e extremamente difícil de moer. Apesar disto muitos processos de extração e moagem úmida tem sido sugeridos[RUTENBERG e MOLNAR, 1981] para separar o polissacarídeo dos " Splits " mesmo neste caso a galactomanana apresenta bastante impureza. A patente americana USP 2,891,050[ELVERUM, 1959] descreve um processo o qual envolve a hidratação dos "Splits" (Endosperma) do guar até uma umidade de 30-60%, após o qual os "Splits" (Endosperma) úmidos foram transformados em escamas finas pela sua passagem entre rolos, após o qual eles foram secos e moídos.

Em outra patente americana KEEN, 1969 descreveu outro processo que produz uma galactomanana sem odor ou sabor pelo tratamento dos "Splits" (Endosperma) com vapor d'água por uma hora. Os Splits foram então, esmagados, secos e moídos.

A patente Americana USP 4,659,811[DEWU, 1984] descreveu um processo para extração da galactomanana a partir da semente de guar, utilizando extração com alcali caustico a 60-120 °C, sendo a

semente esmagada em atmosfera de nitrogênio na forma de escamas. Esta extração foi feita na presença de um sal (Borax) que retarda a hidratação do polissacarídeo, que, após centrifugação para remoção das impurezas foi acidificadas e o polissacarídeo separado por centrifugação seco e moído.

Em outro processo reportado por Sikka, 1969 o endosperma da semente moído foi extraído com água (70-80°C) e os sólidos não solúveis foram separados do extrato por centrifugação. Ao extrato obtido foi adicionado etanol para precipitar o polissacarídeo.

Para obter galactomanana de grau comercial (goma guar a partir de semente de guar), a casca (14-17% da semente) foi removida por hidratação com água, moagem em vários estágios e peneiramento [GEBERT e COLABORADORES, 2000]. O endosperma foi separado do gérmen (43-47% da semente) utilizando moinhos especiais de martelo e de rolo. O endosperma (34-45% da semente) que contém a galactomanana, foi moído até o tamanho desejado e utilizada como goma guar grau alimentício e farmacêutico. Embora algumas impurezas ainda estejam presentes como água (7-15%), proteína (>7%), cinzas (>1,5%).

Em outra patente SWARTZ e Colaboradores, 2000 a viscosidade foi reduzida por tratamento com ácido à elevada temperatura e agitação produzido um produto com baixo teor de cinzas e fibras.

Em outra patente Americana, CHIU e Colaboradores em 2001, a goma guar foi submetida a despolimerização utilizando enzimas para produção de agentes de volume com DP 3 a 75 (MW 500 a 10,000) o qual foi utilizado para substituir sucrose ou outros carboidratos em formulações comestíveis.

Em outra patente RUTENBERG e MOLNAR em 1981 os "Splits" (Endosperma) de guar foram hidratados(50-60% em peso), sujeitos a extrusão. A goma obtida foi então moída produzindo uma goma com alta viscosidade.

Em outra patente KARSTENS e STEIN em 2002 os "Splits" (Endosperma) de guar foram tratados com amônia a quente em autoclave seguido de rápida descompressão produzindo uma goma guar bastante solúvel e com uma solução sem turbidez devido a derivação e solubilização das impurezas insolúveis na semente de guar. Além de produzir um produto já na forma pulverizada .

Em outra patente YEH em 1996 os "Splits" (Endosperma) de guar foram dissolvidos a 65°C em solução de Hidróxido de Sódio em atmosfera nitrogenada , o gel obtido foi lavado com água(2 vezes), e álcool isopropílico 50%, filtrado e seco o produto obtido possui viscosidade de 5800cps a 25°C (solução 1%) com baixo teor de nitrogênio (0,06%) e a transmitância de uma solução aquosa (0,5%) a 500-600nm é 80-81%. O guar obtido além de puro produz uma solução viscosa e sem turbidez (transparente) esta purificação é recomendável em aplicações como produtos de cuidados pessoais, têxtil, papel e tintas onde soluções claras e puras sejam requeridas.

A galactomanana da semente de Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) é pouco conhecida e possui uma relação galactose-manose de 1:1 a 1:2, [ALCOCK, 1989]. O processo de extração como foi descrito nas patentes de CHANG em 1999 e GARTI e Colaboradores em 1998 se iniciam com a moagem das sementes secas de Fenugreek, seguido da extração com hexano para remoção dos lipídeos, seguido da extração com etanol e metanol para remoção

das saponinas. O sólido residual é dissolvido em água quente, filtrado e a galactomanana precipitada pela adição de álcool, após filtração e secagem, a galactomanana foi produzida com 8-10% de proteína e 0,5% de saponinas

As sementes de Carob [McCLEARY e Colaboradores, 1983] foram tratadas com etanol aquoso (80%), filtrado, lavados com etanol, acetona e éter, seguido de extração com água quente, centrifugação e precipitação com etanol, acetona e éter e seco à vácuo.

As galactomananas de *Cyamopsis tetragonoloba* (Guaran), *Cerotonia siliqua* L. (Locust bean ou Carob), *Mendicago sativa* e *Trifolium pratense* L. [GRASDALEN e PAINTER, 1980] foram dissolvidas em ácido fosfórico 85%, agitadas a 4°C por 4 semanas. A solução resultante foi precipitada com éter gelado, que após filtração e lavagem com éter foi dissolvido com água. Após neutralização com BaCO₃ e filtração a amostra foi congelada e liofilizada.

As sementes secas de *Ipomoea turrenthum* [SINGH e Colaboradores, 2003] foram moídas, desengorduradas com éter de petróleo e descoloridas com etanol e extraídas com solução 1% de ácido acético e o extrato precipitado com a adição de etanol. O polissacarídeo bruto foi purificado através da complexação com solução saturada de Hidróxido de Bário por agitação com uma solução (2,5% do polissacarídeo por 12 horas a 60°C). O complexo foi separado por centrifugação, dissolvido em Ácido Acético 1M, e centrifugado e precipitado com etanol, 70, 80, 90 e 95%. A goma pura obtida é um produto branco, amorfo com teor de Cinzas (0,28%) e $(\alpha)_D^{25} = +58^\circ$ (água).

As sementes de *Phoenix dactylifera* foram quebradas e os endospermas separados por peneiração. O endosperma é extraído com água quente e os extratos combinados são filtrados, centrifugados e o polissacarídeo precipitado com etanol, separado e seco á vácuo. O polissacarídeo bruto foi purificado por dissolução (0,6%) em água e precipitado com metanol até atingir a rotação ótica $(\alpha)_D^{25} = +24^\circ$ (H₂O) [ISHRUD e Colaboradores, 2001].

Comparando com o guar de locust bean a galactomanana do fenugrennk (*Trigonella foenum-graecum L.*) é menos conhecida e menos explorada na industria de alimentos [RAMESH e Colaboradores, 2001]. O rendimento de galactomanana e a relação galectose:manose são afetados pelo processo de extração, purificação da galactomanana, e a origem da matéria prima. Assim o Funegreek apresenta rendimento de 18% de galactomanana para o Fenugreek Indiano (SHANKARACHA e RYA, 1972), enquanto o Egípcio (HASSAN, 1972) apresenta rendimento de 33%. A razão galactose:manose apresenta variação conforme tabela 3.5 :

Tabela 3.5. - Relação galactose:manose para o fenugreek de varias origens.

Galactose:Manose	REFERÊNCIAS
1:1,05	DEA e MORRISON 1975
1:1,5 – 1,11	EDWARDS 1992
1:1,12 1,08	BOCIEK 1981
1:1	BOCK 1982
1:2	GARTI 1998
1:0,93	SONG 1989

A farinha de Fenugreek [RAMESH e Colaboradores, 2001] foi extraída com hexano, etanol e água quente. Os extratos aquosos foram

filtrados e precipitados com etanol, que após separação da galactomanana, foram extraídos com Hidróxido de Sódio, filtrados, seu pH foi ajustado com ácido acético, e precipitados com etanol, o polissacarídeo foi dializado e liofilizado.

O endosperma moído de *Cassia spectabilis*[KAPOOR e Colaboradores, 1998] foram purificado pela dissolução da goma em água quente e precipitados com etanol. O polissacarídeo obtido foi complexado com Hidróxido de Bário, o complexo foi separado, decomposto com Ácido Acético 2N, seguindo de precipitação com etanol e lavagem com álcool, a amostra foi purificada por diálise filtração através de várias membranas MILLIPORE.

O endosperma moído de *Mimosa scabrella*[GANTER e Colaboradores, 1997], *Mimosa flocculosa*, *Mimosa taimbensis*, *Mimosa bumucronata* [BUCKERIDGE, 1995], foram extraídos em soxhlet com etanol/tolueno (2:1), e o resíduo foi extraído à frio com água, centrifugado, e por precipitação com álcool, filtração, secagem à vácuo e moagem produziu a galactomanana purificada.

As sementes moídas de *Abutilon indicum* [SING e Colaboradores, 1997] foram extraídas com éter de petróleo e etanol, seguindo da extração com solução de ácido acético 1,5% e precipitado com etanol, filtrado e seco.

O endosperma moído de *Gleitsia triacathos* [MANZI e Colaboradores, 1984 ; MANZI e CEREZO, 1984 ; NAVARRO e Colaboradores, 2002], foi extraído com água e o material insolúvel foi centrifugado. Ao sobrenadante, foi adicionado álcool (3 volumes) e o material

insolúvel foi removido por centrifugação. O sobrenadante após concentração, foi submetido à precipitação com álcool e a galactomanana precipitada centrifugada e seca.

A goma gúar [FROLLINI e Colaboradores, 1995] foi purificado por dissolução em água fria (1g/l) seguido de filtração. A solução foi concentrada para 3g/l por evaporação à pressão reduzida (40°C) e o polímero foi isolado por precipitação em etanol, seguido de filtração e secagem.

As sementes de *Leucaema leucocephala* [SIERAKOWSKI e Colaboradores, 2000] foram submetidos a extração com tolueno/etanol para remoção dos pigmentos e lipídios, e em seguida aquecidos com água à 95°C para destruir a atividade enzimática por 15 minutos e extraídos com água à 25°C exaustivamente. O polissacarídeo foi precipitado com etanol, separado por filtração a seco. O polissacarídeo foi purificado por dissolução em água, clarificado por centrifugação, e o líquido sobrenadante foi filtrado em membranas de 3,0, 1,2 e 0,8mm e precipitado com etanol e seco.

Referências Bibliográficas

- ALCOCK, N.W., Sterechemistry of the 4-Hydroxyisoleucine from *Trigonella foenum-graecum*, *Phytochemistry*, v.28, p. 1835-1841, 1989.
- BOCIEK, S. M., IZZARD, M. J., MORRISON, A., WELTI, D. The ¹³C NMR spectra of (1-6)-ad-galactosyl-(1-4)-bd-mannans. *Carbohydrate Research*, v. 93, p. 279-283, 1981.
- BOCK, K., THOGERSEN, H. Nuclear magnetic resonance spectroscopy: the study of mono- and oligosaccharides. *Annual Report of NMR Spectroscopy*, v. 13, p. 1-57, 1982.
- BUCKERIDGE, M. S., PANEGASSI, V. R., ROCHA, D. C., DIETRICH, S. M. C. Seed galactomannan in the classification and evolution of *Leguminosae*. *Phytochemistry*, v 38(4), p. 871-875, 1995.
- CHANG, P., USP 5,997,877, (1999).
- CHIU, C.W., HENLEY, M.J., ZALLIE, J.P., JEFFCOART, R., USP 6,299,924 (2001).
- DEA, I. C., MORRISON, A. Chemistry and interations of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, San Diego, v. 31, p. 241-312, 1975
- DEWU, S.R., USP 4,659,811, 1984.

- EDWARDS, M., SCOTT, C., GIDLEY, M. J., REID, T. S. G. Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. *Planta*, 187, 67-74, 1992.
- ELVERUM, G.W., USP 2,891,050, 1959 .
- FRONLLINI, E., REED, W.F., MILAS, M., RINANDO, M., Polyelectrolytes from polysaccharides: selective oxidation of guar gum, a revisited reaction . *Carbohydrates Polymers*, v. 27 , p. 129-135 , 1995.
- GANTER, J.L.M.S., CARDOSO,A.T.M., KAMINSKI, M., REICHER, F., Galactomannans from the seed of *Mimosa scrabella* : a scale up process., *Int. J. of Biol. Maramol.* v. 21 , p. 137-140 , 1997 .
- GARTI, N., ASERIM, A., MADAR, Z., STERNHEIM, B., USP 5,847,109 ,1998 .
- GARTI, N., MADAR, Z., ASERIN, A., STERNHEIM, B. Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. *Lebensmittel-wissenschaft und-Technologie* , v. 30, p. 305-311, 1997.
- GEBERT, M.S., FRIEND, D.R., WONG, D., PARASRAPURIA, J., USP. 6,063,402 , 2000.
- GRASDALEN, H. , PAINTER, T., NMR studies of composition and sequence in legume seed galactomannans. *Carbohydr. Research* , Amsterdam, v. 81, p. 59-66, 1980.

- HASSAN, A., BOCTOR, A. M. A direct semi-micro method for the quantitative determination of fenugreek mucilage. *Egyptian Pharmacological Bulletin*, v. 44, p. 55-59, . 1962.
- ISHRUD, O., ZAHID, M., ZHOO, H., PAN, Y., A water soluble galactomannan from the seeds of *Phoenix dactylifera* L., *Carbohydrate Research*, v 335 , p. 397-301 , 2001.
- KAPOOR, V. P., TARAVEL, F. R., JOSELEAU, J. P., MILAS, M., HANZY, H., RINAUDO, M.. *Cassia spectabilis* DC seed galactomannan: structural, crystallographical and rheological studies. *Carbohydrate Research*, 306, 231-241, 1998.
- KARSTENS, T., STEIN, A., USP 6,348,590 , 2002 .
- KEEN, J.L., USP 3,455,899 , 1969 .
- MANZI, A., E. , MANZINI, M. N. and CEREZO, A. S., The galactomannan system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. *Carbohydr. Res. Amsterdam*, v. 125, p. 127-143, 1984.
- MANZI, A.E., CEREZO, A.S., The galactomannan like oligosaccharides from the endosperm of the seed of *gleditsia triacanthos*, , *Carbohydrate Research*, v. 134 , p. 115-131 , 1984 .
- McCLEARY, B.V., NURTHEN, E., TARAVEL, F.R., JOSELOU, J.P., Characterization of the oligosaccharides produced on hydrolysis of galactomannan with β -D-mannase, *Carbohydrate Research*, v. 111 , p. 91-109 , 1983.

- NAVARRO, D.A., CEREZO, A.S., STORTZ, C.A., NMR spectroscopy and chemical studies of an arabinan-rich system from the endosperm of seed of *Gleditsia triacanthos*, v. 337 , p. 255-263 , 2002.
- RAMESH, H.P., YAMAKI, K., ONO, H., TSHUSHIDA, T., Two-dimensional NMR spectroscopic studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graezum* L.) galactomannan without chemical fragmentation, *Carbohydrate Polymers* . v. 45, p. 69-77, 2001.
- RUTENBERG, M.W., MOLMAR, T.R., USP 4,269,975 , 1981 .
- SHANKACHARYA, N.B., NATARAJAN, C.P., Fenugreek chemical composition and uses, *Indian Spices*, v. 9 , p. 2-12 , 1972
- SIERAKOWSKI, M.R., MILAS, M., DESBRIERES, J., RINAUDO, M., Specific modifications of galactomannans, *Carbohydrate Polymers*, v.42 , p. 51-57 , 2000.
- SIKKA, K.C., JOHARI, R.P., *Research and Industry*, v.14, p. 138-139, 1969.
- SING, V., SRIVASTANA, V., PANDEY, M., SETHI, R., SANGHI, R., *Ipomoea turpethum* seed: A potential source of commercial gum, *Carbohydrate Polymers*, v. 51 , p. 357-359 , 2003.
- SINGH, V., MISHRA, U.C., KHARE, G.C., GUPTA, P.C., A neutral seedgum from *Abutilon indicum*, *Carbohydrates Polymers*. v. 33 , p. 203-205 , 1997 .