



**Estudo Fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth. e  
*Lonchocarpus atropurpureus* Benth. (Leguminosae)  
Isolamento, Determinação Estrutural e  
Atividade Biológica**

**Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz**

**Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do Curso de Química Orgânica para obtenção do Título de Mestre em Ciências.**

**Prof.a. Dra. Eva Gonçalves Magalhães**  
Orientadora

Setembro de 1998

Campinas, São Paulo - Brasil

UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	P. 859e
V.	Ex.
TÍTULO BB/	35966
PLA/	395/98
	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	19/11/98
N.º CPDC	400.98722-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP**

Ruiz, Ana Lúcia Tasca Gois  
R859e Estudo fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth e *Lonchocarpus atropurpureus* Benth (leguminosae) isolamento, determinação estrutural e atividade biológica / Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz -- Campinas, [SP : s.n], 1998.

Orientadora: Eva Gonçalves Magalhães.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Flavonoides. 2. Quimiosistemática. 3. CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). 4. Testes biológicos (citotoxicidade e bioautografia). I. Magalhães, Eva Gonçalves. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Ruiz, Ana Lucia Tasca Gois

Estudo fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth. e *Lonchocarpus atropurpureus* Benth. (L T/UNICAMP/R859e

(35966/98)

## Resumo

**Estudo fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth. e *Lonchocarpus atropurpureus* Benth. (Leguminosae) - Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica.**

**Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Eva Gonçalves Magalhães.**

**Palavras Chaves: Flavonóides, CLAE, Quimiosistemática, Testes Biológicos (toxicidade e bioautografia).**

O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico de *Poecilanthe parviflora* resultou no isolamento de três esteróides *campesterol* 1, *stigmasterol* 2 e  $\beta$ -*sitosterol* 3 e um ácido graxo C-22 com três insaturações na forma de seu éster metílico 6; do extrato metanólico de *P. parviflora* isolou-se *sacarose* 4 e *quebrachitol* 5 na forma de seus derivados peracetilados. O estudo fitoquímico do extrato éter de petróleo de *Lonchocarpus atropurpureus* resultou no isolamento de cinco flavonóides sendo três conhecidos *minimiflorina* 7, *mundulinol* 10 e *mundulina* 11 e dois inéditos 3-metoxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalila)-2'-hidroxiflavanona 8 e 3-hidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalila)-2'-hidroxiflavanona 9 e dois triterpenos pentacíclicos  $\beta$ -*amirina* 12 e *lupeol* 13. Todas as estruturas foram determinadas com o auxílio de métodos espectroscópicos (UV, IV, EM, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, HETCOR, HSQC, HMBC). Vale ressaltar que dentre os flavonóides isolados, 7, 8 e 9 apresentam grupo hidroxila em C-2' do anel B, que é uma posição pouco comum de substituição. A análise por CLAE permitiu a quantificação de quatro flavonóides (7, 8, 9 e 10) no extrato éter de petróleo de *L. atropurpureus* e uma comparação qualitativa dos extratos éter de petróleo de cascas do caule, fragmentos do caule, folhas, sementes e raízes de *L. atropurpureus*. Foram realizados testes de bioautografia com os extratos de *P. parviflora* (frente a fungos e bactérias) e *L. atropurpureus* (frente a fungos) sem que nenhuma atividade tenha sido observadas nas condições utilizadas. O teste de toxicidade com *Artemia salina* foi realizado com os extratos de *L. atropurpureus* e com os flavanonóis inéditos; os extratos éter de petróleo, diclorometânico e os flavanonóis 8 e 9 mostraram-se ativos. O teste de citotoxicidade *in vitro* demonstrou a inatividade do flavanonol 8 frente a três linhagens celulares e o estudo *in vivo* mostrou um discreto aumento do efeito insulínico na presença de 8.

## Abstract

**Phytochemistry of *Poecilanthe parviflora* Benth. and *Lonchocarpus atropurpureus* Benth. (Leguminosae) - Isolation, Structural Determination and Biological Activity.**

**Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Eva Gonçalves Magalhães**

**Keys words: Flavonoids, HPLC, Chemosystematic, Bioassays (toxicity and bioautography).**

Dichloromethanic extract from *Poecilanthe parviflora* roots was submitted to chromatographic analysis and furnished a mixture of steroids (*campesterol* 1,  *$\beta$ -sitosterol* 2 and *stigmasterol* 3) and an *unsaturated fatty acid methyl ester*(C-22, three saturations) 6. Acetylation of methanolic extract followed by chromatographic analysis furnished *peracetylated sucrose* 4 and *quebrachitol* 5. Light petroleum extract from *Lonchocarpus atropurpureus* roots was submitted to chromatographic analysis allowing the isolation of five flavonoids (7, 8, 9, 10 and 11) and a mixture consisted by two pentacyclic triterpenes (12 and 13). *Minimiflorin* 7, *mundulinol* 10 and *mundulin* 11 have been isolated before from other sources while *5,2'-dihydroxy-3-methoxy-6,7-(2'',2''-dimethylchromene)-8-(3''',3'''-dimethylallyl)-flavanone* 8 and *3, 5-dihydroxy-6,7-(2'',2''-dimethylchromene)-8-(3''',3'''-dimethylallyl)-2'-hydroxy-flavanone* 9 are new compounds. The two pentacyclic triterpenes were determinate to be  *$\beta$ -amirin* 12 and *lupeol* 13 . The molecular structures were elucidated by means of their respective spectral data (UV, IR, MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) and bidimensional spectra (HETCOR, HSQC, HMBC). Flavonoids 7, 8 and 9 present an OH on C-2' which is not a very frequent substitution position. Quantitative analysis of light petroleum extract of *L. atropurpureus* roots by using HPLC reversed phase showed that 8 is the most abundant flavonoid. The roots's extracts of *P. parviflora* were tested against some fungi and bacteria and the roots's extracts of *L. atropurpureus* were tested against some fungi through the bioautigraphy method and all were inactive. The extracts of *L. atropurpureus* roots and the new flavonoids 8 and 9 showed activity in the *Brine Shrimp* bioassay. Flavonoid 8 showed no activity when it was tested against three cancer lineage (citotoxicity *in vitro*) but showed a light increase in the insulinic activity when it was tested in a model *in vivo*.

## *Curriculum Vitae*

### 1. GRADUAÇÃO:

Curso de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Médicas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas - PUC-Campinas.

### 2. RESUMOS PUBLICADOS:

2.1. Magalhães, A.F.; **Ruiz, A.L.T.G.**; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Poecilante parviflora*. Livro de Resumos da III Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Fito-23, 1997.

2.2. Magalhães, A.F.; **Ruiz, A.L.T.G.**; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G. Novos flavanonois em *Lonchocarpus atropurpureus* Benth. Livro de Resumos da XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN-50, 1998.

2.3. Magalhães, A.F.; **Ruiz, A.L.T.G.**; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G.; Soriano, M.P.C. Análise por CLAE dos extratos de *Lonchocarpus atropurpureus* e *L. dipteroneurus*. Suplemento do XX Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micro-moleculares, QM-10, 1998.

2.4. Magalhães, A.F.; **Ruiz, A.L.T.G.**; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G. Atividade biológica dos extratos e de flavonóides isolados das raízes de *Lonchocarpus atropurpureus*. Suplemento do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, pág. 120, 1998.

2.5. Nogueira, M.A.; **Ruiz, A.L.T.G.**; Carvalho, C.R.O.; Magalhães, A.F.; Magalhães, E.G. & Saad, M.J.A. Efectos de flavonoides en las etapas iniciales de la accion insulínica en hígado y músculo de ratas *in vivo*. Suplemento do IV Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Chile, 1998.

2.6. **Ruiz, A.L.T.G.**; Nogueira, Magalhães, E.G.; Magalhães, A.F. & M.A.; Pizão, P.E. Ensayos biológicos com extractos y flavonoides aislados de *Lonchocarpus atropurpureus* Benth y *Lonchocarpus latifolius* (Wild) DC. Suplemento do IV Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Chile, 1998.

### 3. CURSOS:

- ✿ **Semana Integrada de Estudos da Faculdade de Ciências Médicas**
  - 1994: Medicamentos Fitoterápicos - duração: 8h
  - 1993: Manipulação em Farmácia Magistral - duração: 12h
  - Controle de Infecções Hospitalares - duração: 8h
  - 1992: Florais de Bach - duração: 8h
  - 1991: Fitoterápicos - duração: 8h
  
- ✿ **UFSCar - Ciclo de Seminários do Programa de Pós-Graduação**
  - 1998: "Biodiversidade: um Enfoque Químico-Biológico" - 12,5h
  - Ministrado por: Dr. Otto R. Gottlieb e Dra. Maria Renata de M. B. Borin

### 4. ESTÁGIOS:

- ✿ **Instituto Agronômico de Campinas - IAC - Estação Experimental de Campinas**  
Fazenda Sta. Elisa - Setor de Fitoquímica (ABR/96 - AGO/96).  
**Atividades:** Extração e análise de óleos essenciais; manuseio de cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massa.
  
- ✿ **Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL - (AGO - NOV/95)**  
**Atividades:** Controle de qualidade microbiológico de grãos e produtos de panificação.
  
- ✿ **Hospital e Maternidade "Celso Pierro" e Centro de Saúde Jd. Campos Eliseos - (SET - DEZ/94).**  
**Atividades:** Controle de estoque de medicamentos e materiais; manipulação de anti-sépticos, degermantes e fórmulas magistrais; dispensação de medicamentos e orientação a pacientes.
  
- ✿ **C.P.Q.B.A - UNICAMP - Laboratório de Síntese (MAR - AGO/90)**  
**Atividades:** Síntese parcial e síntese total de fármacos; análise cromatográfica e espectrofotométrica (UV) de intermediários e produtos finais.
  
- ✿ **Coordenadoria de Assistência Técnica Integrada - CATI -Lab. de Defensivos Agrícolas (JAN - MAR/90)**  
**Atividades:** Controle de Qualidade Físico de Defensivos Agrícolas.

*Para Antonio,  
pelo amor e carinho  
ontem, hoje e sempre.*

*Para meus pais Amadeu e Lurdes,  
pelo carinho e constante torcida.*

*Para Vanderlei, Gislaine, Junior, Ligia,  
Antonia, Olimpia, Miguel, Cintia e Ciro  
pela amizade sempre presente.*

## **Agradecimentos**

À Universidade Estadual de Campinas através do Instituto de Química pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Eva Gonçalves Magalhães pela orientação deste trabalho sempre com muita atenção e amizade.

A Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, Dr. Mario José Abdala Saad e Dr. Paulo Eduardo Pizão pela colaboração na realização dos bioensaios e pela atenção sempre presente.

À Sônia Cláudia do Nascimento Queiros pela amizade e ajuda durante os trabalhos com CLAE.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial as técnicas do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Sônia Crisóstomo, Sônia Fanelli e Paula Pilli pelo excelente trabalho técnico.

Aos colegas de grupo Valéria, Carlos, Luiz Marcos, Giordano, Catarina e Míriam pelo convívio agradável e, em especial, a Marisa, Celira e Maria del Pilar pela amizade, pelos bate-papos e pela constante motivação.

Aos colegas de laboratório pelo convívio amistoso.

À Maria, anjo da guarda, pela amizade e apoio técnico.

À todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



**Este trabalho de pesquisa foi apresentado nos seguintes congressos:**

- Magalhães, A.F.; Ruiz, A.L.T.G.; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Poecilante parviflora*. Livro de Resumos da III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Fito-23, 1997.
- Magalhães, A.F.; Ruiz, A.L.T.G.; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G. Novos flavanonóis em *Lonchocarpus atropurpureus* Benth. Livro de Resumos da XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN-50, 1998 (Trabalho premiado como um dos cinco melhores da área de Produtos Naturais).
- Magalhães, A.F.; Ruiz, A.L.T.G.; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G.; Soriano, M.P.C. Análise por CLAE dos extratos de *Lonchocarpus atropurpureus* e *L. dipteroneurus*. Suplemento do XX Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micro-moleculares, QM-10, 1998.
- Magalhães, A.F.; Ruiz, A.L.T.G.; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G. Atividade biológica dos extratos e de flavonóides isolados das raízes de *Lonchocarpus atropurpureus*. Suplemento do XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, pág. 120, 1998.
- Nogueira, M.A.; Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, C.R.O.; Magalhães, A.F.; Magalhães, E.G. & Saad, M.J.A. Efectos de flavonoides en las etapas iniciales de la accion insulínica en hígado y músculo de ratas *in vivo*. Suplemento do IV Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Chile, 1998.
- Ruiz, A.L.T.G.; Nogueira, Magalhães, E.G.; Magalhães, A.F. & M.A.; Pizão, P.E. Ensayos biológicos com extractos y flavonoides aislados de *Lonchocarpus atropurpureus* Benth y *Lonchocarpus latifolius* (Wild) DC. Suplemento do IV Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Chile, 1998.

*"Hoje vemos como por um espelho, confusamente; mas então  
veremos face a face. Hoje conheço em parte mas então  
conhecerei como sou conhecido.*

*Por ora subsistem a fé, a esperança e o amor - as três.*

*Porém a maior delas é o amor. "*

*1 Cor. 13, 12-13.*

# Índice

	<b>Páginas</b>
<b>Lista de Quadros .....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	
<b>Introdução Geral</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I: Estudo Fitoquímico de <i>Poecilanthe parviflora</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>9</b>
<b>2. 1. Obtenção do Material Vegetal .....</b>	<b>9</b>
<b>2. 2. Obtenção dos Extratos e Isolamento dos Constituintes .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Resultados e Discussão</b>	
<b>III. 1. Esteróides .....</b>	<b>18</b>
<b>III. 2. Éster metílico de um ácido graxo .....</b>	<b>20</b>
<b>III. 3. Sacarose peracetilada .....</b>	<b>21</b>
<b>III. 4. Quebrachitol peracetilado .....</b>	<b>22</b>
<b>III. 5. Compostos Nitrogenados .....</b>	<b>23</b>
<b>Anexo A: Tabelas .....</b>	<b>24</b>
<b>Anexo B: Figuras .....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo II: Estudo Fitoquímico de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>41</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>45</b>

	<b>página</b>
2. 1. Obtenção de Material Vegetal .....	46
2. 2. Obtenção dos Extratos e Isolamento dos Constituintes .....	48
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>58</b>
<b>3. 1. Flavanonas</b>	
3. 1. 1. Minimiflorina .....	59
3. 1. 2. Mundulina .....	65
<b>3. 2. Flavanonóis</b>	
3. 2. 1. Substância 8 .....	66
3. 2. 2. Substância 9 .....	67
3. 2. 3. Mundulinol .....	71
<b>3. 3. Triterpenos pentacíclicos</b>	
3. 3. 1. $\beta$ -Amirina e Lupeol .....	72
<b>Anexo C: Tabelas .....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo D: Figuras .....</b>	<b>84</b>
<b>Capítulo III: Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....</b>	<b>111</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>111</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>112</b>
<b>2. 1. Análise Qualitativa .....</b>	<b>113</b>
2. 1. 1. Seleção da fase móvel .....	113
2. 1. 2. Seleção do comprimento de onda .....	114
2. 1. 2. Condições de análise .....	114
<b>2. 2. Análise Quantitativa .....</b>	<b>114</b>

	<b>página</b>
2. 2. 1. Preparação das Soluções Padrões .....	114
2. 2. 2. Construção das Curvas Analíticas .....	115
<b>3. Resultados e Discussão</b>	
3. 1. <i>Poecilanthe parviflora</i> .....	117
3. 2. <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....	119
3. 2. 1. Análise Qualitativa .....	119
3. 2. 2. Análise Quantitativa .....	128
<b>Capítulo IV: Testes Biológicos</b> .....	<b>129</b>
1. <b>Introdução</b> .....	<b>129</b>
2. <b>Materiais e Métodos</b>	
2. 1. Ensaio de Bioautografia .....	<b>130</b>
2. 2. Ensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> (“Brine Shrimp Letality Test”) .....	<b>131</b>
2. 3. Efeitos de flavonóides nas etapas iniciais da ação insulínica e <i>Immunoblotting</i> .....	<b>132</b>
2. 4. Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	<b>134</b>
3. <b>Resultados e Discussão</b>	
3. 1. Bioautografia .....	<b>135</b>
3. 2. Ensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> (“Brine Shrimp Letality Test”) .....	<b>135</b>
3. 3. Efeitos de flavonóides nas etapas iniciais da ação insulínica e <i>Immunoblotting</i> .....	<b>138</b>
3.4. Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	<b>139</b>
<b>Conclusão Geral</b> .....	<b>142</b>

# Lista de Quadros

Páginas

## Introdução Geral

1. Alcalóides identificados nas folhas e nas sementes de <i>Poecilanthe parviflora</i> .....	3
2. Alguns flavonóides isolados em algumas espécies do gênero <i>Lonchocarpus</i> .....	4
3. Aminoácidos não-proteicos e aminas de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....	5

## Capítulo I

1. Proposta de fragmentação para a mistura de Esteróides .....	19
2. Proposta de fragmentação para o éster metílico do ácido 8,11,14-docosatrienóico ( $T_R = 13,366$ min) .....	20

## Capítulo II

1. Substâncias isoladas de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....	58
2. Proposta de Fragmentação para <i>Minimiflorin</i> (7) e substância 8.....	63
3. Proposta de Fragmentação tipo Retro Diels-Alder para <i>Minimiflorin</i> (7) e para substância 8 .....	64
4. Proposta de Fragmentação para a substância 9 e <i>Mundulinol</i> (10) .....	69
5. Proposta de Fragmentação tipo Retro Diels-Alder para a substância 9 e <i>Mundulinol</i> (10) .....	70
8. Proposta de Fragmentação tipo Retro Diels-Alder para $\beta$ - <i>Amirina</i> .....	73
9. Proposta de Fragmentação para <i>Lupeol</i> .....	74

## Lista de Tabelas

Páginas

### Capítulo I

1. Relação Fração eluída/Concentração do eluente e Grupo/Fração coletada do extrato diclorometânico de <i>Poecilanthe parviflora</i> .....	11
--	----

### Anexo A

2. Dados de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) da mistura de esteróides .....	24
3. Dados de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de esteróides .....	24
4. Dados de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) da mistura 6 .....	25
5. Dados de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de Sacarose peracetilada.....	25
6. Dados de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de Sacarose peracetilada.....	25
7. Dados de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de Quebrachitol peracetilado	26
8. Dados de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de Quebrachitol peracetilado .....	26
9. Dados de correlação (HETCOR) de Quebrachitol peracetilado.....	26

### Capítulo II

5. Relação Fração eluída/Concentração do eluente e Grupo/Fração coletada do extrato éter de petróleo de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....	53
8. Diferença de deslocamento químico entre minimiflorina e seu diacetato. ..	61

### Anexo C

1. Dados de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) dos compostos 8, 9 e <i>Mundulinol</i> (10) .....	75
2. Dados de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <i>Minimiflorina</i> (7) e substâncias 8 e 9 .....	76
3. Dados de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) de <i>Minimiflorina</i> (7) e <i>Mundulina</i> (11) .....	77
4. Dados de RMN <sup>13</sup> C (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <i>Mundulinol</i> (10) e <i>Mundulina</i> (11)	78
6. Dados de RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) da mistura $\beta$ - <i>Amirina</i> (12) + <i>Lupeol</i> (13) .....	79

	<b>Página</b>
7. Dados de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura <i>β</i> -Amirina (12) + Lupeol (13) .....	80
9. Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, J <sup>1</sup> ) e HMBC (H-C, J <sup>n</sup> ) para <i>Minimiflorina</i> .....	81
10. Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, J <sup>1</sup> ) e HMBC (H-C, J <sup>n</sup> ) para substância 8 .....	82
11. Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, J <sup>1</sup> ) e HMBC (H-C, J <sup>n</sup> ) para substância 9 .....	83

### Capítulo III

1. Dados utilizados para a construção das curvas analíticas de quatro flavonóides (7 a 10) isolados do extrato éter de petróleo das raízes de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....	115
2. Equações da reta para os quatro flavonóides (7 a 10) isolados do extrato éter de petróleo das raízes de <i>L. atropurpureus</i> .....	116
3. Concentração das substâncias 7 a 10, isoladas do extrato éter de petróleo, nas raízes de <i>L. atropurpureus</i> .....	128

### Capítulo IV

1. Resultados de Bioautografia .....	136
2. Resultados obtidos para os extratos de <i>L. atropurpureus</i> com o ensaio de <i>Artemia salina</i> .....	136



## Lista de Figuras

Páginas

### Introdução Geral

1. Estrutura do flavonóide Rotenona .....	1
2. Estrutura dos Aza-açúcares DMDP e DMJ .....	2

### Capítulo I

2. Placa de CCD dos extratos metanólicos de <i>Poecilanthe parviflora</i> e de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> desenvolvida com BAW e revelada com ninidrina .....	17
3. Esteróides isolados de <i>P. parviflora</i> .....	18
9. Estrutura de sacarose octa-acetilada.....	21
15. Estrutura de quebrachitol penta-acetilado .....	22

### Anexo B

1. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, D <sub>2</sub> O) do extrato metanólico de <i>Poecilanthe parviflora</i>	27
4. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) da mistura de esteróides (1 + 2 + 3) .....	28
5. a. RMN <sup>13</sup> C (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de esteróides (1 + 2 + 3)	
b. DEPT da mistura de esteróides (1 + 2 + 3) .....	29
6. CG/EM da mistura de esteróides (1 + 2 + 3) .....	30
7. CG/EM da mistura 6 .....	31
8. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) da mistura 6 .....	32
10. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de sacarose octa-acetilada (4) .....	33
11. a. RMN <sup>13</sup> C (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de sacarose octa-acetilada (4)	
b. DEPT de sacarose octa-acetilada (4) .....	34
12. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de sacarose P.A. octa-acetilada .....	35
13. a. RMN <sup>13</sup> C (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de sacarose P.A. octa-acetilada	
b. DEPT de sacarose P.A. octa-acetilada .....	36
14. Gráfico de contorno HETCOR de sacarose P.A. octa-acetilada .....	37
16. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de quebrachitol penta-acetilado (5) .....	38

17. a. RMN <sup>13</sup> C (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de quebrachitol penta-acetilado (5)	
b. DEPT de quebrachitol penta-acetilado (5) .....	39
18. Gráfico de contorno HETCOR de quebrachitol penta-acetilado (5) .....	40

## Capítulo II

1. Espécime de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> Benth. cultivado no Parque Ecológico da UNICAMP.....	43
2. Ramos floridos de <i>L. atropurpureus</i> Benth., Foto menor: galhos com cachos de flores; Foto maior: detalhe das flores.....	44
3. Segmentos de raiz de <i>L. atropurpureus</i> (1 <sup>a</sup> . Coleta, presença de nódulos de fixação de N <sub>2</sub> ) .....	47
4. Estrutura de <i>Minimiflorina</i> (7) .....	59
7. Possíveis posições dos substituintes no anel A de <i>Minimiflorina</i> (7) .....	60
14. Estrutura de <i>Mundulina</i> (11) .....	65
17. Estrutura do flavanonol 8 (inérito) .....	66
24. Estrutura do flavanonol 9 (inérito) .....	67
31. Estrutura de <i>Mundulinol</i> (10) .....	71
34. Estrutura de <i>β-Amirina</i> (12) e <i>Lupeol</i> (13) .....	72

## Anexo D

5. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <i>Minimiflorina</i> .....	84
6. a. RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <i>Minimiflorina</i>	
b. DEPT de <i>Minimiflorina</i> .....	85
8. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do diacetato de <i>Minimiflorina</i> .....	86
9. Gráficos de Contorno HSQC de <i>Minimiflorina</i> (7) .....	87
10. Gráficos de Contorno HMBC de <i>Minimiflorina</i> (7) .....	88
11. Espectro de Massas (IE, 70 eV) de <i>Minimiflorina</i> (7) e da substância 8...	89
12. UV de <i>Minimiflorina</i> (7), <i>Mundulinol</i> (11) e das substâncias 8 e 9.....	90

	página
13. IV de <i>Minimiflorina</i> (7) e da substância 8.....	91
15. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de <i>Mundulina</i> (11) .....	92
16.a. RMN <sup>13</sup> C (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <i>Mundulina</i> (11)	
.b. DEPT (135 e 90) de <i>Mundulina</i> (11) .....	93
18. RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) da substância 8 .....	94
19.a. RMN <sup>13</sup> C (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 8	
.b. DEPT (135 e 90) da substância 8 .....	95
20. Espectro de Massas de espectro de massas da substância 8 .....	96
21. Gráficos de Contorno HSQC da substância 8.....	97
22. Gráficos de Contorno HMBC da substância 8.....	98
23. Espectro de Massas de alta resolução das substâncias 8 (a) e 9 (b) .....	99
25. RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) da substância 9 .....	100
26.a: RMN <sup>13</sup> C (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 9	
.b. DEPT (135 e 90) da substância 9 .....	101
27. Gráficos de Contorno HSQC da substância 9.....	102
28. Gráficos de Contorno HMBC da substância 9.....	103
29. Espectro de Massas (IE, 70 eV) da substância 9 e de <i>Mundulinol</i> (10) ....	104
30. IV da substância 9 e de <i>Mundulinol</i> (10) .....	105
32. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de <i>Mundulinol</i> (10) .....	106
33.a: RMN <sup>13</sup> C (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <i>Mundulinol</i> (10)	
.b. DEPT (135 e 90) de <i>Mundulinol</i> (10) .....	107
35.a: RMN <sup>13</sup> C (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <i>β-Amirina</i> (12) + <i>Lupeol</i> (13)	
.b. DEPT (135 e 90) de <i>β-Amirina</i> (12) + <i>Lupeol</i> (13) .....	108
36. RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de <i>β-Amirina</i> (12) + <i>Lupeol</i> (13) .....	109
37. CG/EM de <i>β-Amirina</i> (12) + <i>Lupeol</i> (13) .....	110

### Capítulo III

1. Gráficos de regressão linear (curvas analíticas) dos flavonóides de 7 a 10.	116
--	-----

	<b>Página</b>
2. Cromatograma do extrato diclorometânico das raízes de <i>Poecilanthe parviflora</i> (fase móvel isocrática) .....	117
3. Cromatogramas do extrato diclorometânico das raízes de <i>Poecilanthe parviflora</i> (fase móvel gradiente) .....	118
4. Cromatograma do extrato éter de petróleo de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....	119
5. Sobreposição dos cromatogramas do extrato éter de petróleo e do extrato diclorometânico das raízes de <i>L. atropurpureus</i> .....	120
6. Análise dos extratos obtidos por extração a quente (Soxhlet) e a frio (Maceração) das raízes de <i>L. atropurpureus</i> : frações hexânica e acetato de etila e sobreposição do extrato diclorometânico com a fração acetato de etila	121
7. Análise dos extratos obtidos por extração a quente (Soxhlet, metanol) e a frio (Maceração, metanol/água) das raízes de <i>L. atropurpureus</i> .....	122
8. Análise dos extratos obtidos a partir da 1 <sup>a</sup> . amostra de raiz e da 2 <sup>a</sup> . amostra de raiz de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....	123
9. Análise dos extratos obtidos a partir da 3 <sup>a</sup> . amostra de raiz de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> .....	125
10. Análise do perfil cromatográfico de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> cultivado no Parque Ecológico da Unicamp (1997) .....	126
11. Análise do perfil cromatográfico de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> cultivado na Mata do Monjolinho do IAC (1998) .....	127

#### **Capítulo IV**

1. Procedimento para diluição da amostra para o bioensaio de letalidade com <i>Artemia salina</i> .....	132
2. Bioautografia com os extratos de <i>Poecilanthe parviflora</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	137
3. Bioautografia com os extratos de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i> frente a <i>Candida albicans</i> .....	137

	<b>Página</b>
<b>4. Immunoblotting (autoradiografia) .....</b>	<b>139</b>
<b>5. Teste de Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....</b>	<b>140</b>
<b>6. Curva dose <i>versus</i> resposta do bioensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....</b>	<b>141</b>

### **Considerações Finais**

<b>1. Gráfico dos valores médios do oxidação/metilação de algumas espécies do gênero <i>Lonchocarpus</i> .....</b>	<b>143</b>
--	------------

## Lista de Abreviaturas

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação ótica específica a 20°C
$^{125}\text{I}$	Isótopo radioativo de iodo
<b>BAW</b>	n-butanol/ácido acético/água
<b>CC</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CCDP</b>	Cromatografia em camada delgada preparativa
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	dubleto
$\delta$	deslocamento químico
<i>dd</i>	duplo dubleto
<b>DEPT</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C com intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etiledinitrilotetracético (usado na forma do sal dissódico)
<b>EM</b>	espectro de massas
<b>EPLA</b>	Extrato éter de petróleo das raízes de <i>Lonchocarpus atropurpureus</i>
<b>eV</b>	elétron volts
<b>F.M.</b>	Fase móvel
<b>Fig.</b>	Figura
<b>HETCOR</b>	Espectro bidimensional de correlação de deslocamento químico heteronuclear (C x H), a uma ligação
<b>HMBC</b>	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (H x C) a três ligações (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
<b>HSQC</b>	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (H x C) a uma ligação (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
<b>Hz</b>	Hertz
<b>InS</b>	Insolúvel
<b>IRS</b>	Substrato do receptor de insulina

<b>IV</b>	Infravermelho
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>kDa</b>	Quilo Dalton
<b>m</b>	multiplete
<b>m/z</b>	Relação massa/carga
<b>M<sup>+</sup></b>	Íon molecular
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromo
<b>p.f.</b>	Ponto de fusão
<b>ppm</b>	Parte por milhão
<b>RMN<sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
<b>RMN<sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
<b>S</b>	Solúvel
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida e dodecil-sulfato de sódio para eletroforese
<b>t</b>	tripleto
<b>Tab.</b>	Tabela
<b>td</b>	triplo dublete
<b>Tris</b>	Tri(hidroximetil)-aminometano
<b>UV</b>	Ultravioleta

### 1. A família *Leguminosae*:

A família *Leguminosae* (ou *Fabacea*) compreende cerca de 670 gêneros e 17.500 espécies mundialmente distribuídas, sendo a terceira maior família após *Asteraceae* e *Orchidaceae*. Além de muitas espécies representarem uma rica fonte de proteína para a alimentação humana e animal, várias substâncias de interesse comercial são obtidas desta família, como por exemplo a rotenona (Fig. 1), um flavonóide tóxico para peixes e com atividade inseticida, extraída das espécies de *Derris*, *Lonchocarpus* e *Tephrosia*; e deoximanojirimicina (DMJ) e DMDP (2R, 5R-diidroximetil-3R, 4R-diidroxipirrolidina, Figura 2), aza-açúcares com ação sobre glicosidases que estão sendo pesquisados como agentes antitumoral e antiviral e que foram extraídas de espécies de *Lonchocarpus* e *Derris*<sup>2</sup>.

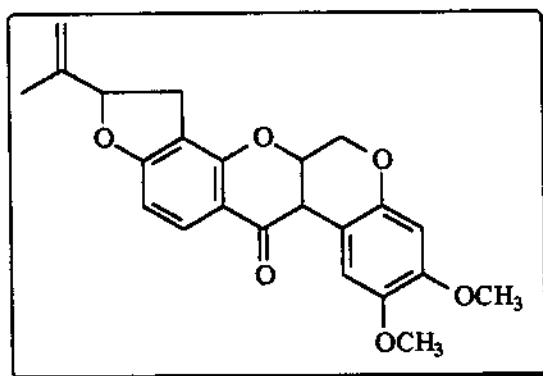


Figura 1: Rotenona, substância extraída das raízes de algumas espécies de *Lonchocarpus*, *Derris* e *Tephrosia*

Esta família se subdivide em três subfamílias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae*, as quais são consideradas famílias independentes por alguns taxonomistas, dentre eles Hutchinson. As duas primeiras são encontradas principalmente em regiões tropicais, enquanto que a subfamília *Papilionoideae* apresenta distribuição mundial<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> LEWIS, G. P., and OWEN, P. E. Legumes of the Ilha de Maraca, Royal Botanic Gardens Kew, p.6-7, 1989.

<sup>2</sup> EVANS, S. V.; FELLOWS, L. E.; SHING, T. K. M. and FLEET, G. W. J. Glycosidase inhibition by plant alkaloids which are structural analogues of monosaccharides. *Phytochemistry* 24 (9): 1953-1955, 1985.



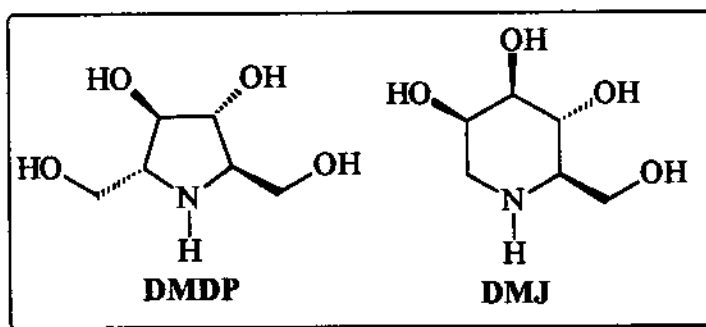


Figura 2: Aza-açúcares DMDP e DMJ extraídos de raízes e sementes de várias espécies de *Lonchocarpus*

## 2. O gênero *Poecilanthe*:

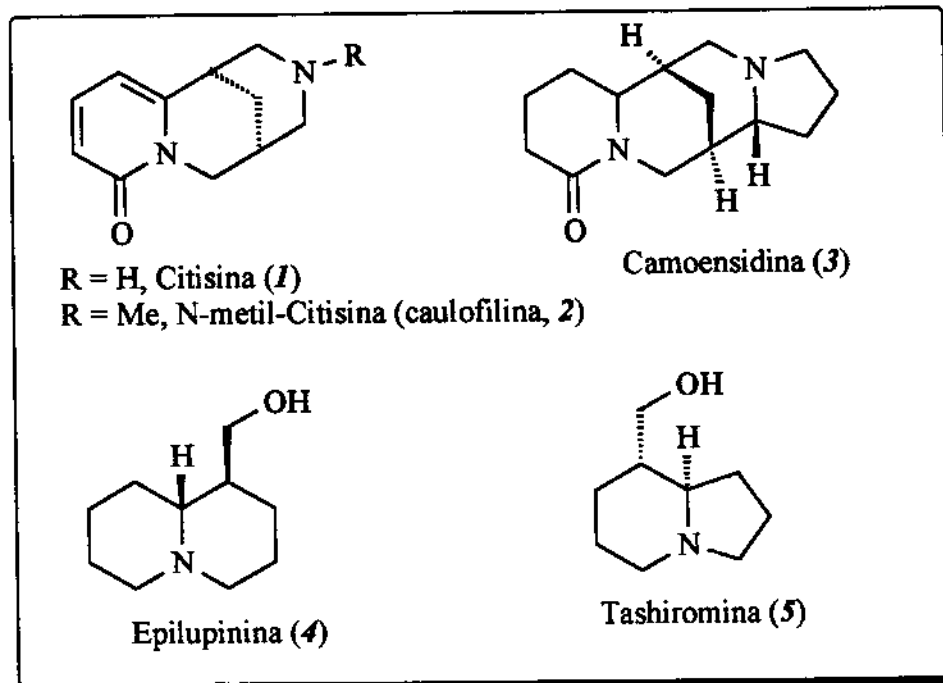
O gênero *Poecilanthe* Benth. (Leguminosae, *Papilionoideae*) compreende 10 espécies distribuídas na América do Sul tropical<sup>3</sup>. A posição taxonômica deste gênero ainda não foi bem estabelecida. Em 1860, BENTHAM classificou-o na tribo Dalbergieae; GEESINK reclassificou-o em 1981, com base na anatomia do tronco, para a tribo Tephrosieae (atual Milletieae), porém GEESINK observou em 1984 outras características botânicas que levaram o gênero *Poecilanthe* a ser classificado na família Rubinieae. Em 1987, LAVIN recoloca o gênero sob a tribo Dalbergieae ressaltando que *Poecilanthe* talvez seja filogeneticamente isolada<sup>4</sup>.

No intuito de fornecer dados que ajudem a esclarecer essa controvérsia, GREINWALD e colaboradores<sup>4</sup> realizaram o estudo da composição de alcalóides das folhas e sementes das espécies de *Poecilanthe* (quadro 1); seus resultados conflitam com a presente posição taxonômica (tribo Dalbergieae) do gênero. Um recente estudo filogenético para diferentes gêneros da tribo Milletieae, realizado por LAVIN<sup>5</sup>, sugere a subdivisão desta tribo em sete subgrupos; dentro do subgrupo denominado primitivo encontram-se os gêneros *Callerya*, *Cyclolobium*, *Dalbergiella*, *Poecilanthe* e *Wisteria* entre outros.

<sup>3</sup> AZEVEDO TOZZI, A.M.G. Contribuição ao conhecimento de *Poecilanthe* (Leguminosae, Papilionoideae). 6º Congresso Latinoamericano de Botânica, Libro de Resúmenes, Sesiones Técnicas: 259, 1994.

<sup>4</sup> GREINWALD, R., BACHMANN, P., LEWIS, G., WITTE, L. and CZYGAN, F.-C. Alkaloids of the genus *Poecilanthe* (Leguminosae: Papilionoideae). *Biochemical Systematics and Ecology* 23 (5): 547-553, 1996.

<sup>5</sup> LAVIN, M.; ESHBAUGH, E.; HU, J.M.; MATHEUS, S. and SHARROCK, R.A. Monophyletic subgroups of the tribe Milletieae (Leguminosae) as revealed by phytochrome nucleotide sequence data. *American Journal of Botany* 85 (3): 412-433, 1998.

Quadro 1: Alcalóides<sup>6,7</sup> identificados nas folhas e nas sementes de *Poecilanthe parviflora*

### 3. O gênero *Lonchocarpus*:

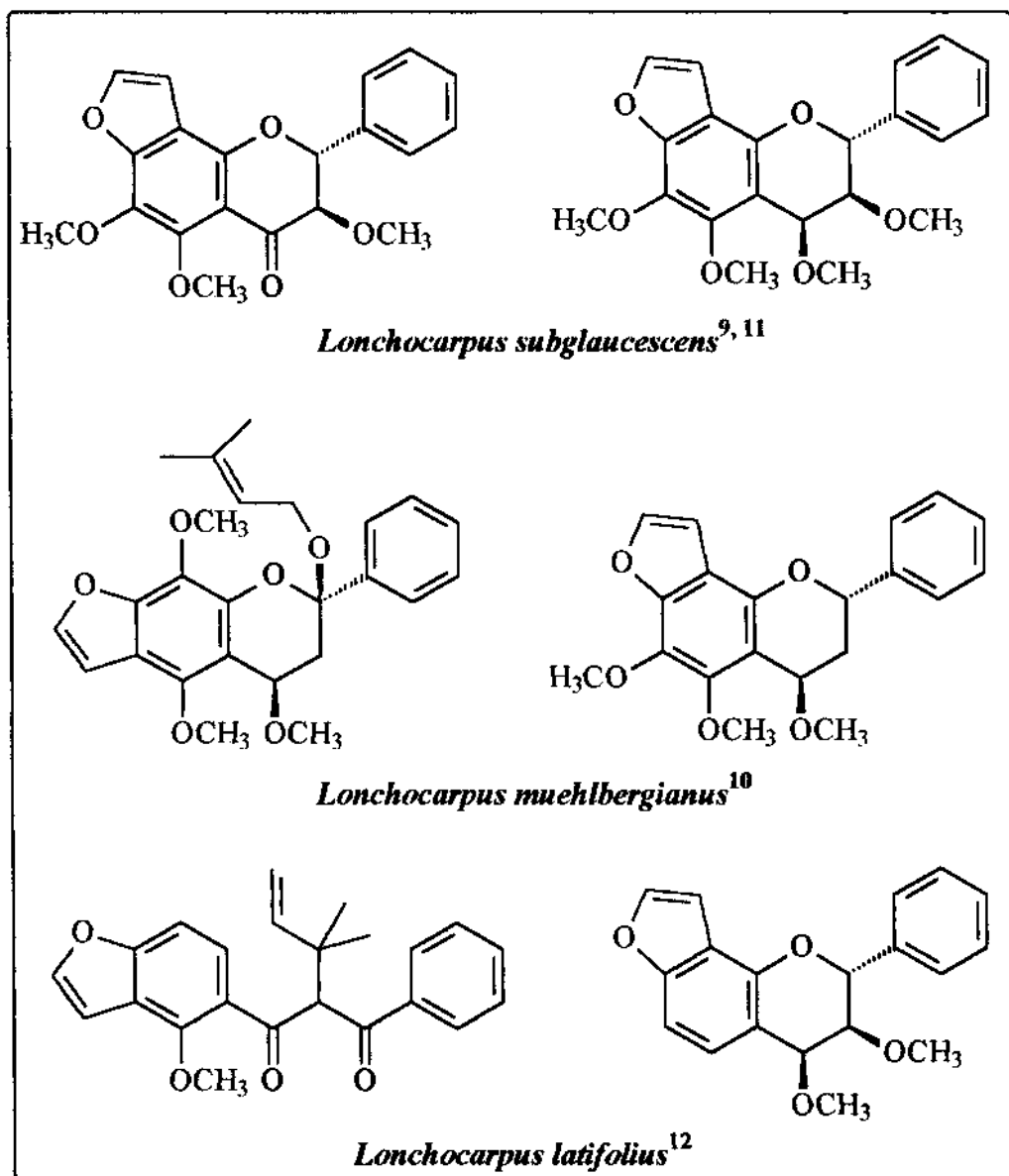
As várias posições sistemáticas propostas para o gênero *Lonchocarpus* (Leguminosae, *Papilionoideae*) mostram a ausência de um consenso entre os diversos estudiosos do grupo, porque várias de suas características morfológicas se intersectam com as de outros gêneros tais como *Derris*, *Pongamia* e *Deguelia*. As afinidades verificadas com gêneros próximos colocam-no numa posição transicional entre tribos, dificultando portanto uma classificação satisfatória. O gênero é subdividido em dois subgêneros, o subgênero *Punctatii* e o subg. *Lonchocarpus*.

Neste contexto, o estudo fitoquímico de novas espécies de *Lonchocarpus* torna-se relevante para a quimiotaxonomia do gênero, principalmente levando-se em conta a proposta de GOTTLIEB; segundo esta o grau de evolução de uma espécie poderia ser avaliado pelo seu potencial redox o qual pode ser expresso indiretamente através de valores médios de oxidação versus metilação (O/Me) dos seus metabólitos secundários<sup>8</sup>.

<sup>6</sup> SOUTHON, I.W. and BUCKINGHAM, J. Dictionary of Alkaloids, C-00549 (1,2), C-00038 (3) e E-00071 (4), 1989.

<sup>7</sup> OHMIYA, S.; KUBO, H.; OTOMASU, H.; SAITO, K. and MURAKOSHI, I. Tashiromine; a new alkaloid from *Maackia tashiroi*. *Heterocycles* 30 (1): 537-542, 1990.

<sup>8</sup> GOTTLIEB, O. R. *Micromolecular Evolution, Systematic and Ecology*. Springer-Verlog, Germany, 170p., 1982.

Quadro 2: Alguns flavonóides isolados em algumas espécies do gênero *Lonchocarpus*

Os dados fitoquímicos obtidos com as 35 espécies de *Lonchocarpus* estudadas até agora mostram a predominância de diversos tipos de flavonóides<sup>9</sup> que foram isolados principalmente das raízes; o quadro 2 mostra alguns flavonóides inéditos isolados de espécies já estudadas por nosso grupo de pesquisa<sup>10, 11, 12</sup>. Foram ainda detectados

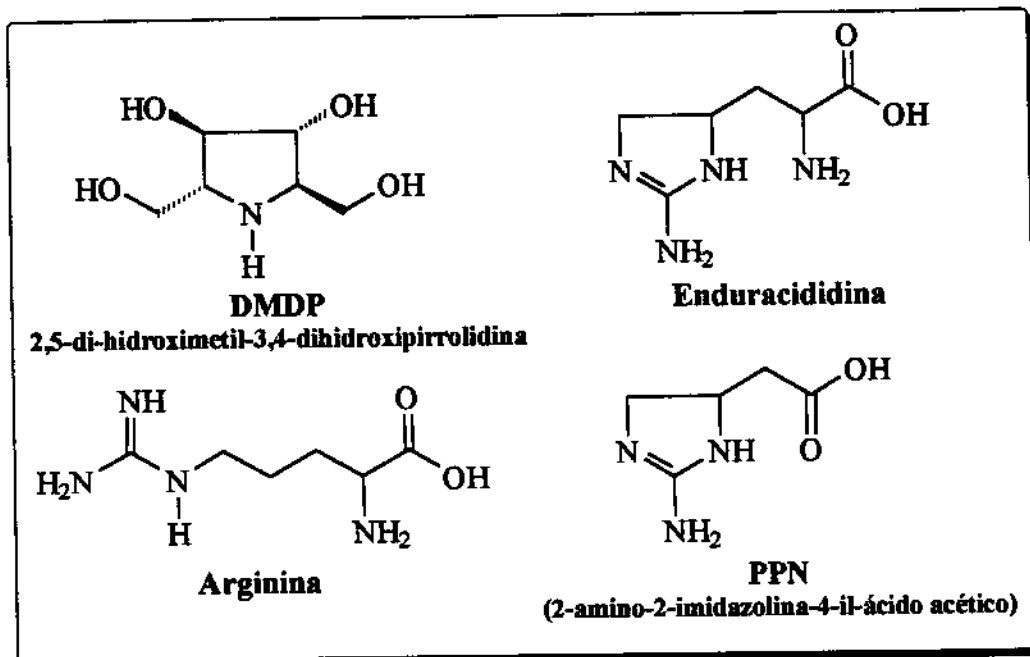
<sup>9</sup> SALES, B.H.L. de N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* Benth. e síntese de β-hidroxichalconas. Campinas, 1994, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

<sup>10</sup> BLANCO, I. S. Flavonóides de *Lonchocarpus muehlbergianus* e síntese de flavanas 4-oxigenadas, Campinas, 1995, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

<sup>11</sup> MAGALHÃES, A. F., TOZZI, A. M. A., SALES, B. H. L. N. AND MAGALHÃES, E.G. Twenty three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. *Phytochemistry* 42 (5): 1459-1471, 1996.

aminoácidos não proteicos e aminas nas sementes de diversas espécies de *Lonchocarpus*<sup>13</sup> (quadro 3).

Quadro 3: Aminoácidos não-proteicos e aminas de *Lonchocarpus atropurpureus*<sup>13</sup>



#### 4. Flavonóides:

Em termos estruturais, os flavonóides são constituídos de dois anéis benzênicos (A e B) ligados por uma cadeia de três átomos de carbono. A etapa central na biossíntese é a condensação de três moléculas de éster CoA do ácido malônico com um éster CoA do ácido cinâmico adequado, levando ao intermediário chalcona que existe em equilíbrio com a flavanona correspondente. Várias reações enzimáticas que incluem hidroxilação do anel A e do anel B, metilação dos grupos hidroxila, reações de glicosilação e alquilação, resultam na diversidade de flavonóides encontrados na natureza<sup>14</sup>.

<sup>12</sup> NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* - Isolamento, identificação, determinação estrutural, testes biológicos e análise sazonal - Campinas, 1998, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

<sup>13</sup> EVANS, S. V.; FELLOWS, L. E. and BELL, E. A., Distribution and systematic significance of basic non-protein amino acids and amines in the Tephrosieae. *Biochemical Systematic and Ecology* 13 (3): 271-302, 1985.

<sup>14</sup> HELLER, W. and FORKMANN, G. Biosynthesis of Flavonoids in HARBONE, J.B. The Flavonoids - Advances in research since 1986. 1<sup>th</sup> Edition, Chapman & Hall, chapter 11, page 499ss, 1996.

Nas plantas os flavonóides atuam protegendo contra radiação UV-B<sup>15</sup>, na regulação do crescimento do tubo polínifero no estigma<sup>16</sup> e como sinais regulatórios na transcrição dos genes de nodulação em *Rhizobium*, que corresponde a primeira etapa para formação dos nódulos de fixação de nitrogênio (simbiose)<sup>17</sup>.

O uso terapêutico de flavonóides tem sido amplamente investigado, com propriedades variadas tais como atividades anti-inflamatória e anti-alérgica, propriedades antitrombose e vasoprotetora, inibição da promoção de tumores e como protetores da mucosa gástrica. Também possuem acentuada atividade antitumoral, bactericida e fungicida<sup>18</sup>.

### 5. Objetivos:

Dentro deste contexto exposto, o grupo de pesquisa trabalhando sob orientação dos professores Dr. Aderbal F. Magalhães e Dra. Eva G. Magalhães, no Instituto de Química da Unicamp, vem desenvolvendo o estudo sistemático de espécies inéditas de *Lonchocarpus* e gêneros afins, como *Poecilanthus*, com ênfase no isolamento, determinação estrutural e atividade biológica de flavonóides a fim de reunir dados fitoquímicos que possam corroborar com as hipóteses botânicas, ajudando assim a resolver problemas de taxonomia. Paralelamente, os extratos serão testados para algumas atividades biológicas, tais como toxicidade frente a *Artemia salina*, atividade antimicrobiana, citotoxicidade *in vitro* e ação sobre receptor de insulina (tirosina proteína quinase) *in vivo*.

---

<sup>15</sup> KOES, R.E.; QUATTROCCHIO, F. and MOI, J.N.M. *apud* CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M. E. J. and McDONALD, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 761 (1+2): 315-321, 1997.

<sup>16</sup> VOGT, T.; POLAK, P.; TARLYN, N. and TAYLOR, L.P. *apud* CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M. E. J. and McDONALD, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 761 (1+2): 315-321, 1997.

<sup>17</sup> CLEYETMAREL, J.C.; ROME, S.; SALDUCCI, X. and WERY, J. Host-specific regulation of nodulation mediated by flavonoids compounds present in plant. *Acta Botanica Gallica* 143 (6): 521-529, 1996

<sup>18</sup> EVANS, W.C. *apud* NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* - Isolamento, identificação, determinação estrutural, testes biológicos e análise sazonal - Campinas, 1998, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

Esta tese está dividida em quatro capítulos:

- ❁ **Capítulo I:** Estudo fitoquímico de *Poecilanthe parviflora*; isolamento e determinação estrutural de esteróides, sacarose e ciclitol dos extratos diclorometânico e metanólico das raízes.
  
- ❁ **Capítulo II:** Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus atropurpureus*; isolamento e determinação estrutural de flavonóides e triterpenos do extrato éter de petróleo obtido das raízes.
  
- ❁ **Capítulo III:** Análise através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; análise qualitativa dos extratos de *P. parviflora* e *L. atropurpureus*; perfil cromatográfico (raiz, casca do caule, caule, folhas e sementes) e análise quantitativa dos flavonóides em raízes de *L. atropurpureus*.
  
- ❁ **Capítulo IV:** Ensaios de bioautografia, toxicidade com *Artemia salina*, ação sobre receptor de insulina (enzima tirosina proteína quinase) *in vivo* e citotoxicidade *in vitro* com os extratos e a substância 8 de *L. atropurpureus*.

## 1. Introdução

A espécie *Poecilanthe parviflora* é a única espécie deste gênero que ocorre na região Sul do Brasil, estendendo-se até a Argentina, Paraguai e Uruguai. É uma arvoreta de 3 a 7m de altura, caducifolia; distribuída pelos Estados da região Sul do Brasil, habita principalmente as formações florestais, tendo sido coletada em matas de galeria, mata secundária, capoeira e em pastagens. Cultivada como planta ornamental em São Paulo e nas praças de Buenos Aires, na Argentina<sup>1</sup>.

A planta *Poecilanthe parviflora* é classificada como:

Família: Leguminosae

Sub-família: *Papilionoideae*

Tribo: *Milletieae*

Subtribo: "Primitivo"<sup>2</sup>

Gênero: *Poecilanthe*

Espécie: *Poecilanthe parviflora*

<sup>1</sup> AZEVEDO TOZZI, A.M.G. Contribuição ao conhecimento de *Poecilanthe* (Leguminosae, Papilionoideae). 6°. Congresso Latinoamericano de Botanica, Libro de Resúmenes, Sesiones Técnicas: 259, 1994.

<sup>2</sup> LAVIN, M.; ESHBAUGH, E.; HU, JM.; MATHEUS, S. and SHARROCK, R.A. Monophyletic subgroups of the tribe Milletieae (Leguminosae) as revealed by phytochrome nucleotide sequence data. *American Journal of Botany* 85 (3): 412-433, 1998.

## 2. Materiais e Métodos:

Os espectros de RMN<sup>1</sup>H, de RMN<sup>13</sup>C (totalmente desacoplado e DEPT) e bidimensionais (HETCOR) foram obtidos em equipamento GEMINI 300BB (VARIAN) e em BRUKER AP-300 ambos em campo de 7 tesla, a temperatura ambiente, sendo as substâncias dissolvidas em clorofórmio deuterado Merck.

As análises por CG/EM foram feitas em cromatógrafo gasoso CG Hewlett - Packard HP 5890 série 2 com coluna DB-5 (5% difenil, 95% dimetil polisiloxane), sob as seguintes condições: injetor a 290°C, coluna a 50°C com razão de aquecimento de 15°C/min até 290°C permanecendo assim por 10min e interface com espectrômetro de massa HP 5970 a 285°C; os espectros de massas foram comparados com padrões presentes na biblioteca "The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data" version 3.2.

As placas de CCD (Merck Sílica gel GF<sub>254</sub>, sobre vidro) e as cromatofolhas de alumínio silicagel GF<sub>254</sub> 0,2nm (Art. 1.05554, Merck) foram reveladas sob luz UV (254 e 366nm) e nebulizadas com solução de anisaldeído modificada<sup>3</sup> (etanol /anisaldeído/ácido sulfúrico/ác. acético 90:5:5:1) seguido de aquecimento das placas cromatográficas. As placas de CCP e CCD sobre vidro foram preparadas no laboratório com sílica gel GF<sub>254</sub> (Merck).

### 2. 1. Obtenção do Material Vegetal:

Um segmento de raiz (1940g) de um espécime de *P. parviflora* cultivado no Campus da UNICAMP, em frente ao Ginásio de Esportes, foi coletado às 11 horas do dia 16 de agosto de 1996 ; nesse dia observou-se que a arvoreta apresentava frutos e algumas folhas com sinais de contaminação por fungos (tipo ferrugem do café). A coleta foi feita sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi (Depto. de Botânica - I.B.).

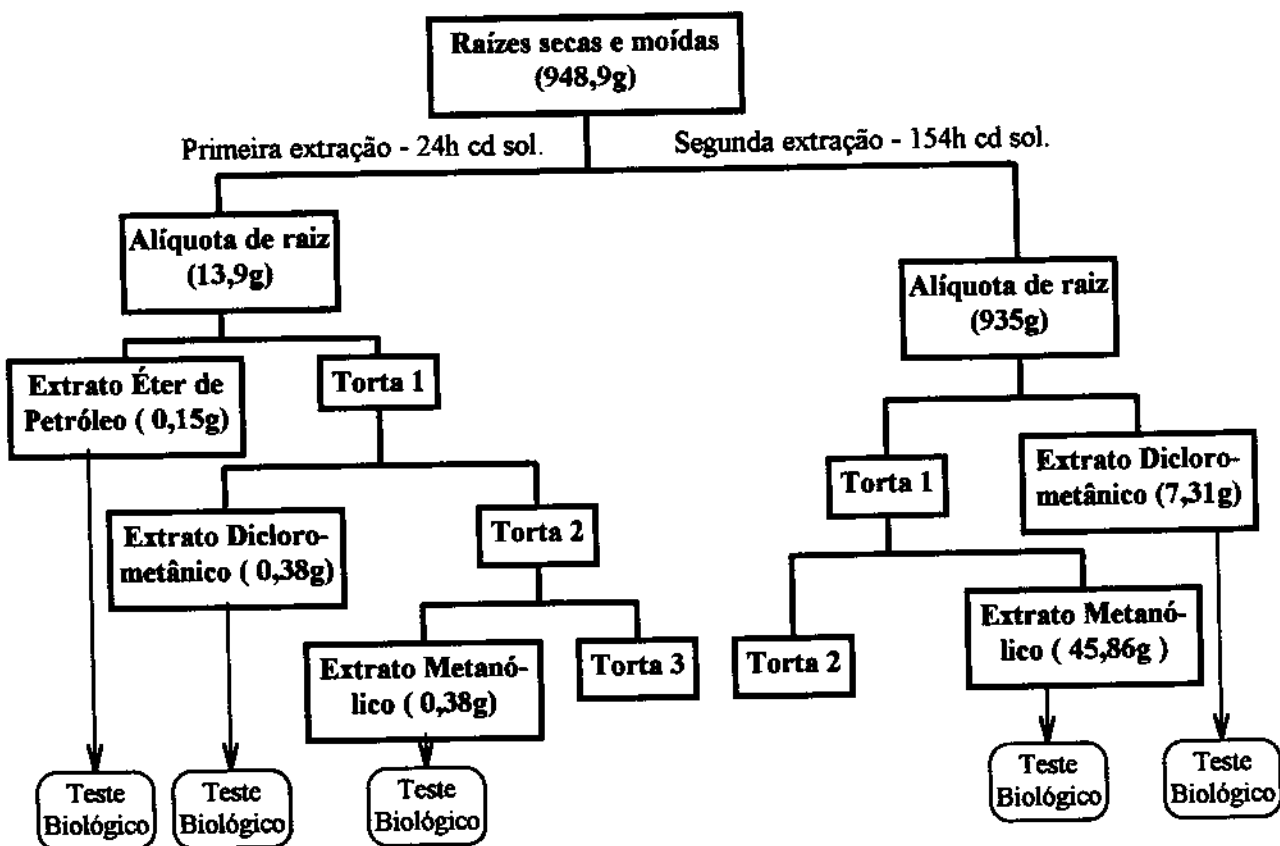
<sup>3</sup> MERCK. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E.Merck, Darmstadt, 118p. 1971.



## 2. 2. Obtenção dos Extratos e Isolamento dos Constituintes:

A raiz foi serrada em pedaços menores e estes secos à sombra. Após moagem, obteve-se 980g de material vegetal o qual foi espalhado em uma bandeja e levado novamente para secar à sombra, resultando em 950g de material vegetal seco e moído.

Fez-se inicialmente um estudo em pequena escala para observar o comportamento em placa cromatográfica (CCD) dos extratos dessa planta. Assim, realizou-se a primeira extração em Soxhlet. Através de análise destes extratos por CCD verificou-se que os extratos éter de petróleo e diclorometânico eram muito semelhantes e bastante complexos; sendo assim, procedeu-se a segunda extração em Soxhlet (Fluxograma 1).



Fluxograma 1: Extração por Soxhlet de *Poecilanthe parviflora*

Uma alíquota (3,93g) do extrato diclorometânico foi fracionada em coluna de sílica gel 60Å (70-230 mesh) eluída com diclorometano aumentando-se a polaridade gradati-

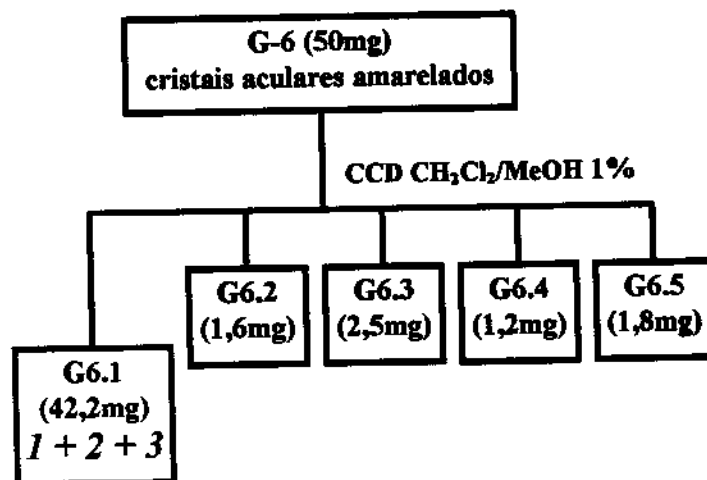
vamente com metanol. Foram coletadas 75 frações, posteriormente reunidas em 42 grupos com base na análise em CCD (Tabela 1).

Tabela 1: Relação Fração eluída/Concentração do eluente e Grupo/Fração coletada

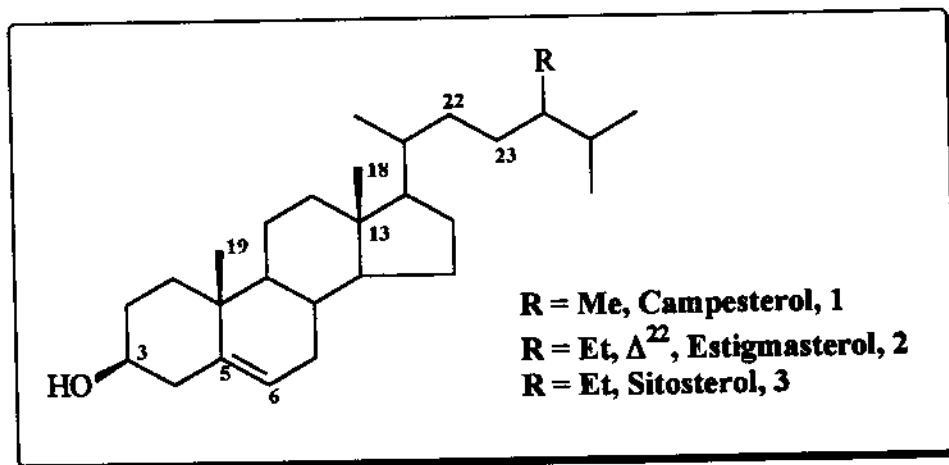
Fase Móvel	Grupo	Frações	Massa (mg)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	1	12,4
	2	2	176,4
	3	3	61,1
	4	4	36,0
	5	5-6	36,3
	6	7-8	78,3
	7	9-10	23,4
	8	11	4,9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 1%	9	12-14	30,7
	10	15-17	20,0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 2,5%	11	18	10,4
	12	19	41,3
	13	20	725,3
	14	21	245,4
	15	22-27	268,0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5%	16	28	55,2
	17	29	34,7
	18	30-31	64,1
	19	32-34	83,3
	20	35	30,5
	21	36	35,2
	22	37-39	61,8
	23	40-43	59,7
	24	44	12,3
	25	45	6,8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 7,5%	26	46	15,2
	27	47-48	53,6
	28	49-50	54,6
	29	51	26,5
	30	52-53	84,0
	31	54-55	51,9
	32	56-57	56,8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 15%	33	58-60	27,0
	34	61	64,8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 20%	35	62	98,0
	36	63-66	236,1
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 25%	37	67	perdida
	38	68	23,7
	39	69	23,7
	40	70-73	86,8
	41	74	20,2
	42	75-76	25,3

A seguir encontram-se os fluxogramas correspondentes às análises em CCP dos grupos elaborados neste trabalho:

### Grupo 6:



**Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol (1), Estigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol (2) e Estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol (3),  
Campesterol, Estigmasterol e  $\beta$ -Sitosterol**



**Aspecto físico:** cristais incolores

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**$[\alpha]_D^{20}$ :** não determinado

**RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):** tabela 2, pag. 24

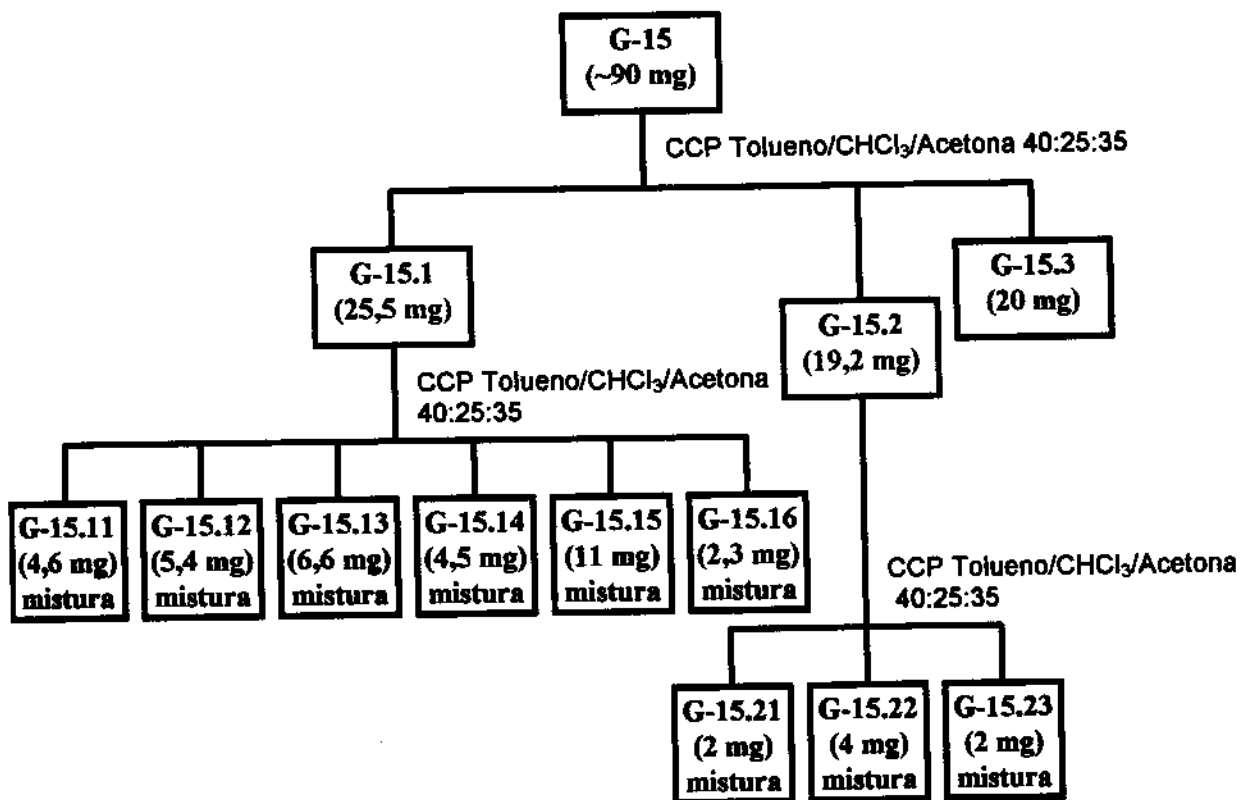
**RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>):** tabela 3, pag. 24

**CG/EM: T<sub>R</sub> (min), m/z (%):** 25,77 (Campesterol, 1): 400 (35), 385 (10), 273 (15), 271 (5), 262 (5), 247 (<1), 232 (5), 231 (10), 163 (5), 139 (5), 138 (5), 135 (15), 133 (10), 121 (10);

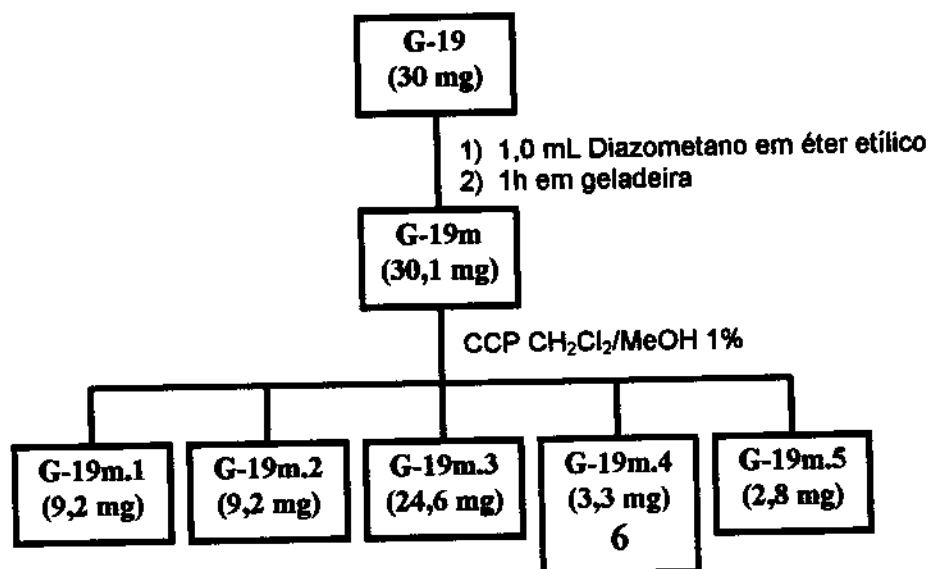
**T<sub>R</sub> (min), m/z (%):** 26,10 (Estigmasterol, 2): 412 (80), 300 (42), 274 (<5), 271 (50), 259 (5), 232 (10), 231 (<1), 163 (10), 161 (20), 141 (5), 138 (5), 135 (15), 133 (40), 121 (20);

**T<sub>R</sub> (min), m/z (%):** 27,61 (Sitosterol, 3): 414 (90), 399 (50), 329 (75), 303 (60), 276 (5), 271 (10), 261 (<5), 232 (30), 231 (5), 163 (30), 138 (7), 135 (25), 133 (25), 127 (5), 121 (30).

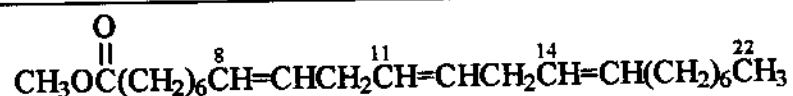
**Grupo 15:**



## Grupo 19:



## Éster Metílico do Ácido 8, 11, 14-Docosatrienóico



Éster metílico do ácido 8,11,14-docosatrienóico (6)

**Aspecto físico:** óleo incolor

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

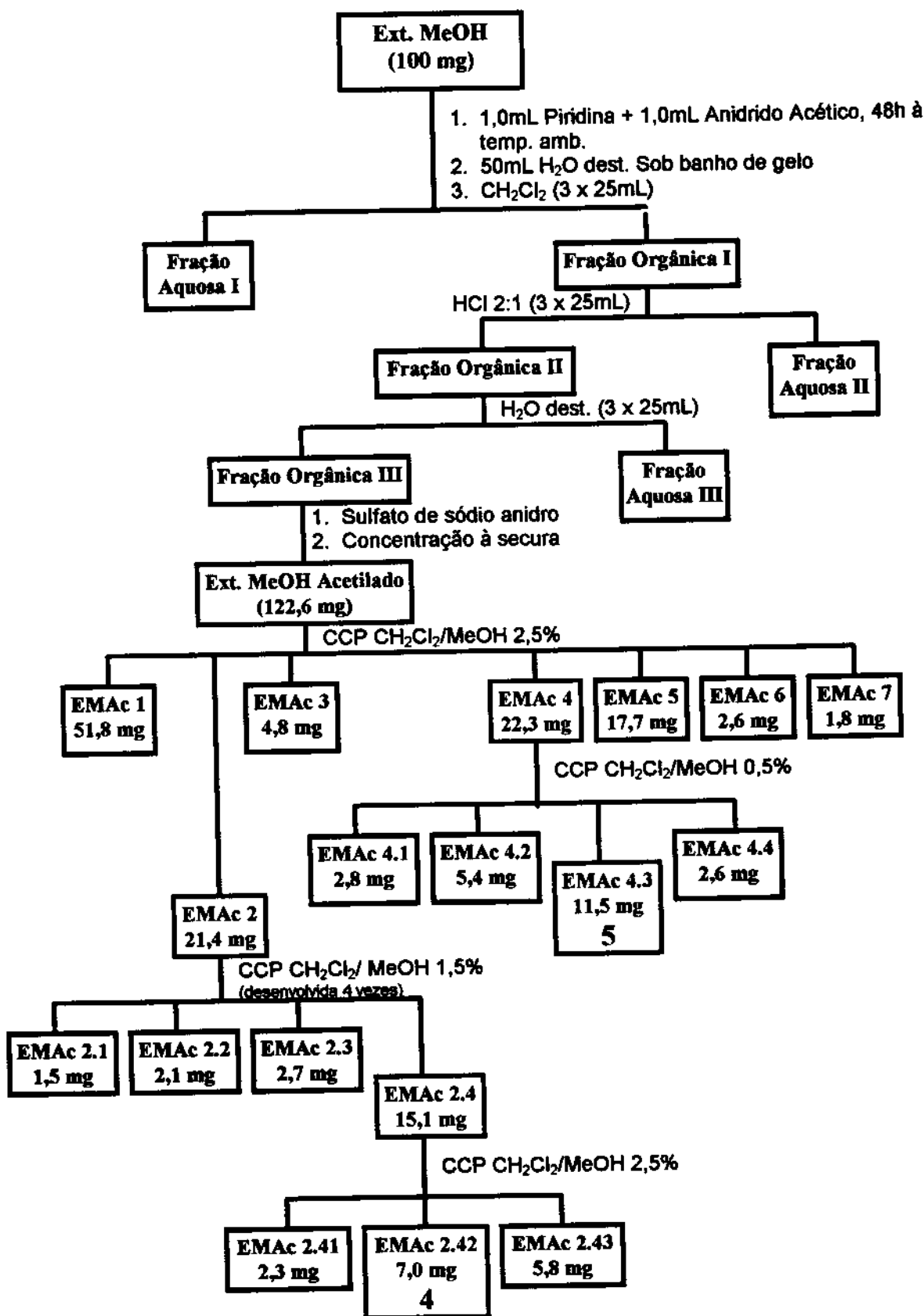
**[a]<sup>D</sup><sub>20</sub>:** não determinado

**RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):** tabela 4, pag. 25

**RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>):** não determinado

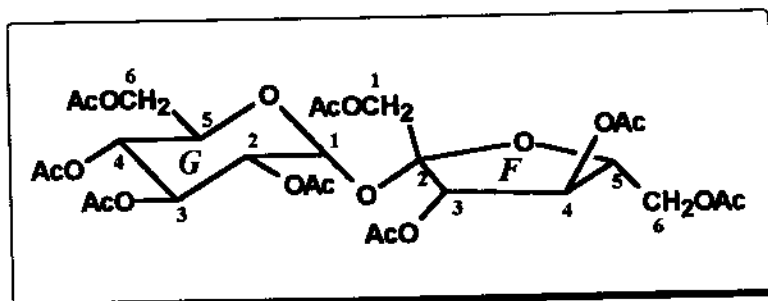
**EM: m/z (%):** 310 (1), 279 (1), 236 (1), 178 (14), 136 (19), 81 (60), 74 (12), 59 (43), 55 (100).

A acetilação do extrato metanólico e análise do produto acetilado seguiram o procedimento descrito no fluxograma abaixo:



## O-β-D-frutofuranosil-(2→1)-α-D-glicopiranosídeo peracetilado

## Sacarose peracetilada (4)



Aspecto físico: óleo amarelado

UV: não determinado

IV: não determinado

$[\alpha]_D^{20}$ : não determinado

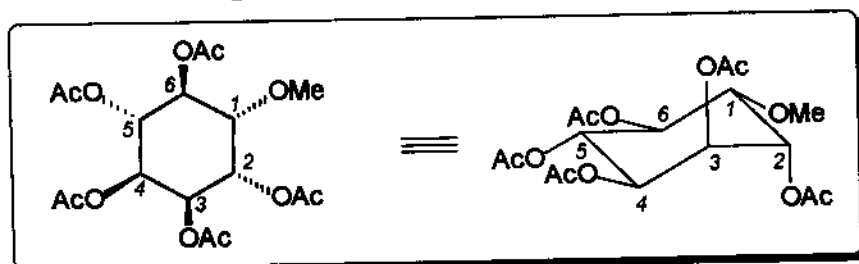
RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): tabela 5, pag. 25

RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>): tabela 6, pag. 25

EM: m/z (%): não determinado

1-O-metil-2,3,4,5,6-penta-acetil-*chiro*-inositol

## Quebrachitol peracetilado (5)



Aspecto físico: óleo incolor

UV: não determinado

IV: não determinado

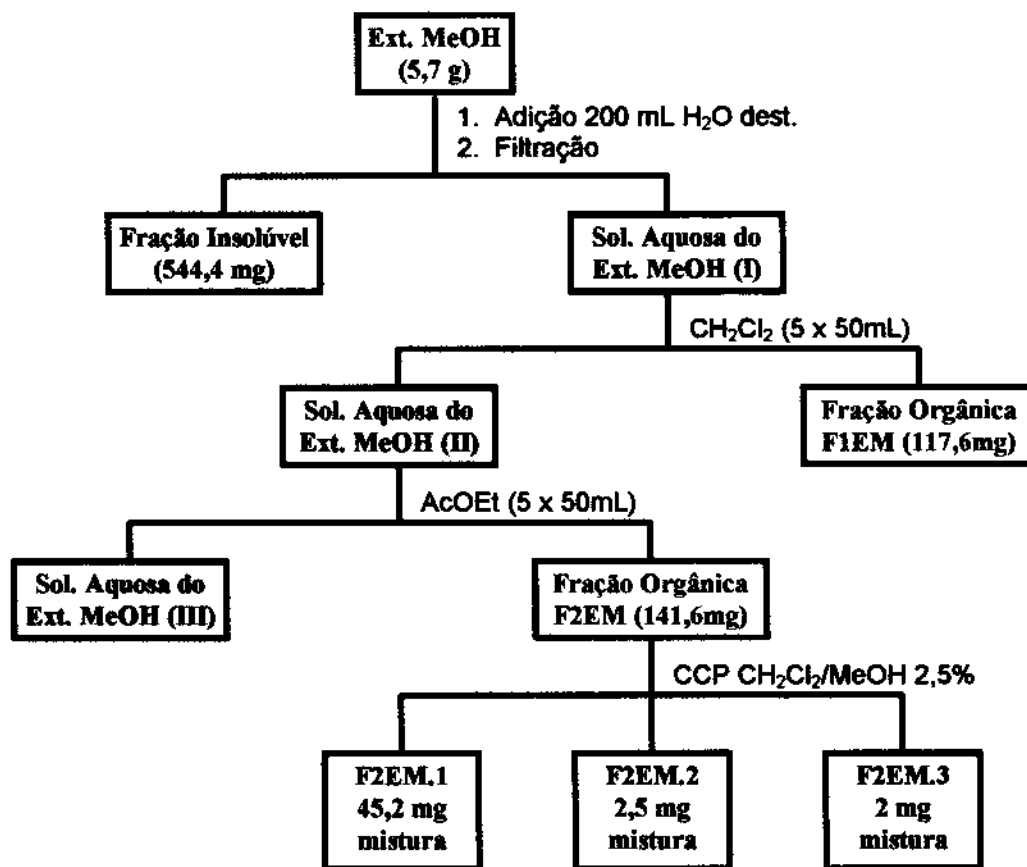
$[\alpha]_D^{20}$ : não determinado

RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): tabela 7, pag. 26

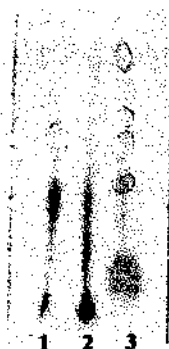
RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>): tabela 8, pag. 26

EM: m/z (%): não determinado

Outro experimento testado foi a partição de uma solução aquosa do extrato metanólico em solventes mais apolares. Assim:



Uma amostra do extrato metanólico, dissolvida em água deuterada, foi enviada para análise do espectro de RMN<sup>1</sup>H; este sugeriu a presença em pequena quantidade de compostos aromáticos (Fig. 1, pág. 27). Análise em CCD desenvolvida com *n*-butanol/ác. acético/ água (BAW) 12:3:5 e revelada com ninidrina (sol. 0,2% em acetona 95%) indicou a presença de compostos nitrogenados (Fig. 2).



- 1: Extrato Hidrometanólico a frio das raízes de *Lonchocarpus atropurpureus*;
  - 2: Extrato Metanólico a quente das raízes de *Lonchocarpus atropurpureus*;
  - 3: Extrato Metanólico a quente das raízes de *Poecilanthe parviflora*.
- Regiões circuladas absorvem no ultravioleta (254nm)

**Figura 2:** CCD dos extratos metanólicos revelada com ninidrina  
Notar as manchas em tons alaranjados.



### 3. Resultados e Discussão:

#### 3. 1. Esteróides:

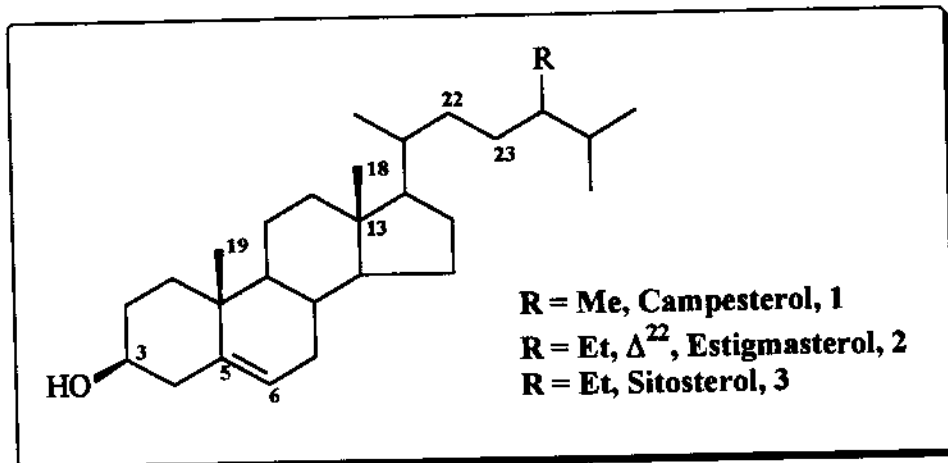


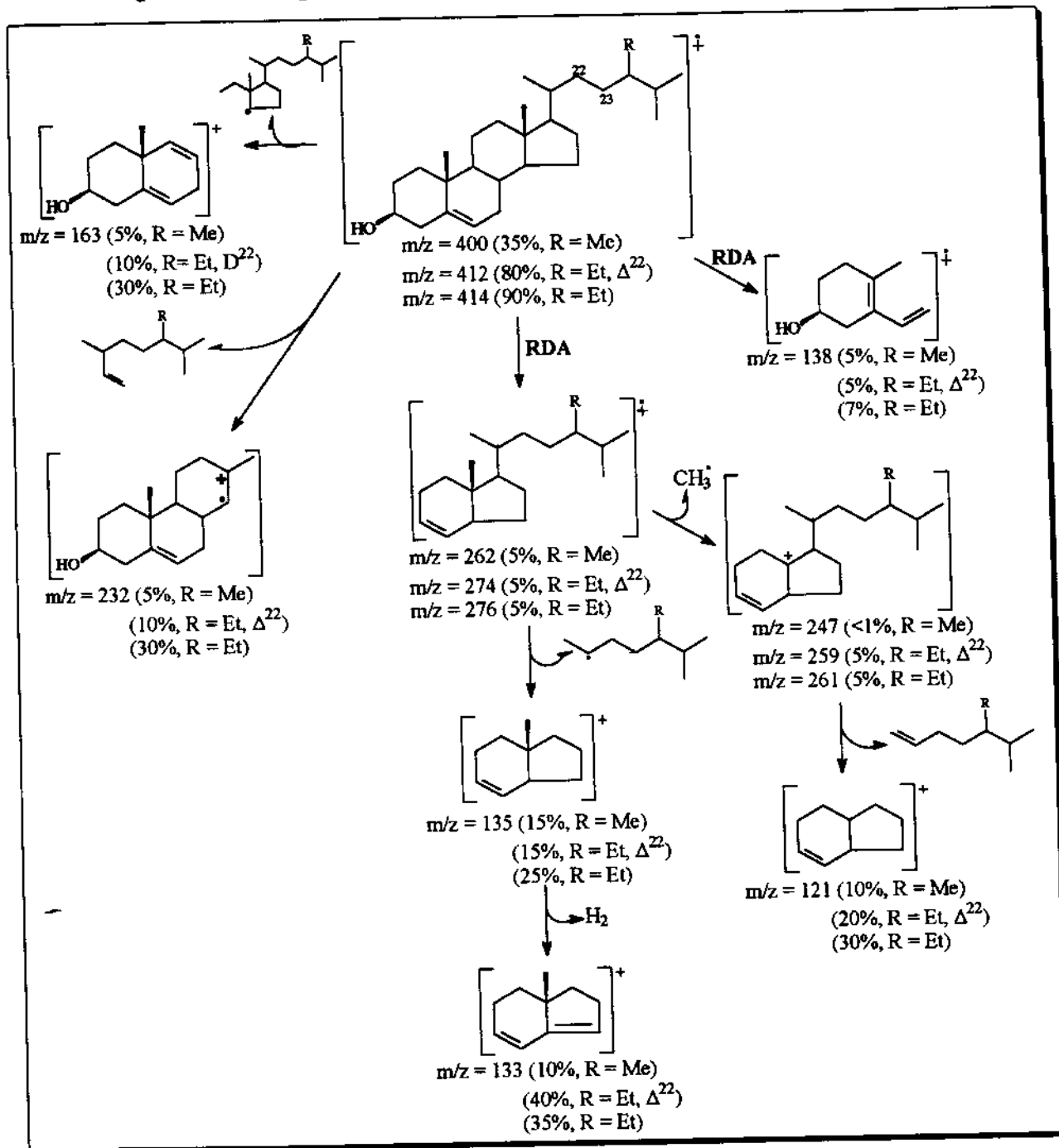
Figura 3: Esteróides isolados

A análise do espectro de RMN<sup>1</sup>H (Tab. 2, pág. 24; Fig. 4, pág. 28) de G 6.1 sugeriu a presença de uma mistura de substâncias de núcleo esteroidal (Fig. 3) devido às absorções características dos hidrogênios da metila angular C-18 (fusão dos anéis C e D) em  $\delta_H$  0,68 - 0,69 (*s*), dos hidrogênios da metila angular C-19 (fusão dos anéis A e B) em  $\delta_H$  0,80 - 0,84 (*s*), do hidrogênio carbinólico em C-3 em  $\delta_H$  3,53 (*m*) e do hidrogênio olefinico em C-6 em  $\delta_H$  5,35 (*d*,  $J = 5,1$  Hz); as absorções em  $\delta_H$  5,02 (*dd*,  $J = 8,4$  e 15,3 Hz) e  $\delta_H$  5,15 (*dd*,  $J = 8,4$  e 15,3 Hz) foram atribuídas aos hidrogênios olefinicos (H-22 e H-23) em *trans* da cadeia lateral. Nos espectros de RMN<sup>13</sup>C e DEPT (Tab. 3, pag. 24; Fig. 5.a e 5.b, pag. 29) destacaram-se os deslocamentos químicos de C-3 ( $\delta$  71,6; CH), C-5 ( $\delta$  140,9; C<sub>0</sub>), C-6 ( $\delta$  121,9; CH), C-22 sp<sup>2</sup> ( $\delta$  138,5; CH), C-23 sp<sup>2</sup> ( $\delta$  129,4; CH), C-22 sp<sup>3</sup> ( $\delta$  33,7; CH<sub>2</sub>) e C-23 sp<sup>3</sup> ( $\delta$  25,8; CH<sub>2</sub>); no espectro DEPT não apareceram sinais em  $\delta$  140,9 (C-5),  $\delta$  36,3 (C-10) e  $\delta$  42,0 (C-13), os quais correspondem aos carbonos quaternários do sistema cíclico<sup>4</sup>. A análise por CG/EM (Fig. 6, pag. 30), mostrou um cromatograma com três picos indicando a presença de três substâncias ( $t_{R1} = 25,77$  min,  $t_{R2} = 26,10$  min e  $t_{R3} = 27,61$  min), as quais foram identificadas pelos respectivos espectros de massas

<sup>4</sup> FERRACIN, R.J. Estudo fitoquímico de *Murraya paniculata*. São Carlos, 1996, Tese Doutor em Ciências, Departamento de Química, UFSCar.

como sendo ergost-5-en-3 $\beta$ -ol (1, campesterol, 15,2%), estigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol (2, estigmasterol, 48,1%) e estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol (3, sitosterol, 36,7%) (quadro 1).

Quadro 1: Proposta de fragmentação<sup>5,6</sup> para os compostos 1, 2 e 3:



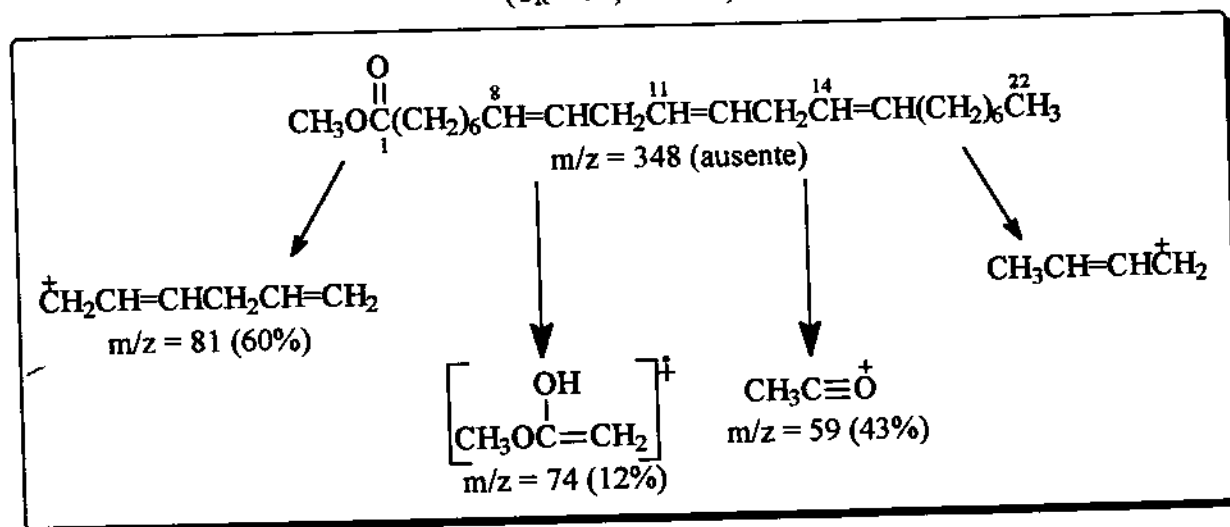
<sup>5</sup> BIEMANN. Mass Spectrometry, MacGraw-Hill, NY, p. 339, 1962.

<sup>6</sup> MUCCINO, R.R. and DJERASSI, C. Mass spectroscopy in structural and stereochemical problems - CCXXXIX. Elucidation of the ring D cleavage in lanostane. *Journal of the American Chemical Society* 96 (2): 556-570, 1974.

## 3. 2. Éster metílico de ácido graxo:

Em análise por CCD, o grupo G-19 mostrou comportamento característico de ácido carboxílico (mancha com cauda), por isso uma alíquota foi metilada com diazometano visando a obtenção dos derivados ésteres metílicos menos polares (mancha arredondada) e portanto com melhor resolução em CCD. Após a metilação observou-se, por CCD, a presença de manchas com R<sub>f</sub> maior (menos polares) e mais arredondadas sugerindo a ocorrência de metilação de alguns compostos. Após purificação, a fração G-19.4 (3,3 mg) mostrou-se a mais interessante (por CCD aparecia como uma mancha única). A análise do cromatograma, por CG/EM (Fig. 7, pag. 31), revelou uma mistura complexa sendo que a análise do espectro de massas do pico principal (T<sub>R</sub> = 13,366min), e comparação com biblioteca Wiley, sugeriu tratar-se de um ácido graxo C-22 com três insaturações em C-8, C-11 e C-14 na forma de seu éster metílico (6); as principais fragmentações foram descritas no quadro 2.

Quadro 2: Proposta de fragmentação para o éster metílico do ácido 8,11,14-docosatrienóico (T<sub>R</sub> = 13,366 min)



O espectro de RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>, Fig. 8, pag. 32) de G-19.4 apresentou algumas absorções características <sup>7</sup> de um grupo CH<sub>2</sub> vizinho à carbonila ( $\delta_{\text{H}}$  2,17, *m*), de uma metoxila ( $\delta_{\text{H}}$  3,67, *s*) e de hidrogênios olefinicos em *cis* ( $\delta_{\text{H}}$  5,45, *dt*, *J* = 11 e 7 Hz).

<sup>7</sup> GUSTONE, F.D. An introduction to the chemistry and biochemistry of fatty acids and their glycerides. Chapman and Hall Ltd. Chapter 23, page 45, 1967.

## 3. 3. Sacarose Octa-acetilada:

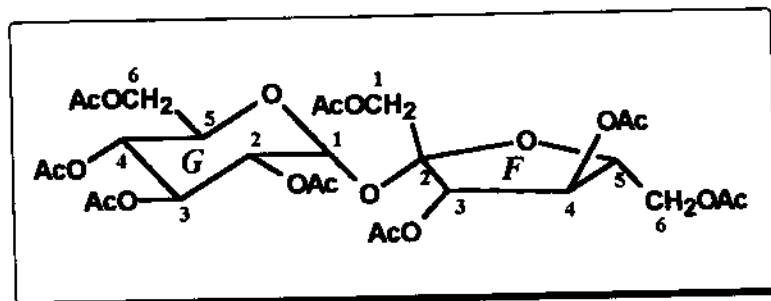


Figura 9: Estrutura da sacarose acetilada

O composto 4 foi identificado como sacarose na forma de seu derivado octa-acetilado (Fig. 9); seu espectro de RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>, Tab. 5, pag. 25; Fig. 10, pag. 33) apresentou absorções referentes ao H-1 (hidrogênio anomérico) em  $\delta_H$  5,69 (*d*,  $J = 3,7$ ), ao H-2 em  $\delta_H$  4,88 (*dd*,  $J = 3,7$  e 10,3 Hz) e ao H-4  $\delta_H$  5,08 (*t*,  $J = 9,7$  Hz), todos característicos para o resíduo glicose; as metilas dos grupos acetila mostraram oito absorções características entre  $\delta_H$  2,02 e 2,18 (singletos). No espectro de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Tab. 6, pag. 25; Fig. 11.a e 11.b, pag. 34) os oito sinais entre  $\delta_C$  20,4 e 20,5 e oito entre  $\delta_C$  169,9 e 171,1 foram característicos para os grupos acetila (CH<sub>3</sub> e C=O, respectivamente); as absorções características para os carbonos do resíduo frutose foram localizadas em  $\delta_C$  62,8 (CH<sub>2</sub>, C-1),  $\delta_C$  63,6 (CH<sub>2</sub>, C-6),  $\delta_C$  74,9 (CH, C-4),  $\delta_C$  75,6 (CH, C-3),  $\delta_C$  79,1 (CH, C-5),  $\delta_C$  104,1 (C<sub>0</sub>, C-2) sendo este último o carbono anomérico da frutose e envolvido na ligação entre os dois açúcares. Para o resíduo glicose foram atribuídas as seguintes absorções características em  $\delta_C$  61,7 (CH<sub>2</sub>, C-6),  $\delta_C$  68,1 (CH, C-4),  $\delta_C$  68,4 (CH, C-5),  $\delta_C$  69,6 (CH, C-3),  $\delta_C$  70,2 (CH, C-2),  $\delta_C$  89,9 (CH, C-1, carbono anomérico da glicose). Estes dados foram confirmados pela literatura<sup>8,9</sup> e pelos dados espectrais (Figs. 12 a 14, pag. 35-37) de sacarose P.A. acetilada segundo a mesma metodologia empregada para o extrato.

<sup>8</sup> NISHIDA, T., ENZELL, C.R. and MORRIS, G.A. Concerted use of homo- and hetero-nuclear 2D NMR: <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H assignment of sucrose octaacetate. *Magnetic Resonance in Chemistry* 24 (2): 179-182, 1986.

<sup>9</sup> BINKLEY, W.W.; HORTON, D. and BHACCA, N.S. Physical studies on oligosaccharides related to sucrose - Part I. NMR studies on the peracetates of sucrose, 1-ketose and nystose. *Carbohydrate Research* 10 (2): 245-258, 1969.

## 3. 4. Quebrachitol peracetilado:

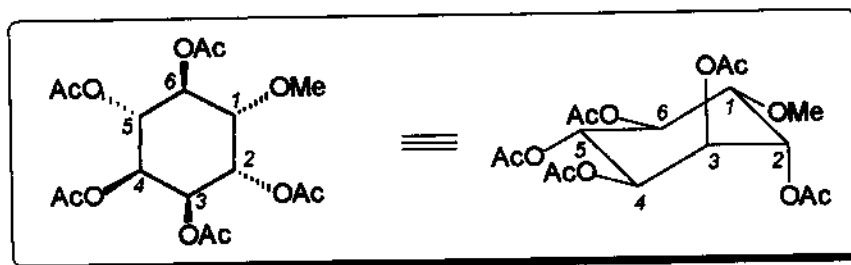


Figura 15: Quebrachitol peracetilado

O estudo dos dados de RMN<sup>1</sup>H sugeriu a presença de seis hidrogênios carbinólicos distribuídos em um duplo dubleto em  $\delta_H$  3,60 (1H, *dd*,  $J = 3$  e 6 Hz, H-1) atribuído a um hidrogênio axial vizinho a uma metoxila, um multipletto em  $\delta_H$  5,22 (3H, *m*, H-4, H-5 e H-6) referente a três hidrogênios axiais e em  $\delta_H$  5,45 (2H, *m*, H-2 e H-3) referentes a dois hidrogênios equatoriais (RMN<sup>1</sup>H, 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Tab. 7, pag. 26; Fig. 16, pag. 38); verificou-se também a presença de sinais em  $\delta_H$  2,05, 2,06, 2,09, 2,11 e 2,12 (singletos) referentes às metilas de cinco grupos acetila e em  $\delta_H$  3,41 (3H, *s*) atribuído aos hidrogênios de uma metoxila. Estes dados indicavam uma estrutura polidroxilada que poderia ser um açúcar ou um cicitol; o esqueleto de um açúcar foi excluído pela ausência de um sinal mais desprotegido e integrando para um hidrogênio anomérico. Juntamente com os dados de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Tab. 8, pag. 26; Fig. 17.a e 17.b, pag. 39) que apresentou sinais em  $\delta_C$  58,7 (CH<sub>3</sub>, metoxila),  $\delta_C$  67,5 (CH, C-2 e C-3),  $\delta_C$  68,8 (CH, C-5),  $\delta_C$  68,9 (CH, C-6 e C-4),  $\delta_C$  77,6 (CH, C-1) e dados da literatura<sup>10,11</sup> chegou-se ao esqueleto 1-O-metil-*chiro*-inositol (quebrachitol) que foi isolado na forma do derivado penta-acetilado (quebrachitol peracetilado, 5, figura 15); no espectro de RMN<sup>13</sup>C os acetatos foram caracterizados pelas absorções em  $\delta_C$  20,62, 20,67, 20,74 e 20,81(CH<sub>3</sub>)  $\delta_C$  168,9, 169,4, 169,6, 169,8 e 169,9 (C=O, cinco carbonilas); todos esse dados foram confirmados pelo espectro HETCOR (Tab. 9, pag. 26; Fig. 18, pag. 40). Este ciclitol já foi iso-

<sup>10</sup> LICHTENTHALER, F.W. and EMIG, P. N.M.R. - Studien an zuckern und cyclanolen - Zusammenhang zwischen sterischer orientierung von O- und N-acetyl-gruppen und der signallage ihrer methyl-resonanzen bei cyclit- und aminocyclit-polyacetaten. *Carbohydrate Research* 7: 121-137, 1968.

<sup>11</sup> DORMAN, D.E.; ANGYAL, S.J. and ROBERTS, J.D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of some inositols and their o-methylated derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 92 (5): 1351-1354, 1970.

lado, na sua forma livre, da seiva do xilema de *Acer platanoides*<sup>12</sup>, do pericarpo de *Sapindus rarak* DC (Sapindaceae)<sup>13</sup> e das raízes de *Zanha africana*<sup>14</sup>; foram encontrados também vários relatos do uso deste ciclitol como um precursor em sínteses assimétricas de compostos bioativos.

### 3. 5. Compostos Nitrogenados:

Segundo a literatura<sup>15</sup> cinco alcalóides foram detectados por CG/EM nas folhas e sementes de *P. parviflora*; evidenciou-se, em nosso grupo de pesquisa, a presença de compostos nitrogenados no extrato metanólico das raízes através da experiência cromatográfica usando BAW como sistema de desenvolvimento e solução de ninidrina como revelador. A ocorrência de manchas de alaranjado a marrom indicaram a presença de compostos nitrogenados, porém não foi possível dedicar maior atenção no isolamento e caracterização destes compostos uma vez que a metodologia disponível em nossa laboratório não permitiria o isolamento desses compostos mais polares; por outro lado a tentativa de estabelecer uma nova metodologia poderia envolver muito tempo, sob o risco de expirar o prazo do mestrado sem ter resultados concretos para a apresentação de uma tese. Desta forma decidiu-se iniciar estudo fitoquímico de uma segunda planta (Capítulo II).

<sup>12</sup> SCHILL, V.; HARTUNG, W.; ORTHEN, B. and WEISENSEEL, M.H. The xilem sap of maple (*Acer platanoides*) trees - Sap obtained by a novel method shows changes with season and height. *Journal of Experimental Botany* 47 (294), 123-133, 1996.

<sup>13</sup> CHUNG, M.S.; KIM, N.C.; LONG, L.; SHAMON, L.; AHMAD, W.Y.; SAGRERONIEVES, L.; KARDONO, L.B.S.; KENNELLY, E.J.; PEZZUTO, J.M.; SOEJARTO, D.D. and KINGHORN, A.D. Dereplication of saccharide and polyol constituents of candidate sweet-tasting plants: isolation of the sesquiterpene glycoside mukurozioside IIB as a sweet principle of *Sapindus rarak*. *Phytochemical Analysis* 8 (2), 49-54, 1997.

<sup>14</sup> MSONTHI, J.; HOSTETTMANN, K.; CUELLAR, M.J.; GINER, R.M.; RECIO, M.D.C.; JUST, M.J. and MANEZ, S. Three new oleanane saponins from *Zanha africana*. *Journal of Natural Products* 60 (2), 191-194, 1997.

<sup>15</sup> GREINWALD, R., BACHMANN, P., LEWIS, G., WITTE, L. and CZYGAN, F.-C. Alkaloids of the genus *Poecilanthe* (Leguminosae: Papilionoideae). *Biochemical Systematics and Ecology* 23 (5): 547-553, 1996.

## Apêndice A: Tabelas:

Tabela 2: Dados Experimentais de RMN<sup>1</sup>H da mistura de esteróides

Sinal ( $\delta$ )	multiplicidade	Sinal ( $\delta$ )	multiplicidade
0,68	s, CH <sub>3</sub> ang C-18	5,02	dd, J = 8,4 e 15,3 Hz
0,69	s, CH <sub>3</sub> ang C-18	5,15	dd, J = 8,4 e 15,3 Hz
0,80 -0,84	m, CH <sub>3</sub> ang C-19	5,35	d, J = 5,1 Hz
3,53	m, HO-3		

Tabela 3: Dados de RMN<sup>13</sup>C da mistura de esteróides

Carbono	Mistura ( $\delta$ ) <sup>*</sup>	Estigmasterol( $\delta$ ) <sup>#</sup>	$\beta$ -Sitosterol ( $\delta$ ) <sup>#</sup>	Campesterol( $\delta$ ) <sup>#</sup>
1	37,1	37,2	37,2	37,2
2	31,7	31,8	31,8	31,8
3	71,6 ✓	71,5	71,5	71,5
4	42,1	42,2	42,2	42,2
5	140,9	140,7	140,7	140,7
6	121,9	121,6	121,6	121,6
7	33,7	33,6	33,6	33,6
8	33,5	33,6	33,6	33,6
9	50,0	50,1	50,1	50,1
10	36,3	36,4	36,4	36,4
11	20,9	21,1	21,1	21,1
12	39,6	39,7	39,7	39,7
13	42,0	42,2	42,2	42,2
14	56,7	56,7	56,7	56,7
15	24,1	24,2	24,2	24,2
16	28,0	28,3	28,3	28,3
17	55,9	56,0	56,0	56,0
18	12,0	12,1	12,1	12,1
19	19,1	19,2	19,2	19,2
20	40,3	40,3	40,3	40,3
21	20,3	20,5	18,7	21,1
22	138,5 / 33,7/38,0	137,9	33,9	38,1
23	129,4 / 25,8	129,8	26,0	29,2
24	51,1 / 45,7	51,2	45,8 ✓	51,1
25	32,2 / 29,5	31,9	29,1	31,8
26	19,9 ✓	21,2	19,8	21,0
27	19,5	19,8	19,0	19,0
28	25,2 / 22,8	25,4	23,0	25,3
29	11,7 ✓	11,9	11,8	—

\* Resultado Experimental, # Literatura<sup>1</sup><sup>1</sup> FERRACIN, R.J. Estudo fitoquímico de *Murraya paniculata*. São Carlos, 1996, Tese Doutor em Ciências, Departamento de Química, UFSCar.

Tabela 4: RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>/TMS, 300 MHz) da mistura 6:

Sinal (δ)	multiplicidade
2,17	m, H-2
3,67	s, OCH <sub>3</sub>
5,45	dt, J = 11 e 7 Hz, hidrogênios olefinicos em <i>cis</i>

Tabela 5: Dados de RMN<sup>1</sup>H de Sacarose Octa-acetilada (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

Sinal	<sup>1</sup> H <sub>A</sub>	<sup>1</sup> H <sub>B</sub>	C <sup>1</sup> H <sub>3</sub> <sub>A</sub>	C <sup>1</sup> H <sub>3</sub> <sub>B</sub>
G1	5.69	5.69	—	—
G2	4.87	4.88	2.10	2.10
G3	5.44	—	2.02	2.02
G4	5.08	5.08	2.05	2.05
G5	4.28*	—	—	—
G6	4.14*, 4.28*	—	2.10	2.10
F1	4.17	—	2.12	2.12
F2	—	—	—	—
F3	5.47	—	2.18	2.18
F4	5.36	—	2.11	2.11
F5	4.21	—	—	—
F5	4.35, 4.29	—	2.12	2.12

A - dados da literatura<sup>2</sup> em CDCl<sub>3</sub> a 299.943 MHz; B - dados experimentais em CDCl<sub>3</sub> a 300.067 MHz

Tabela 6: Dados de RMN<sup>13</sup>C de Sacarose Octa-acetilada (CDCl<sub>3</sub>):

Sinal	<sup>13</sup> C <sub>A</sub>	<sup>13</sup> C <sub>B</sub>	CO <sub>A</sub>	CO <sub>B</sub>	<sup>13</sup> CH <sub>3</sub> <sub>A</sub>	<sup>13</sup> CH <sub>3</sub> <sub>B</sub>
G1	89.93	89.94	—	—	—	—
G2	70.26	70.21	170.07	170.47	20.64 <sup>#</sup>	20.43
G3	69.61	69.58	170.01	170.43	20.66	20.43
G4	68.17	68.11	169.50	169.89	20.61	20.38
G5	68.50	68.43	—	—	—	—
G6	61.75	61.66	170.66	171.10	20.58 <sup>#</sup>	20.35
F1	62.85	62.79	170.09	170.48	20.69 <sup>‡</sup>	20.48
F2	104.02	104.07	—	—	—	—
F3	75.68	75.63	169.65	170.05	20.56	20.35
F4	74.98	74.92	169.88	170.29	20.72	20.48
F5	79.14	79.09	—	—	—	—
F6	63.63	63.58	170.46	170.89	20.63 <sup>‡</sup>	20.38

A - dados da literatura<sup>2</sup> a 75.429 MHz; B - Dados experimentais a 75.452 MHz; ambos em CDCl<sub>3</sub>

<sup>2</sup> NISHIDA, T.; ENZELL, C.R. and MORRIS, G.A. Concerted use of homo- and hetero-nuclear 2D NMR: <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H assignment of sucrose octaacetate. *Magnetic Resonance in Chemistry* 24 (2): 179-182, 1996.



**Tabela 7:** Dados de RMN<sup>1</sup>H 1-O-metil-*chiro*-inositol (quebrachitol) peracetilado:

Sinal $\delta_A$	Sinal $\delta_B$	H, multiplicidade
1,98	2,05	3H, s, -O-CO-CH <sub>3</sub> eq.
2,00	2,06	3H, s, -O-CO-CH <sub>3</sub> eq.
2,03	2,09	3H, s, -O-CO-CH <sub>3</sub> eq.
2,14 (2H)	2,11	3H, s, -O-CO-CH <sub>3</sub> ax.
—	2,12	3H, s, -O-CO-CH <sub>3</sub> ax.
—	3,41	3H, s, OCH <sub>3</sub> -1
—	3,60	1H, dd, J = 3 e 6 Hz, H-1 ax.
—	5,22	3H, m, H-4, H-5 e H-6 axiais
—	5,45	2H, m, H-2 e H-3 equatoriais

A - dados da literatura<sup>3</sup> em CDCl<sub>3</sub> em Varian A-60; B - dados experimentais em CDCl<sub>3</sub> a 300.067 MHz.

**Tabela 8:** RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - Dados Experimentais - Quebrachitol peracetilado

Carbono	Sinal $\delta$	Carbono	Sinal $\delta$
1	77,6	5	68,8
2	67,4	6	68,9
3	67,4	O-CH <sub>3</sub>	58,7
4	68,9	O-COCH <sub>3</sub>	20,62, 20,64, 20,74, 20,81
		O-COCH <sub>3</sub>	168,9, 169,4, 169,6, 169,8 169,9

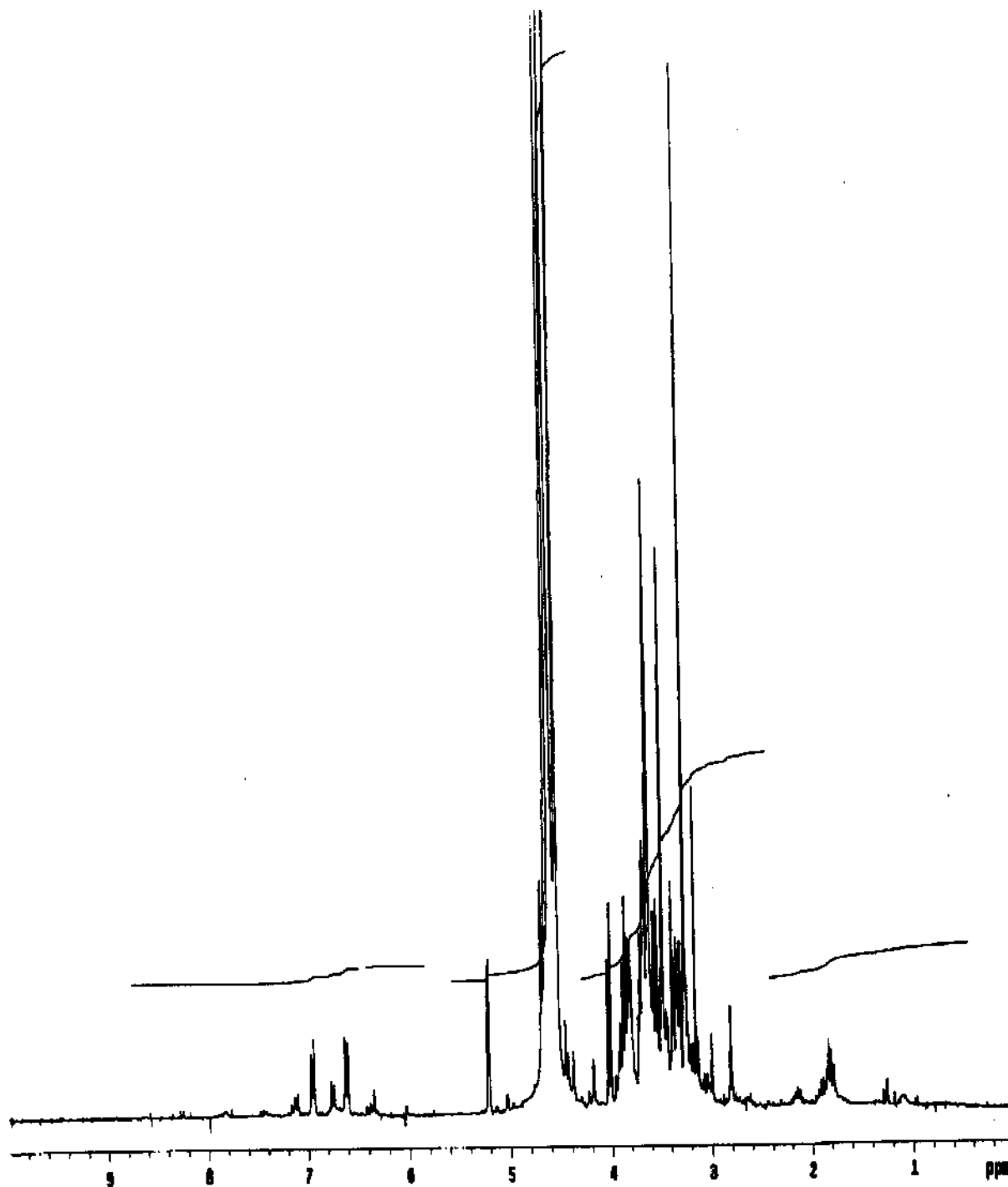
**Tabela 9:** Experimento HETCOR

Sinal	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	77,6	3,60
2	67,4	5,54
3	67,4	5,54
4	68,9	5,22
5	68,8	5,22
6	68,9	5,22
O-CH <sub>3</sub>	58,7	3,41

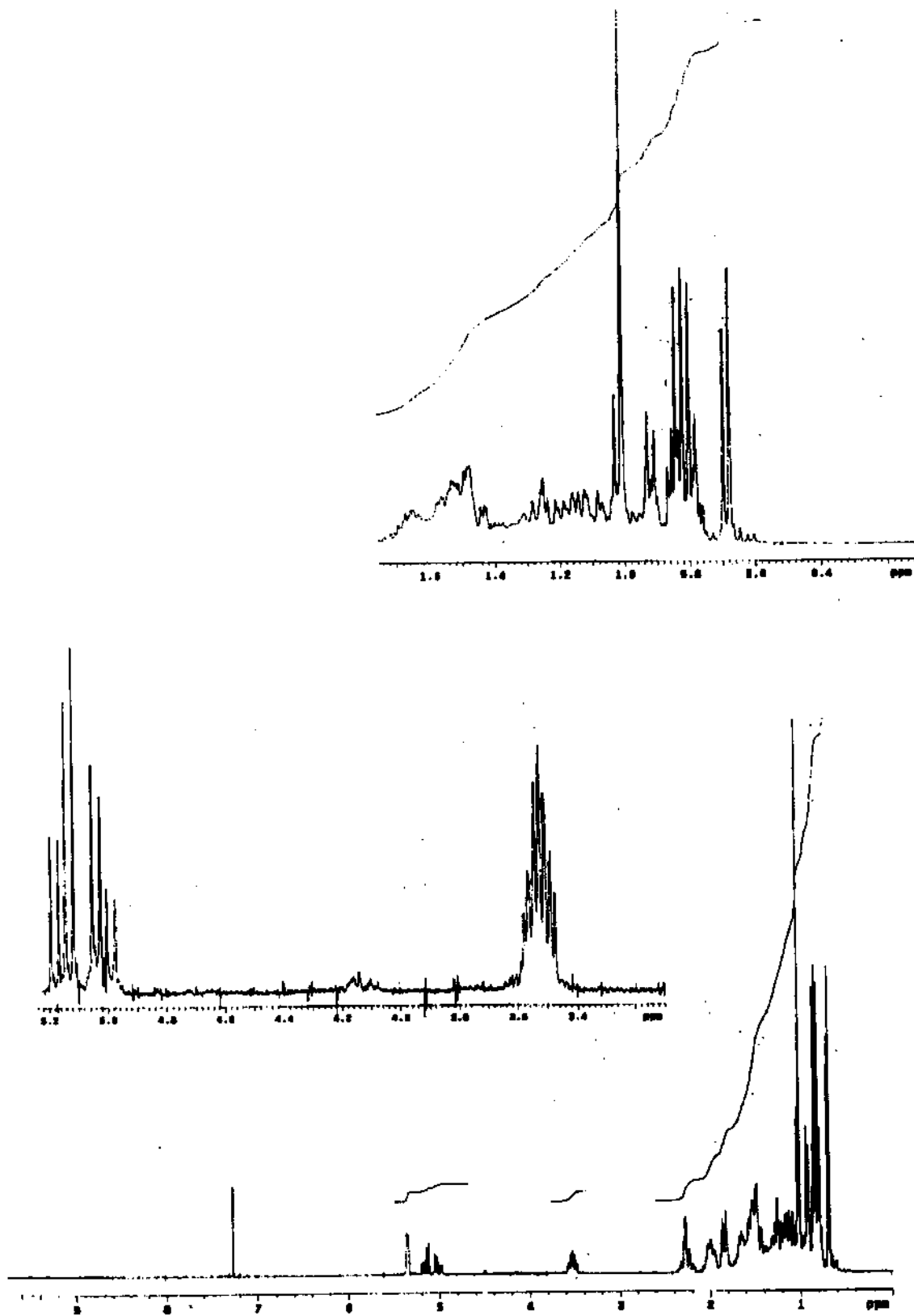
Sinal	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
O-COCH <sub>3</sub>	20,62, 20,64, 20,74, 20,81	2,05, 2,06, 2,09, 2,11, 2,12

<sup>3</sup> LICHTENTHALER, F.W. und EMIG, P. N.M.R. - Studien an zuckern und cyclanolen - Zusammenhang zwischen sterischer orientierung von O- und N-acetyl-gruppen und der signallage ihrer methyl-resonanzen bei cyclit- und aminocyclit-polyacetaten. *Carbohydrate Research* 7 : 121-137, 1968.

## Apêndice B: Figuras:



**Figura 1:** RMN $^1\text{H}$  (300 MHz, D $_2\text{O}$ ) do extrato metanólico total de *Poecilanthe parviflora*



**Figura 4:**  $\text{RMN}^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) da mistura 1 + 2 + 3.

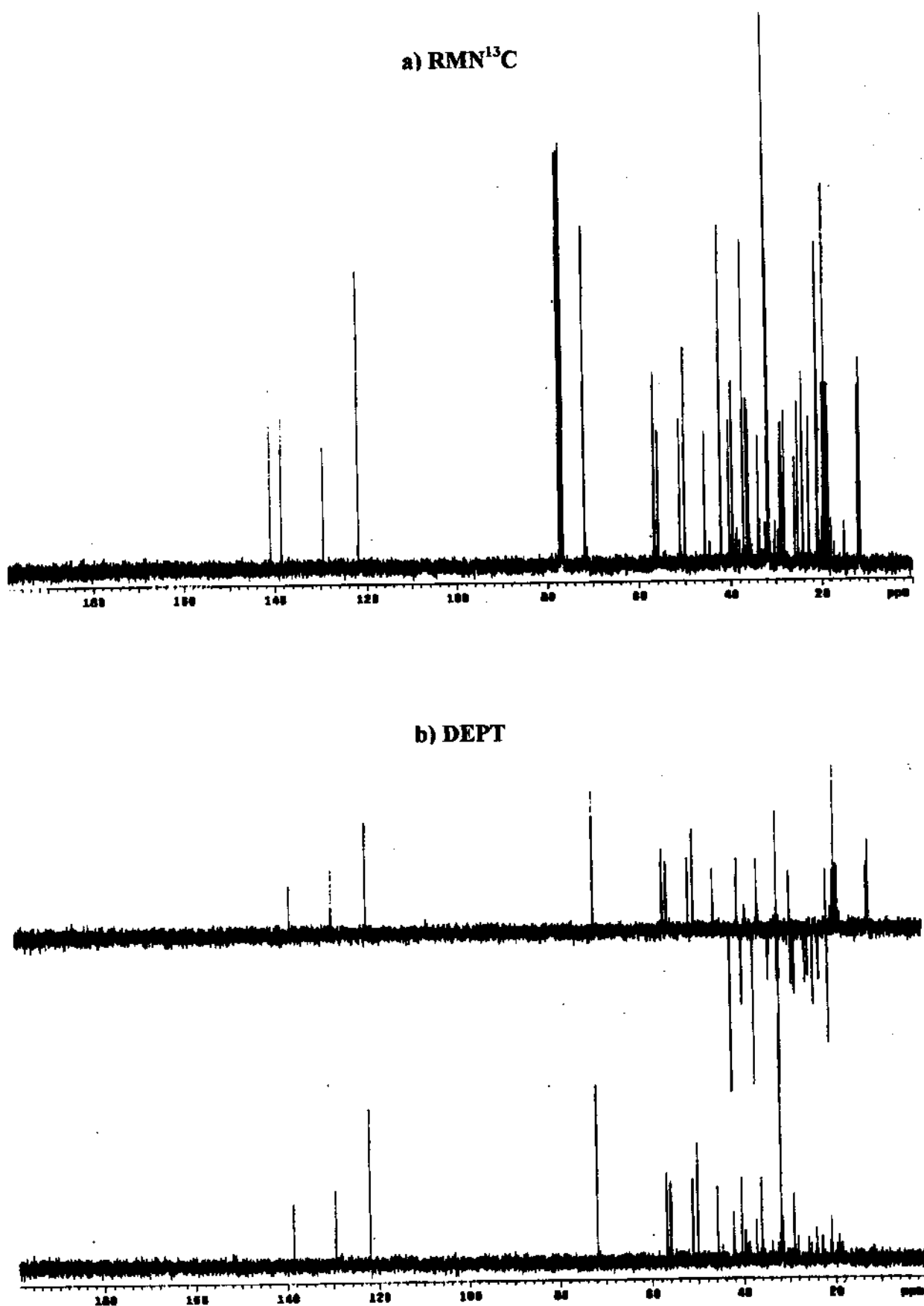


Figura 5: RMN<sup>13</sup>C (a) e DEPT (b) da mistura 1 + 2 + 3.

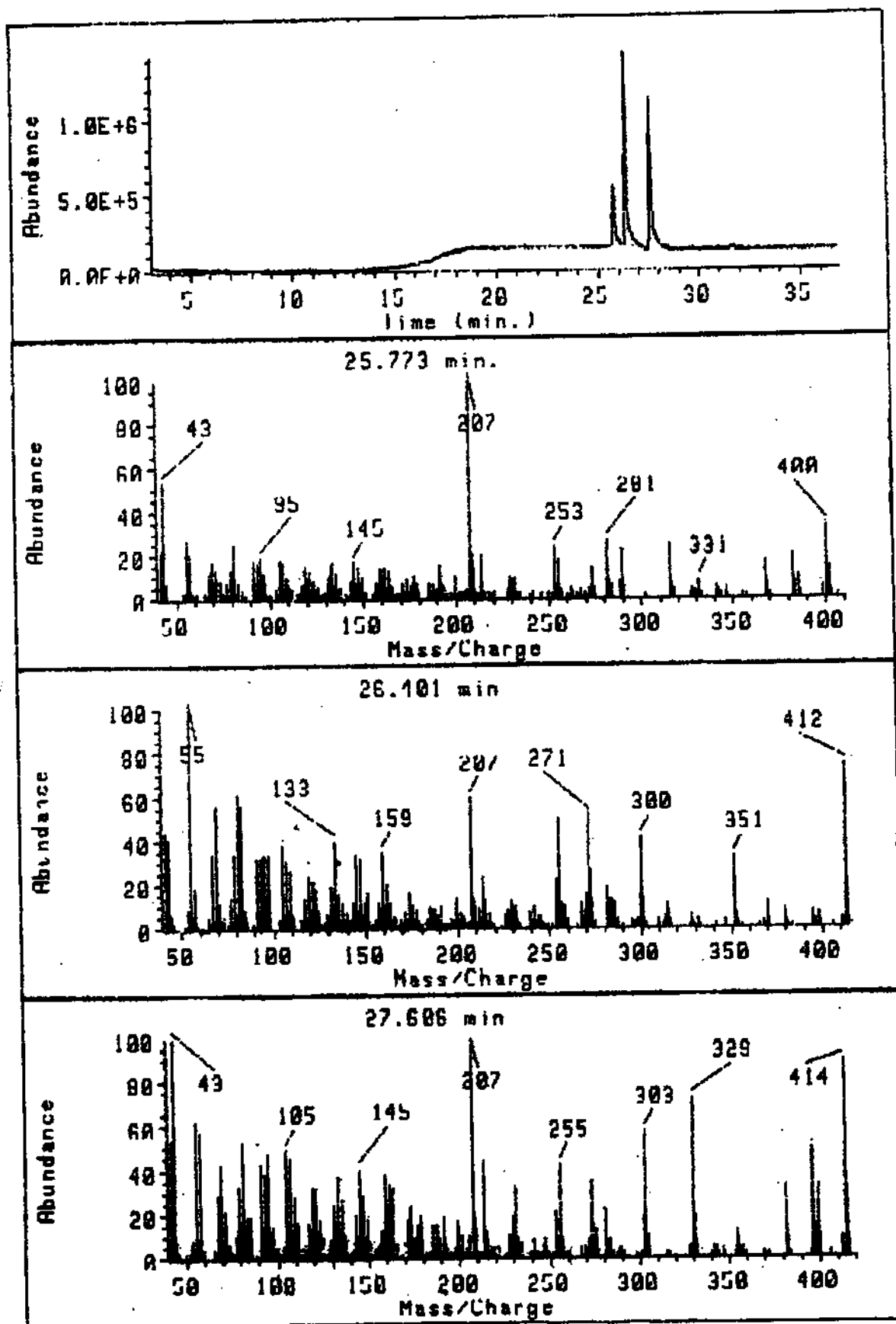
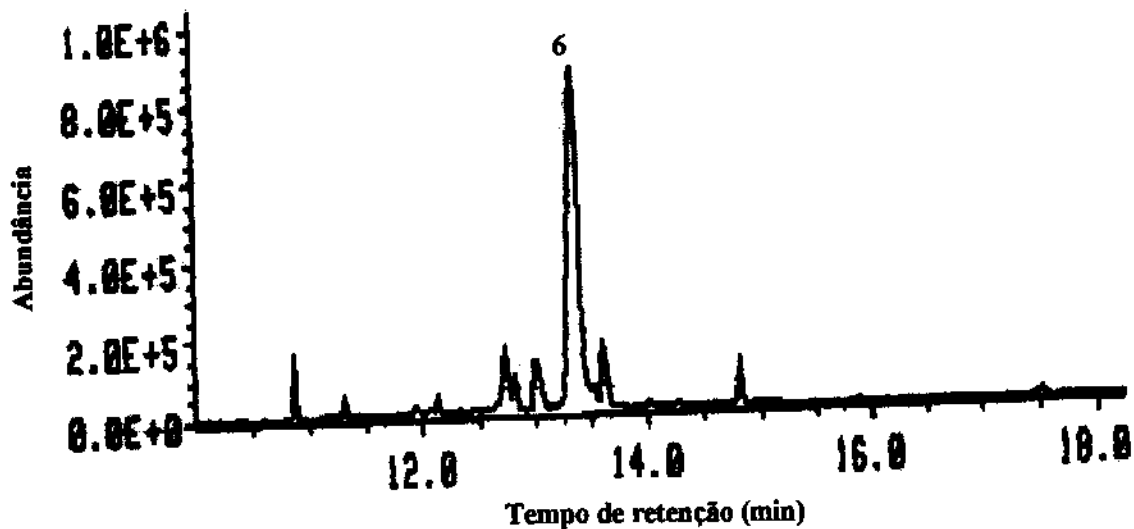
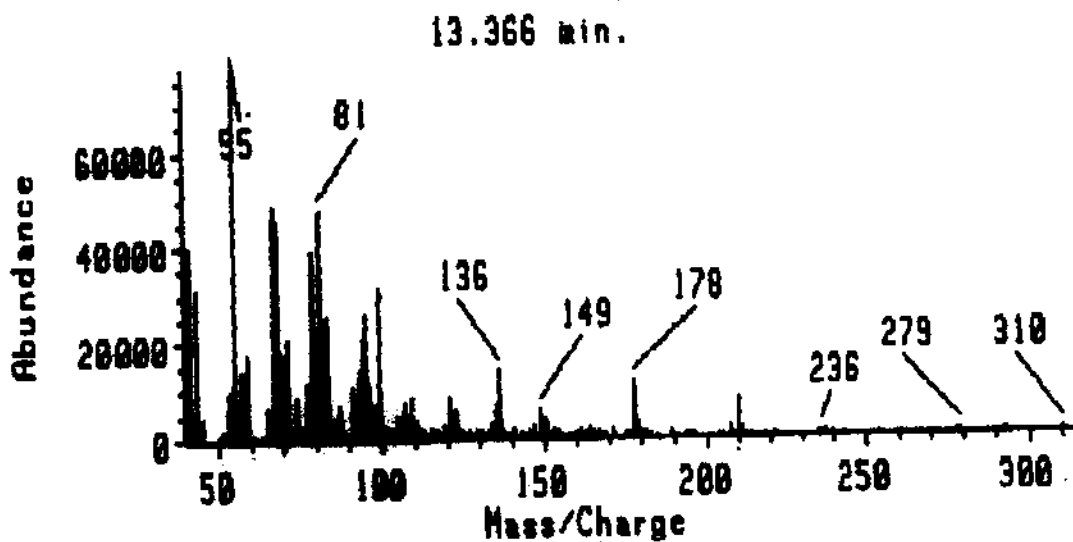


Figura 6: CG/EM de 1, 2 e 3.

Obs.: O pico em m/z 207 corresponde a uma impureza.



Cromatograma de G-19.4



Espectro de massas do pico principal 6 ( $T_R = 13,366\text{min}$ )

Figura 7: CG/EM de 6.

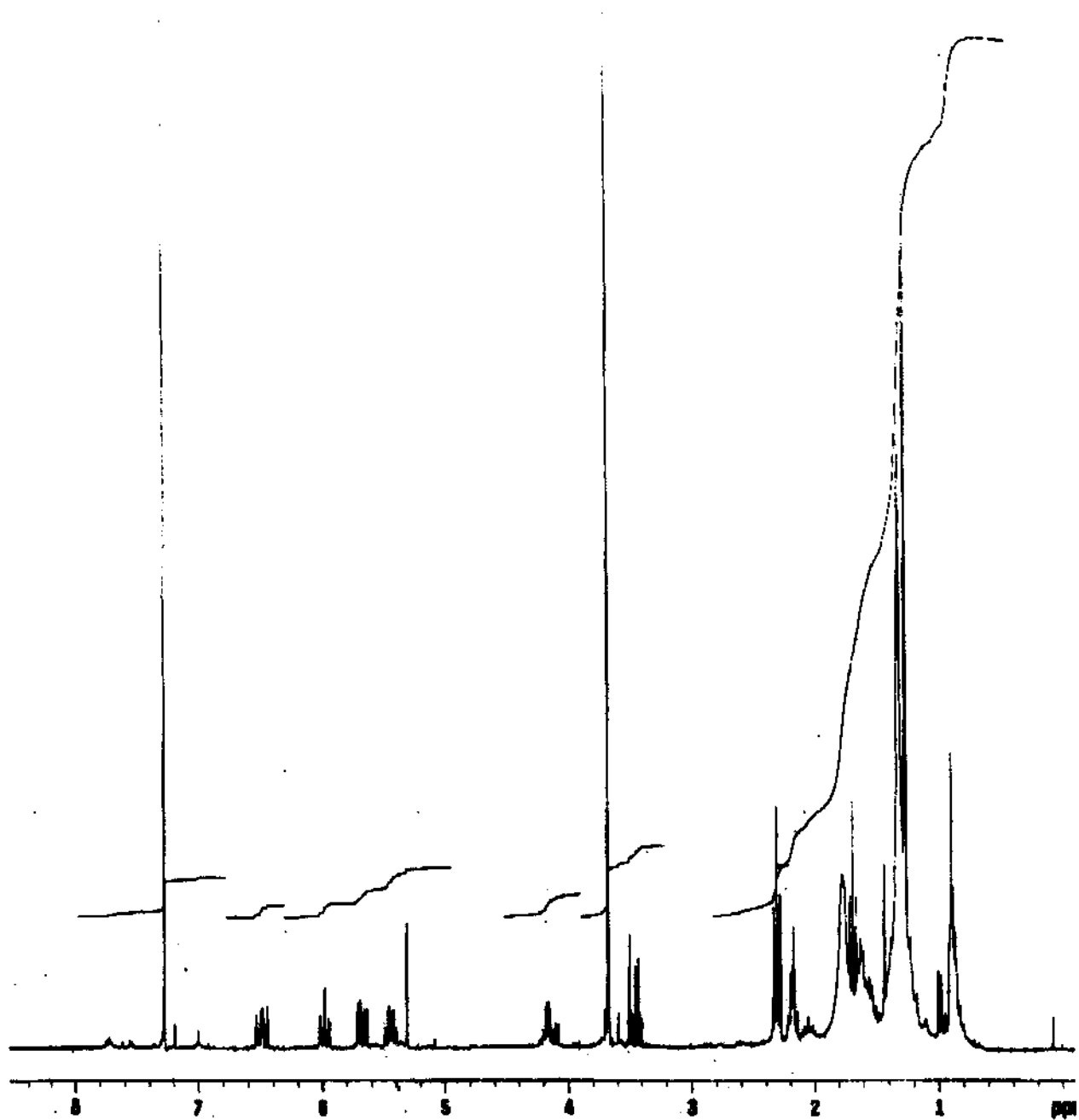
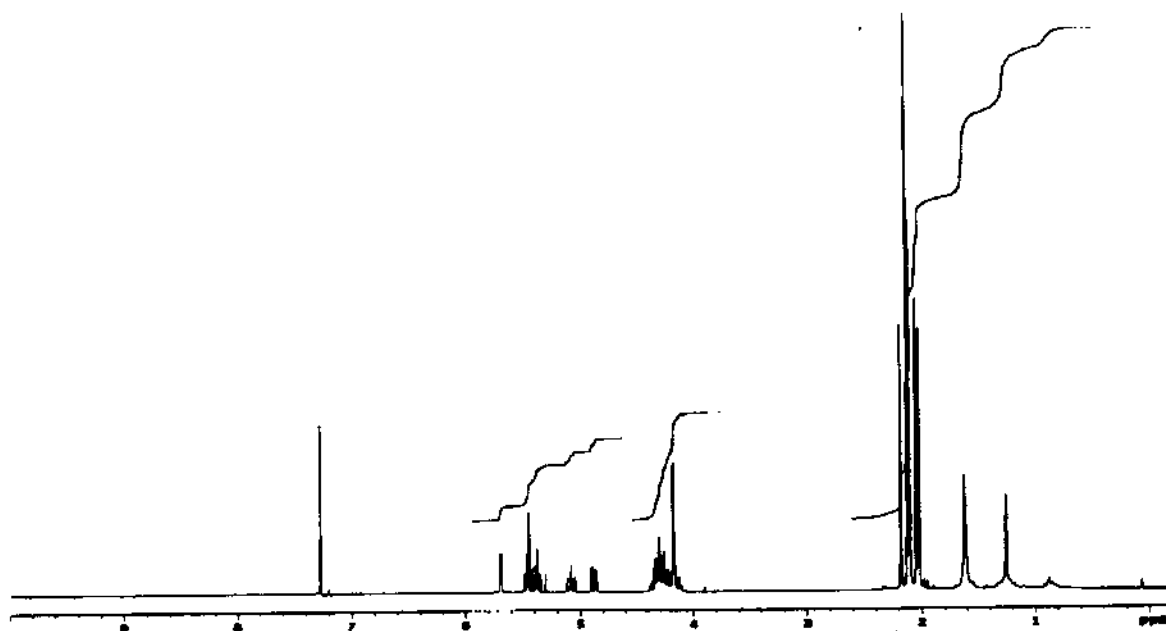
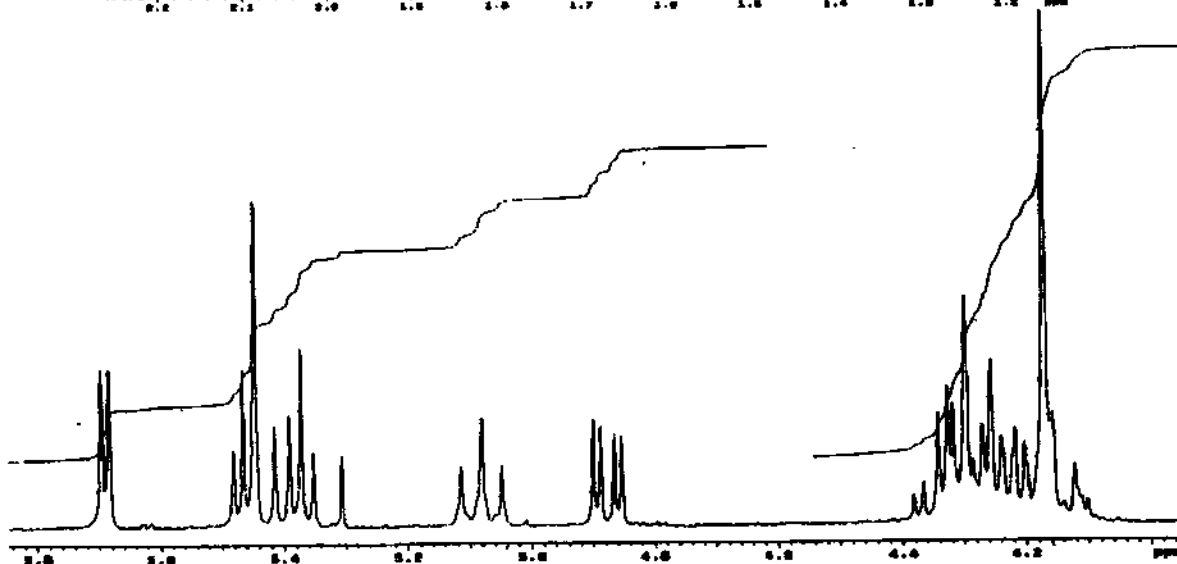
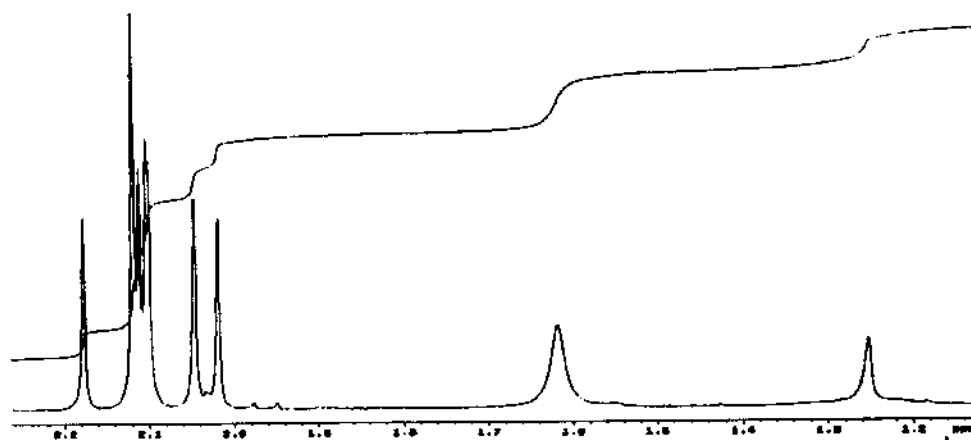


Figura 8:  $\text{RMN}^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura 6.



Espectro total



Expansões

Figura 10: RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto 4.



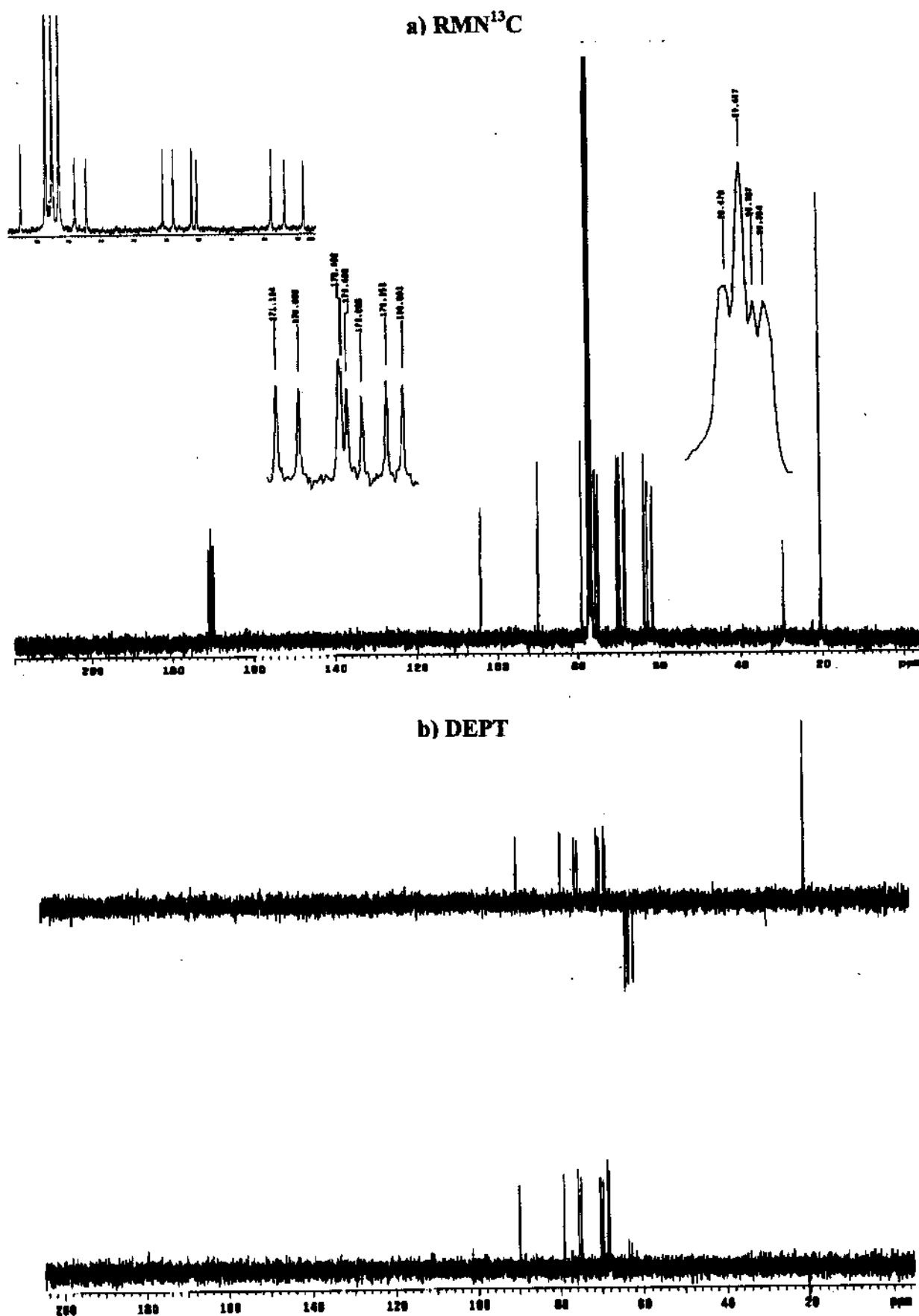
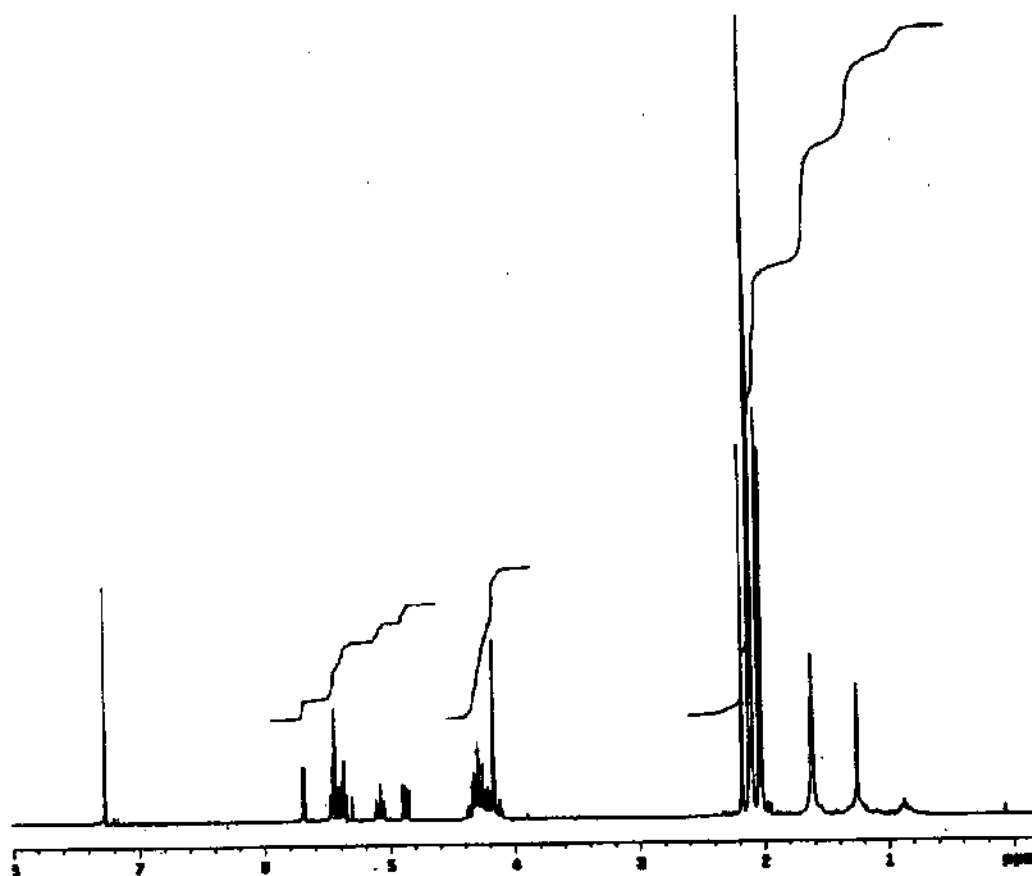


Figura 11: RMN<sup>13</sup>C (a) e DEPT (b) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto 4.



**Figura 12:** RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Sacarose P.A. peracetilada.

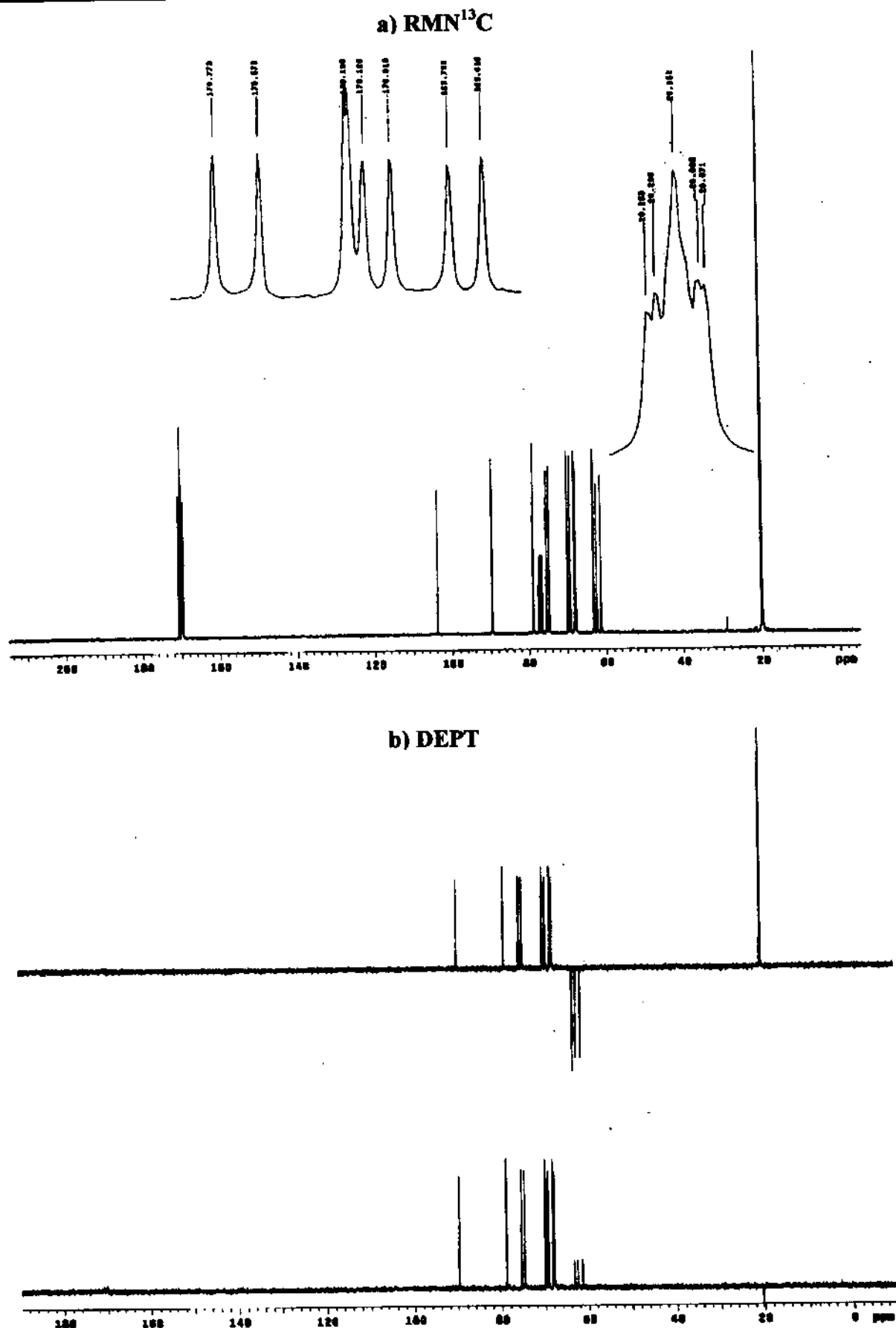
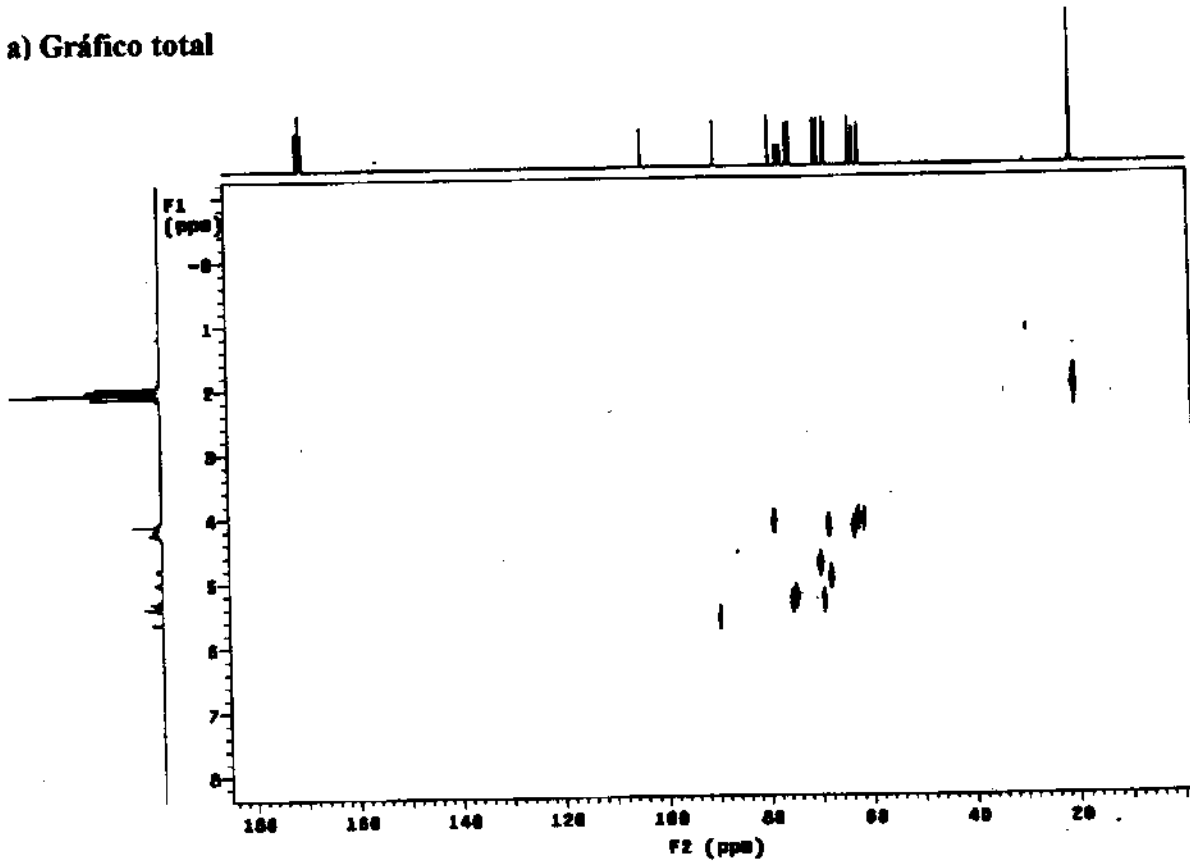


Figura 13: RMN<sup>13</sup>C (a) e DEPT (b) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Sacarose P.A. peracetilada.

a) Gráfico total



b) Expansão

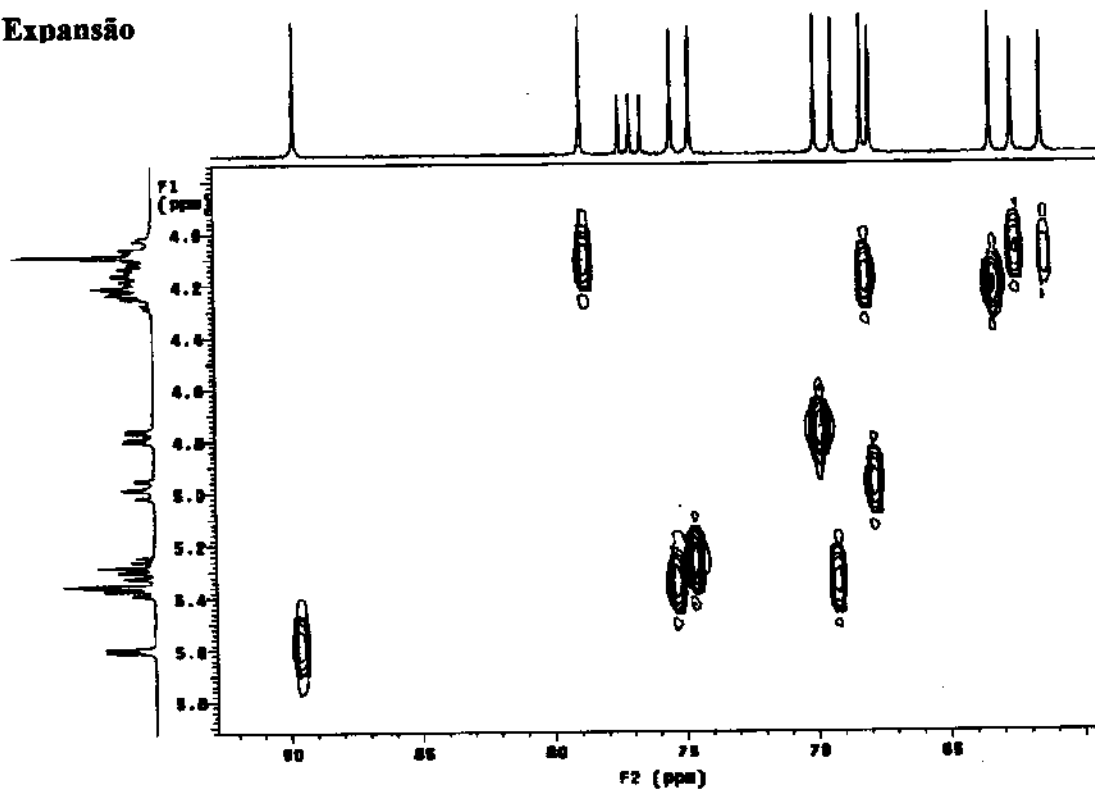
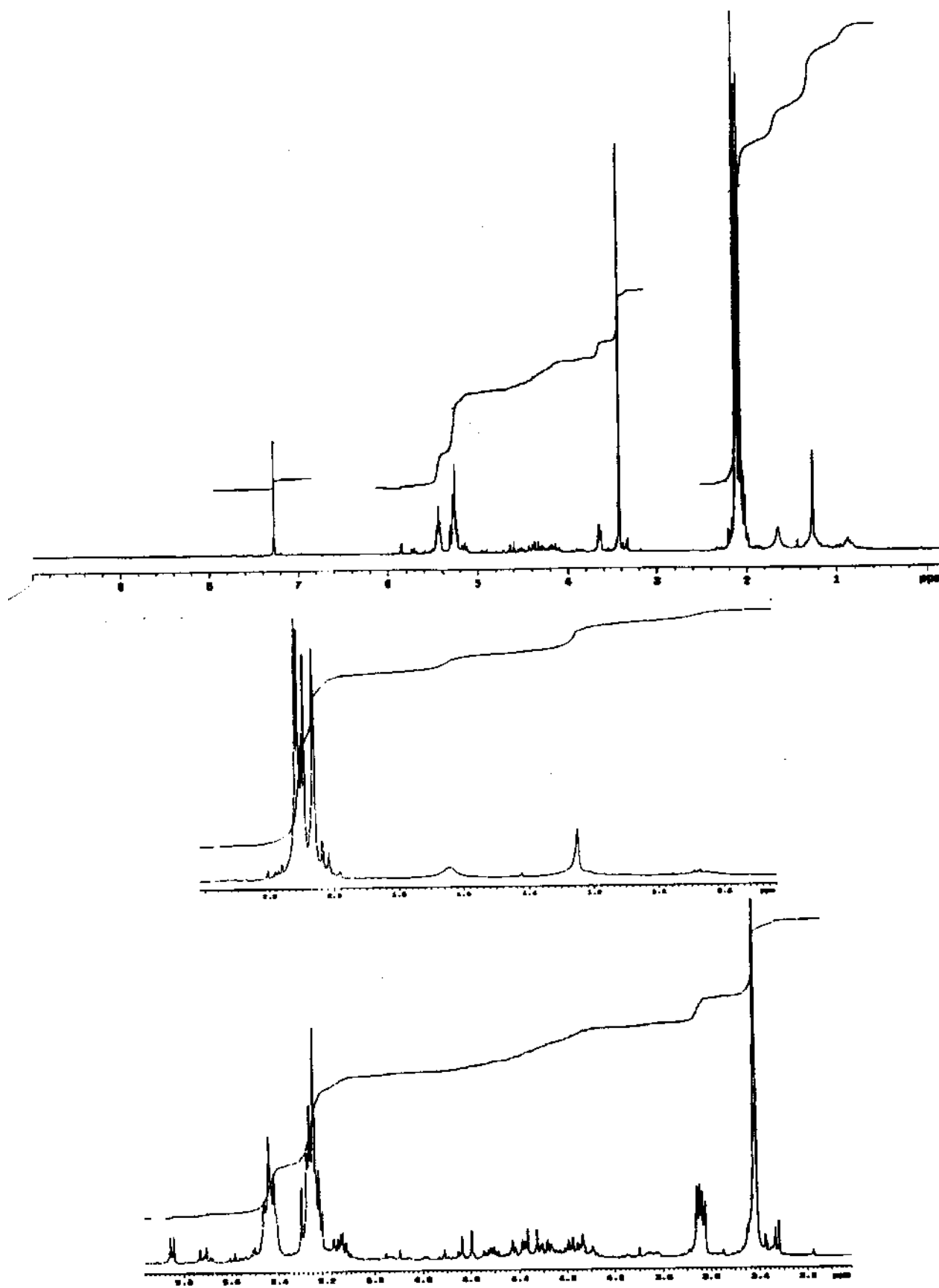


Figura 14: Gráficos de contorno HETCOR (a: total, b: expansão) de Sacarose P.A. peracetilada.



**Figura 16:** RMN $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 5.

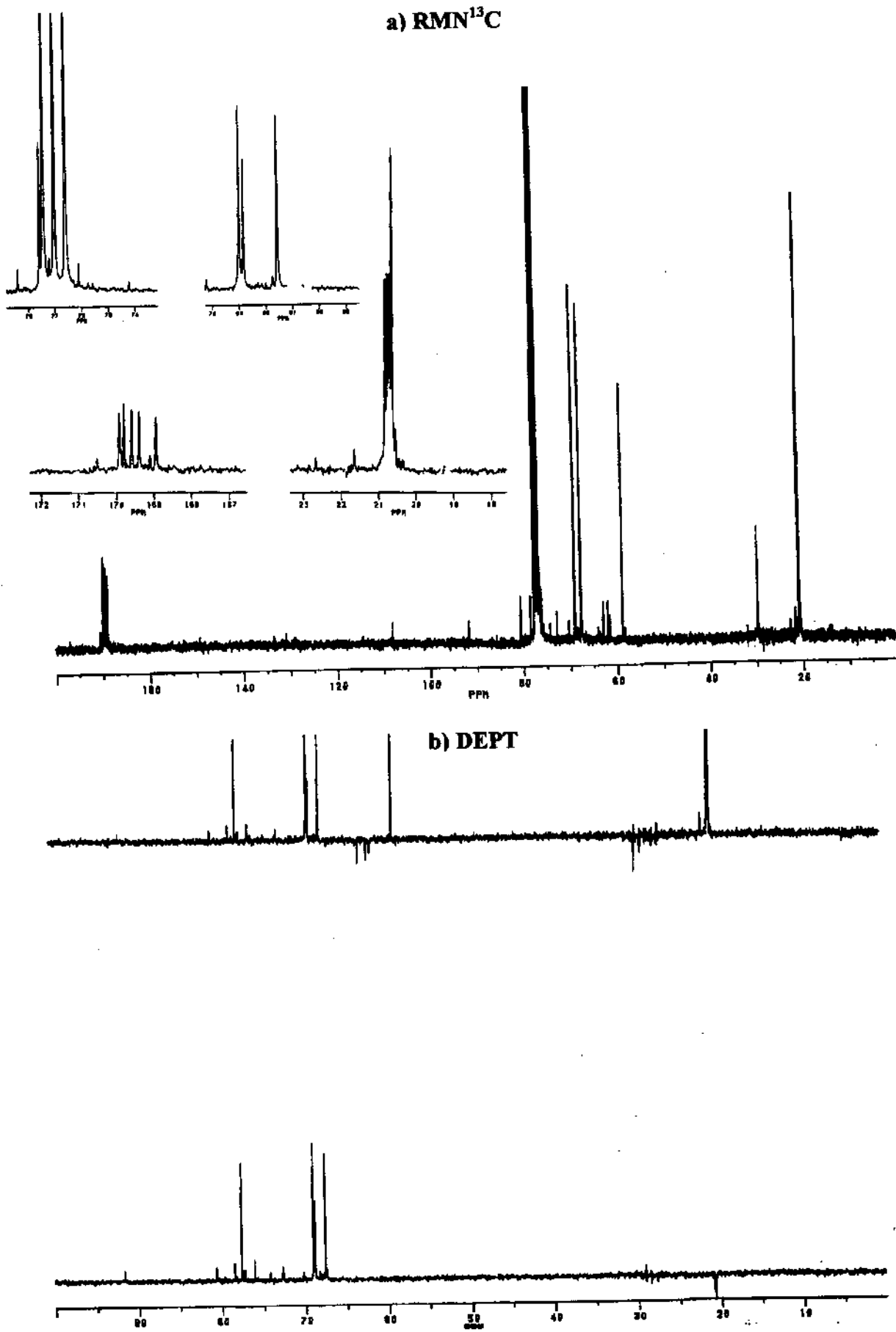


Figura 17: RMN<sup>13</sup>C (a) e DEPT (b) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto 5.

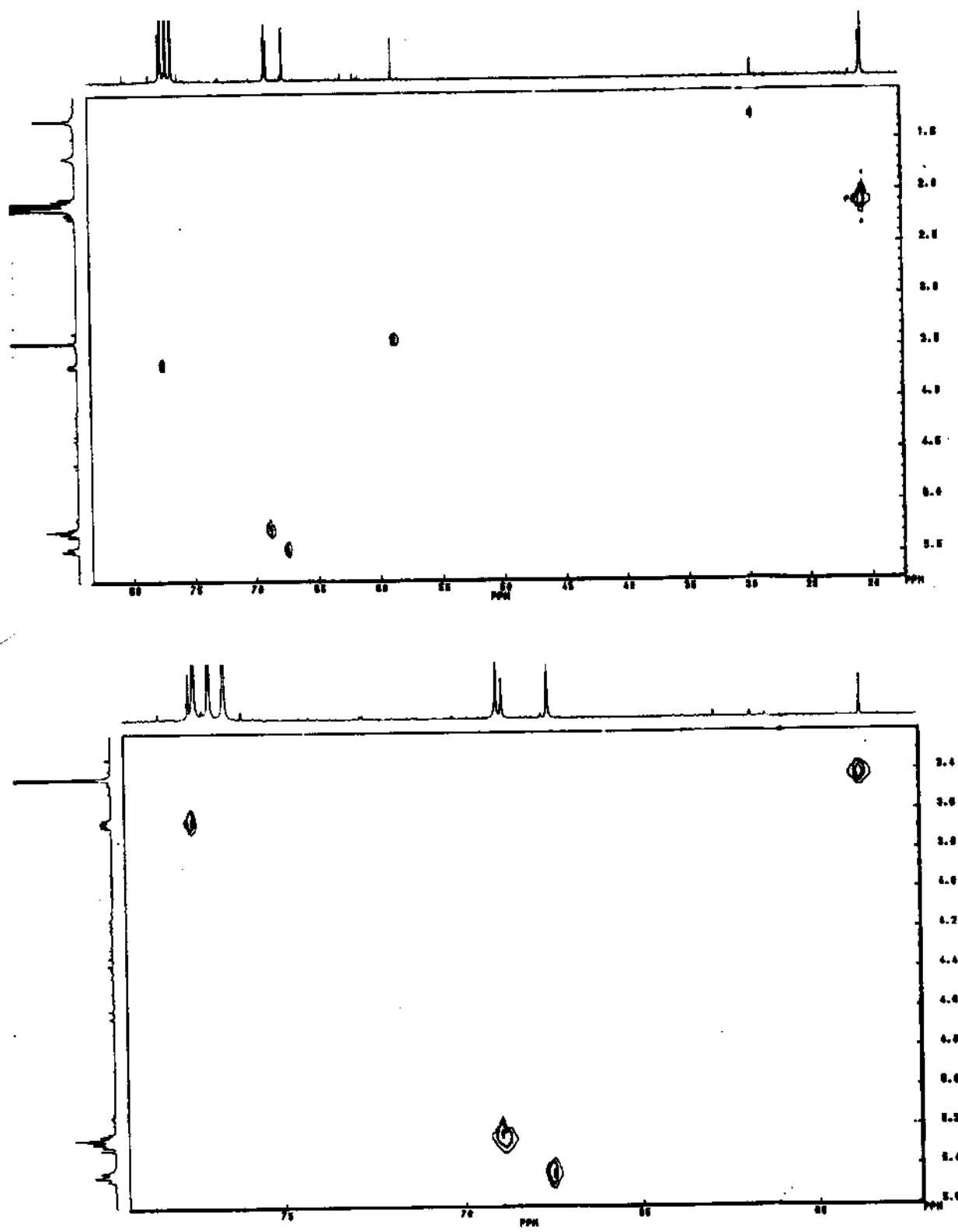


Figura 18: Gráficos de contorno HETCOR (a: total, b: expansão) do composto 5.

## 1. Introdução:

A espécie *Lonchocarpus atropurpureus*, nativa do México, é uma árvore com 3 a 8 m de altura (Fig. 1), com ramos acinzentados, glabros. As folhas possuem de 5 a 9 folíolos, raquis delgado, glabros, 3 a 7,5 cm de comprimento. Os folíolos são submembranosos, com pecíolos canaliculados 2 a 3 mm de comprimento, glabros ou glabrescente, limbo oval-oblongo ou sublanceolatos, mais ou menos arredondado ou cuneato na base, obtuso ou levemente obtuso-acuminado no ápice, 2 a 6,5 cm de comprimento, 1 a 3 cm de largura, verde escuro na face superior, pálido, totalmente reticulado, e mais ou menos pilosos na face inferior, nervuras central e periférica indistinto na face superior e salientes na face inferior. Estípula oval, pubescente, pequena e caduca.

Os cachos de flores são axilares ou paniculados no final dos ramos, raquis mais ou menos pubescente, 1,5 a 7,5 cm de comprimento (Fig. 2). Pedúnculos e pecíolos são delgados, pubescentes, forma simples ou bifloral, 2 a 3 mm de comprimento, o último com cerca de 1 mm de comp., brácteas e bracteólas oblongas, pubescentes, as últimas muitos menores, opostas, presas ao cálice. Cálice geralmente cupuliforme, totalmente não pubescente, cerca de 2 mm de comp., de início distinguível penta-lobulado, posteriormente subtruncado. Pétalas púrpura rosado escuro, suborbiculares padrão, concavas, sublobuladas e levemente caloso na base, intensa e largamente pubescente no verso do ápice, limbo com 8,5 mm de comp., aproximadamente 10 mm de largura, as margens laterais infletidas; sépalas aderidas à carena, oblonga, auriculada, rotundo-obtusa no ápice, glabra, limbo com 7,5 mm de comp. e 3,2 mm de largura; pétalas carenais geralmente obtusa e escassamente pubescente no ápice, o limbo com 5,5 mm de comp. e 3 mm de largura. Estames vexilares livres na base. Ovário estipulado, linear, totalmente pubescente, com cerca de 5,5 mm de comp., 5 ou 6 óvulos; estilete fortemente curvado (retrocurvado); estigma capitulado.

O fruto (legume) é comprido e delgado, estreito, fino, arredondado e mucronado no ápice, borda fina na margem carenal, glabros, 4 a 10 cm de comp., 0,9 a 1 cm de larg., com 1 a 4 sementes.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PITTIER, H. The middle American species of *Lonchocarpus*. Contributions from the United States National Herbarium 20 (2): 37-93, 1917.



A planta *Lonchocarpus atropurpureus* é classificada da seguinte forma:

Família: Leguminosae

Subfamília: *Papilionoideae*

Tribo: *Milletieae*

Sub-tribo: *Lonchocarpinae*

Gênero: *Lonchocarpus*

Subgênero: *Lonchocarpus*

Seção: *Lonchocarpus*

Espécie: *Lonchocarpus atropurpureus*



**Figura 1:** Espécime de *Lonchocarpus atropurpureus* Benth. cultivado no Parque Ecológico da UNICAMP



**Figura 2:** Ramos floridos de *L. atropurpureus* Benth.

Foto menor: galhos com cachos de flores; Foto maior: detalhe das flores

## 2. Materiais e Método:

Os espectros de RMN<sup>1</sup>H e de RMN<sup>13</sup>C (totalmente desacoplado e DEPT) foram obtidos em equipamento GEMINI 300BB (VARIAN) com campo de 7 tesla e espectros de RMN<sup>1</sup>H e de RMN<sup>13</sup>C (totalmente desacoplado e DEPT) e bidimensionais (HSQC, HMBC, NOESY) foram adquiridos em equipamento INOVA 500 (VARIAN) com campo de 11 tesla, a temperatura ambiente, sendo as substâncias dissolvidas em clorofórmio deuterado Merck.

As análises de CG/EM foram feitas em cromatógrafo gasoso CG Hewlett - Packard HP 5890 série 2 acoplado a espectrômetro de massa HP 5970 e coluna HP-5.

As análises de espectrometria de massas (baixa resolução, espectro de massas de espectro de massas e alta resolução) foram realizadas em equipamento VG Auto-spec utilizando-se a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

Os espectros de ultravioleta foram obtidos em equipamento HP 8452A Diode Array Spectrophotometer (compostos 7 e 8) e Cary 5G UV-Vis-NIR Spectrophotometer (compostos 9 e 10) sendo as amostras preparadas a uma concentração de 0,01mg/mL em metanol grau HPLC. Os valores da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) foram calculados por:

$$\epsilon = A/c.l, \text{ onde } \epsilon = \text{absorvidade molar}$$

A = absorbância em um determinado comprimento de onda

c = concentração molar da substância

l = caminho ótico da cela (1 decímetro)

Os espectros no infravermelho foram adquiridos em equipamento Perkin-Elmer 1600 (FTIR) em pastilha de KBr (para os sólidos) ou filme líquido.

Os valores de rotação ótica foram obtidos em polarímetro Carl Zeiss Jena Polamat A com lâmpada de mercúrio (546nm), à temperatura ambiente, sendo as amostras dissolvidas em diclorometano grau HPLC e os valores corrigidos para lâmpada de sódio e temperatura de 20°C.

$$\alpha_{20} = \frac{\alpha_T}{[1 + 0,000143 (T - 20)]} \quad \text{onde } T = \text{temperatura na qual a medida foi}$$

realizada

$$\alpha_{Na} = \frac{\alpha_{Hg}^{20}}{1,17543} \quad \text{onde } \alpha_{Hg}^{20} = \text{valor de rotação ótica corrigido pela equa-}$$

ção anterior

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha_{Na}^{20}}{c \cdot l} \quad \text{onde } \alpha_{Na}^{20} = \text{valor corrigido na equação anterior,}$$

$\alpha_D^{20}$  = valor de rotação ótica específica,  
 c = concentração em g/L da substância,  
 l = caminho ótico da cela (1 decímetro).

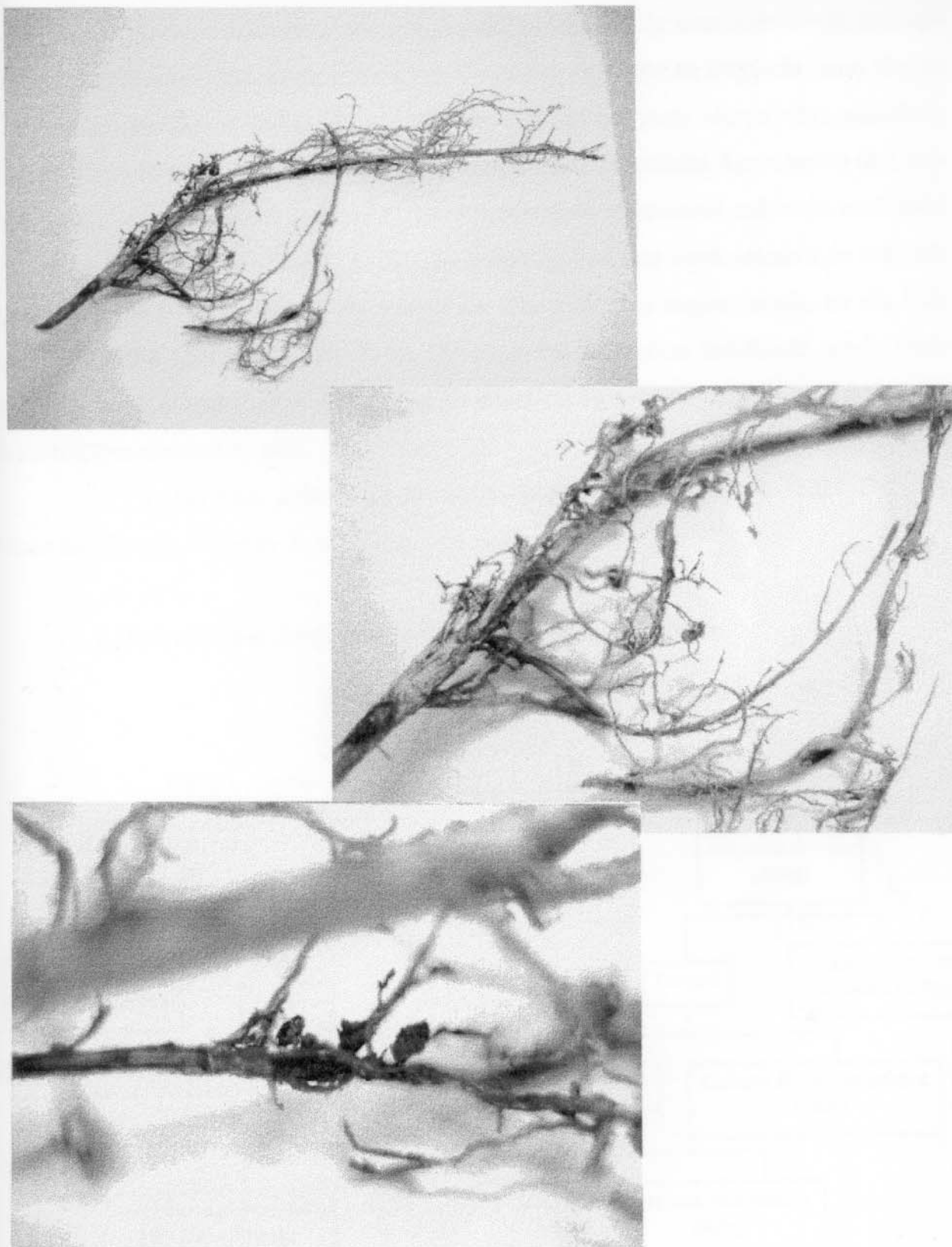
Os pontos de fusão foram obtidos em placas de aquecimento tipo Kofler, instaladas em um microscópio modelo Thermopan (C. Reichert Optische Werke A G).

As placas de CCD (Merck Sílica gel GF<sub>254</sub>, sobre vidro) e as cromatofolhas de alumínio silicagel GF<sub>254</sub> 0,2 nm (Art. 1.05554, Merck) foram reveladas sob luz UV (254 e 366 nm) e nebulizadas com solução de anisaldeído modificada<sup>2</sup> (etanol/anisaldeído/ácido sulfúrico/ác. acético 90:5:5:1) seguido de aquecimento das placas cromatográficas. As placas de CCP e CCD sobre vidro foram preparadas no laboratório com sílica gel GF<sub>254</sub> (Merck).

## 2. 1.Obtenção de Material Vegetal:

Foram coletados segmentos de raízes (344,5g) de um espécime de *L. atropurpureus* cultivado no Parque Ecológico da UNICAMP no dia 4 de março de 1997, em torno das 10h da manhã. Observou-se que as radículas apresentavam muitos nódulos de fixação de nitrogênio (uma associação comum entre espécies leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio) (Figura 3); coletou-se também um pequeno ramo com folhas.

<sup>2</sup> MERCK. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E.Merck, Darmstadt, 118p. 1971.



**Figura 3:** Segmentos de raiz de *L. atropurpureus* (1ª. Coleta)

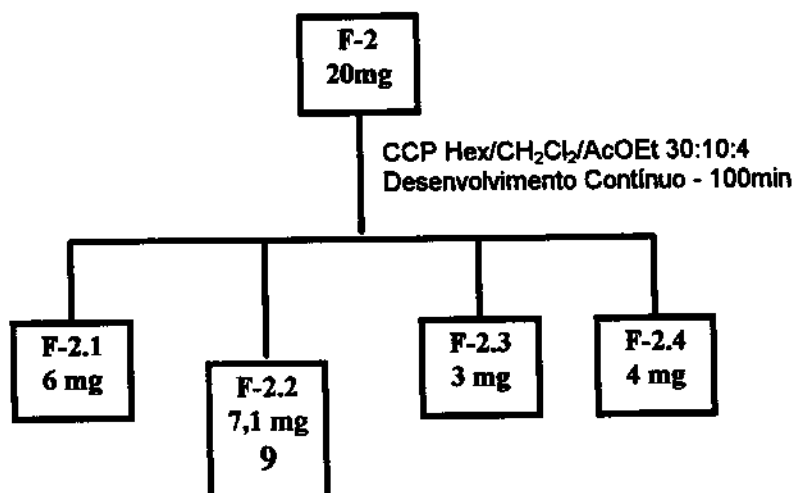
Notar a ocorrência de nódulos de fixação de nitrogênio.



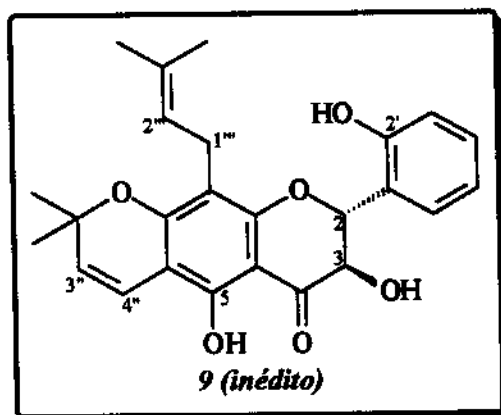
Os segmentos de raízes da primeira coleta foram picados, secos em estufa (70°C/três dias) e moídos em moinho de facas Willey resultando em 156,8 g de material moído. A extração em Soxhlet com 11,7 g de raízes resultou em 206 mg de extrato éter de petróleo, 133 mg de extrato diclorometânico e cerca de 300 mg de extrato metanólico (fluxograma 1).

O extrato éter de petróleo (100 mg) foi fracionado em CCP desenvolvida com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> resultando em oito frações, sendo três as mais interessantes; repetiu-se o fracionamento do extrato para enriquecimento das frações de interesse. A seguir encontram-se os fluxogramas correspondentes às análises em CCP destas três frações:

#### Fração 2:



#### 2', 3, 5-triidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalila)-flavanona



**Aspecto Físico:** sólido pastoso amarelo

$[\alpha]_D^{20} = -54,43$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6,25 mg/mL)



UV  $\lambda$  máx. (nm, log  $\epsilon$ ): 276 (4,80), 316 (4,35), 372 (3,81) (MeOH, 0,011mg/mL).

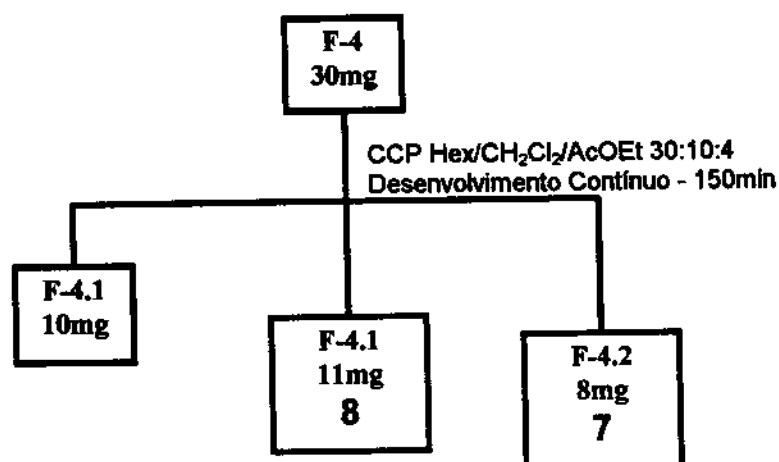
IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3406, 2966, 2923, 2844, 1644, 1627, 1460, 1381, 1290, 1233, 1188, 1022, 938, 905, 844, 748.

RMN<sup>1</sup>H (500MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ): tabela 1, pág. 75.

RMN<sup>13</sup>C (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): tabela 2, pág. 76.

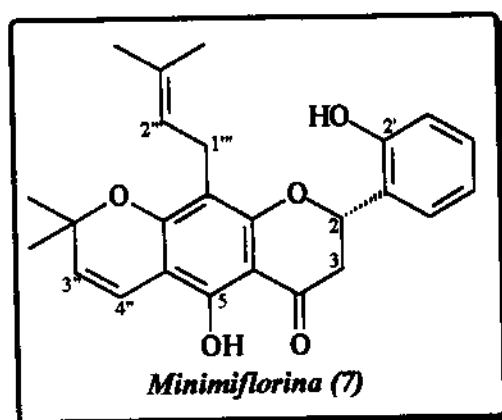
EM: m/z (%): 422 (100), 407 (65), 405 (13), 404 (17), 389 (26), 361 (<1), 351 (4), 349 (6), 333 (6), 286 (4), 285 (7), 271 (29), 258 (5), 243 (17), 231 (29), 215 (32), 136 (5), 135 (3), 107 (15), 91 (7), 77 (7), 69 (2), 57 (<2).

#### Fração 4:



**2', 5-diidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalila)-flavanona**

#### *Minimiflorina*



**Aspecto físico:** oleoso (amarelo)

$[\alpha]_D^{20} = -4,05$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3,15 mg/mL)

**UV  $\lambda$  máx. (nm, log  $\epsilon$ ):** 276 (4,73), 314 (4,21), 362 (3,57) (MeOH, 0,01mg/mL).

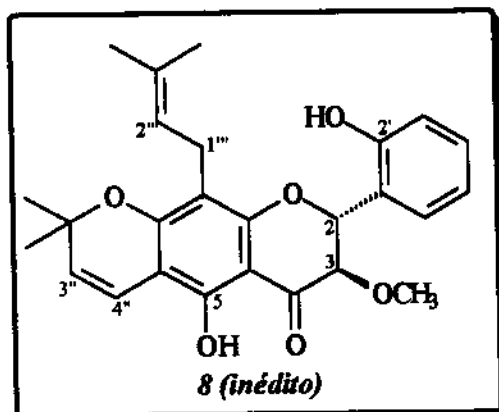
**IV (filme de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>):** 3418, 2966, 2918, 2855, 1644, 1628, 1600, 1458, 1380, 1297, 1239, 1196, 1160, 1120, 753, 733.

**RMN<sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):** tabela 3, pág. 77.

**RMN<sup>13</sup>C (125MHz, CDCl<sub>3</sub>):** tabela 2, pag.76.

**EM: m/z (%):** 406 (81), 391 (100), 389 (2), 373 (19), 361 (<1), 345 (16), 333 (6), 317 (20), 286 (2), 285 (5), 271 (18), 258 (4), 243 (16), 231 (8), 215 (41), 120 (3), 119 (5), 91 (15), 77 (8), 69 (11), 57 (7).

**2', 5-diidroxi-3-Metoxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalila)-flavanona**



**Aspecto Físico:** cristais aculares amarelos em MeOH

**P.F.:** 128,8 - 129,2°C

$[\alpha]_D^{20} = -12,69$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6,7 mg/mL)

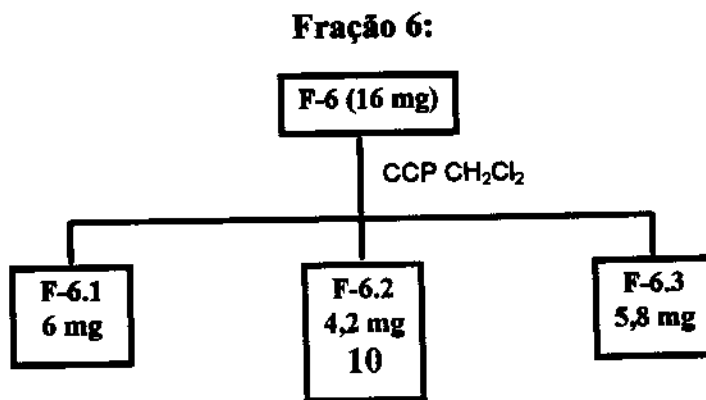
**UV  $\lambda$  máx. (nm, log  $\epsilon$ ):** 276 (4,52), 318 (4,06), 374 (3,29) (MeOH, 0,01mg/mL)

**IV (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3368, 2966, 2924, 2855, 1643, 1620, 1583, 1500, 1457, 1381, 1338, 1290, 1266, 1233, 1188, 1138, 1127, 1094, 1027, 983, 947, 750, 727.

**RMN<sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):** tabela 1, pág. 75.

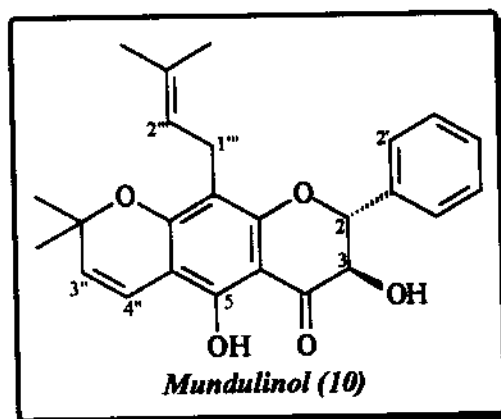
**RMN<sup>13</sup>C (125MHz, CDCl<sub>3</sub>):** tabela 2, pág. 76.

EM: m/z (%): 436 (100), 421 (80), 403 (6), 389 (16), 375 (1), 361 (5), 347 (2), 333 (2), 286 (5), 285 (10), 271 (44), 243 (27), 231 (21), 215 (42), 150 (9), 149 (8), 107 (11), 91 (12), 77 (10), 69 (14), 57 (9).



3,5-diídrosi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalila)-flavanona

*Mundulinol*



**Aspecto Físico:** oleoso (amarelo)

$[\alpha]_D^{20} = +2,35$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7,25 mg/mL)

UV λ máx. (nm, log ε): 276 (4,86), 316 (4,40), 372 (3,72) (MeOH, 0,016mg/mL)

IV (filme de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3449, 2966, 2922, 2844, 1638, 1627, 1583, 1463, 1379, 1355, 1286, 1239, 1190, 1165, 1125, 1022, 944, 844, 765, 735.

RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): tabela 1, pág. 75.

RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>): tabela 4, pag. 78.

EM: m/z (%): 406 (85), 391 (100), 373 (3), 363 (7), 335 (3), 286 (3), 285 (8), 271 (24), 258 (3), 243 (14), 231 (11), 215 (13), 189 (10), 120 (4), 119 (2), 91 (14), 77 (5), 69 (6), 57 (6).

Com estes resultados promissores iniciou-se a extração do restante do material vegetal (110g), o que resultou em 2,0134 g de extrato éter de petróleo, 1,90g de extrato diclorometânico e cerca de 4g de extrato metanólico (Fluxograma 1).

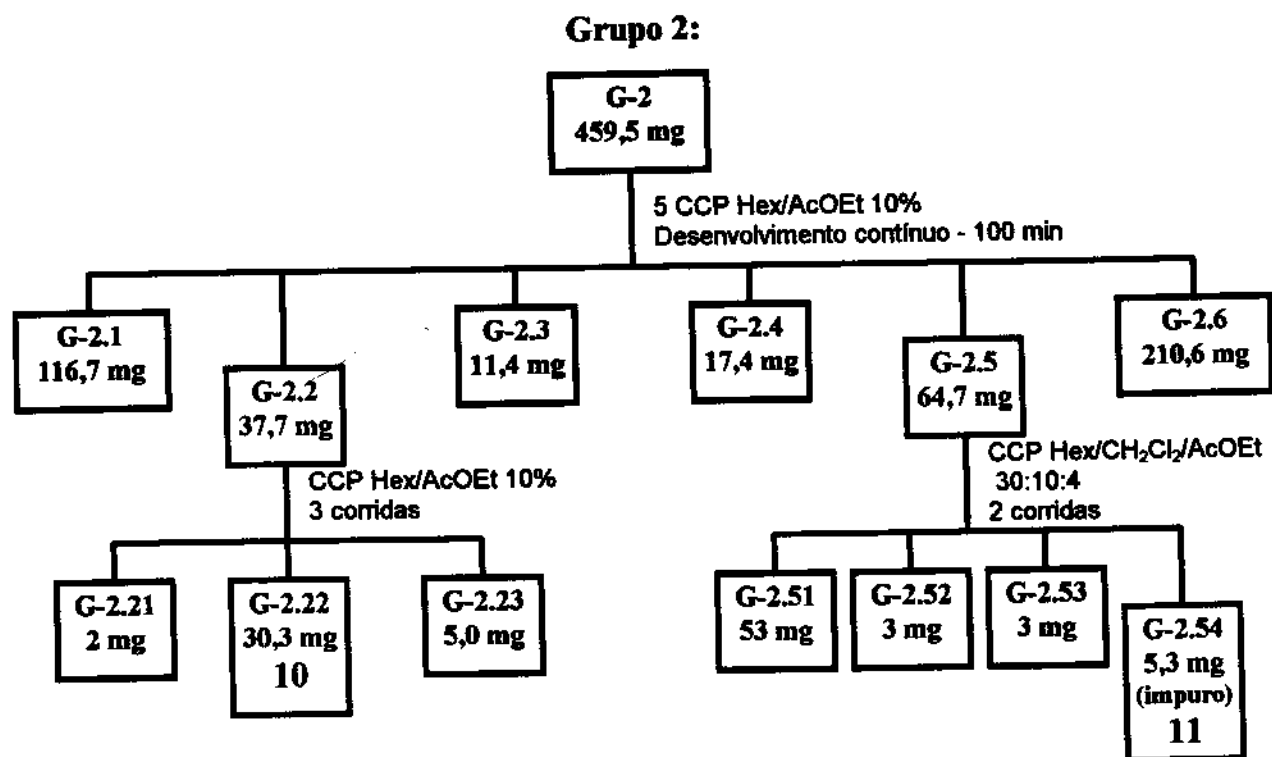
O extrato éter de petróleo (2,0g) foi fracionado em coluna de silicagel 60Å (*flash*<sup>3</sup>, 200-400 mesh, tubo de vidro de 50 mm de Ø, fluxo de 50 mL/min) eluída com diclorometano aumentando-se a polaridade gradativamente com metanol. Foram coletadas 325 frações posteriormente reunidas em 20 grupos com base na análise em CCD (Tabela 7). Os grupos em destaque foram aqueles elaborados neste trabalho porque contêm maior quantidade de material e apresentaram manchas distintas em CCD. Os demais grupos apresentaram-se como misturas complexas e mais polares.

**Tabela 5:** Relação Fração eluída/Concentração do eluente e Grupo/Fração coletada do extrato das raízes de *Lonchocarpus atropurpureus*

Frações	Grupo	Massa (mg)	Eluente
1 - 5	1	26,5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
6 - 23	2	459,5	
24 - 30	3	75,1	
31 - 35	4	117,2	
36 - 72	5	478,3	
73 - 83	6	79,5	
84 - 115	7	156,6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 1%
116 - 125	8	17,9	
126 - 145	9	24,4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 2,5%
145 - 148	10	76,5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5%
149 - 155	11	80,1	
156 - 161	12	51,7	
162 - 173	13	26,7	
174 - 209	14	78,1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 10%
210 - 216	15	11,7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 15%
217 - 237	16	24,1	
238 - 261	17	82,3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 20%
262 - 277	18	16,9	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 25%
278 - 293	19	18,9	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 1:1
294 - 325	20	100,3	MeOH

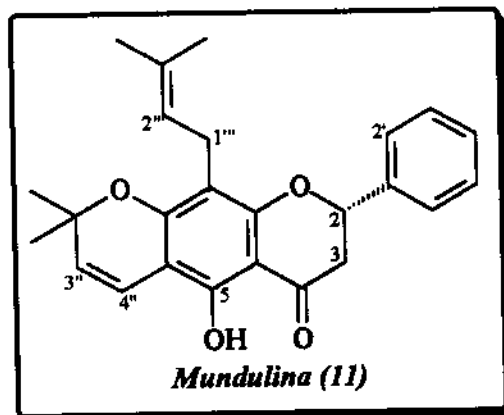
<sup>3</sup> STILL, W. C., KAHN, M., and MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry*, 43 (14): 2923-2925, 1978.

A seguir encontram-se descritos os fluxogramas referentes às análises cromatográficas dos grupos de elaborados:



**5-hidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalila)-flavanona**

*Mundulina*



**Aspecto Físico:** sólido pastoso amarelo

$[\alpha]_D^{20}$  = não determinado

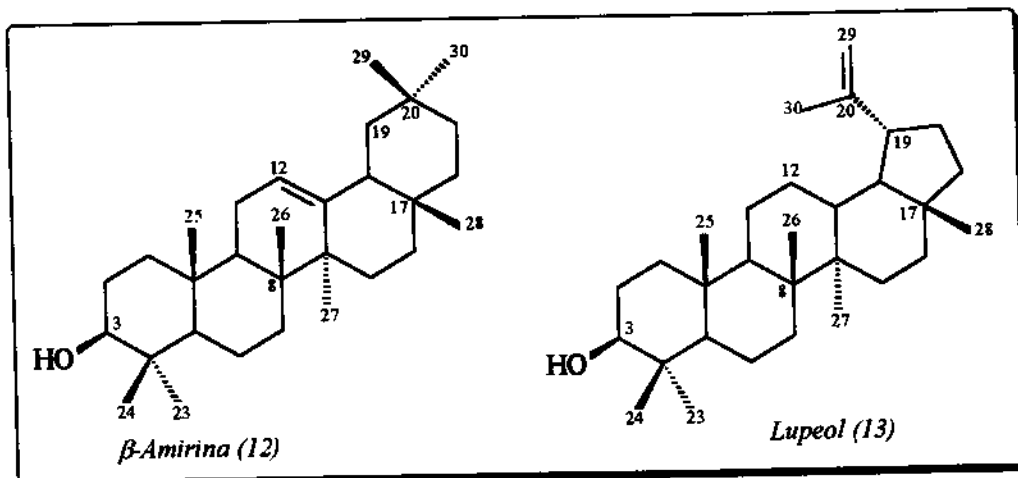
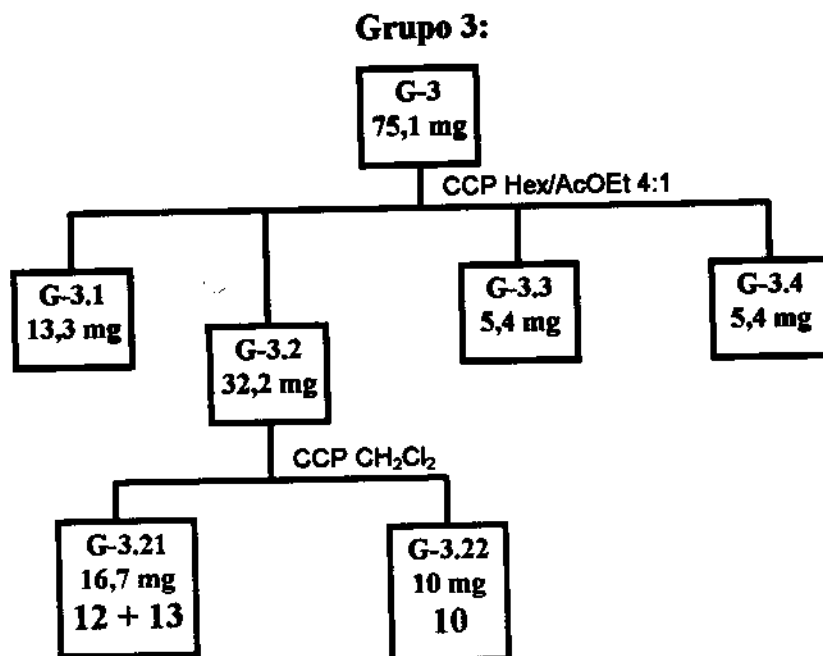
UV  $\lambda$  máx. (nm, log  $\epsilon$ ): não determinado

IV (filme de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): não determinado

RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): tabela 3, pag. 77.

RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>): tabela 4, pag. 78.

EM: m/z (%): não determinado



**Aspecto Físico:** sólido incolor cristalino

$[\alpha]_D^{20}$  = não determinado

UV  $\lambda$  máx. (nm, log  $\epsilon$ ): não determinado

IV (filme de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): não determinado

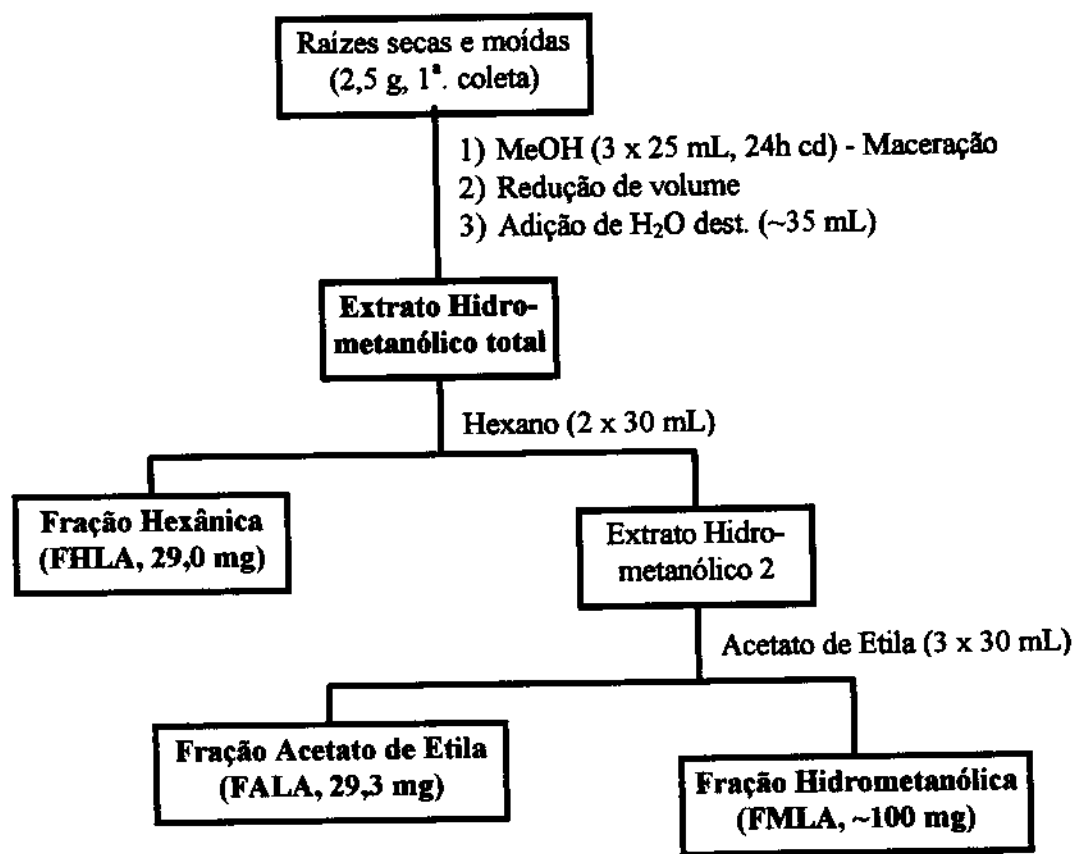
RMN<sup>1</sup>H (300MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ): tabela 6, pag. 79.

RMN<sup>13</sup>C (75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): tabela 7, pag. 80.

CG/EM:  $T_R$  (min) m/z (%):  $T_R = 31,194$  ( $\beta$ -amirina + lupeol): 426 (não aparece), 220 (2), 218 (100), 207 (13), 191 (6), 189 (19).

Uma alíquota (9,3 mg) de minimiflorina foi acetilada com anidrido acético/piridina (0,15 mL/0,15 mL) para confirmar a posição dos substituintes no anel A. O produto acetilado bruto (10,4 mg) foi purificado por CCP (Hex/AcOEt 4:1, desenvolvida 2x) forneceu 7,3 mg de um sólido oleoso amarelo claro cujos dados espectrais de RMN<sup>1</sup>H confirmaram se o diacetato de minimiflorina.

Um método de extração de extração a frio (maceração)<sup>4</sup> foi testado; a metodologia está resumida no seguinte fluxograma:



Os grupos G-5 e G-7 foram purificados por cromatógrafo líquido de alta eficiência semi-preparativo fornecendo, respectivamente, os flavonóides 8 e 9 (Cap. III).

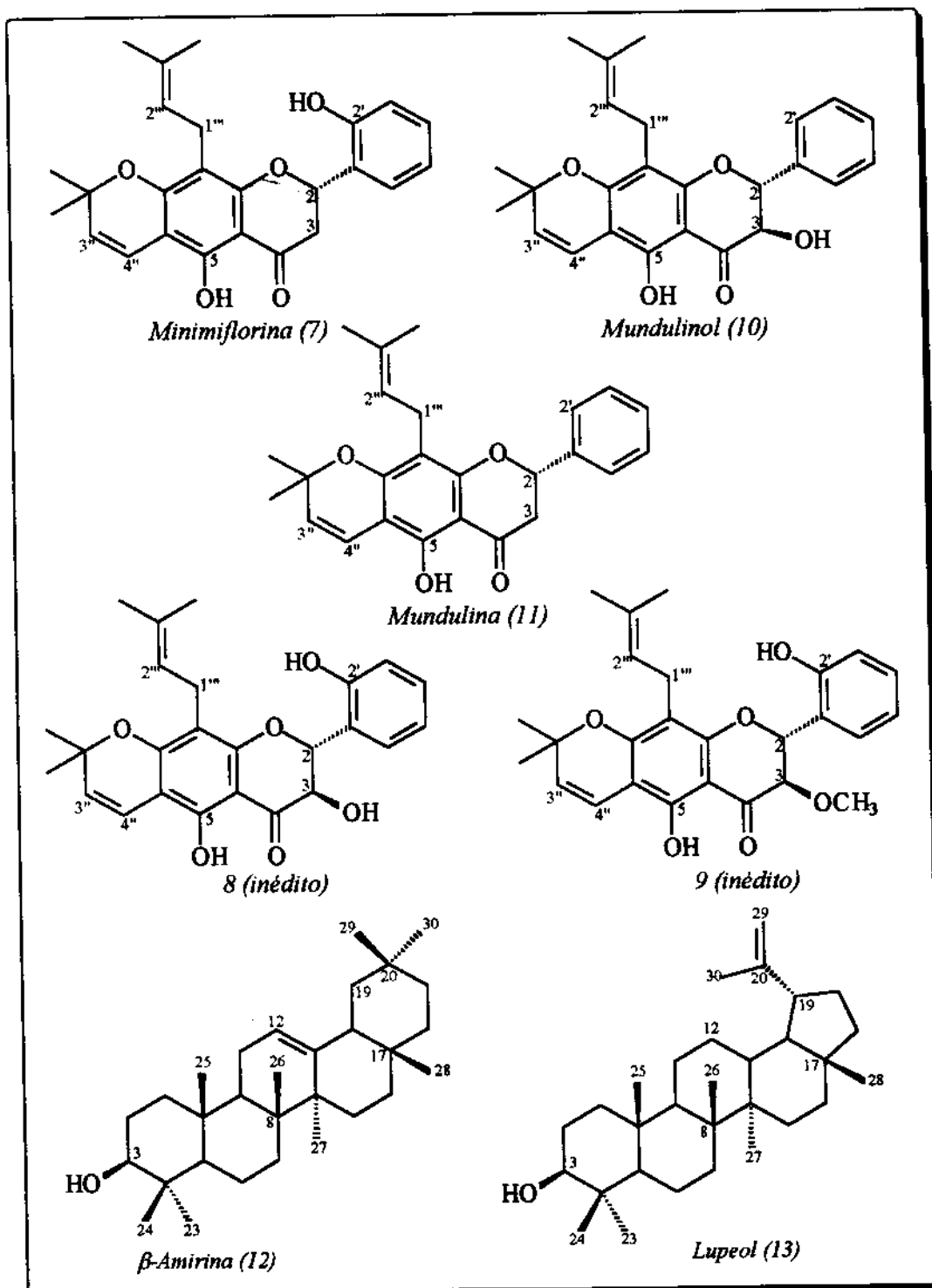
Os segmentos de raiz da segunda e terceira coletas, após secagem em estufa (5 dias/30°C), foram extraídos segundo a metodologia de extração a frio descrita anteriormente; as folhas e fragmentos de caule da primeira coleta e as folhas, casca do caule,

<sup>4</sup> SEO, E. -K., SILVA, G. L., CHAI, H. -B., CHAGWEDERA, T. E., FARNSWORTH, N. R., CORDELL, G. A., PEZZUTO, J. M. and KINGHORN, A. D. Cytotoxic prenylated flavanones from *Monotes engleri*. *Phytochemistry*, 45 (3): 509-515, 1997.

sementes maduras e fragmentos de caule da segunda coleta foram secos em estufa (7 dias a 30°C) e macerados com éter de petróleo durante 15 dias e todos os extratos resultantes foram analisados por técnicas cromatográficas (CLAE, Capítulo III).



## 3. Resultados e Discussão:

Quadro 1: Substâncias isoladas de *Lonchocarpus atropurpureus*

Do extrato éter de petróleo das raízes de *L. atropurpureus* foram isoladas 7 substâncias (quadro 1) sendo duas flavanonas minimiflorina (7) e mundulina (11), três flavanonóis (8 e 9, inéditos; 10, mundulinol) e dois triterpenos pentacíclicos  $\beta$ -amirina e

lupeol (12 e 13, respectivamente). A seguir, encontram-se as discussões a respeito da determinação estrutural destes compostos por classe.

### 3. 1. Flavanonas:

#### 3. 1. 1. Substância 7 - Minimiflorina

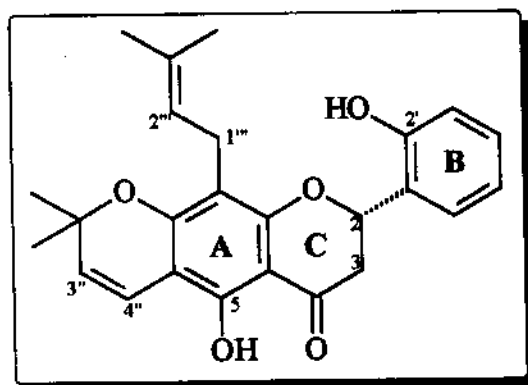


Figura 4: Minimiflorina

Este composto apresentou sinais característicos para o anel C de uma flavanona em  $\delta_H$  2,91 (1H, *dd*,  $J = 17$  e 3Hz, H-3eq), em  $\delta_H$  3,12 (1H, *dd*,  $J = 17$  e 12Hz, H-3ax) e em  $\delta_H$  5,63 (1H, *dd*,  $J = 12$  e 3Hz, H-2) no seu espectro de RMN<sup>1</sup>H (500MHz, Tab. 3, pág. 77; Fig. 5, pág. 84) e também em  $\delta_C$  41,9 (C-3) e em  $\delta_C$  76,8 (C-2) no espectro de RMN<sup>13</sup>C (75MHz, Tab. 2, pag. ; Fig. 6.a, pág. 85). O grupo hidroxila em C-5 forma ponte de hidrogênio com o grupo carbonila em C-4 como foi evidenciado pelo sinal em  $\delta_H$  12,26 (1H, *s*). Dois dubletos largos ( $\delta_H$  6,91, 1H, *dl*,  $J = 7,5$ Hz, H-3' e  $\delta_H$  7,32, 1H, *dl*,  $J = 7,5$ Hz, H-6') e dois tripletos largos ( $\delta_H$  6,98, 1H, *tl*,  $J = 7,5$ Hz, H-5' e  $\delta_H$  7,26, 1H, *tl*,  $J = 7,5$ Hz, H-4') sugeriram um anel B 2'-substituído por uma hidroxila (posição de substituição bastante incomum)<sup>5</sup>. Pelos espectros de RMN<sup>13</sup>C (75MHz) e de DEPT (fig. 6.b, pág. 85) os sinais em  $\delta_C$  124,3, 153,7, 116,9, 129,9, 120,9 e 126,2 foram atribuídos respectivamente a C<sub>0</sub>-1', C<sub>0</sub>-2', CH-3', CH-4', CH-5' e CH-6'.

<sup>5</sup> IINUMA, M. and MIZUNO, M. Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones. *Phytochemistry* 28 (3): 681-694, 1989.

Um grupo 3''',3'''-dimetilalil foi observado pelos seus sinais característicos no espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz) em  $\delta_H$  1,68 (6H, s, CH<sub>3</sub>-4''' e CH<sub>3</sub>-5'''),  $\delta_H$  3,24 (2H, m, H-1''') e  $\delta_H$  5,63 (1H, *tl*,  $J = 7\text{Hz}$ , H-2''') e no de RMN<sup>13</sup>C em  $\delta_C$  17,8 (CH<sub>3</sub>-4'''),  $\delta_C$  21,5 (CH<sub>2</sub>-1'''), 25,8 (CH<sub>3</sub>-5'''), 122,2 (CH-2''') e 131,7 (C<sub>0</sub>-3'''). O grupo 2'',2''-dimetilcromeno foi caracterizado por absorções características em  $\delta_H$  5,53 (1H, *d*,  $J = 10\text{Hz}$ , H-3'') e  $\delta_H$  6,65 (1H, *d*,  $J = 10\text{Hz}$ , H-4'') e  $\delta_C$  28,3 (CH<sub>3</sub>-2''a),  $\delta_C$  28,4 (CH<sub>3</sub>-2''b),  $\delta_C$  78,3 (C<sub>0</sub>-2''),  $\delta_C$  115,6 (CH-3'') e  $\delta_C$  126,2 (CH-4''). Como o íon de  $m/z = 120$  do espectro de massas revelou um anel B substituído por uma hidroxila em C-2', esses grupos deveriam estar ligados ao anel A, o que foi evidenciado pela presença, no espectro de massa, dos íons de  $m/z$  286 ( $M^+ - 120$ , 2%) e 285 ( $M^+ - 120 - 1\text{H}$ , 5,3%). Porém estes grupos poderiam estar ligados neste anel de três formas:

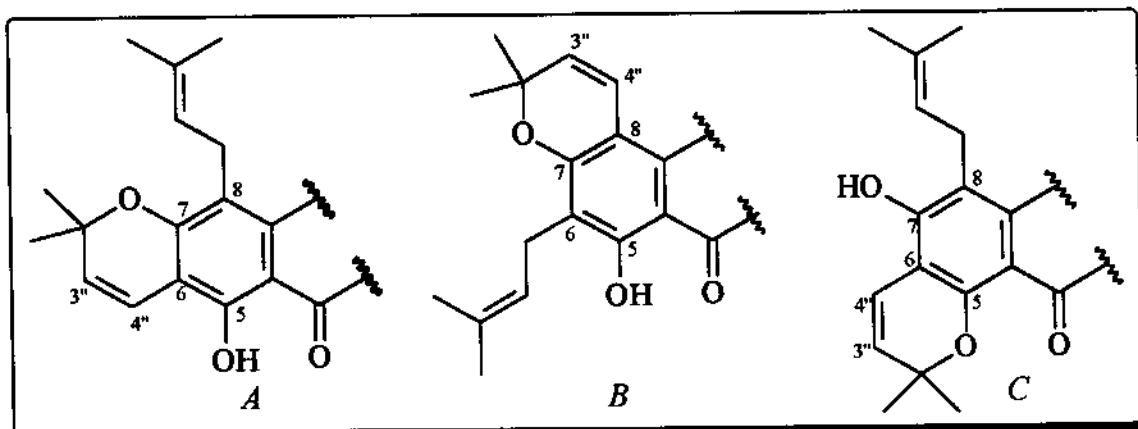


Figura 7: Possíveis posições dos substituintes no anel A

A proposição *C* foi rapidamente descartada uma vez que, no espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz) de **7**, observou-se claramente a presença de uma hidroxila quelato-gênica ( $\delta_H$  12,28) e o espectro de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz) apresentou apenas um sinal em  $\delta_C$  196,3 correspondente a uma carbonila; assim deveria haver uma hidroxila em C-5 formando ponte de hidrogênio com a carbonila em C-4. Para decidir entre as outras duas hipóteses (*A* e *B*, Fig. 7), procedeu-se a acetilação do composto, uma vez que segundo dados da literatura<sup>6,7</sup> se o 2'',2''-dimetilcromeno estiver fundido angularmente ao anel A

<sup>6</sup> ARNONE, A.; CARDILLO, G.; MERLINI, L. AND MONDELLI, R. - NMR effects of acetylation and long-range coupling as a tool for structural elucidation of hydroxychromenes. *Tetrahedron Letters* 43: 4201-4206, 1967.

(B) os hidrogênios H-3'' e H-4'' sofrerão desproteção após acetilação da hidroxila em C-5; porém se esse mesmo grupo estiver ligado linearmente (A) o hidrogênio H-3'' sofrerá desproteção enquanto que o hidrogênio H-4'' será protegido pelo cone de proteção da carbonila do acetato ligado em C-5. A análise do espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz) do produto diacetilado revelou uma proteção do H-4'' seguida de uma desproteção do H-3'' (Tab. 8; fig. 8, pág. 86) indicando que a hipótese A (grupo 2'',2''-dimetilcromeno linear ao anel A, minimiflorina) é a correta.

Tabela 8: Diferença de deslocamento químico entre minimiflorina e seu acetato.

Hidrogênio	Minimiflorina ( $\delta$ )	Diacetato ( $\delta$ )	$\Delta\delta$
H-3''	5,44	5,65	+0,21
H-4''	6,63	6,38	-0,25

Os experimentos bidimensionais HSQC (Tab. 9, pág. 81; Fig. 9, pág. 87) e HMBC (Tab. 9, pág. 81; Fig. 10, pág. 88) permitiram atribuir os carbonos C-6 e C-8, fornecendo assim mais uma evidência da posição linear do grupo 2'',2''-dimetilcromeno. Foram relevantes as correlações dos hidrogênios H-1''' ( $\delta_H$  3,24) com os carbonos C-7 ( $\delta_C$  158,7,  $J^3$ ), C-8 (108,8,  $J^2$ ), C-9 (159,7,  $J^3$ ), C-1''' (21,4,  $J^1$ ), C-2''' (122,2,  $J^2$ ) e C-3''' (131,7,  $J^3$ ) e do hidrogênio H-3'' que apresentou correlações com C-6 (103,3,  $J^3$ ), C-2'' (78,3,  $J^2$ ) e C-3'' (126,2,  $J^1$ ).

Como já foi mencionado, o estudo do espectro de massas (Fig. 11, pág. 89) deste composto confirmou a presença dos substituintes ligados no anel A (2'',2''-dimetilcromeno e 3''',3'''-dimetilalila) e no anel B (hidroxila em C-2'); outro fragmento iônico interessante foi o íon m/z 391 (100%) decorrente da perda de um radical metila a partir do íon molecular m/z 406 (81,3%) muito comum em compostos com grupo 2'',2''-dimetilcromeno. O íon m/z 373 (18,8%) pode ser prontamente racionalizado através da saída de água a partir do íon m/z 391, enquanto os íons m/z 345 (15,6%) e m/z 317 (19,9%) foram explicados através da saída, respectivamente, de gás carbônico e 2-metil-1-propeno a partir do íon m/z 373 (Quadro 2).

<sup>1</sup>NARAYANA, R.M.; KRUPADANAM, G.L.D. and SRIMANNARAYANA, G. - Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. *Phytochemistry*, 37 (1): 267-269, 1994.

Uma rota de fragmentação muito importante nesta classe de composto é a fragmentação tipo Retro Diels-Alder do anel C; entre os fragmentos iônicos que se explicam por esta rota destacam-se os íons  $m/z$  286 (2%, cátion radicalar) e  $m/z$  285 (5,3%, cátion) ambos já discutidos anteriormente, assim como os íons  $m/z$  258 (3,7%) e  $m/z$  231 (8,3%) que foram explicados pela perda de gás carbônico e radical 2-metil-1-propenila, respectivamente, a partir do cátion radicalar  $m/z$  286. As baixas abundâncias relativas sugeriram a ocorrência de outra fragmentação preferencial e esta foi prontamente identificada como tendo início na fragmentação, tipo Retro Diels-Alder, do íon  $m/z$  391 (100%) originando o íon  $m/z$  271 (18,4%). Os íons  $m/z$  243 (16,4%) e  $m/z$  215 (41,3%) foram explicados pela perda de gás carbônico e de 2-metil-1-propeno, respectivamente, a partir do cátion  $m/z$  271. Todos estes íons descritos anteriormente caracterizaram o anel A do composto 7 (Quadro 3).

Os íons característicos do anel B após a fragmentação tipo Retro Diels-Alder do anel C, tanto a partir do íon  $m/z$  406 ( $M^+$ ) quanto do íon  $m/z$  391 ( $M^+ - 15$ ), estão representados no quadro 3 e a maioria diz respeito à fragmentação característica de anéis benzênicos.

O espectro no ultravioleta apresentou o perfil esperado para o esqueleto flavanona, com absorção máxima em 276 nm ( $\log \epsilon = 4,73$ ) na região da Banda II dos flavonóides (cromóforo benzoíla) (Fig. 12, pág. 90); no espectro no infravermelho destacaram-se as absorções relativas à ligação H-O ( $3418,1 \text{ cm}^{-1}$ ) e à carbonila ( $1644,4 \text{ cm}^{-1}$ ) (Fig. 13, pág. 91).

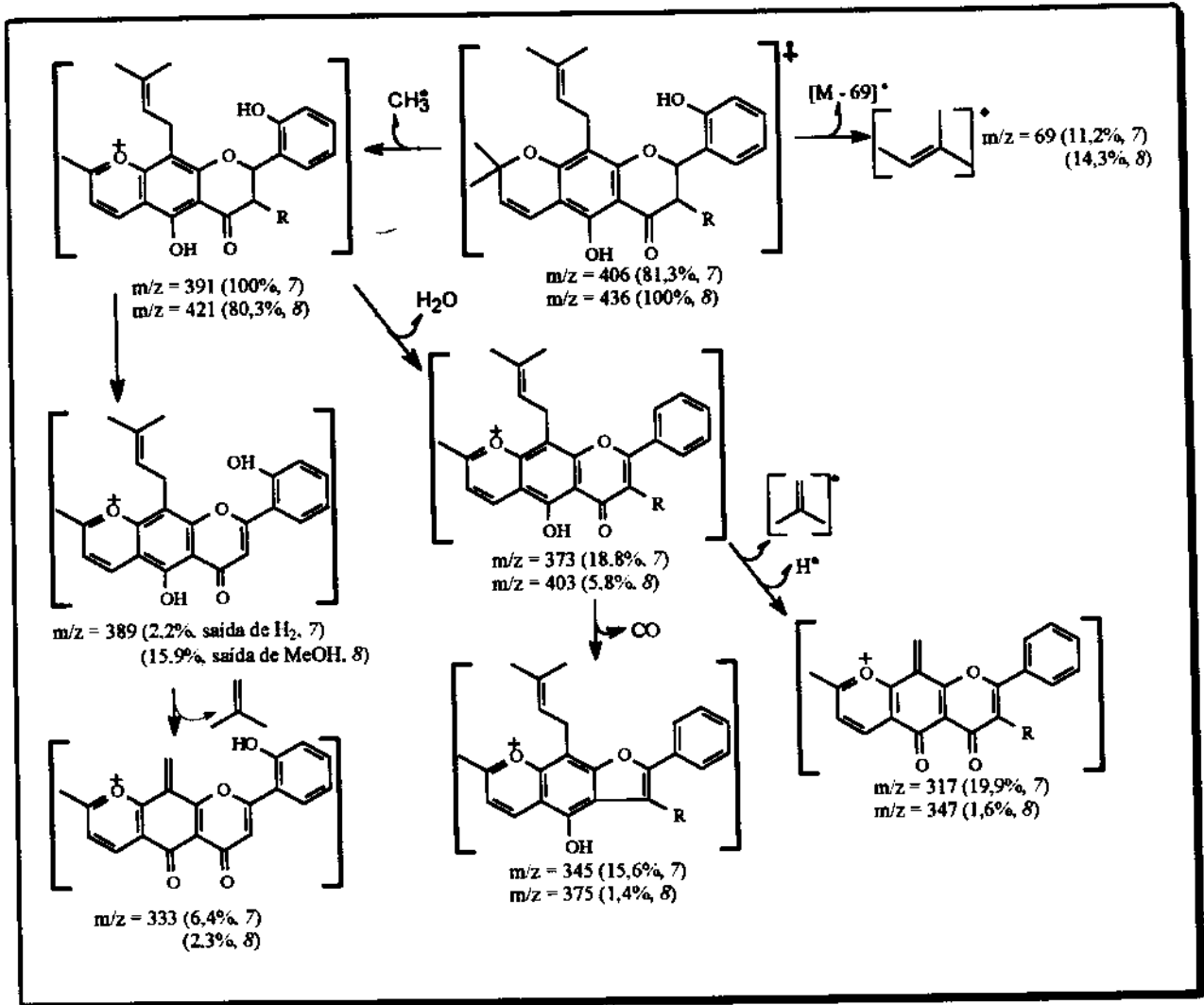
Todos estes dados convergem para identificação de **Minimiflorina** (Fig. 4, pág. 59) que foi inicialmente isolada de *Lonchocarpus minimiflorus*<sup>8</sup> (sementes), que é uma espécie fortemente correlacionada com *L. atropurpureus* quanto à classificação botânica<sup>9</sup>. Esta flavanona também já foi isolada de *Lonchocarpus orotinus*<sup>10</sup> (sementes).

<sup>8</sup> MAHMOUD, E-H. N., and WATERMAN, P. G. Minimiflorin: a new 2'-hydroxyflavanone from *Lonchocarpus minimiflorus* seeds. *Journal of Natural Products* 48 (4): 648-650, 1985.

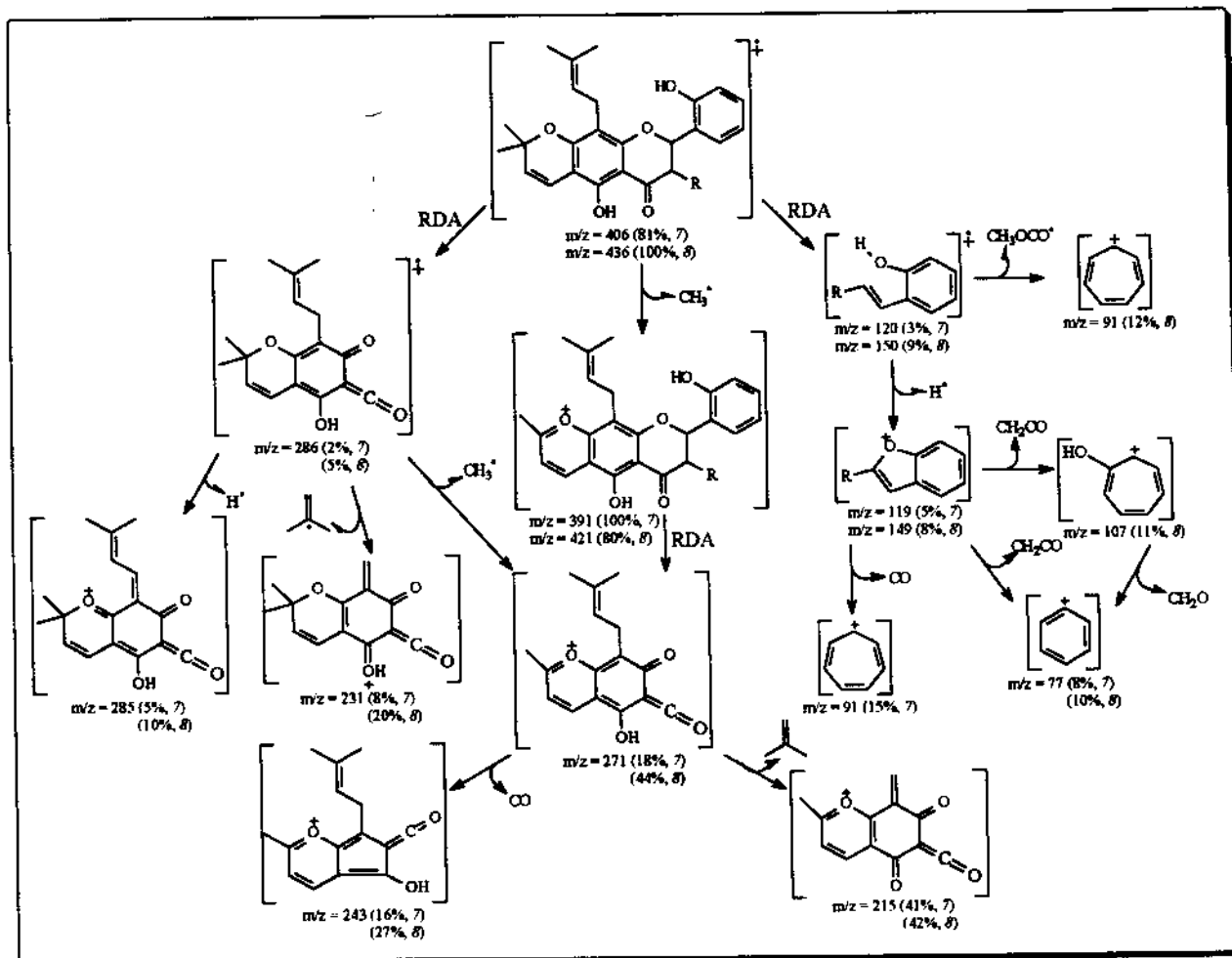
<sup>9</sup> PITTIER, H. The middle American species of *Lonchocarpus*. *Contributions from the United States National Herbarium* 20 (2): 37-93, 1917.

<sup>10</sup> WATERMAN, P. G. and MAHMOUD, E-H. N. Unusual flavanoids from *Lonchocarpus orotinus* seeds. *Phytochemistry* 26 (4): 1189-1193, 1987.

Quadro 2: Proposta de Fragmentação para *Minimiflorina* (7) e para substância 8:



Quadro 3: Proposta de Fragmentação tipo Retro Diels-Alder para *Minimiflorina* (7) e para a substância 8



## 3. 1. 2. Composto 11, Mundulina:

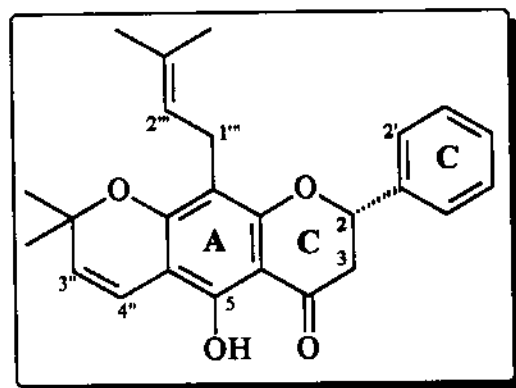


Figura 14: Mundulina

Este composto também apresentou absorções características do esqueleto flavanona no espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, Tab. 3, pág. ; Fig. 15, pág. 92) em  $\delta_H$  2,83, 1H, *dd*,  $J = 17,2$  e 3,3 Hz (H-3eq.),  $\delta_H$  3,04, 1H, *dd*,  $J = 17,2$  e 12,9 Hz (H-3ax.) e  $\delta_H$  5,41, 1H, *dd*,  $J = 12,9$  e 3,3 Hz (H-2) e no de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, Tab. 4, pág. ; Fig. 16.a, pág. 93) em  $\delta_C$  78,1 (C-2) e  $\delta_C$  43,3 (C-3). As absorções na região de hidrogênios aromáticos (aprox.  $\delta_H$  7,40, 5H, *m*, H-2', H-3', H-4', H-5' e H-6') e de carbonos aromáticos ( $\delta_C$  126,2, C-2' e C-4';  $\delta_C$  128,9, C-3', C-4' e C-5') sugeriram a presença de um anel B livre. Os sinais em  $\delta_H$  3,22 (2H, *dl*,  $J = 7$  Hz, 1'') e  $\delta_H$  5,16 (1H, *tl*,  $J = 7$  Hz, H-2'') no espectro de RMN<sup>1</sup>H e em  $\delta_C$  21,3 (1''),  $\delta_C$  122,7 (2''),  $\delta_C$  25,6 (4'') e  $\delta_C$  17,6 (5'') no de RMN<sup>13</sup>C foram atribuídos ao grupo 3'',3''-dimetilalila; já os sinais em  $\delta_H$  5,50 (1H, *d*,  $J = 10$  Hz, 3'') e  $\delta_H$  6,64 (1H, *d*,  $J = 10$  Hz, H-4'') no espectro de RMN<sup>1</sup>H e em  $\delta_C$  128,7 (3''),  $\delta_C$  115,8 (4''),  $\delta_C$  28,1 (CH<sub>3</sub>-2'', 2C) no de RMN<sup>13</sup>C caracterizaram o substituinte 2'',2''-dimetilcromeno, ambos os substituintes estavam ligados ao anel A. Como isolou-se uma pequena quantidade deste composto e este ainda estava impuro, os dados de RMN<sup>13</sup>C foram insatisfatórios e não foi possível obter os demais dados espectroscópicos desta flavanona. Os dados obtidos parecem convergir para o composto **Mundulina** isolado pela primeira vez de *Mundulea sericea*<sup>11</sup>.

<sup>11</sup> VAN ZYL, J. J.; RALL, G. J. H., and ROUX, D. G. The structure, absolute configuration, synthesis, and <sup>13</sup>C N.m.r. spectra of the prenylated pyranoflavonoids from *Mundulea sericea*. *Journal of Chemical Research* (M): 1301-1320, 1979 and (S): 97, 1979.



## 3. 2. Flavanonóis:

## 3. 2. 1. Substância 8, inédita:

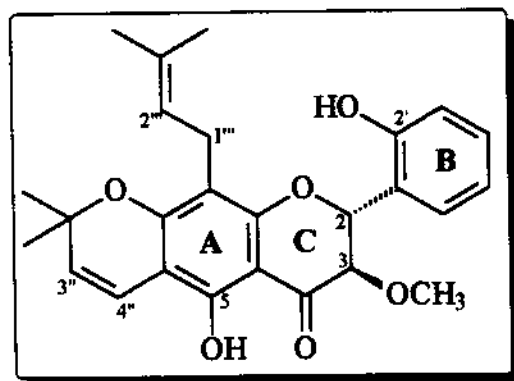


Figura 17: Flavanonol 8, inédito

A análise dos dados espectrais [RMN<sup>1</sup>H (500 MHz), RMN<sup>13</sup>C (125 MHz) e massas] deste composto indicou uma grande similaridade com minimiflorina e as absorções em  $\delta_H$  4,16 (1H, *d*, *J* = 11 Hz, H-3), e  $\delta_H$  5,45 (1H, *d*, *J* = 11 Hz, H-2) no espectro de RMN<sup>1</sup>H (Tab. 1, pág. 75; Fig. 18, pág. 94) e em  $\delta_C$  77,8 (C-2, CH) e  $\delta_C$  81,8 (C-3, CH) no espectro de RMN<sup>13</sup>C (Tab. 2, pág. 76; Fig. 19.a, pág. 95) permitiram caracterizar o anel C de um flavanonol. Além disso, os espectros de RMN<sup>1</sup>H e de RMN<sup>13</sup>C mostraram sinais em  $\delta_H$  3,60 (3H, *s*) e em  $\delta_C$  61,9 (CH<sub>3</sub>) típicos do grupo metoxila (O-CH<sub>3</sub>) no carbono C-3, o que permitiu caracterizar a substância 8 como sendo um flavanonol metilado. O anel B apresentou-se hidroxilado em C-2' pelos deslocamentos químicos e acoplamentos dos quatro hidrogênios aromáticos ( $\delta_H$  7,00, 1H, *dd*, *J* = 8 e 1Hz, H-3';  $\delta_H$  7,04, 1H, *td*, *J* = 8 e 1Hz, H-5';  $\delta_H$  7,31, 1H, *td*, *J* = 8 e 1Hz, H-4' e  $\delta_H$  7,51, 1H, *dd*, *J* = 8 e 1Hz, H-6').

Os grupos 2'',2''-dimetilcromeno e 3''',3'''-dimetilalila, caracterizados pelos deslocamentos químicos típicos descritos na Tab. 1 (pág. 75), estavam ambos ligados ao anel A como ficou evidenciado pela racionalização do espectro de massas (Quadros 2 e 3, pág. 63 e 64; Fig. 11, pág. 89); o experimento de espectro de massas de espectro de massas (Fig. 20, pág. 96) permitiu confirmar a proposta de fragmentação representada nos quadros 2 e 3.

Para confirmar a posição dos grupos ligados ao anel A foram realizados os experimentos bidimensionais de ressonância magnética nuclear HSQC (Tab. 10, pág. 82; Fig. 21, pág. 97) e HMBC (Tab. 10, pág. 82; Fig. 22, pág. 98). Os gráficos de contorno indicaram que o grupo 2'',2''-dimetilcromeno estava ligado linearmente ao anel A uma vez que o hidrogênio H-1''' ( $\delta_H$  3,23) apresentou correlações com C-7 ( $\delta_C$  158,3,  $J^B$ ), C-8 ( $\delta_C$  109,1,  $J^A$ ), C-9 ( $\delta_C$  160,3,  $J^B$ ) e o H-3''' ( $\delta_H$  5,54) mostrou correlações com C-6 ( $\delta_C$  103,5,  $J^B$ ) e C-4'' ( $\delta_C$  127,1,  $J^A$ ).

O espectro de massas de alta resolução (Fig. 23, pág. 99) mostrou o pico do íon molecular  $M^+ = 436,188560$  (0,0%) correspondente à fórmula molecular  $C_{26}H_{28}O_6$  (436,188589); o que está de acordo com a fórmula descrita através da análise dos dados de ressonância magnética nuclear e de espectrometria de massas de baixa resolução.

O espectro no ultravioleta (Fig. 12, pág. 90) mostrou o perfil esperado para um flavanono, com o máximo de absorção em 276 nm ( $\log \epsilon = 4,52$ ), banda II (cromóforo benzoila) de flavonóides. Do espectro no infravermelho (Fig. 13, pág. 91), destacam-se as bandas referentes a ligações O-H ( $3368,1 \text{ cm}^{-1}$ ) e C=O ( $1643,3 \text{ cm}^{-1}$ ).

Estes dados permitiram caracterizar este flavanono como sendo 5, 2'-diidroxí-3-metoxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalila)-flavanona. Após ampla pesquisa em *Chemical Abstracts* verificou-se que este composto era inédito.

### 3. 2. 2. Substância 9, inédito:

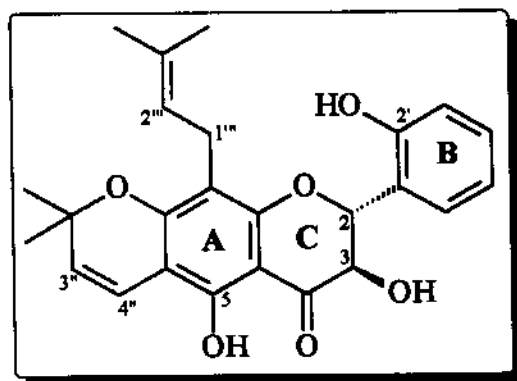


Figura 24: Flavanonol 9, inédito

No espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, Tab. 1, pág. 75; Fig. 25, pág. 100) de 9 observaram-se absorções características do esqueleto flavanonol em  $\delta_{\text{H}}$  4,53 (1H, *d*,  $J = 12\text{Hz}$ , H-3) e em  $\delta_{\text{H}}$  5,39 (1H, *d*,  $J = 12\text{Hz}$ , H-2) e no espectro de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, Tab. 2, pág. 76; Fig. 26.a, pág. 101) os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  78,6 (C-2) e  $\delta_{\text{C}}$  73,2 (C-3). O grupo 2'',2''-dimetilcromeno foi novamente identificado pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,55 (1H, *d*,  $J = 10\text{ Hz}$ , H-3'') e  $\delta_{\text{H}}$  6,64 (1H, *d*,  $J = 10\text{ Hz}$ , H-4'') e em  $\delta_{\text{C}}$  28,4 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-2''),  $\delta_{\text{C}}$  78,0 (C-2''),  $\delta_{\text{C}}$  115,3 (C-3'') e  $\delta_{\text{C}}$  126,8 (C-4''); as absorções em  $\delta_{\text{H}}$  3,2 (2H, *m*, H-1''') e  $\delta_{\text{H}}$  5,12 (1H, *tl*,  $J = 7\text{ Hz}$ , H-2''') e em  $\delta_{\text{C}}$  25,8 (CH<sub>3</sub>-5'''),  $\delta_{\text{C}}$  17,9 (CH<sub>3</sub>-4'''),  $\delta_{\text{C}}$  131,7 (C-3'''),  $\delta_{\text{C}}$  122,0 (C-2''') e  $\delta_{\text{C}}$  21,3 (C-1''') permitiram a identificação de um substituinte 3''',3'''-dimetilalila. A presença de um sinal largo em  $\delta_{\text{H}}$  4,17 no espectro de RMN<sup>1</sup>H indicou a presença de uma hidroxila em C-3, caracterizando um flavanonol com hidroxila livre.

Para confirmar a posição dos grupos 2'',2''-dimetilcromeno e 3''',3'''-dimetilalila foram realizados os espectros bidimensionais HSQC (Tab. 11, pág. 83; Fig. 27, pág. 102) e HMBC (Tab. 11, pág. 83; Fig. 28, pág. 103). Esses gráficos de contorno indicaram que o grupo 2'',2''-dimetilcromeno estava ligado linearmente ao anel A uma vez que o hidrogênio H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  3,23) apresentou correlações com C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  109,6,  $J^2$ ) e C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  160,0,  $J^3$ ) enquanto o H-3'' ( $\delta_{\text{H}}$  5,55) mostrou correlações com C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  103,5,  $J^3$ ) e C-2'' ( $\delta_{\text{C}}$  78,7,  $J^2$ ).

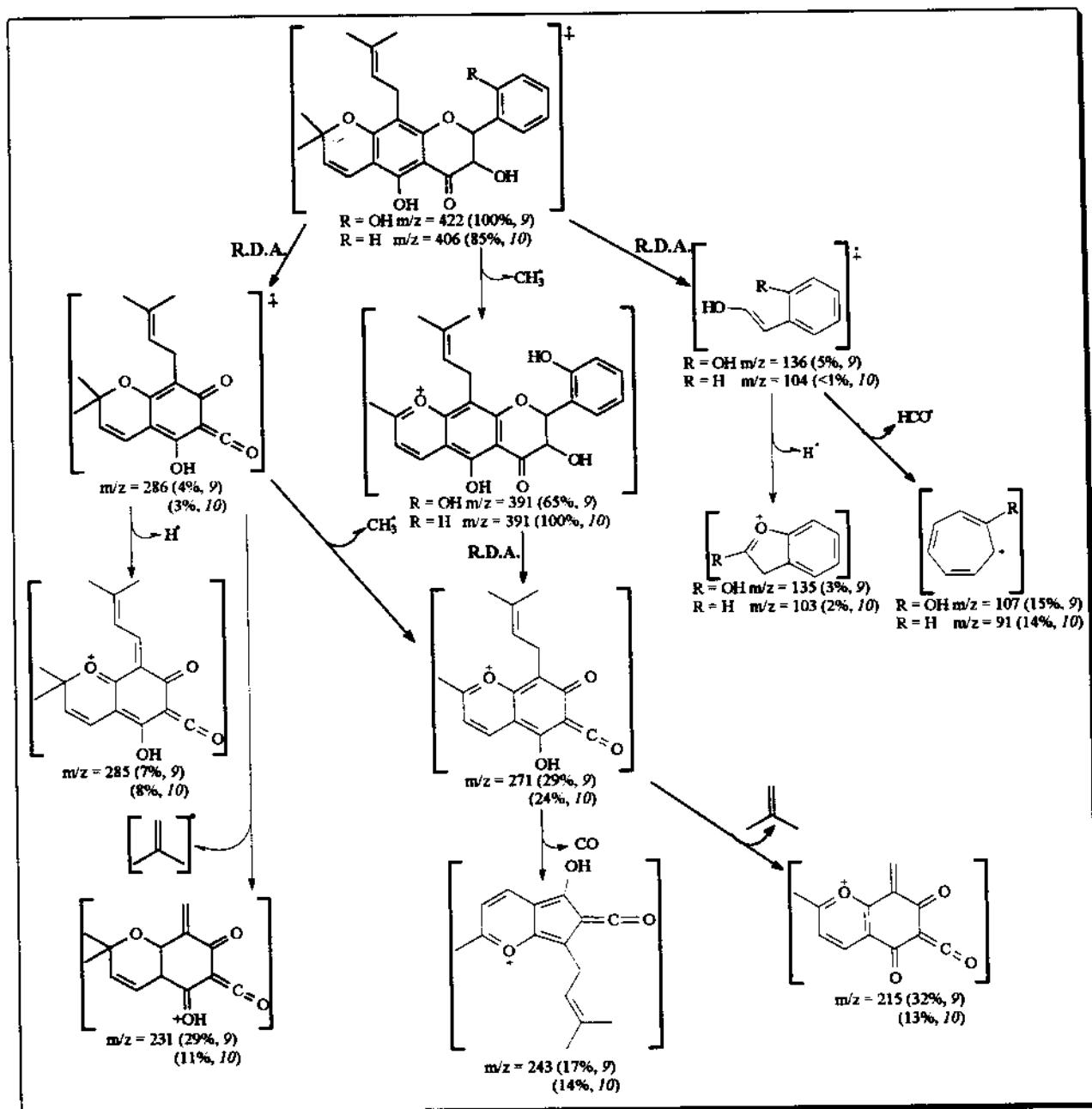
No espectro de massas, os íons *m/z* 286, 285 e 271 (fragmentação tipo Retro Diels-Alder do anel C) sugerem que os grupos substituintes estavam ligados aos anel A. Os fragmentos iônicos observados nesse espectro podem ser explicados pelos mesmos mecanismos de fragmentação discutidos para os compostos 7 e 8 (Quadros 4 e 5, pág. 69 e 70; Fig. 29, pág. 104).

O espectro de massas de alta resolução (Fig. 23, pág. 99) indicou um peso molecular de 422,172916, observada, e 422,172939, calculada, sugerindo a fórmula estrutural de C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>; esta fórmula é compatível com a análise dos dados espectrais anteriormente descrita.

Os espectros no ultravioleta (Fig. 12, pág. 90) e no infravermelho (Fig. 30, pág. 105) apresentaram as absorções esperadas para o esqueleto proposto, a saber, absor-



Quadro 7: Proposta de fragmentação tipo Retro Diels-Alder para o composto 9 e para *Mundulinol* (10)



## 3. 2. 3. Substância 10, Mundulinol:

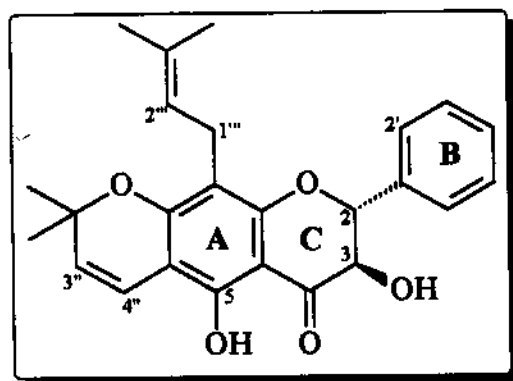


Figura 31: Mundulinol

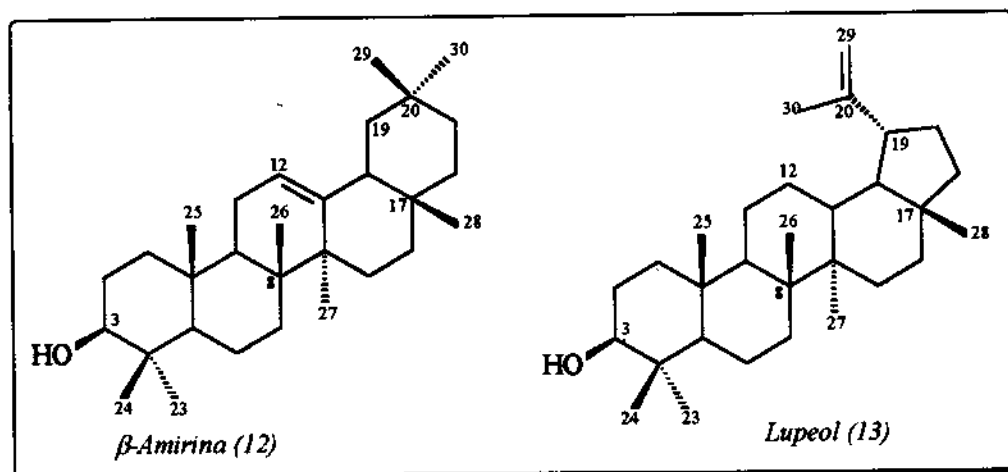
Observou-se, neste espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, Tab.1, pág. 75; Fig. 32, pág. 106), os sinais típicos de um flavanonol em  $\delta_H$  4,51 (1H, *dd*,  $J = 11$  e 1Hz, H-3) e em  $\delta_H$  5,06 (1H, *d*,  $J = 11$  Hz, H-2), cujos correspondentes sinais no espectro de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, Tab. 4, pág. 78; Fig. 33.a, pág. 107) estavam em  $\delta_C$  72,5 (C-2) e em  $\delta_C$  83,1 (C-3); a presença de um sinal integrando para um hidrogênio em  $\delta_H$  3,54 indicou a existência de uma hidroxila livre em C-3. As absorções em  $\delta_H$  7,47 (3H, *m*, H-3', H-4' e H-5') e  $\delta_H$  7,57 (2H, *dd*,  $J = 7,5$  e 1,5Hz, H-2' e H-6') indicaram um anel B livre. Os grupos 2'',2''-dimetilcromeno e 3'',3''-dimetilalila também foram identificados através de suas absorções características (Tab. 1, pág. 75).

A análise do espectro de massas (Quadro 4 e 5, pág. 69 e 70; Fig. 29, pág. 104) foi muito similar a realizada aos compostos anteriores, evidenciando mais uma vez a forte correlação entre os compostos isolados.

Os espectros de ultravioleta (Fig. 12, pág. 90) e de infravermelho (Fig. 30, pág. 105) demonstraram os sinais esperados em  $\lambda$  máx. 276 nm ( $\log \epsilon = 4,86$ ) e absorções para as ligações O-H e C=O em respectivamente 3449,0 e 1638,9  $\text{cm}^{-1}$ .

Todos os dados corroboraram para a identificação de **Mundulinol**, um flavanonol isolado pela primeira vez de *Mundulea sericea*<sup>12</sup>.

<sup>12</sup> VAN ZYL, J. J.; RALL, G. J. H., and ROUX, D. G. The structure, absolute configuration, synthesis, and <sup>13</sup>C N.m.r. spectra of the prenylated pyranoflavonoids from *Mundulea sericea*. *Journal of Chemical Research* (M): 1301-1320, 1979 and (S): 97, 1979.

3. 3. Triterpenos pentacíclicos,  $\beta$ -amirina (11) e lupeol (12):Figura 34:  $\beta$ -Amirina e Lupeol

A comparação entre o espectro de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, Tab. 7, pág. 80; Fig. 35.a, pág. 108), DEPT (Fig. 35.b, pág. 108) e dados da literatura<sup>13</sup> permitiram identificar os núcleos ursoleano e lupano, ambos hidroxilados em C-3. O composto 12,  $\beta$ -amirina, apresentou no espectro de RMN<sup>13</sup>C absorções características em  $\delta_C$  79,1 (C-3, CH),  $\delta_C$  121,9 (C-12, CH<sub>2</sub>),  $\delta_C$  145,4 (C-13, CH),  $\delta_C$  46,9 (C-19, CH<sub>2</sub>),  $\delta_C$  30,9 (C-20, C<sub>0</sub>),  $\delta_C$  33,3 (C-29, CH<sub>2</sub>) e  $\delta_C$  23,7 (C-30, CH<sub>3</sub>) que foram confirmadas com dados publicados<sup>14</sup>; já lupeol (13) foi identificado pelos sinais no espectro de RMN<sup>13</sup>C em  $\delta_C$  79,0 (C-3, CH),  $\delta_C$  25,1 (C-12, CH<sub>2</sub>),  $\delta_C$  38,1 (C-13, CH),  $\delta_C$  47,9 (C-19, CH),  $\delta_C$  151,2 (C-20, C<sub>0</sub>),  $\delta_C$  109,3 (C-29, CH<sub>2</sub>) e  $\delta_C$  19,3 (C-30, CH<sub>3</sub>) e confirmado pela literatura<sup>15</sup>. O espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, Tab. 6, pág. 79; Fig. 36, pág. 109) apresentou sinais em  $\delta_H$  0,76,  $\delta_H$  0,84,  $\delta_H$  0,97,  $\delta_H$  1,04,  $\delta_H$  0,95,  $\delta_H$  0,79 e  $\delta_H$  1,69 (singletos, metilas H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28 e H-30, respectivamente), em  $\delta_H$  4,57 (1H, *dd*,  $J = 2,5$  e 1Hz, H-29a) e

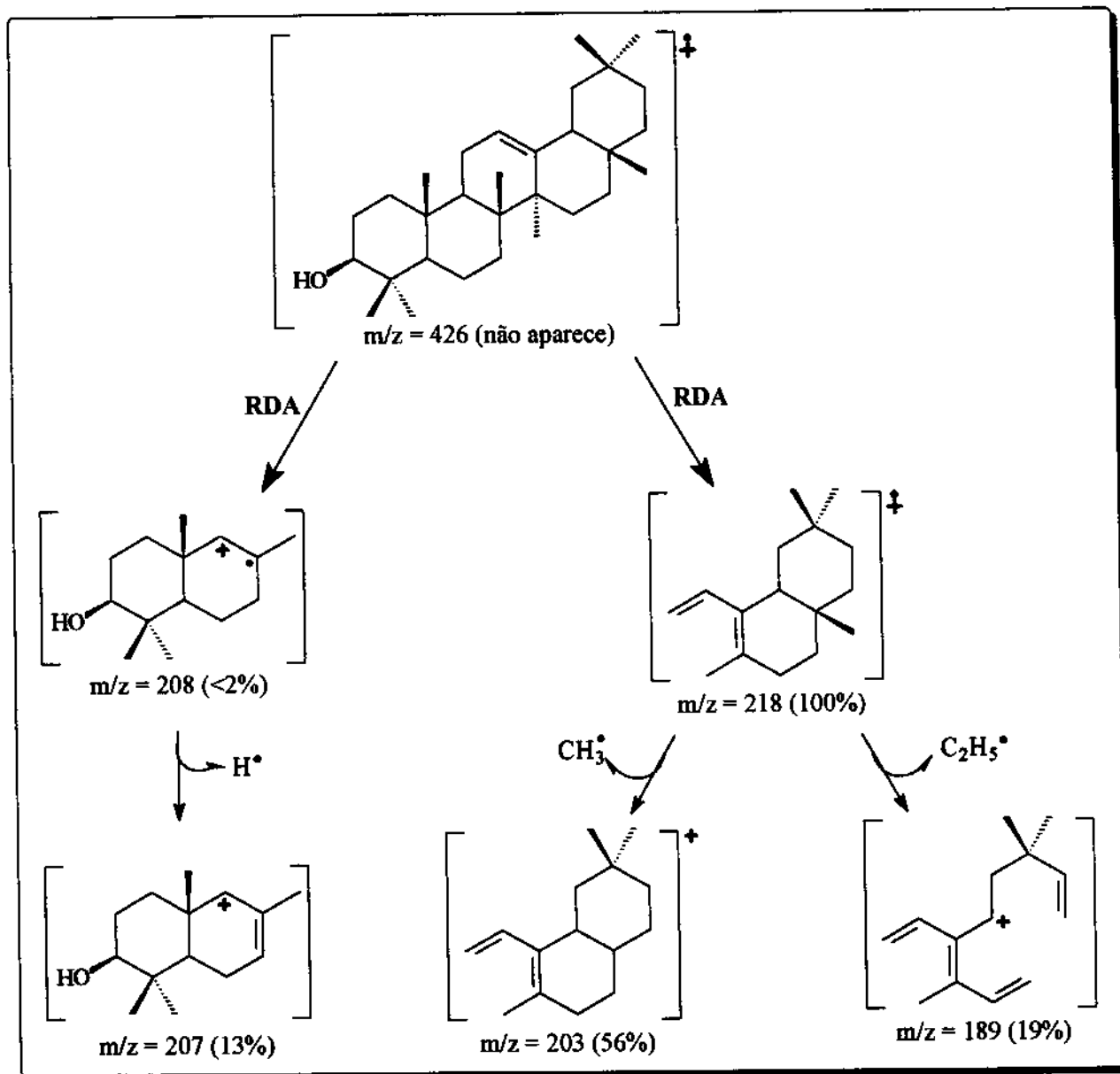
<sup>13</sup> OLEA, R.S.G. e ROQUE, N.F. Análise de misturas de triterpenos por RMN<sup>13</sup>C. *Química Nova* 13 (4): 278-281, 1990.

<sup>14</sup> SEO, S.; TOMITA, Y.; TORI, K. Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of the components of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. *Tetrahedron Letters* 1: 7-10, 1975.

<sup>15</sup> WENKERT, E.; BADDELEY, G.V.; BURFITT, I.R. and MORENO, L.N. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally-occurring substances - LVII. Triterpenes related to lupane and hopane. *Organic Magnetic Resonance* 11 (7): 337-343, 1978.

em  $\delta_H$  4,69 (1H, *dl*,  $J = 2,5\text{Hz}$ , H-29b) referentes a lupeol e em  $\delta_H$  3,21 (*dd*,  $J = 10,5$  e  $5\text{Hz}$ , H-3) e em  $\delta_H$  5,18 (1H, *t*,  $J = 3,5\text{Hz}$ , H-12) atribuídas a  $\beta$ -amirina.

**Quadro 8:** Proposta de fragmentação Tipo Retro Diels-Alder para  $\beta$ -Amirina:

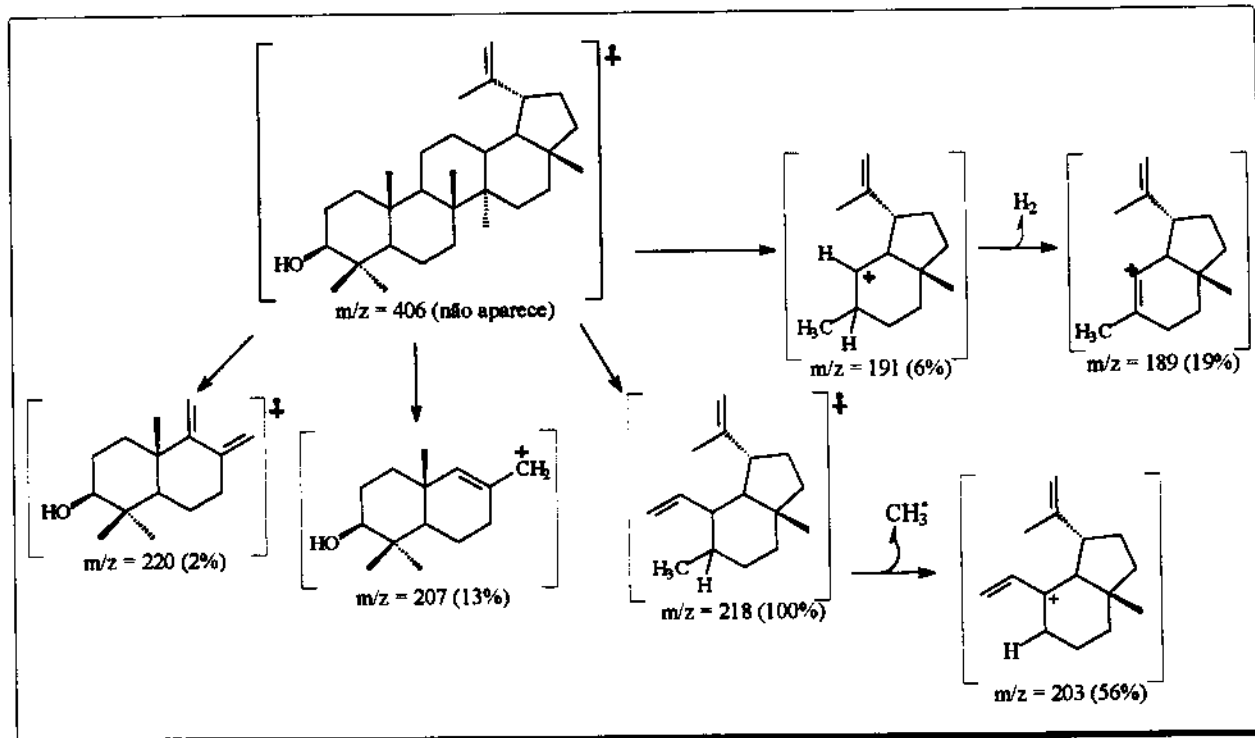


A análise do cromatograma (CG/EM, Fig. 37, pág. 109) revelou a presença de uma mistura complexa, onde o pico com  $T_R = 31,194$  min corresponde à mistura lupeol +  $\beta$ -amirina; o espectro de massas deste pico mostrou as fragmentações características para esses dois núcleos, com o fragmento iônico  $m/z$  218 (100%) sendo explicado por um



mecanismo tipo Retro Diels-Alder<sup>16</sup> para  $\beta$ -amirina (Quadro 8) e por um mecanismo de quebra de ligação sigma e rearranjos<sup>17</sup> para o lupeol (Quadro 9).

Quadro 9: Proposta de fragmentação através de clivagem sigma e rearranjos para Lupeol:

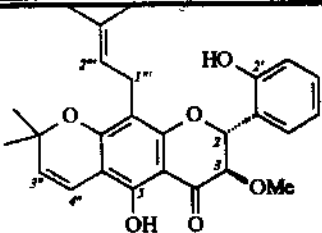
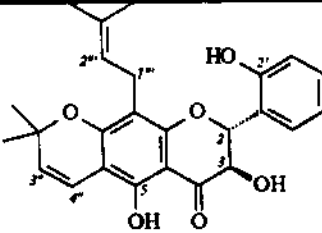
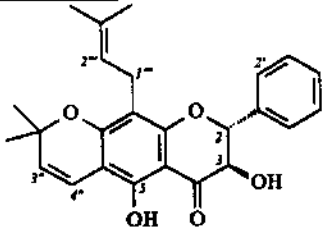


<sup>16</sup> SHANNON, J.S. Studies in mass spectroscopy - VII. Triterpenoids: ifflaionic acid. *Australian Journal of Chemistry* 16 : 683-689, 1963.

<sup>17</sup> MUCCINO, R.R. and DJERASSI, C. Mass spectroscopy in structural and stereochemical problems - CCXXXIX. Elucidation of the ring D cleavage in lanostane. *Journal of the American Chemical Society* 96 (2): 556-570, 1974.

## Anexo C: Tabelas

Tabela 1: Dados de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) dos compostos 8<sup>1</sup>, 9<sup>1</sup> e 10<sup>2</sup>

	 Substância 8		 Substância 9		 Substância 10	
H	$\delta$	multiplicidade e J	$\delta$	multiplicidade e J	$\delta$	multiplicidade e J
2	5,43	1H, d, J = 11 Hz	5,39	1H, d, J = 11 Hz	5,06	1H, d, J = 12 Hz
3	4,15	1H, d, J = 11 Hz	4,53	1H, d, J = 11 Hz	4,51	1H, d, J = 12 Hz
3-OR	3,60	3H, s, O-CH <sub>3</sub>	4,18	1H, sl, OH	3,54	1H, d, J = 1Hz, OH
OH-5	11,95	1H, s	11,29	1H, s	11,42	1H, s
OH-2'	6,73	1H, s	6,86	1H, sl, OH	—	—
3'	7,00	1H, dd, J = 1 e 8 Hz	7,02	1H, dl, J = 7,5 Hz	7,41	5H, m, H-2', H-3',
4'	7,31	1H, td, J = 1 e 8 Hz	7,30	1H, tl, J = 7,5 Hz	—	H-4', H-5' e H-6'
5'	7,03	1H, dd, J = 1 e 8 Hz	7,05	1H, dl, J = 7,5 Hz	—	—
6'	7,52	1H, td, J = 1 e 8 Hz	7,57	1H, tl, J = 7,5 Hz	—	—
CH <sub>3</sub> -2''	1,45*	3H, s	1,46*	3H, s	1,46*	3H, s
CH <sub>3</sub> -2''	1,47*	3H, s	1,47*	3H, s	1,47*	3H, s
3''	5,54	1H, d, J = 10 Hz	5,55	1H, d, J = 10 Hz	5,54	1H, d, J = 10 Hz
4''	6,65	1H, d, J = 10 Hz	6,64	1H, d, J = 10 Hz	6,65	1H, d, J = 10 Hz
1'''	3,23	2H, dd, J = 6 e 10Hz	3,23	2H, dd, J = 7 e 10Hz	3,19	2H, dl, J = 7 Hz
2'''	5,12	1H, t, J = 6 Hz	5,12	1H, tl, J = 7 Hz	5,14	1H, tq, J = 7 e 1 Hz
4'''	1,66**	3H, s	1,66 <sup>#</sup>	6H, s	1,61 <sup>-</sup>	3H, d, J = 1 Hz
5'''	1,67**	3H, s	—	—	1,65 <sup>-</sup>	3H, d, J = 1 Hz

\*, \*\*, ... dados intercambiáveis, <sup>#</sup> H-4''' e H-5''', <sup>1</sup> espectros a 500 MHz, <sup>2</sup> espectro a 300MHz

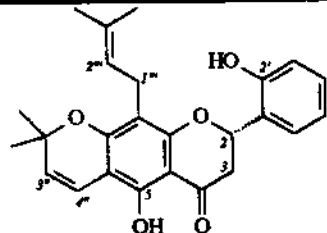
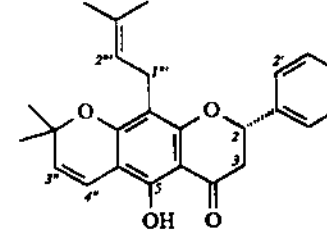
Tabela 2: Dados de RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) de *Minimiflorina* (7)<sup>1</sup>  
e das substâncias 8<sup>2</sup> e 9<sup>1</sup>.

	7	8	9
# C			
CH-2	76,8*	77,8	78,6
C-3	41,9 (CH <sub>2</sub> )	81,8 (CH)	73,2 (CH)
C <sub>σ</sub> -4	196,4	195,7	195,0
C <sub>σ</sub> -5	156,7	156,7	156,0
C <sub>σ</sub> -6	103,3	103,5	103,5
C <sub>σ</sub> -7	158,7	158,3	158,9
C <sub>σ</sub> -8	108,8	109,1	109,6
C <sub>σ</sub> -9	159,7	160,3	161,0
C <sub>σ</sub> -10	102,6	101,3	100,1
C <sub>σ</sub> -1'	124,4	124,2	124,2
C <sub>σ</sub> -2'	153,7	154,0	153,9
CH-3'	116,8	117,8	118,1
CH-4'	129,8	129,9	129,9
CH-5'	120,8	121,1	121,3
CH-6'	126,8	126,3	126,5
C <sub>σ</sub> -2''	78,3	78,5	78,0
CH-3''	115,6	115,4	115,3
CH-4''	126,2	127,1	126,8
CH <sub>3</sub> -2''**	28,3	28,3	28,4
CH <sub>3</sub> -2'''**	28,4	28,4	28,4
CH <sub>3</sub> -1'''	21,5	21,3	21,3
CH-2'''	122,2	122,2	122,0
C <sub>σ</sub> -3'''	131,7	131,6	131,7
CH <sub>3</sub> -4'''*	17,8	17,8	17,9
CH <sub>3</sub> -5'''*	25,8	25,7	25,8
CH <sub>3</sub> -O-3	—	61,9	—

\*,\*\* sinais intercambiáveis; <sup>1</sup> 75 MHz, <sup>2</sup> 125 MHz;

\* este sinal foi mascarado pelo sinal do clorofórmio.

Tabela 3: Dados de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) dos *Minimiflorina* (7)<sup>1</sup> e *Mundulina* (11)<sup>2</sup>

 <b>Substância 7</b>			 <b>Substância 11</b>		
<i>H</i>	$\delta$	<i>multiplicidade e J</i>	$\delta$	<i>multiplicidade e J</i>	
2	5,63	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 13 e 3Hz	5,41	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 13 e 3,3 Hz	
3 eq	2,91	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17 e 3Hz	2,83	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17 e 3,3 Hz	
3 ax	3,12	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17 e 13Hz	3,04	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17 e 13Hz	
OH-5	12,28	1H, <i>s</i>	12,25	1H, <i>s</i>	
3'	6,91	1H, <i>dl</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz	7,40	5H, <i>m</i> , H-2', H-3'	
4'	7,27	1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz		H-4', H-5' e H-6'	
5'	6,98	1H, <i>dl</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz			
6'	7,32	1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz			
CH <sub>2</sub> -2''	1,45*	3H, <i>s</i>	1,43*	3H, <i>s</i>	
CH <sub>2</sub> -2'''	1,47*	3H, <i>s</i>	1,45*	3H, <i>s</i>	
3''	5,53	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10 Hz	5,50	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10 Hz	
4''	6,65	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10 Hz	6,64	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10 Hz	
1'''	3,24	2H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 7 e 10Hz	3,22	2H, <i>dl</i> , <i>J</i> = 7 Hz	
2'''	5,13	1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz	5,16	1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 7 Hz	
4'''	1,68#	6H, <i>s</i>	1,65#	6H, <i>s</i>	
5'''	1,68#	—	1,65#	—	

\*, \*\*, ... dados intercambiáveis, # H-4''' e H-5''', <sup>1</sup> espectros a 500 MHz, <sup>2</sup> espectro a 300MHz

Tabela 4: RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) de *Mundulinol* (10) e *Mundulina* (11)

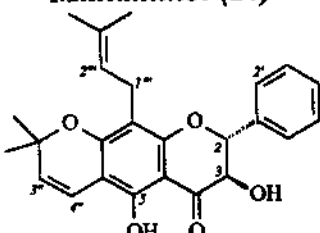
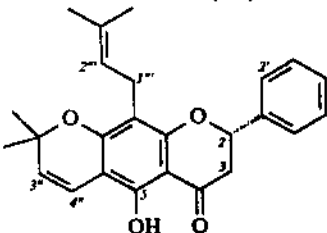
	<i>Mundulinol</i> (10)	<i>Mundulina</i> (11)
		
n°. C		
CH-2	72,5	78,1
<b>C-3</b>	<b>83,1</b>	<b>43,3</b>
C <sub>σ</sub> -4	196,5	-
C <sub>σ</sub> -5	156,2	-
C <sub>σ</sub> -6	109,4	-
C <sub>σ</sub> -7	159,5	-
C <sub>σ</sub> -8	103,3	-
C <sub>σ</sub> -9	161,0	-
C <sub>σ</sub> -10	100,3	-
C <sub>σ</sub> -1'	136,7	-
<b>CH-2'</b>	<b>127,5</b>	<b>126,2</b>
CH-3'	128,7	128,9
CH-4'	129,3	128,9
CH-5'	128,7	128,9
CH-6'	127,5	126,2
C <sub>σ</sub> -2''	78,5	-
CH-3''	115,5	115,8
CH-4''	126,5	128,7
CH <sub>3</sub> -2'''	28,2	28,1
CH <sub>3</sub> -2'''	28,2	28,1
CH <sub>3</sub> -1'''	21,1	21,3
CH-2'''	122,2	122,7
C <sub>σ</sub> -3'''	131,5	-
CH <sub>3</sub> -4'''	17,5	17,6
CH <sub>3</sub> -5'''	25,6	25,6

Tabela 6: RMN<sup>1</sup>H da mistura  $\beta$ -Amirina (12) + Lupeol (13)

n <sup>o</sup> H	$\delta$	multiplicidade e J
H-23 <sup>2</sup>	0,76	s
H-28 <sup>2</sup>	0,79	s
H-24 <sup>2</sup>	0,84	s
H-27 <sup>2</sup>	0,95	s
H-25 <sup>2</sup>	0,97	s
H-26 <sup>2</sup>	1,04	s
H-30 <sup>2</sup>	1,69	s
H-3 <sup>1,2</sup>	3,21	dd, J = 10,5 e 5Hz
H-29a <sup>*2</sup>	4,57	dd, J = 2,5 e 1Hz
H-29b <sup>*2</sup>	4,69	dl, J = 2,5Hz
H-12 <sup>1</sup>	5,18	t, J = 3,5Hz

<sup>1</sup> atribuídas a  $\beta$ -amirina, <sup>2</sup> atribuídas a lupeol, \* sinais intercambiáveis

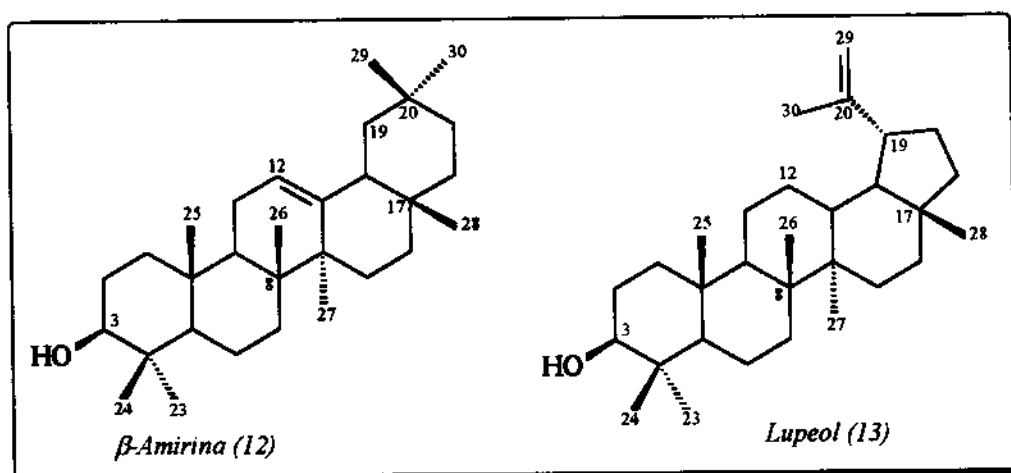
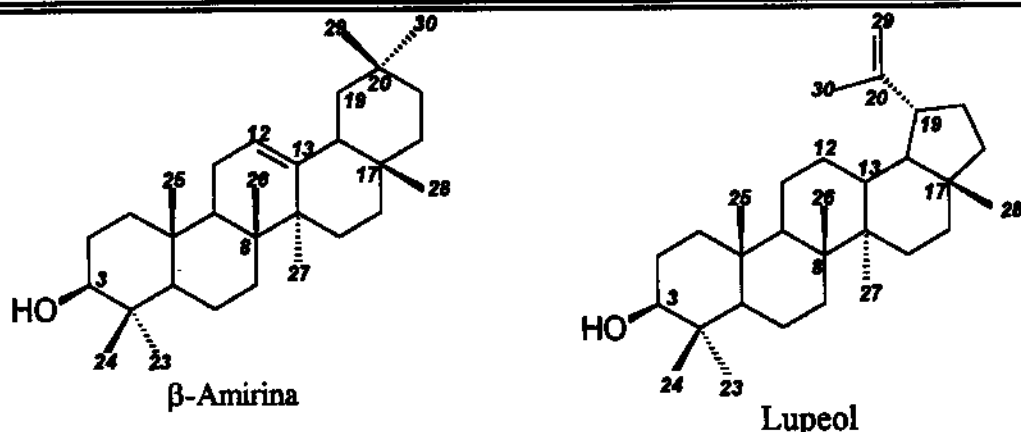


Tabela 7: RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura β-Amirina (12) + Lupeol (13)

no. C	Literatura <sup>1</sup> (15 Mhz)	Experimental (75 MHz)	Literatura <sup>2</sup> (25 Mhz)	Experimental (75 MHz)
1	38,5 (CH <sub>2</sub> )	38,4	38,7 (CH <sub>2</sub> )	38,7
2	27,0 (CH <sub>2</sub> )	27,0	27,4 (CH <sub>2</sub> )	27,3
3	78,9 (CH)	79,0	78,8 (CH)	79,1
4	38,7 (C <sub>0</sub> )	38,7	38,8 (C <sub>0</sub> )	38,7
5	55,1 (CH)	55,1	55,2 (CH)	55,2
6	18,3 (CH <sub>2</sub> )	18,1	18,3 (CH <sub>2</sub> )	18,3
7	32,6 (CH <sub>2</sub> )	32,6	34,2 (CH <sub>2</sub> )	34,3
8	39,7 (C <sub>0</sub> )	39,6	40,8 (C <sub>0</sub> )	40,7
9	47,6 (CH)	47,9	50,4 (CH)	50,5
10	37,0 (C <sub>0</sub> )	36,8	37,1 (C <sub>0</sub> )	37,0
11	23,4 (CH <sub>2</sub> )	23,3	20,9 (CH <sub>2</sub> )	20,9
12	121,7 (CH)	121,9	25,1 (CH <sub>2</sub> )	25,1
13	145,0 (C <sub>0</sub> )	145,4	38,0 (C <sub>0</sub> )	38,1
14	41,7 (C <sub>0</sub> )	41,6	42,8 (C <sub>0</sub> )	42,8
15	28,3 (CH <sub>2</sub> )	29,4	27,4 (CH <sub>2</sub> )	27,3
16	26,2 (CH <sub>2</sub> )	26,2	35,5 (CH <sub>2</sub> )	35,6
17	32,5 (C <sub>0</sub> )	32,3	42,9 (C <sub>0</sub> )	42,9
18	47,2 (CH)	47,3	48,2 (CH)	48,0
19	46,8 (CH)	46,9	47,9 (CH)	47,8
20	31,1 (CH)	30,9	150,9 (C <sub>0</sub> )	151,2
21	34,8 (CH <sub>2</sub> )	34,8	29,8 (CH <sub>2</sub> )	29,9
22	37,2 (CH <sub>2</sub> )	37,2	39,9 (CH <sub>2</sub> )	40,0
23	28,1 (CH <sub>3</sub> )	28,1	28,0 (CH <sub>3</sub> )	28,0
24	15,5 (CH <sub>3</sub> )	15,5	15,4 (CH <sub>3</sub> )	15,4
25	15,5 (CH <sub>3</sub> )	15,5	16,1 (CH <sub>3</sub> )	16,1
26	16,8 (CH <sub>3</sub> )	16,8	15,9 (CH <sub>3</sub> )	16,0
27	26,0 (CH <sub>3</sub> )	26,0	14,5 (CH <sub>3</sub> )	14,5
28	27,3 (CH <sub>3</sub> )	27,3	18,0 (CH <sub>3</sub> )	18,0
29	33,2 (CH <sub>3</sub> )	33,3	109,3 (CH)	109,4
30	23,6 (CH <sub>3</sub> )	23,7	19,3 (CH <sub>3</sub> )	19,3

<sup>1</sup> SEO, S.; TOMITA, Y.; TORI, K. Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. *Tetrahedron Letters* 1: 7-10, 1975.

<sup>2</sup> WENKERT, E.; BADDELEY, G.V.; BURFITT, I.R. and MORENO, L.N. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally-occurring substances - LVII. Triterpenes related to lupane and hopane. *Organic Magnetic Resonance* 11 (7): 337-343, 1978.

**Tabela 9.** Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C,  $J^1$ ) e HMBC (H-C,  $J^n$ ) para *Minimiflorina*

H ( $\delta$ )	C ( $\delta$ , $J^1$ )	C ( $\delta$ , $J^n$ )
2 (5,45)	2 (77,8)	-
3 eq (2,91)	3 (41,9)	-
3 ax (3,12)	3 (41,9)	-
<u>HO-5</u> (12,28)	-	-
3' (6,91)	3' (116,8)	1'(124,4), 5' (120,8)
4' (7,27)	4' (129,8)	2' (153,7), 6' (126,8)
5' (6,98)	5' (120,8)	1'(124,4), 3' (116,8)
6' (7,32)	6' (126,8)	4' (129,8)
<u>CH<sub>3</sub>-2''a</u> (1,45)	<u>CH<sub>3</sub>-2''a</u> (28,3)	2'' (78,3), 3'' (126,2)
<u>CH<sub>3</sub>-2''b</u> (1,47)	<u>CH<sub>3</sub>-2''b</u> (28,4)	2'' (78,3), 3'' (126,2)
3'' (5,53)	3'' (115,6)	6 (103,3), 2'' (78,3)
4'' (6,65)	4'' (126,2)	2'' (78,3)
1''' (3,24)	1''' (21,4)	7 (158,7), 8(108,8), 9(159,7), 2'''(122,2), 3''' (131,7)
2''' (5,13)	2''' (122,2)	-
4''' (1,68)	4''' (17,8)	3''' (131,7), 2''' (122,2)
5''' (1,68)	5''' (25,8)	3''' (131,7), 2''' (122,2)

(-) não foram observadas correlações



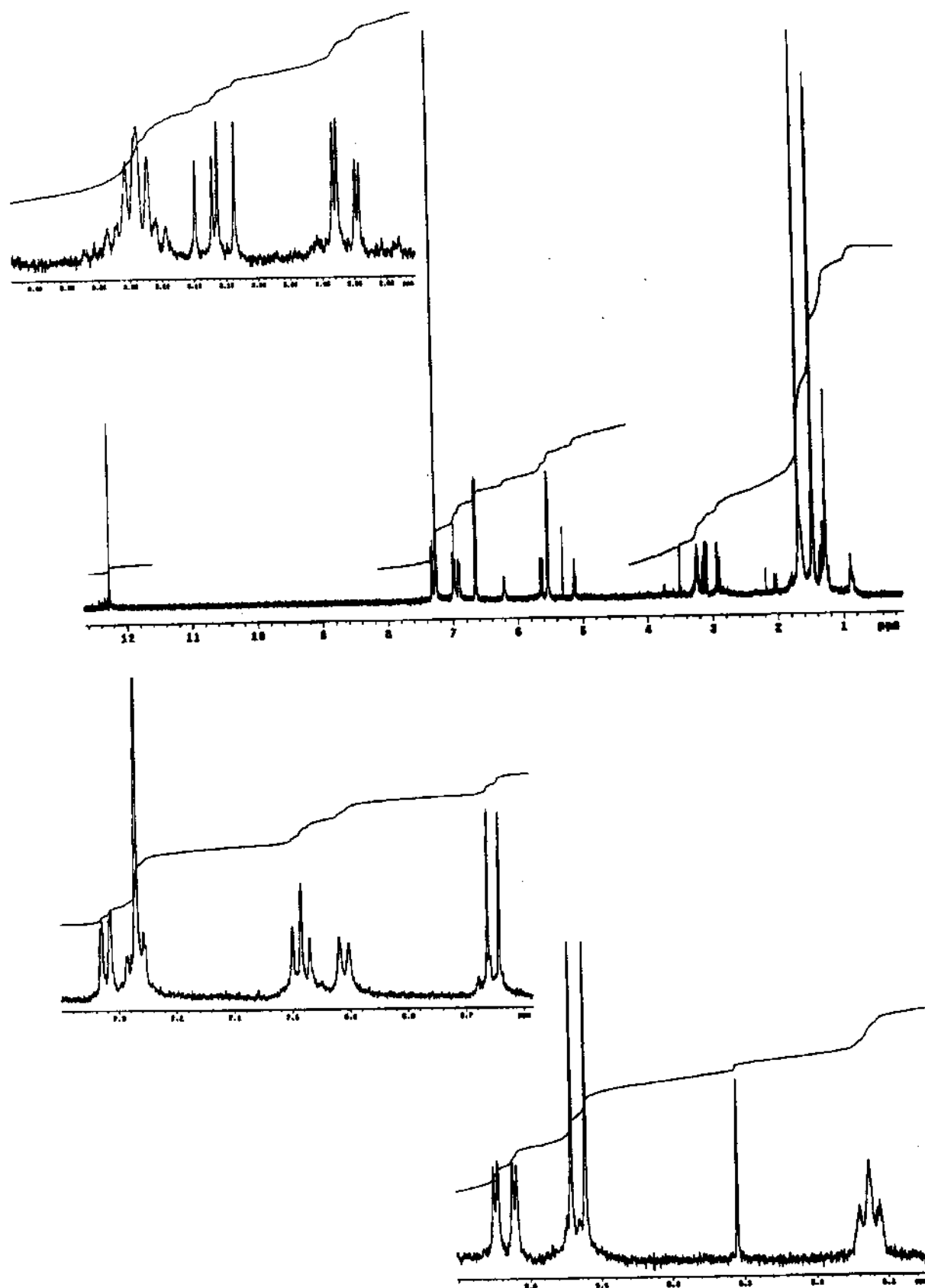
**Tabela 10.** Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C,  $J^1$ ) e HMBC (H-C,  $J^n$ ) para substância 8

H ( $\delta$ )	C ( $\delta$ , $J^1$ )	C ( $\delta$ , $J^n$ )
<b>2 (5,45)</b>	2 (77,8)	3 (81,8), 4 (195,7), 2'(154,0), 6'(126,3)
<b>3 (4,16)</b>	3 (81,8)	2 (77,8), 3-OCH <sub>3</sub> (61,9), 4 (195,7), 1'(124,2)
<b><u>H</u><sub>3</sub>CO-3 (3,60)</b>	3-OCH <sub>3</sub> (61,9)	-
<b><u>HO</u>-5 (11,95)</b>	-	5 (156,7), 6 (103,5), 7 (158,3), 10 (101,3)
<b><u>HO</u>-2' (6,76)</b>	-	3' (117,8)
<b>3' (7,00)</b>	3' (117,8)	5' (121,1)
<b>4' (7,31)</b>	4' (129,9)	2'(154,0), 3' (117,8), 6'(126,3)
<b>5' (7,04)</b>	5' (121,1)	1'(124,2), 2'(154,0), 3' (117,8)
<b>6' (7,51)</b>	6' (126,3)	2'(154,0), 4' (129,9)
<b><u>CH</u><sub>3</sub>-2''a (1,45)</b>	<u>CH</u> <sub>3</sub> -2''a (28,3)	2'' (78,5), 3'' (115,4), 4'' (127,1)
<b><u>CH</u><sub>3</sub>-2''b (1,47)</b>	<u>CH</u> <sub>3</sub> -2''b (28,4)	2'' (78,5), 3'' (115,4), 4'' (127,1)
<b>3'' (5,54)</b>	3'' (115,4)	6 (103,5), 2'' (78,5), 4'' (127,1)
<b>4'' (6,65)</b>	4'' (127,1)	5 (156,7), 7 (158,3), 2'' (78,5)
<b>1''' (3,23)</b>	1''' (21,3)	8 (109,1), 9 (160,3), 2''' (122,2), 3''' (131,6)
<b>2''' (5,13)</b>	2''' (122,2)	4''' (17,8), 5''' (25,7)
<b>4''' (1,67)</b>	4''' (17,8)	3''' (131,6), 5''' (25,7)
<b>5''' (1,67)</b>	5''' (25,7)	3''' (131,6), 4''' (17,8)

**Tabela 11.** Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C,  $J^1$ ) e HMBC (H-C,  $J^n$ ) para substância 9

H ( $\delta$ )	C ( $\delta$ , $J^1$ )	C ( $\delta$ , $J^n$ )
2 (5,39)	2 (78,6)	-
3 (4,53)	3 (73,2)	-
<u>HO-3</u> (4,17)	-	-
<u>HO-5</u> (11,29)	-	-
3' (7,02)	3' (118,1)	-
4' (7,30)	4' (129,9)	-
5' (7,05)	5' (121,3)	-
6' (7,57)	6' (126,5)	2' (153,9)
<u>CH<sub>3</sub>-2''a</u> (1,46)	<u>CH<sub>3</sub>-2''a</u> (28,4)	2'' (78,7), 4'' (126,8)
<u>CH<sub>3</sub>-2''b</u> (1,47)	<u>CH<sub>3</sub>-2''b</u> (28,4)	2'' (78,7), 4'' (126,8)
3'' (5,55)	3'' (115,3)	6 (103,5), 2'' (78,7)
4'' (6,64)	4'' (126,8)	7 (158,9), 2'' (78,7)
1''' (3,23)	1''' (21,3)	8 (109,6), 9 (161,0), 3''' (131,7)
2''' (5,12)	2''' (122,0)	-
4''' (1,66)	4''' (17,9)	3'' (131,7), 2'' (122,0)
5''' (1,66)	5''' (25,8)	3'' (131,7), 2'' (122,0)

## Anexo D: Figuras

Figura 5: RMN $^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de *Minimiflorina* (7)

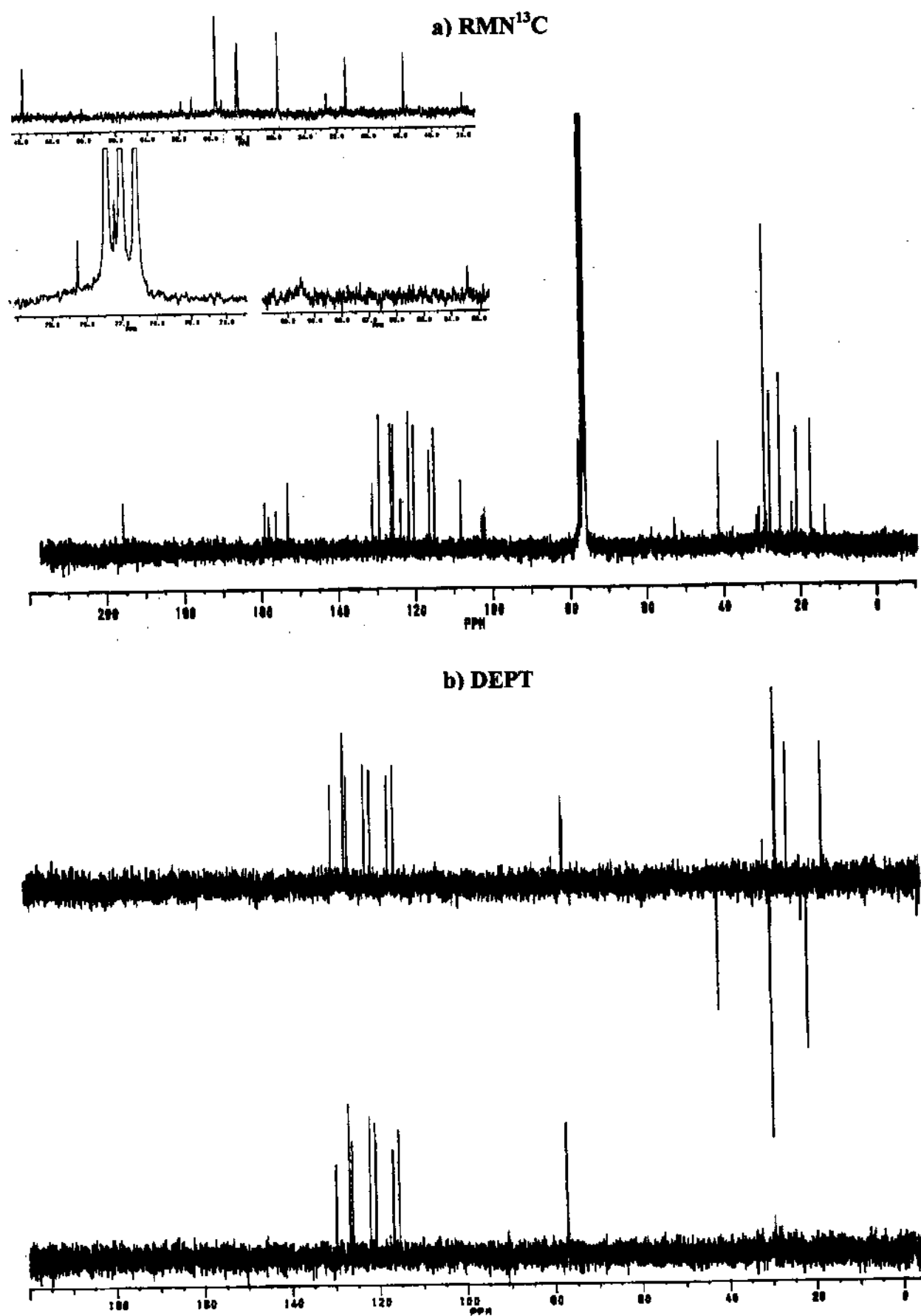


Figura 6.a: RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) e .b: DEPT (135 e 90) de *Minimiflorina* (7)

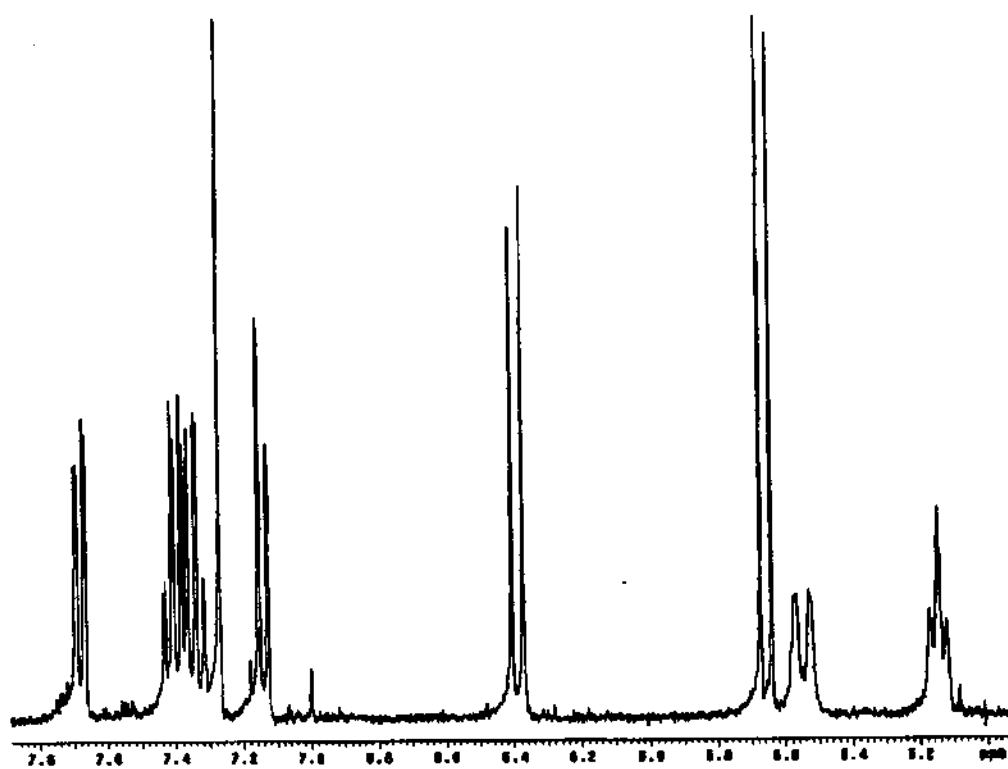
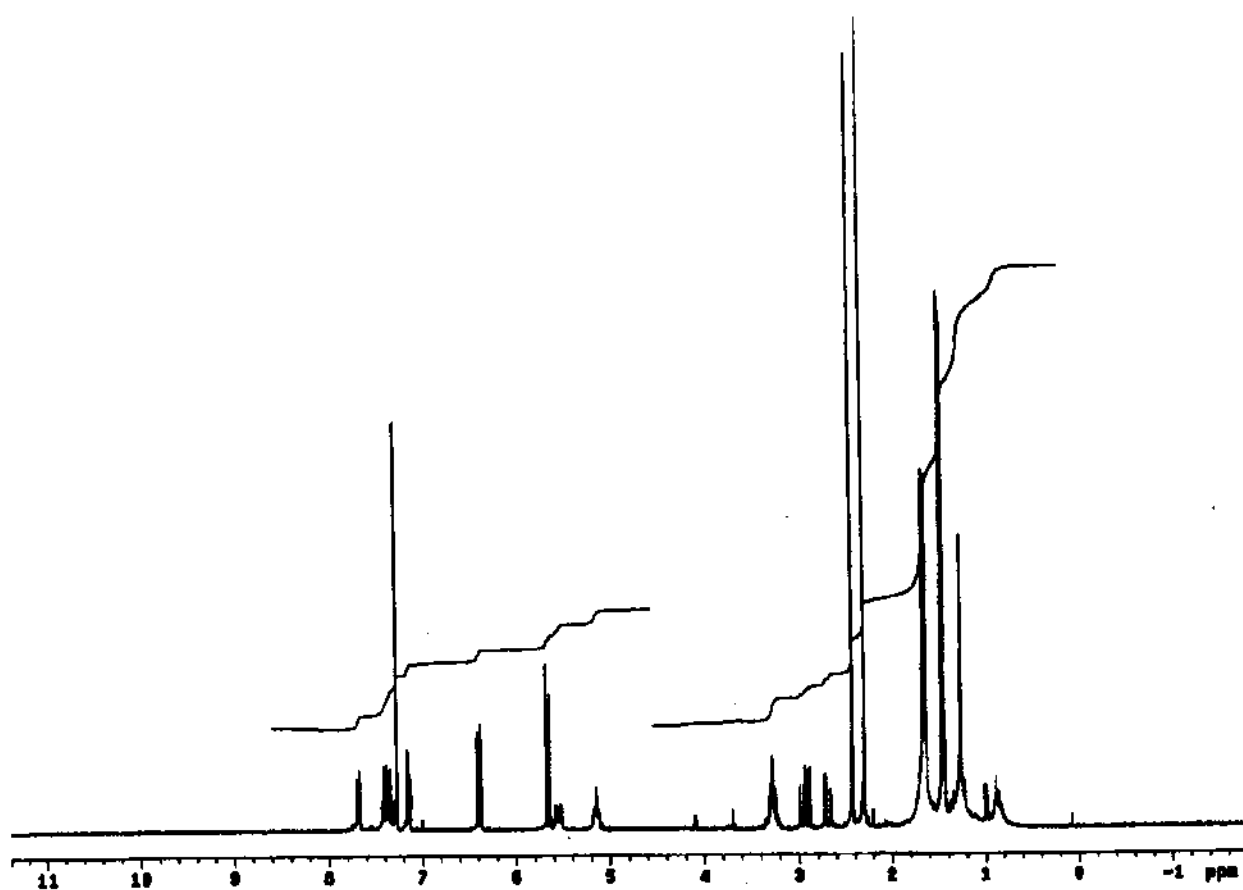


Figura 8: RMN $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do diacetato de *Minimiflorina*

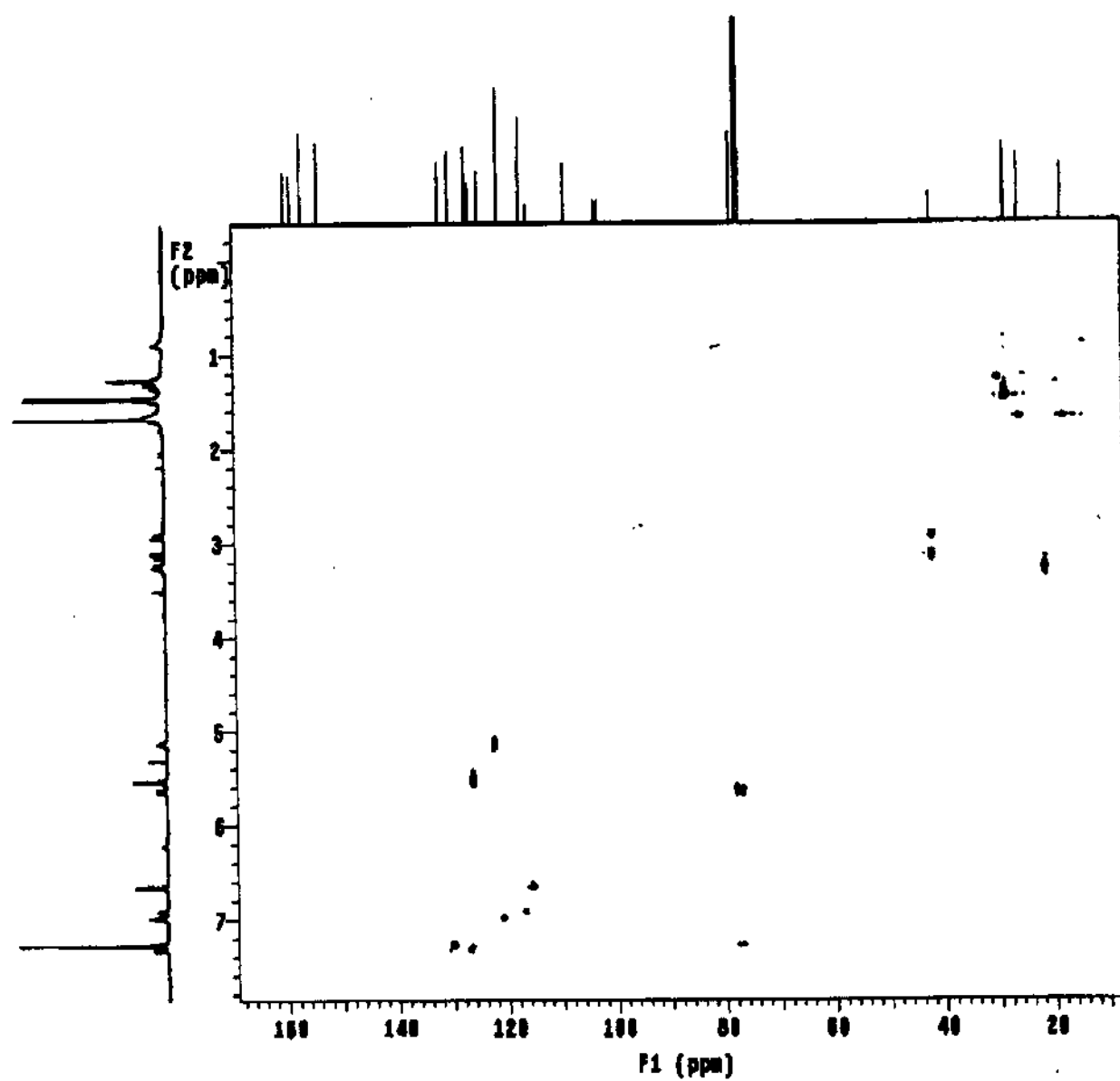


Figura 9: Gráficos de Contorno HSQC de *Minimiflorina* (7)

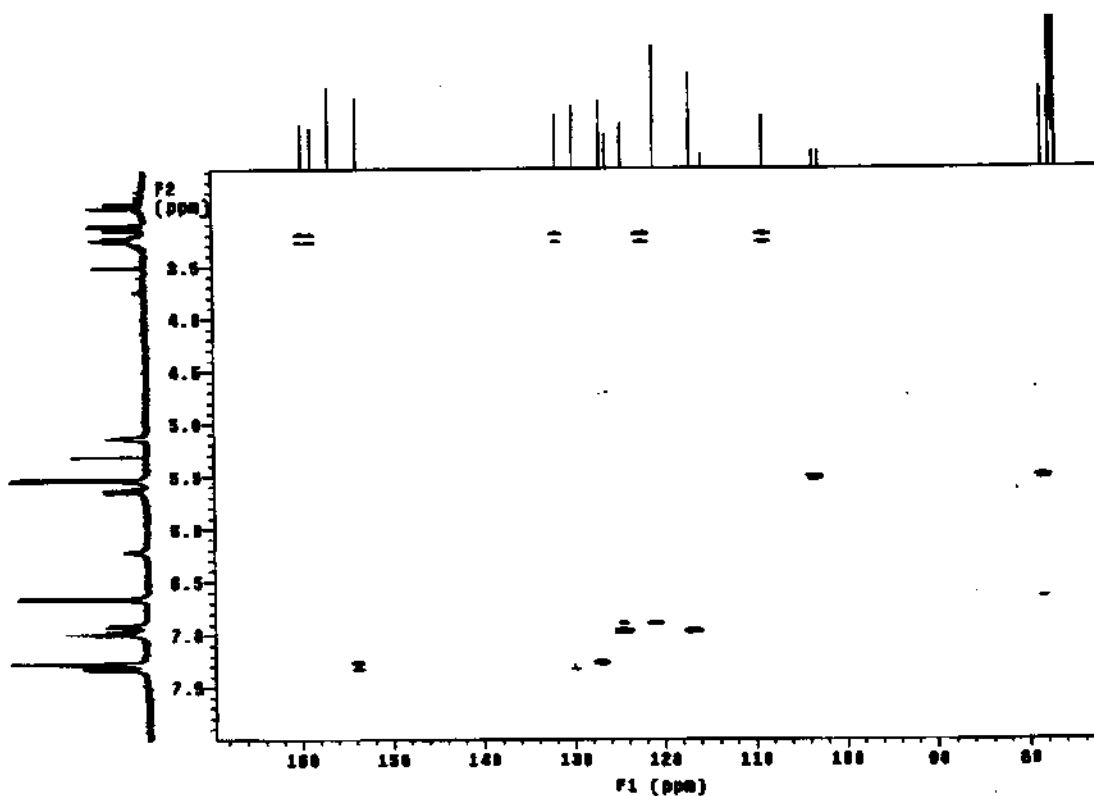
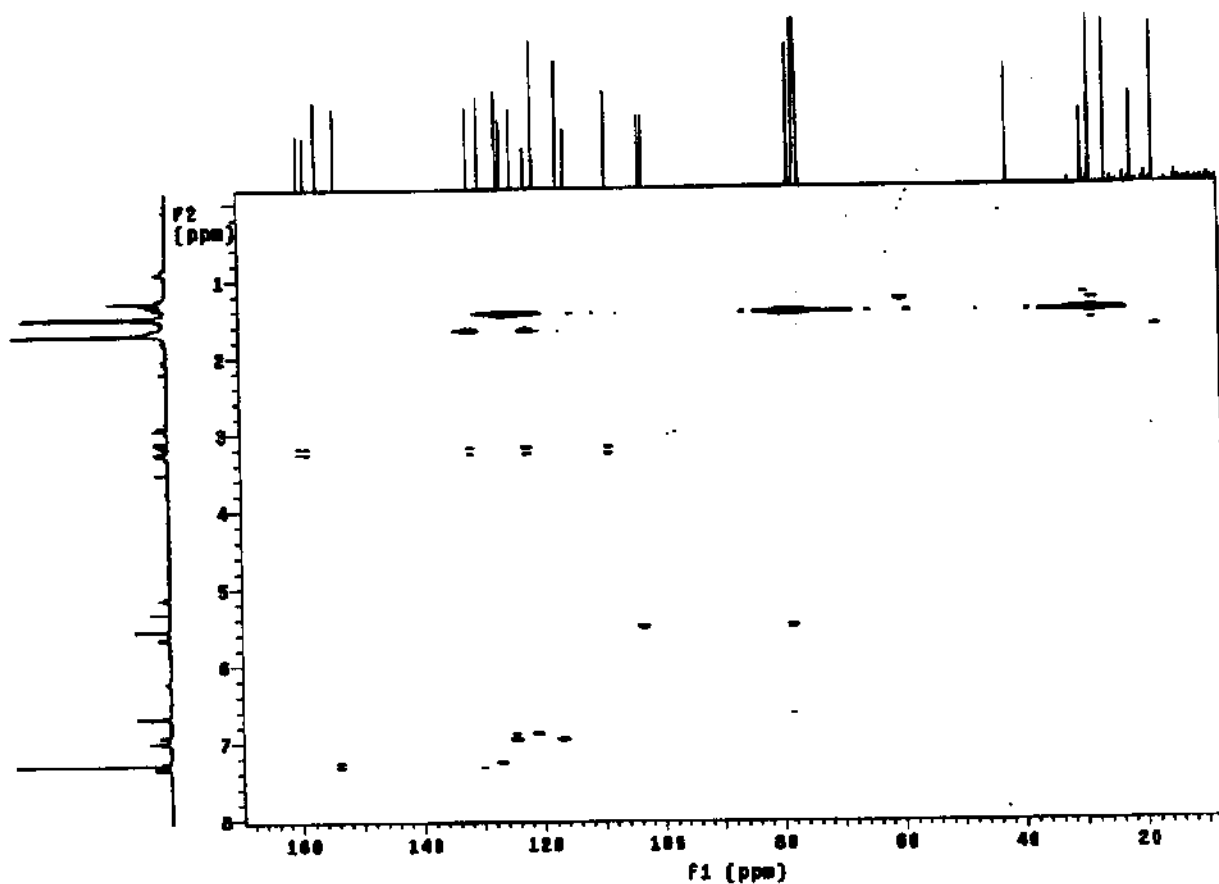


Figura 10: Gráficos de Contorno HMBC de *Minimiflorina* (7)

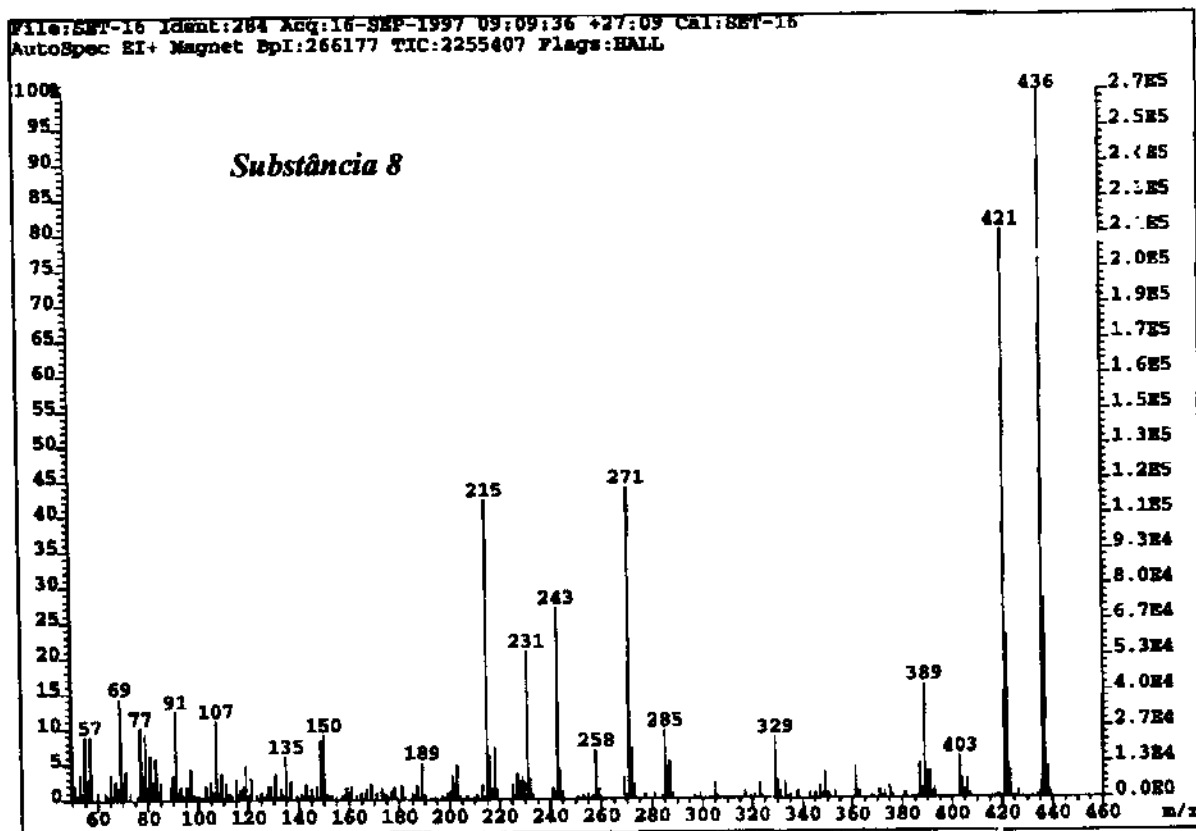
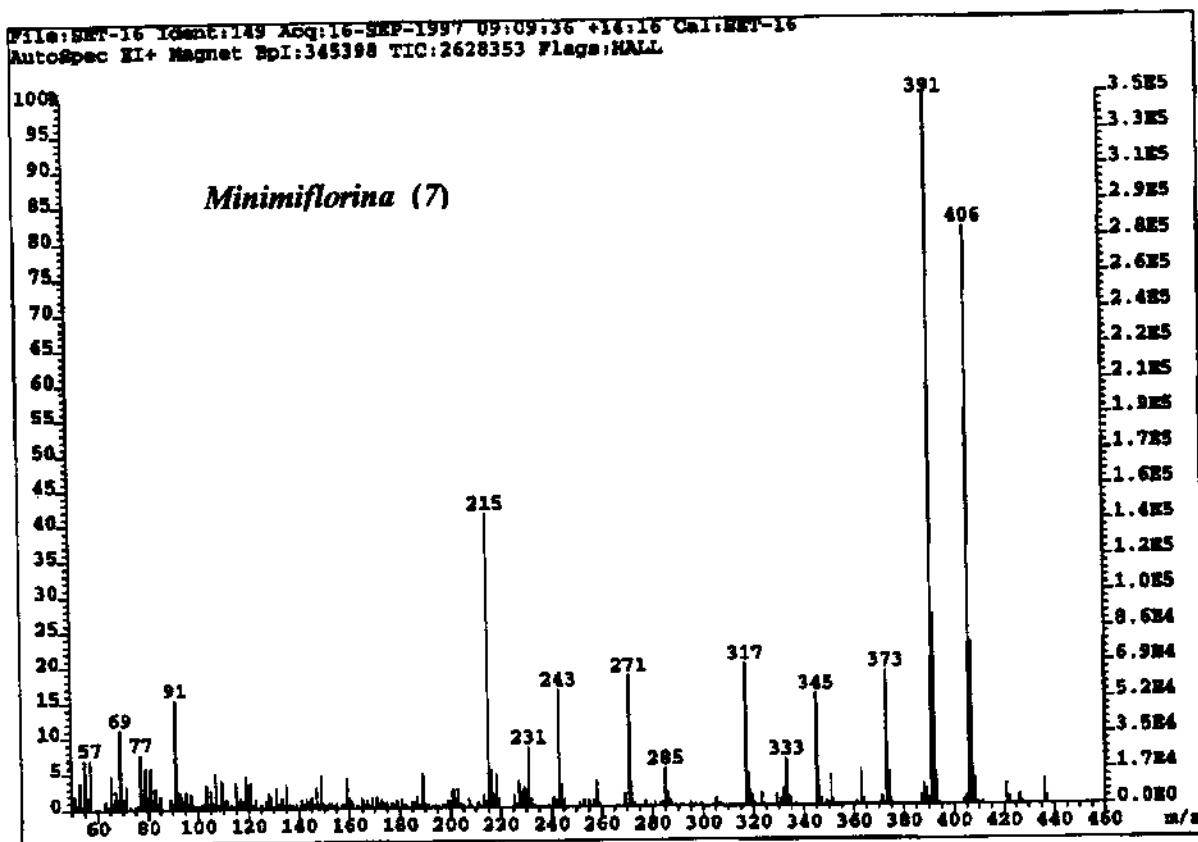


Figura 11: Espectro de Massas (IE, 70 eV) de *Minimiflorina (7)* e da substância 8



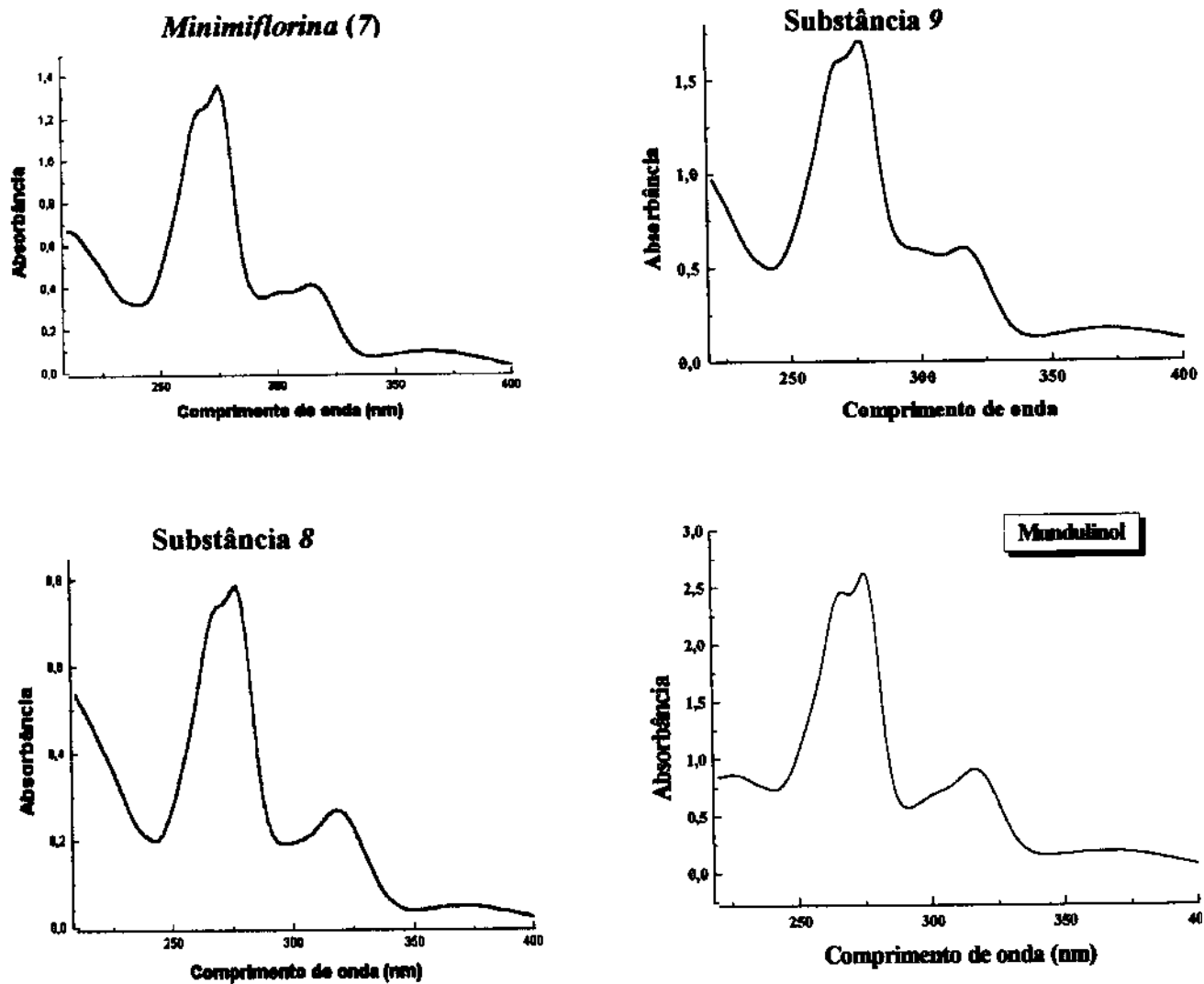
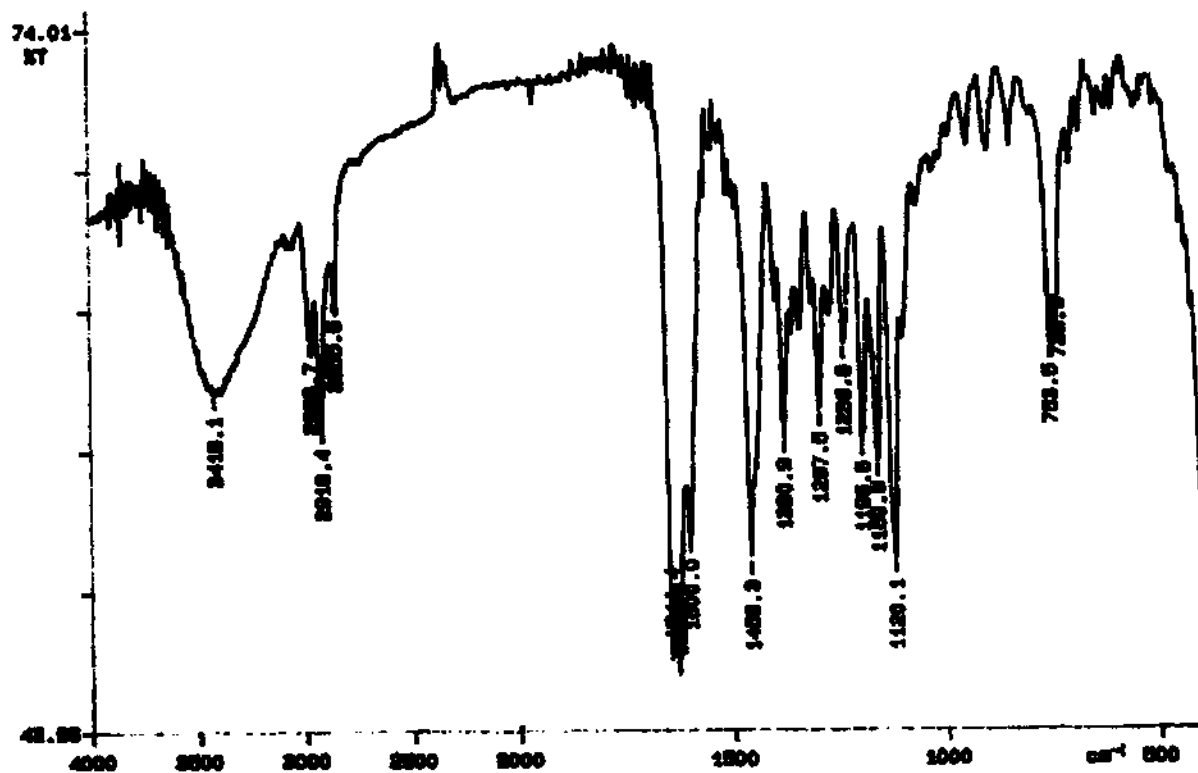


Figura 12: Espectros de UV de *Minimiflorina* (7), *Mundulinol* (10) e das substâncias 8 e 9

Espectro de IV de *Minimiflorina* (7)



Espectro de IV da substância 8

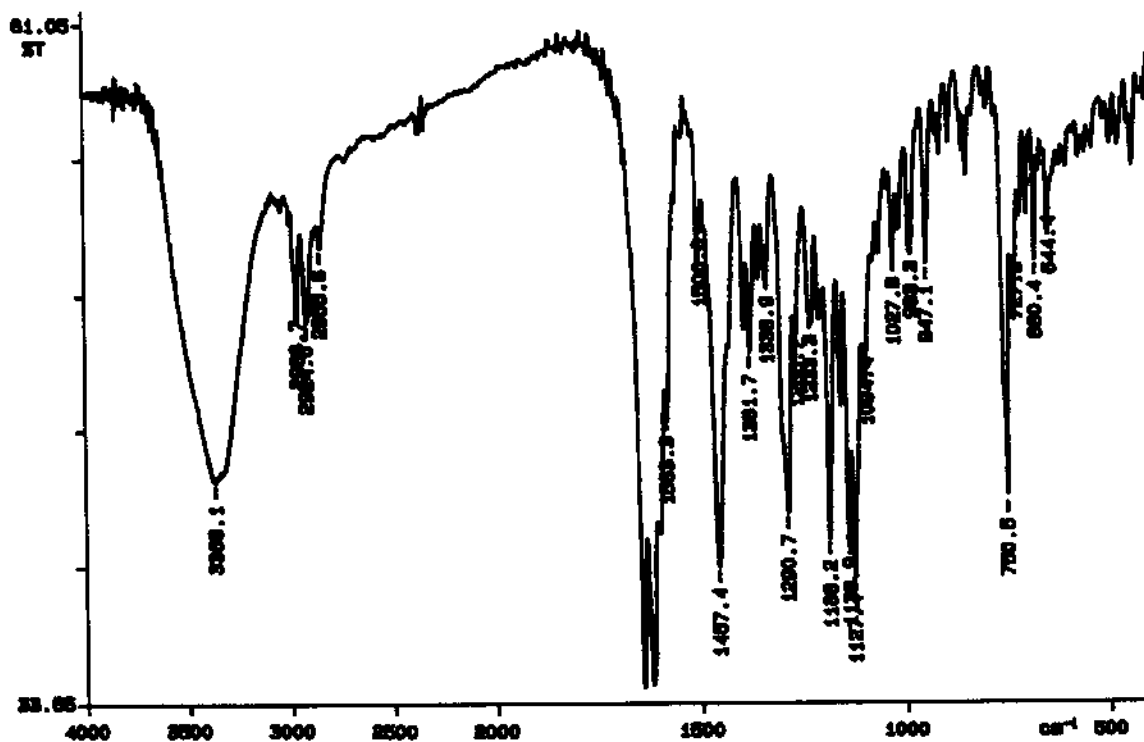


Figura 13: Espectro de Infravermelho de *Minimiflorina* (7) e da substância 8

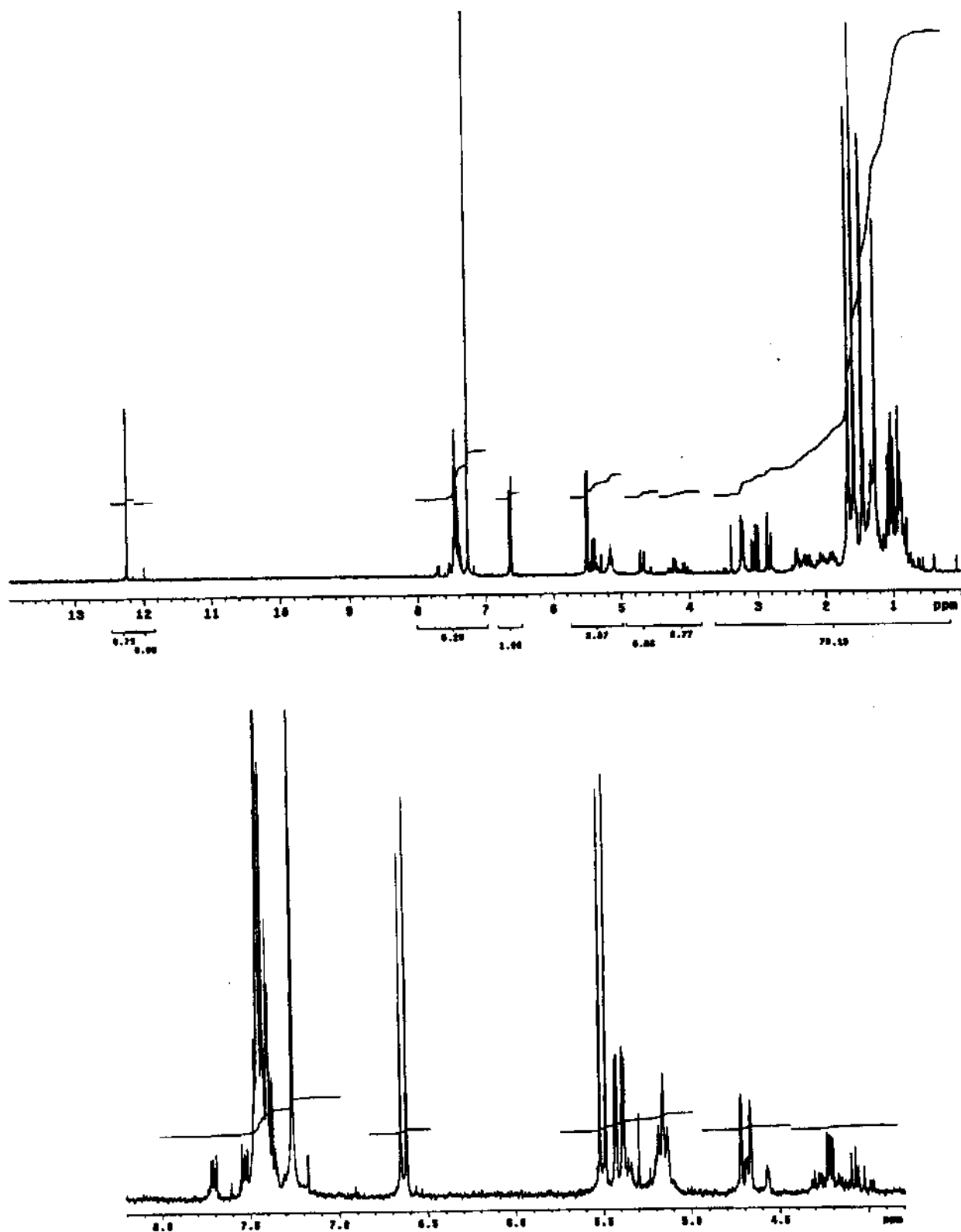


Figura 15: RMN $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de *Munchulina* (11)

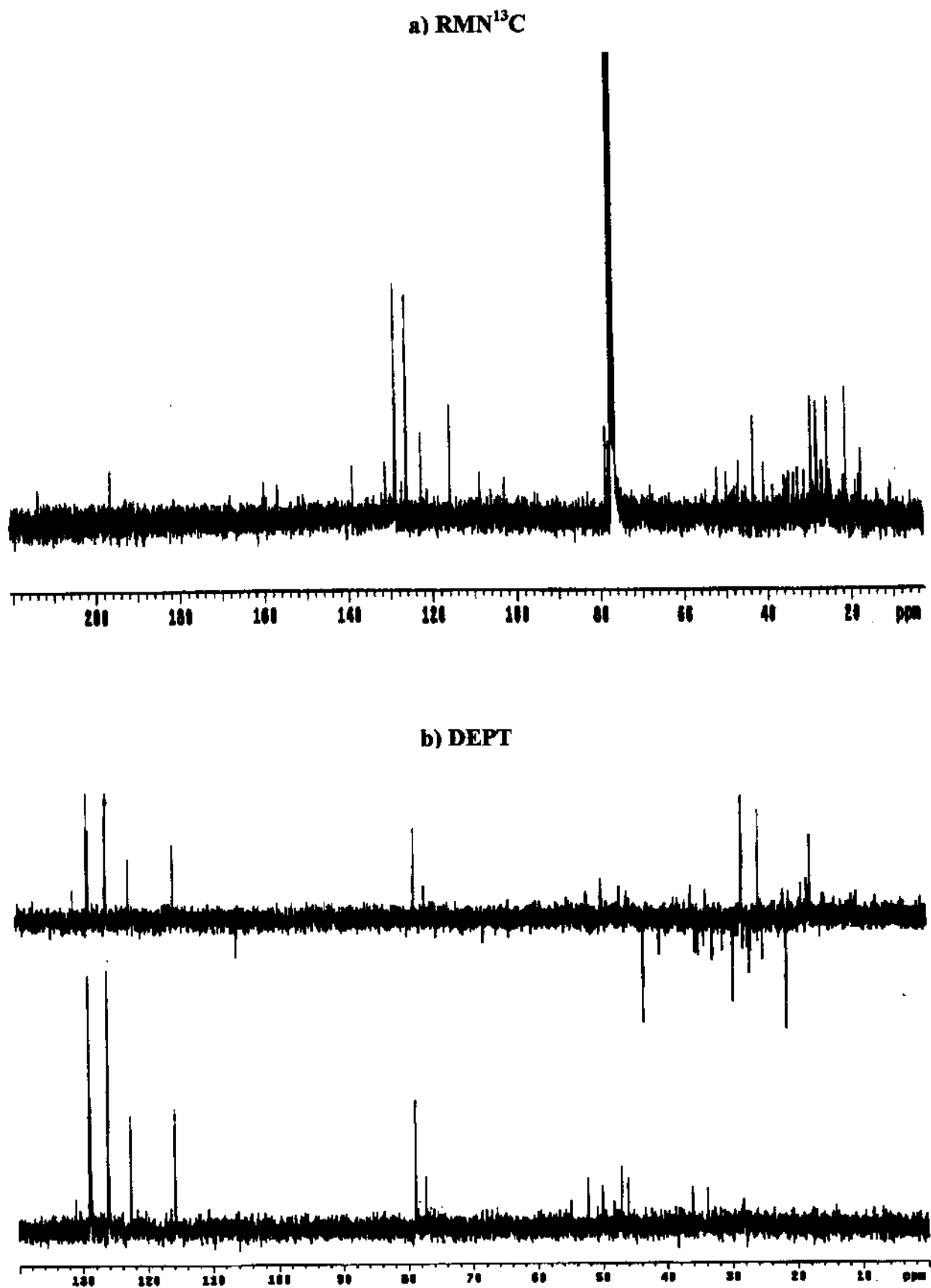


Figura 16.a: RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) e .b: DEPT (135 e 90) de *Mundulina* (11)

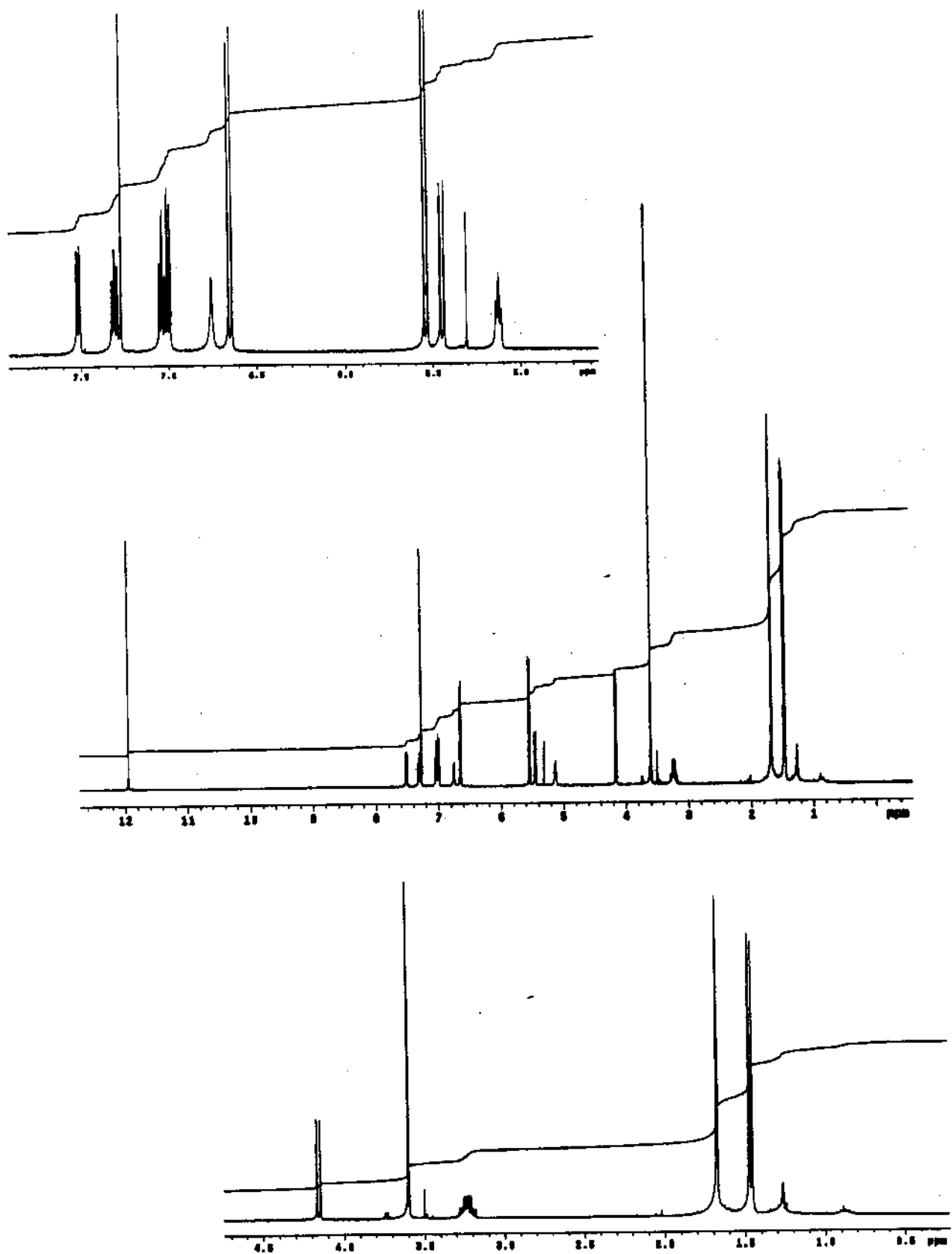


Figura 18:  $\text{RMN}^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) da substância 8

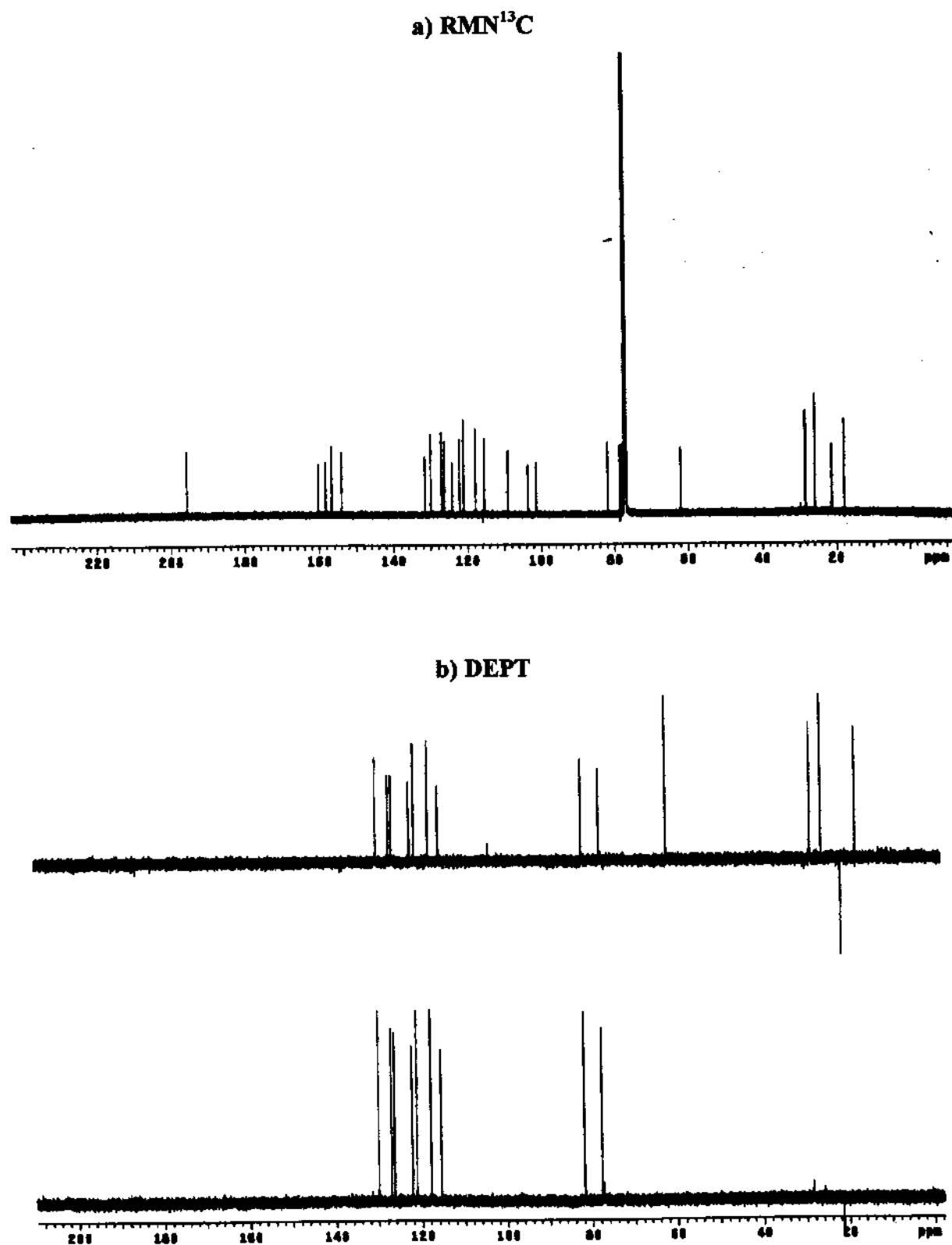


Figura 19.a: RMN<sup>13</sup>C (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) e .b: DEPT (135 e 90) da substância 8

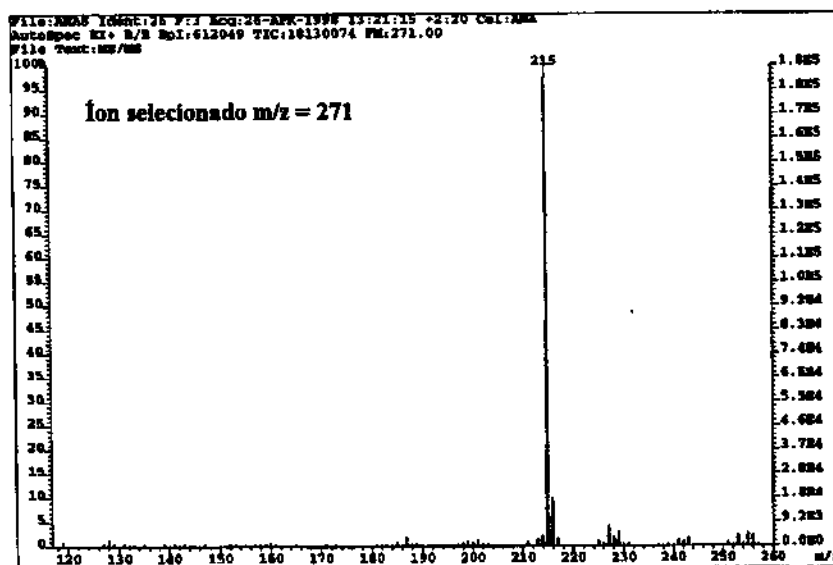
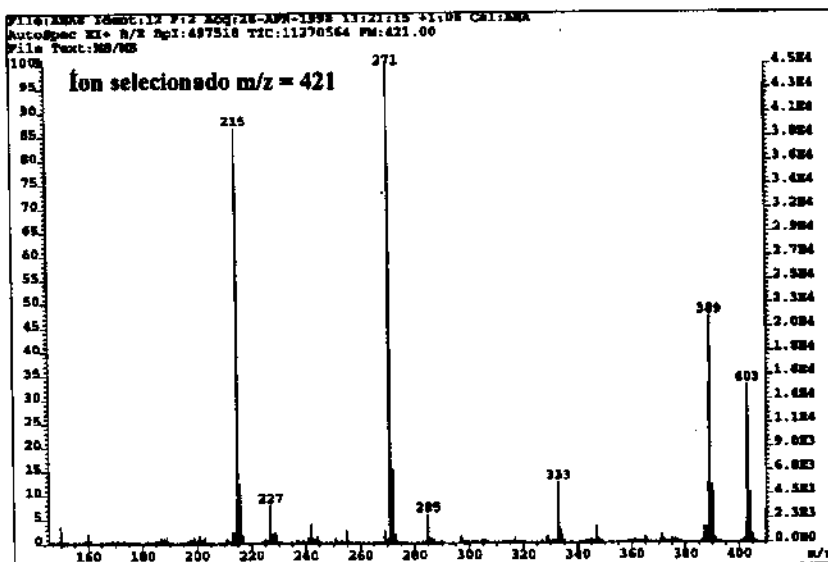
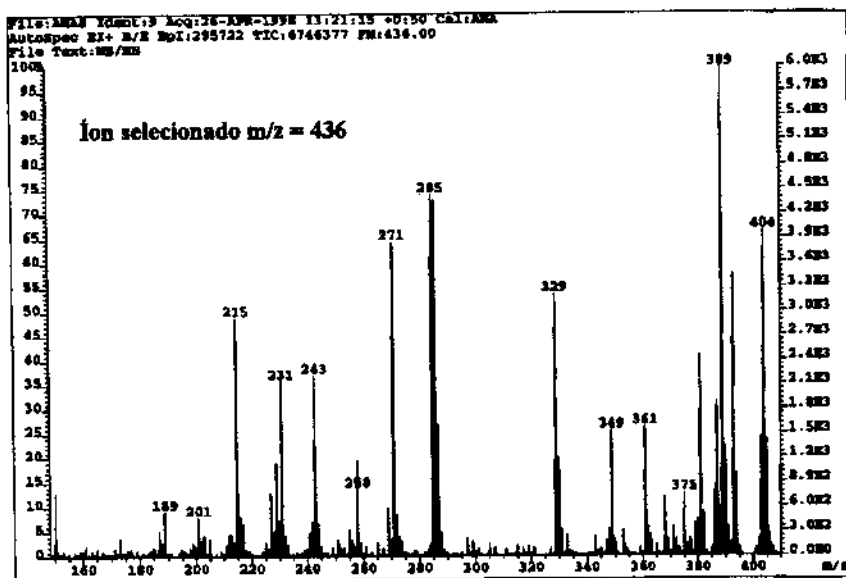


Figura 20: Espectro de Massas de espectro de massas da substância 8

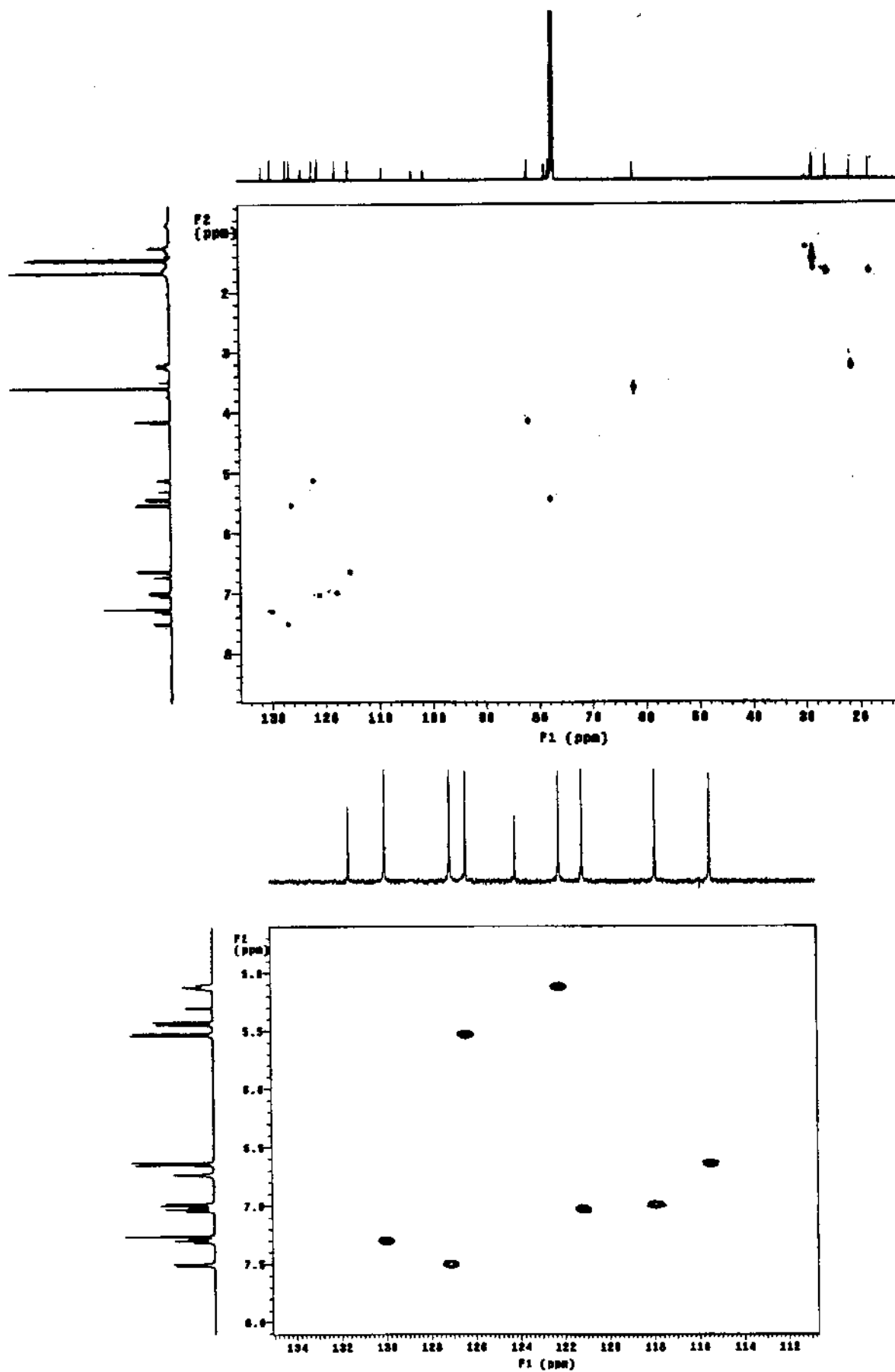


Figura 21: Gráficos de Contorno HSQC da substância 8



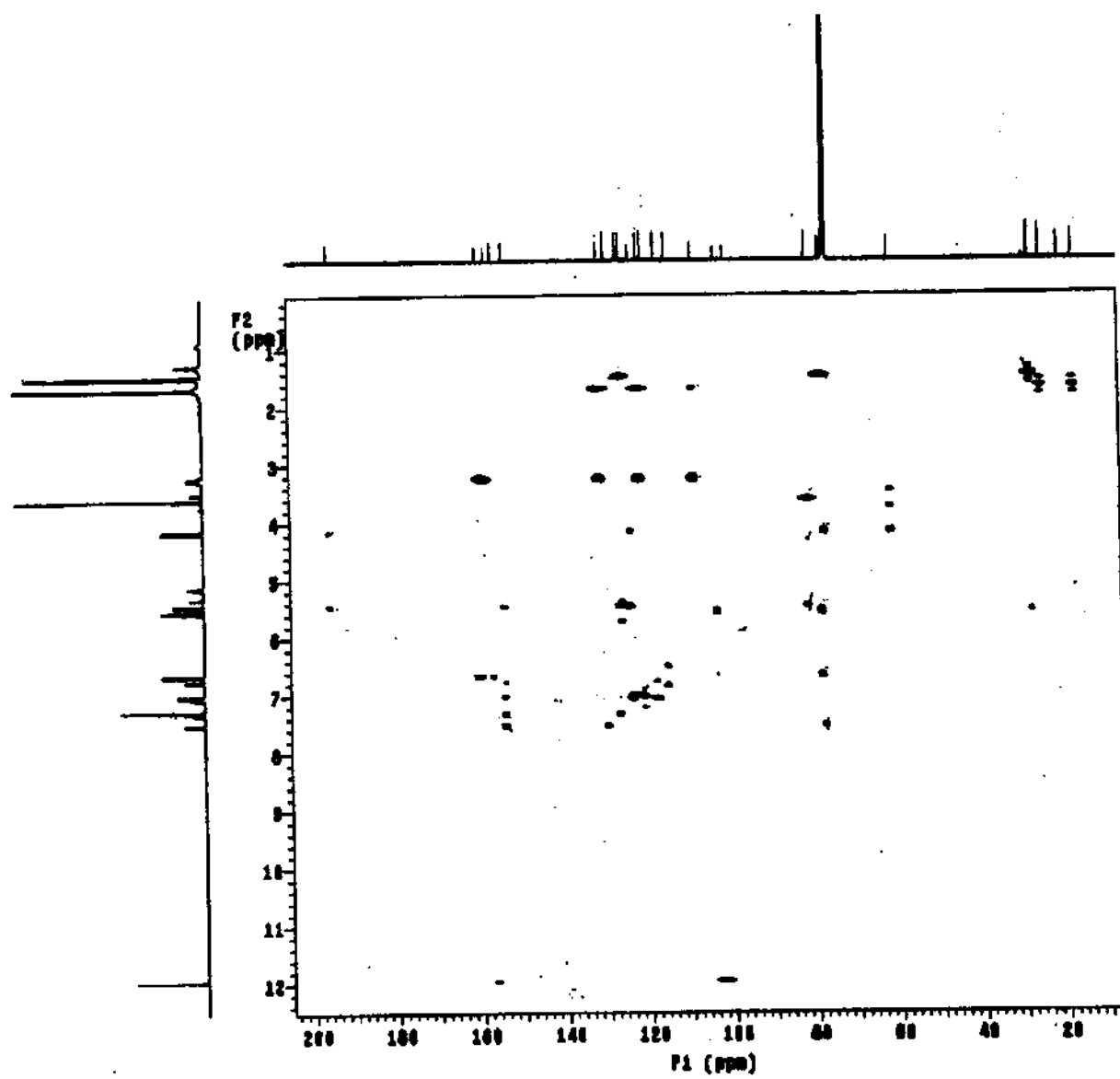
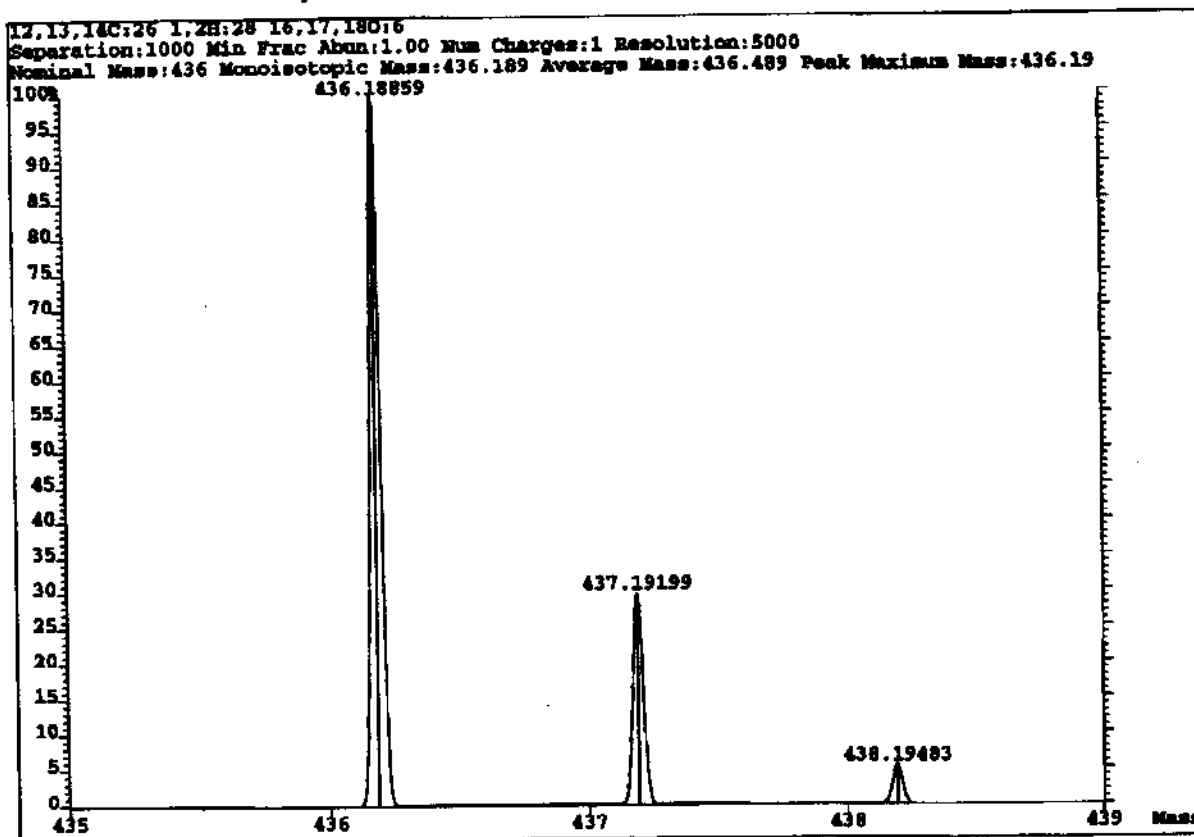


Figura 22: Gráficos de Contorno HMBC da substância 8

Espectro de massas de alta resolução da substância 8



Espectro de massas de alta resolução da substância 9

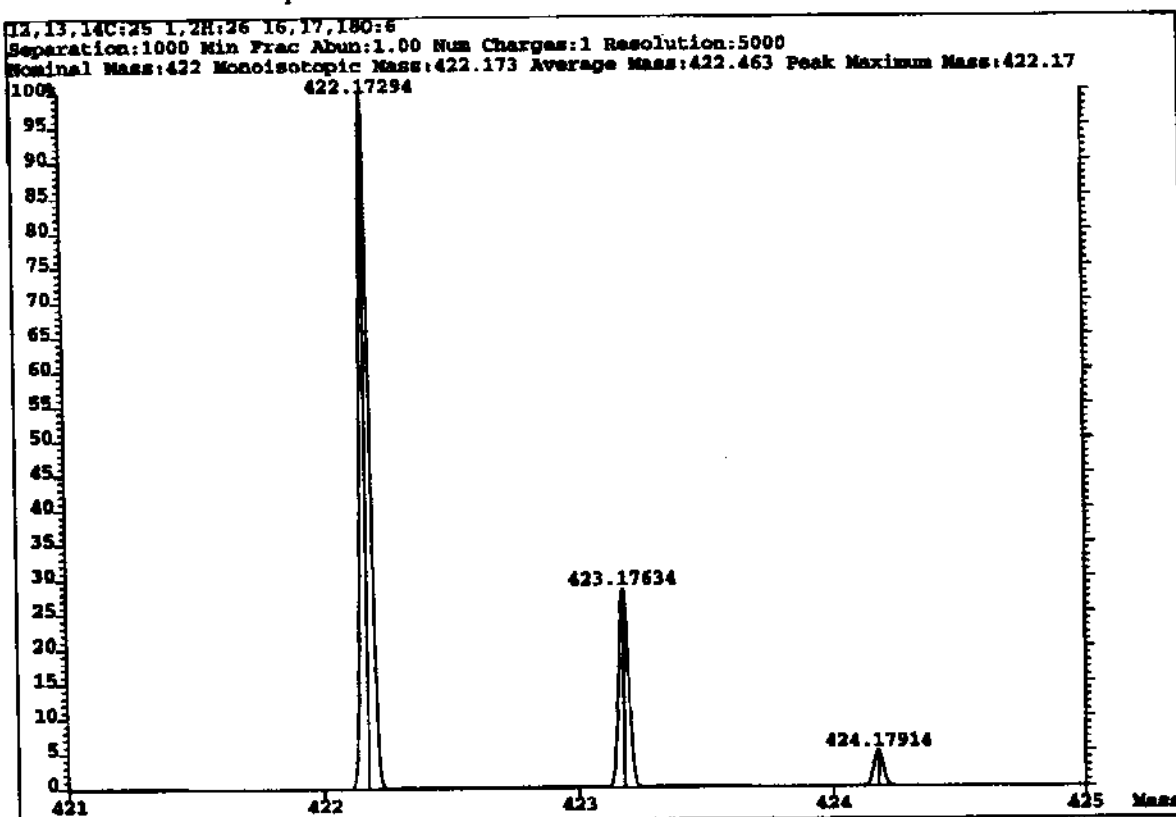


Figura 23: Espectro de Massas de alta resolução da substância 8 (a) e da substância 9 (b)

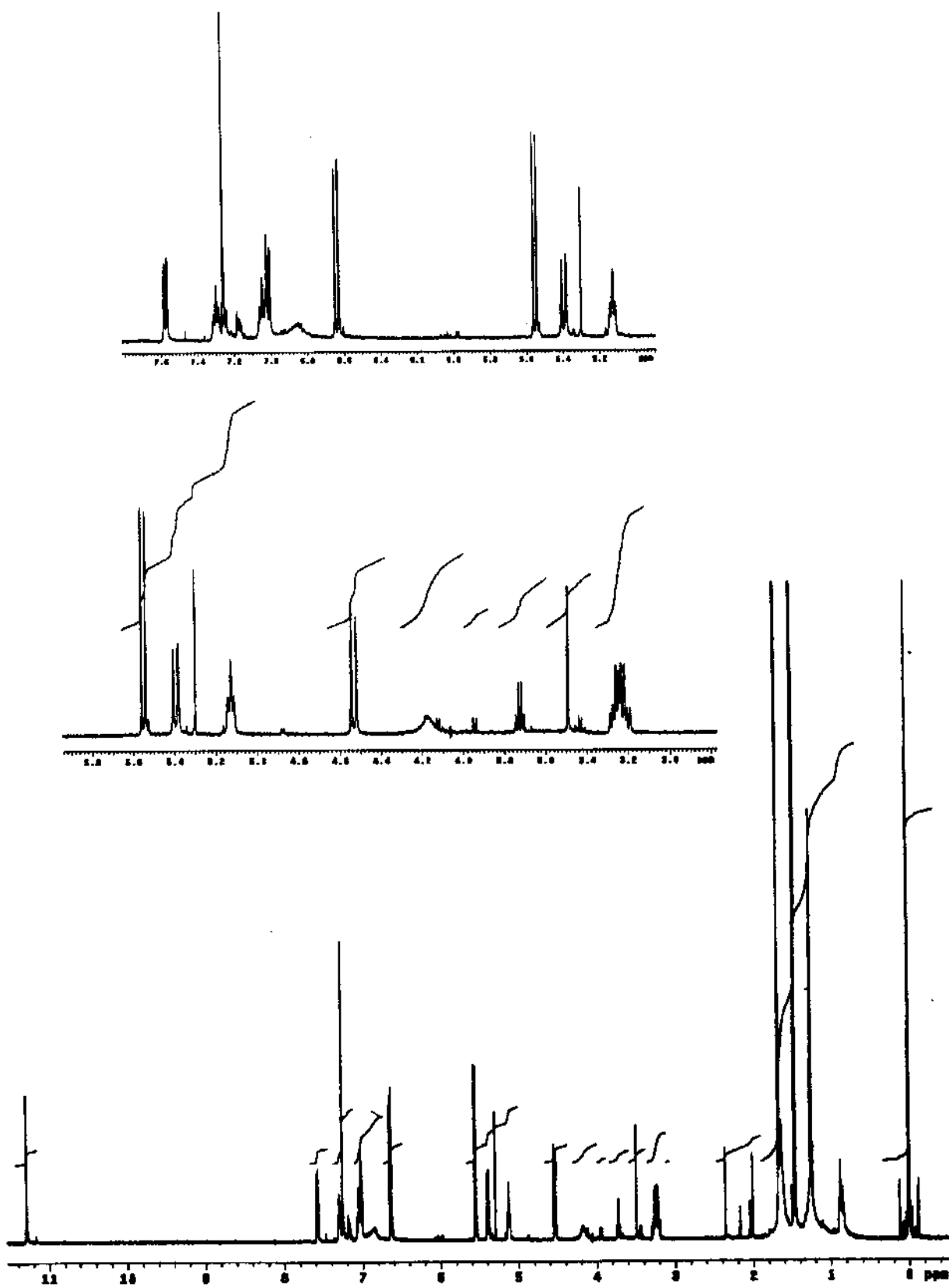


Figura 25: RMN<sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS) da substância 9

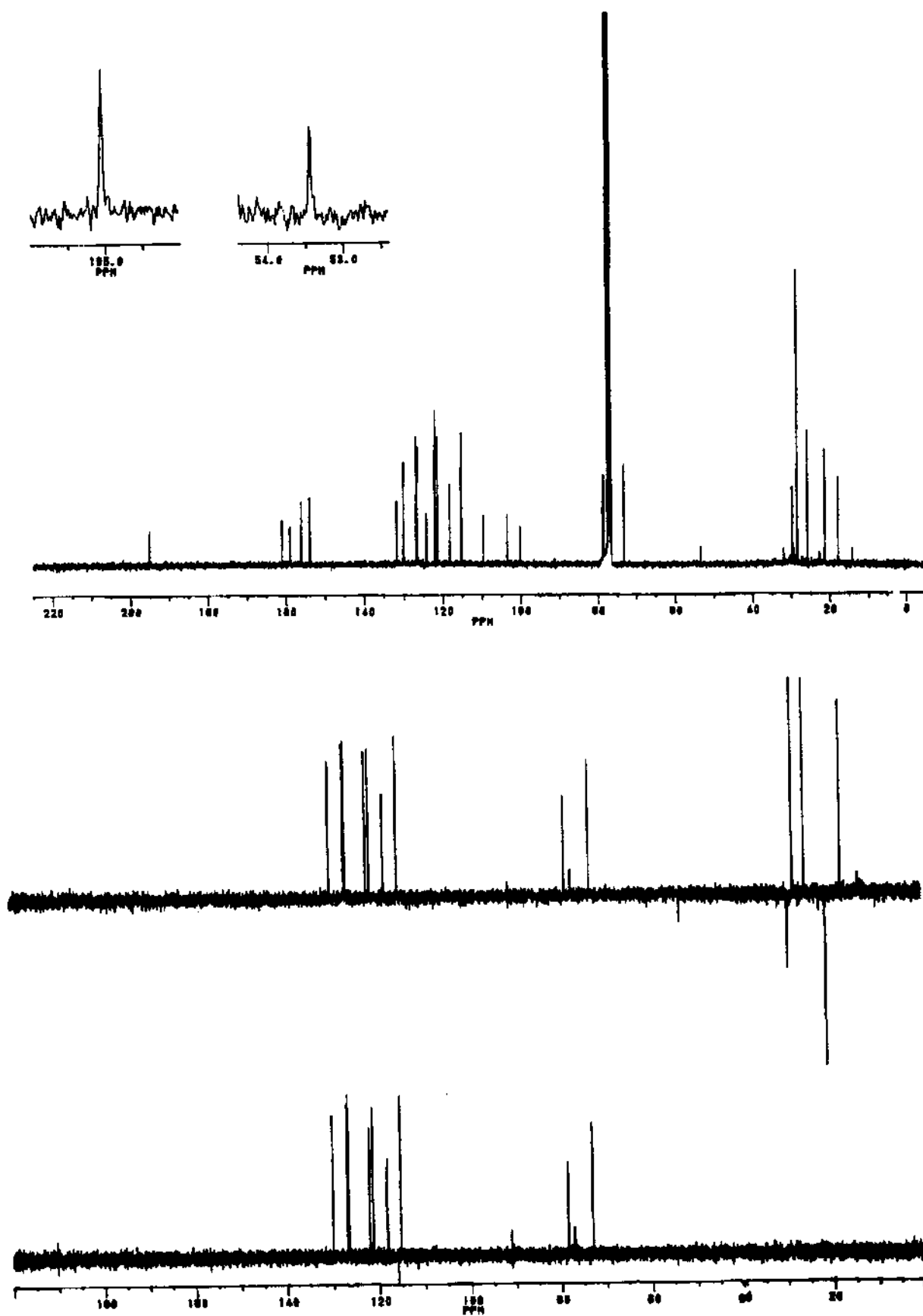


Figura 26.a: RMN $^{13}\text{C}$  (75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e .b: DEPT (135 e 90) da substância 9

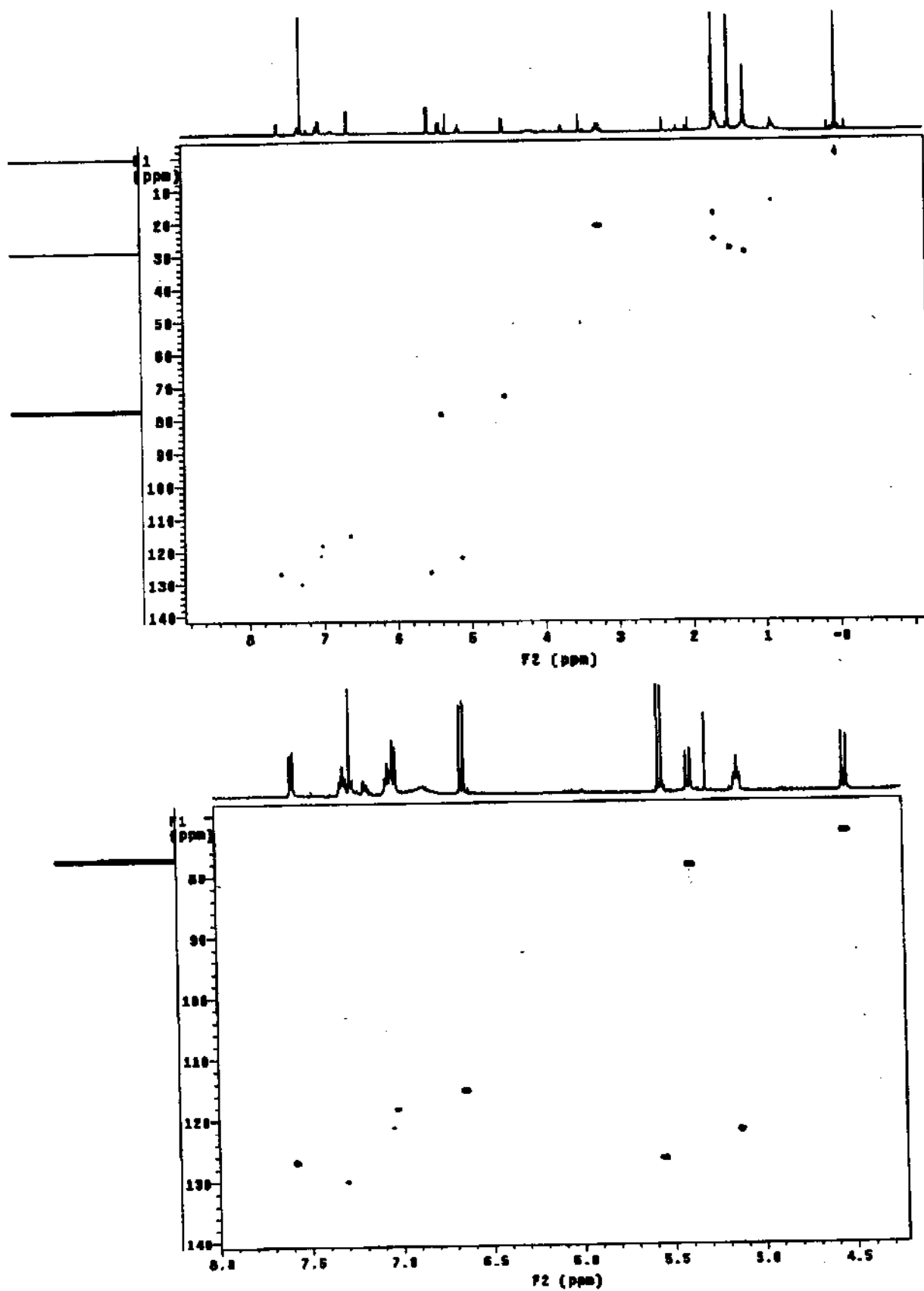


Figura 27: Gráficos de Contorno HSQC da substância 9

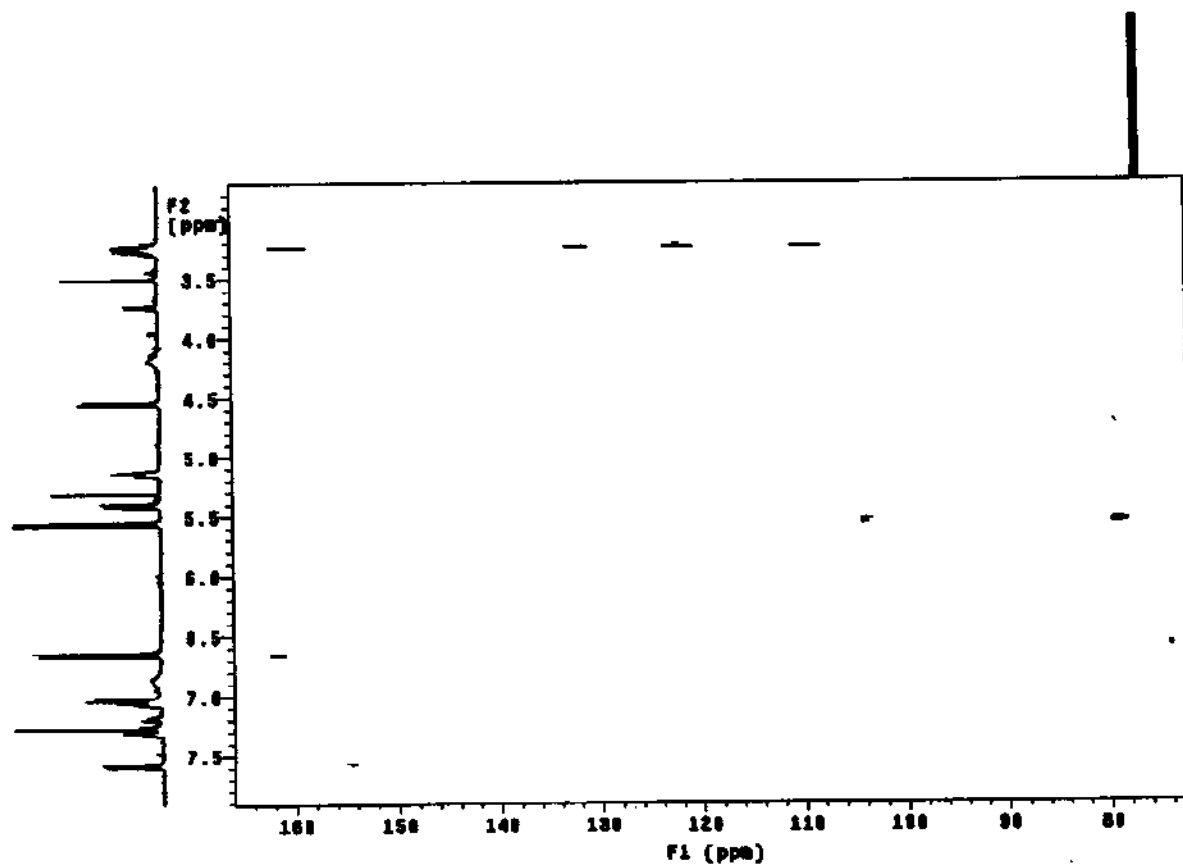
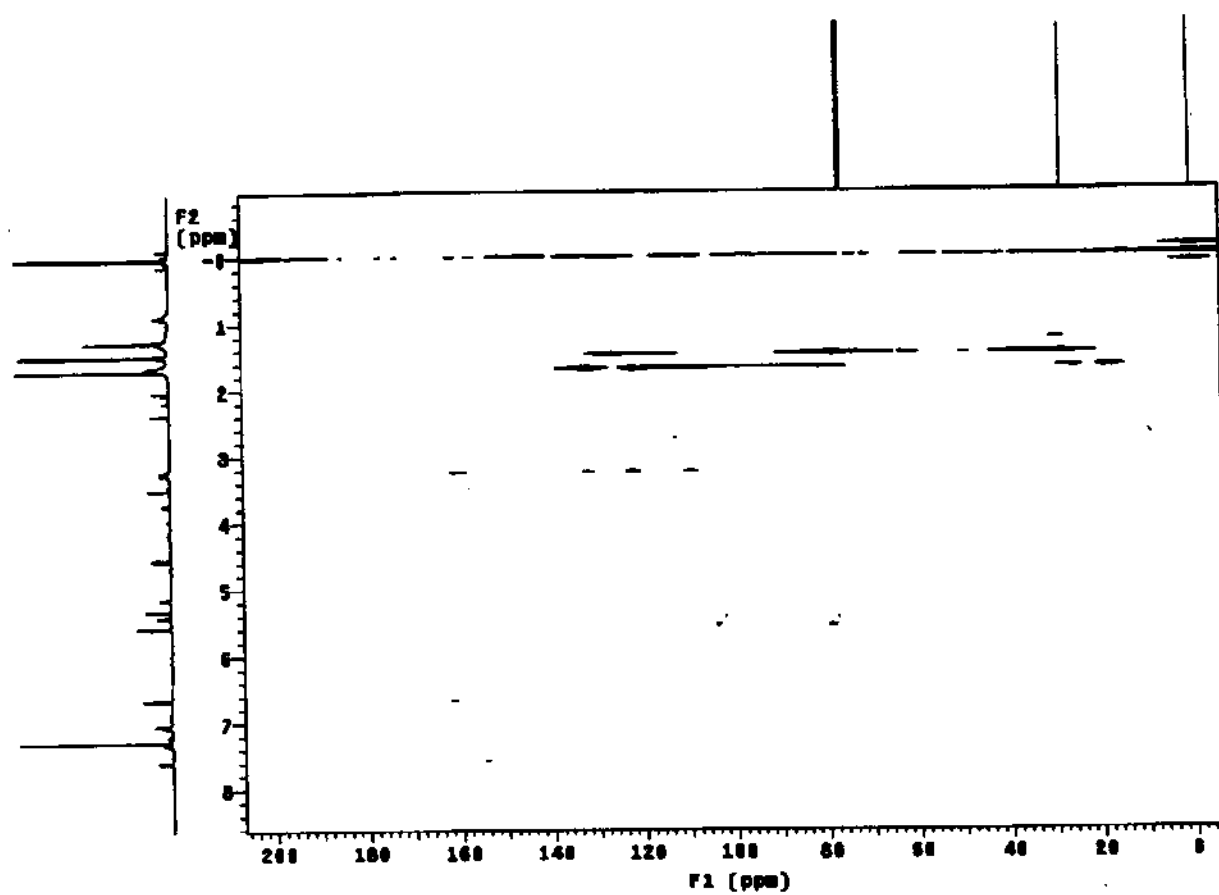


Figura 28: Gráficos de Contorno HMBC da substância 9

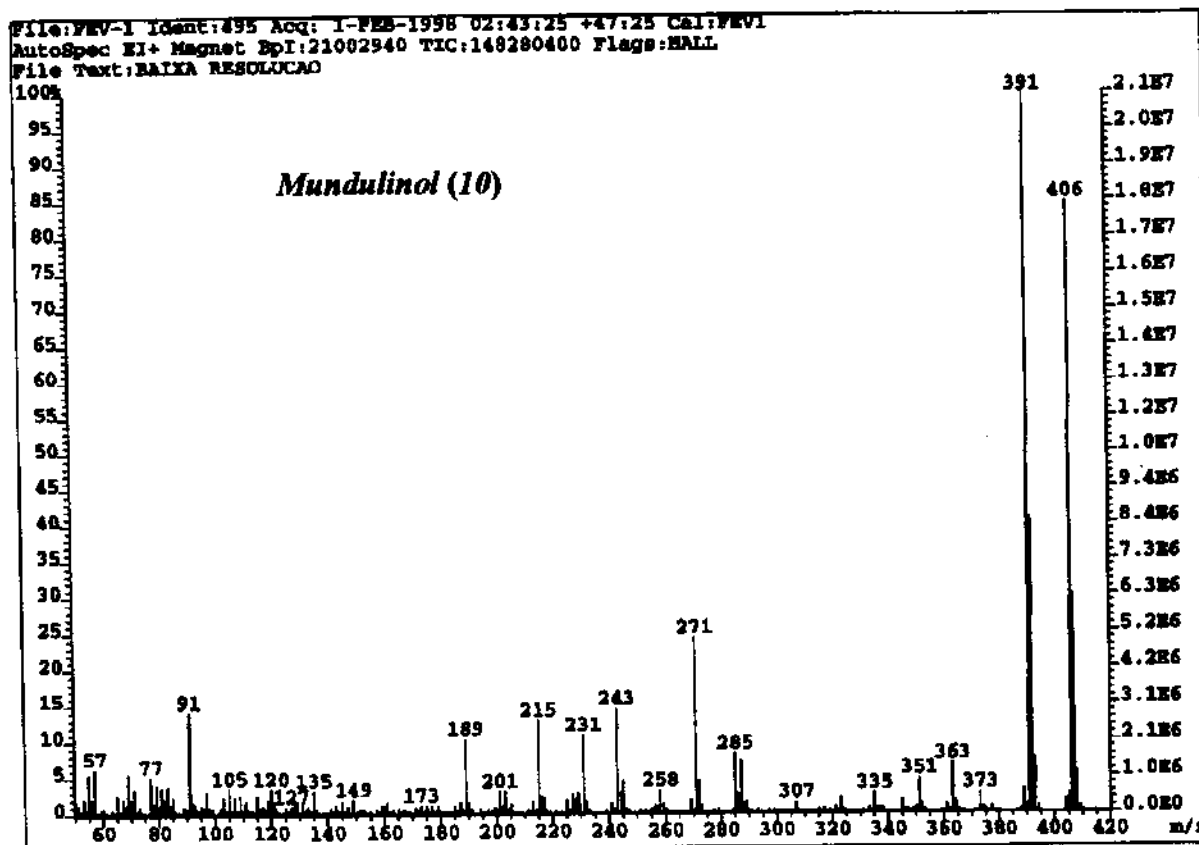
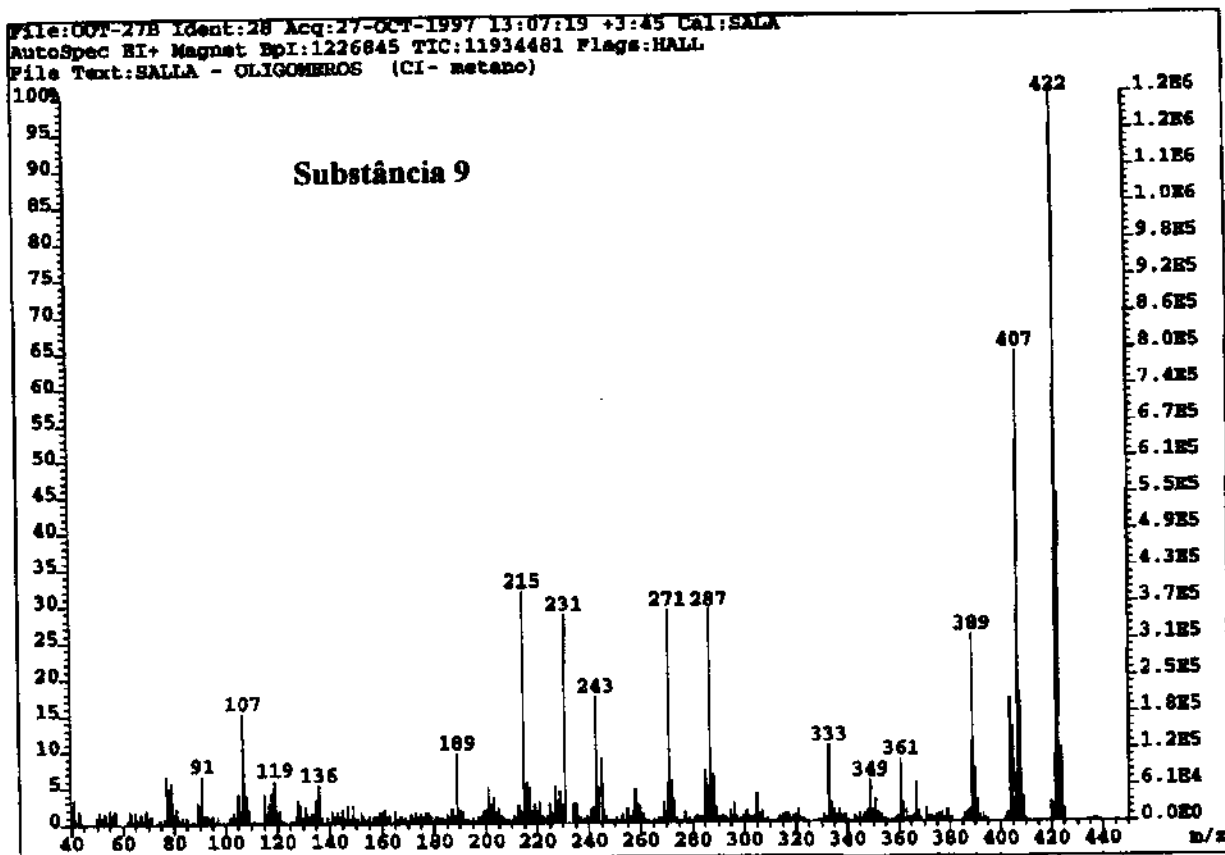
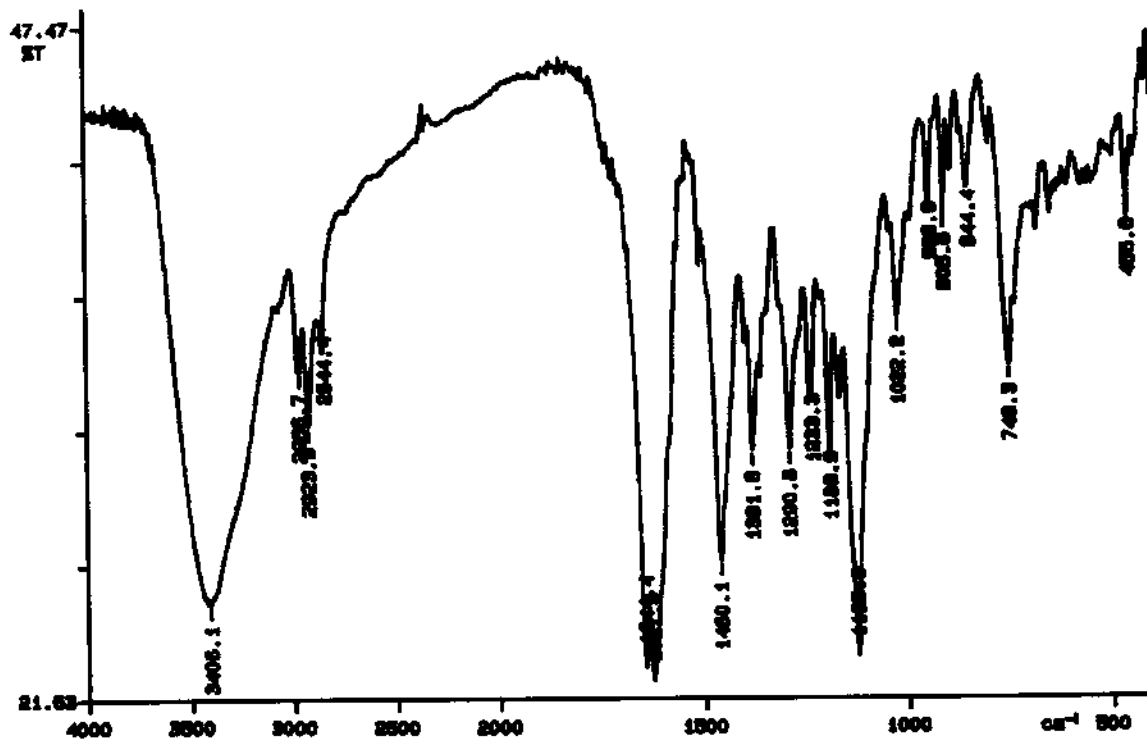


Figura 29: Espectro de Massas (IE, 70 eV) da substância 9 e de *Mundulinol* (10)

Espectro de IV da substância 9



Espectro de IV de *Mundulinol* (10)

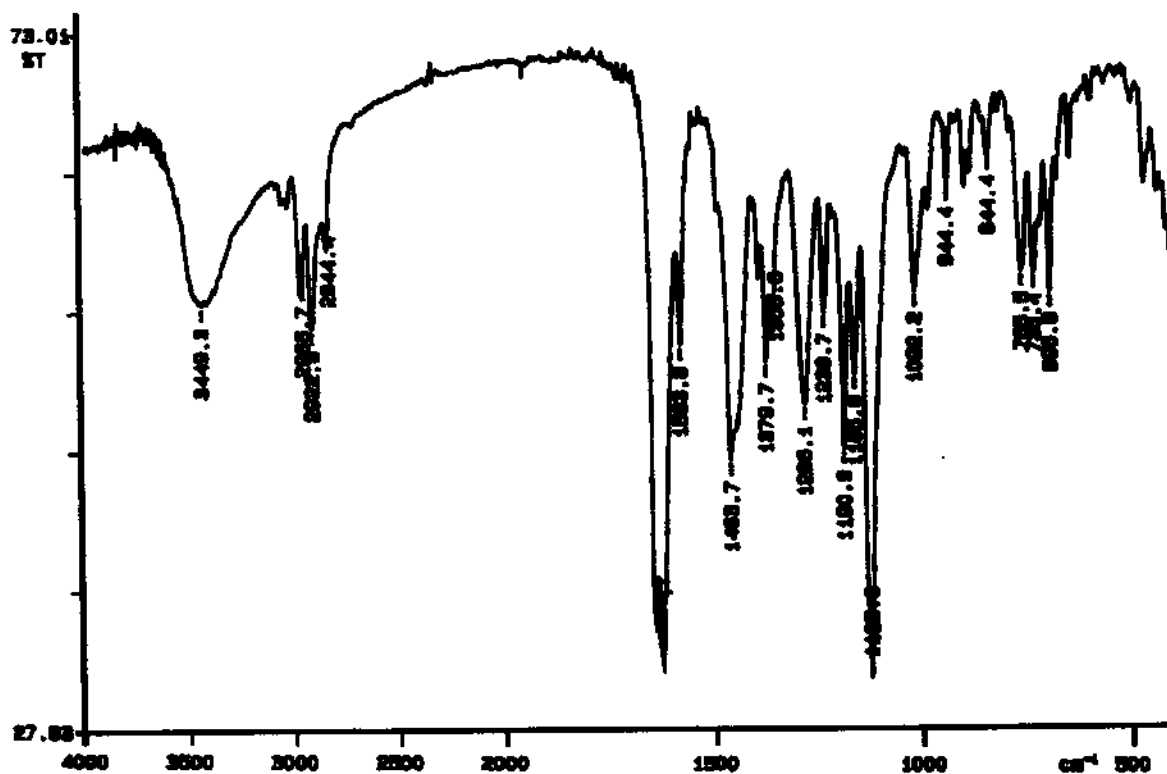


Figura 30: Espectro de Infravermelho da substância 9 e de *Mundulinol* (10)



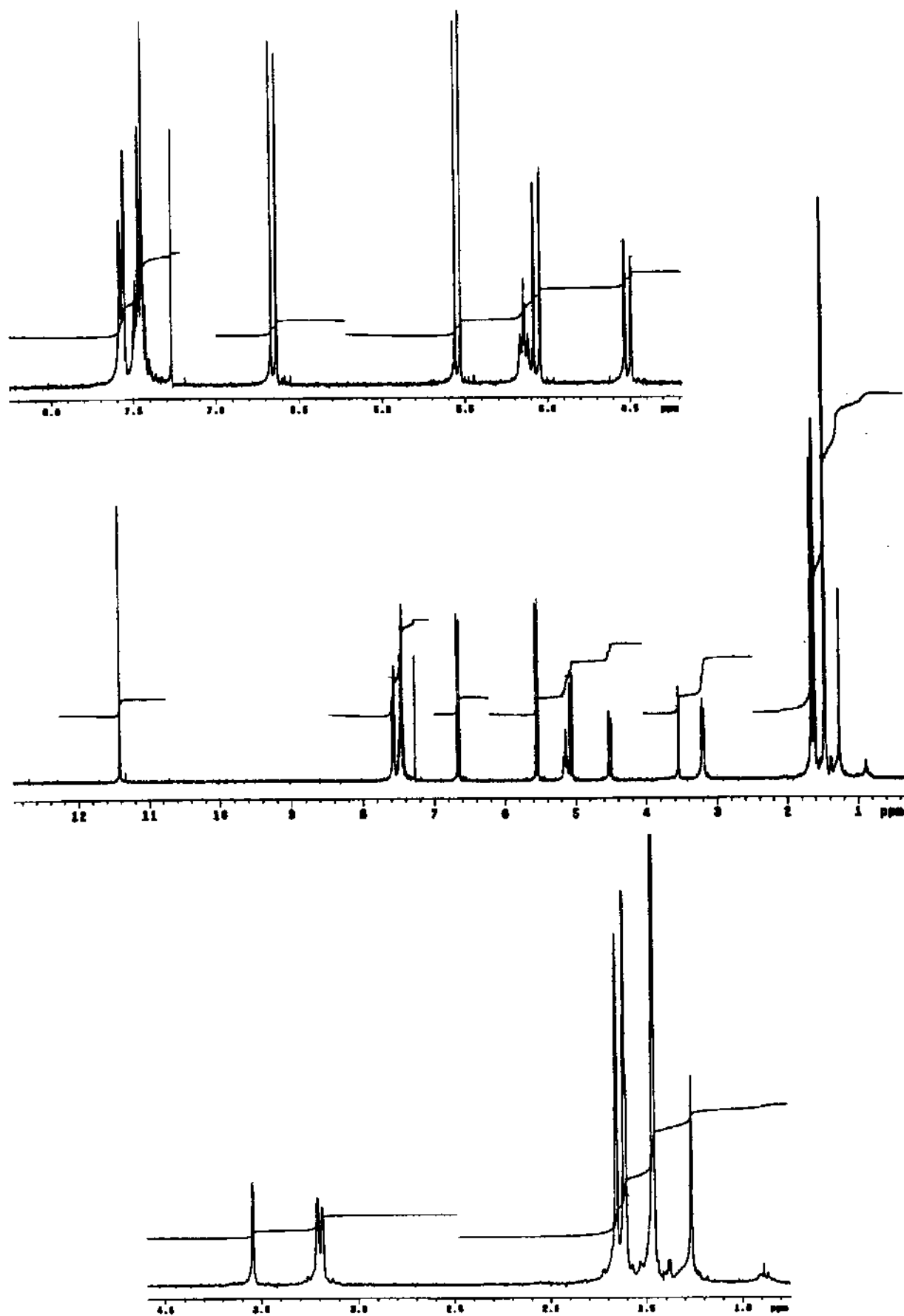


Figura 32:  $\text{RMN}^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de Mundulinol (10)

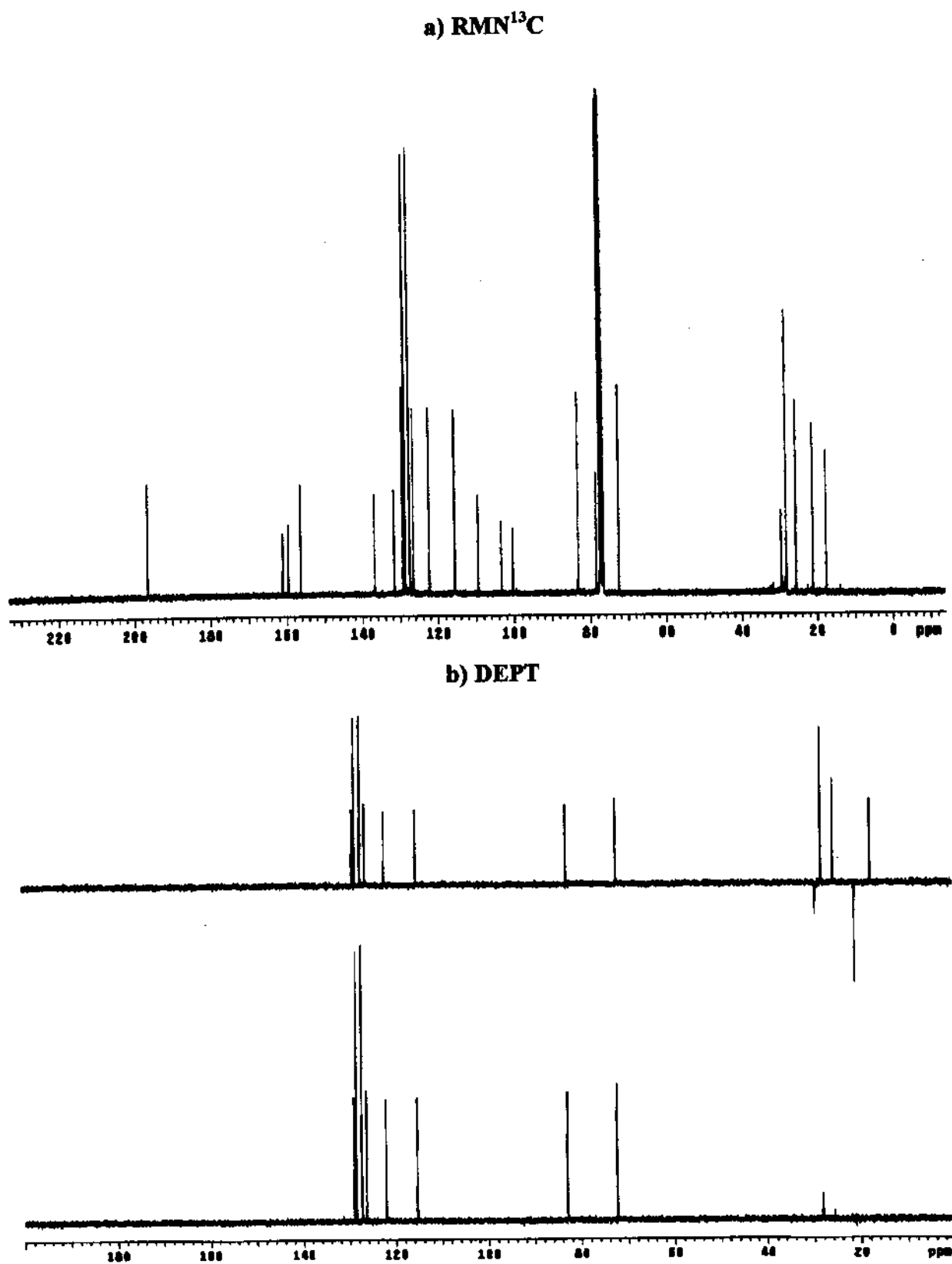
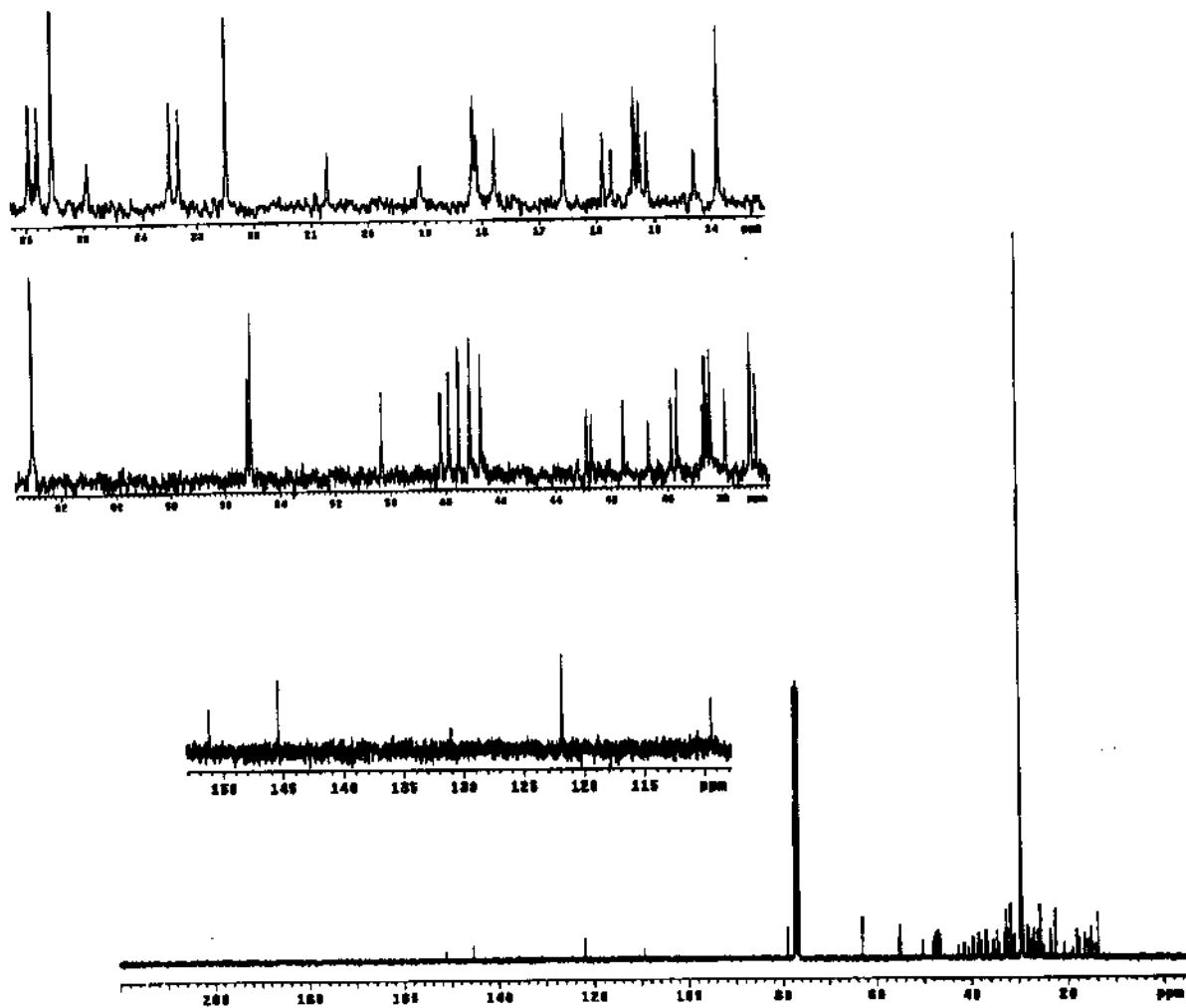


Figura 33.a: RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) e .b: DEPT (135 e 90) de *Mundulinol* (10)

a) RMN<sup>13</sup>C

## b) DEPT

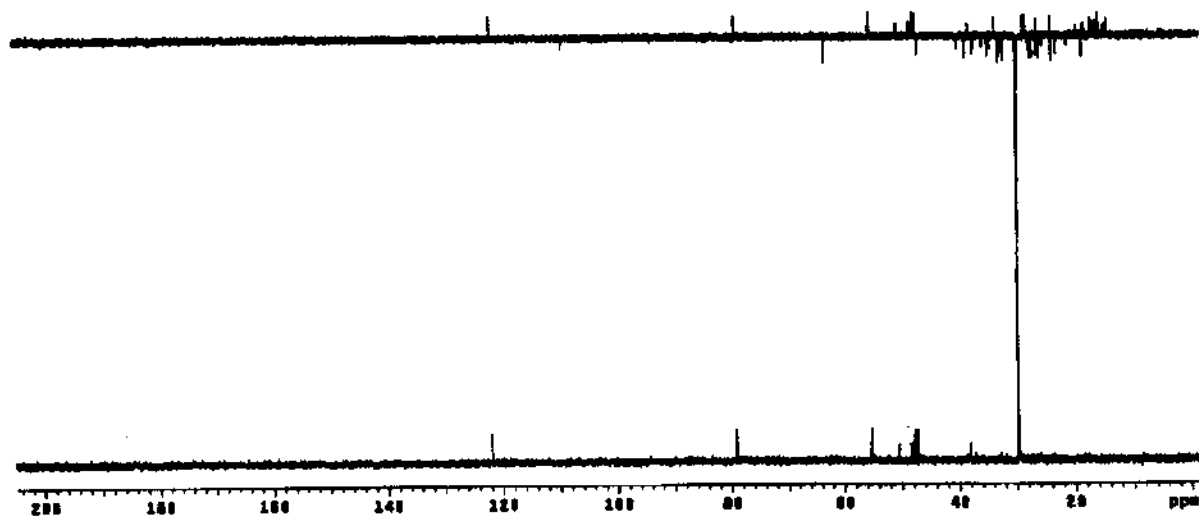


Figura 35.a: RMN<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) e .b: DEPT (135 e 90) de  $\beta$ -Amirina 12 + Lupeol 13

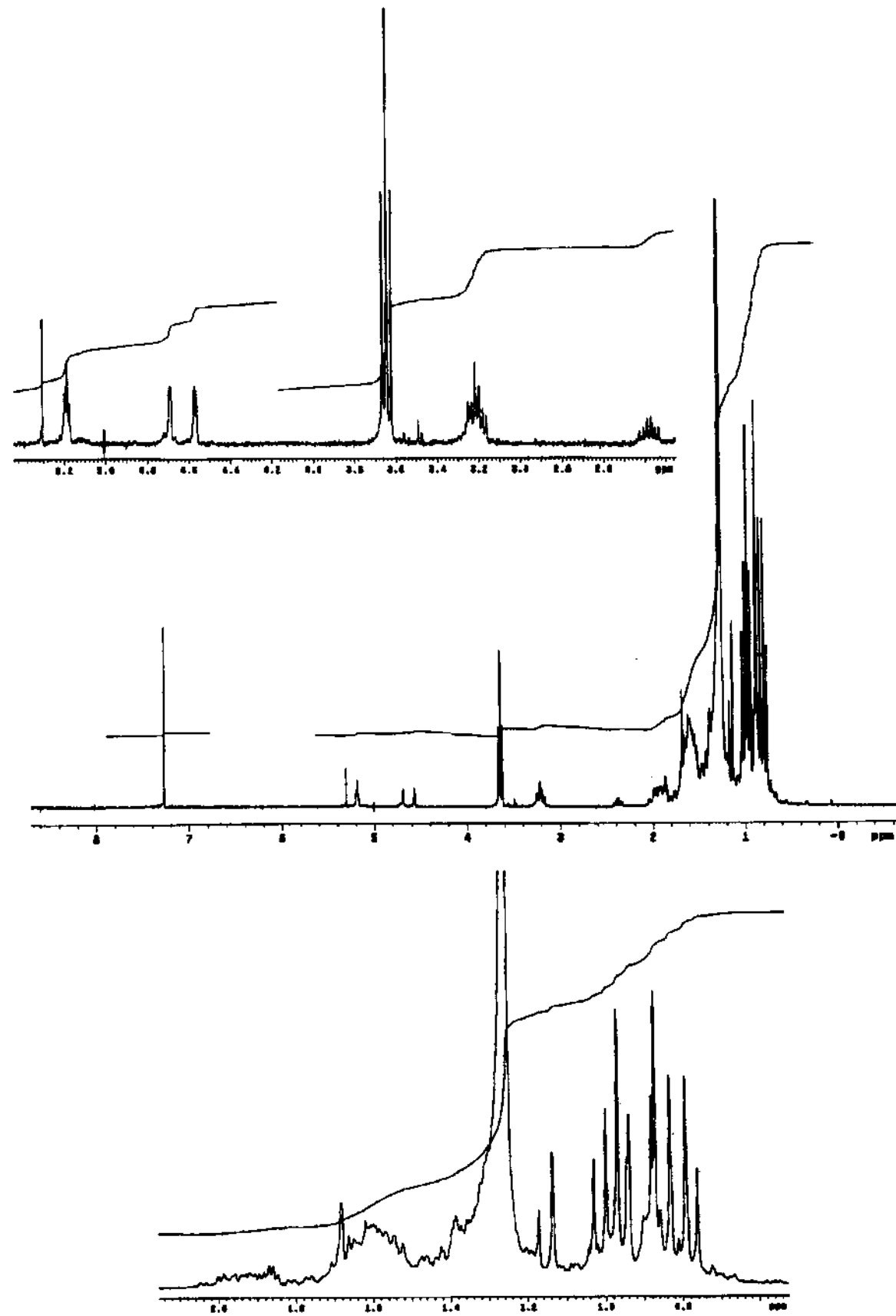
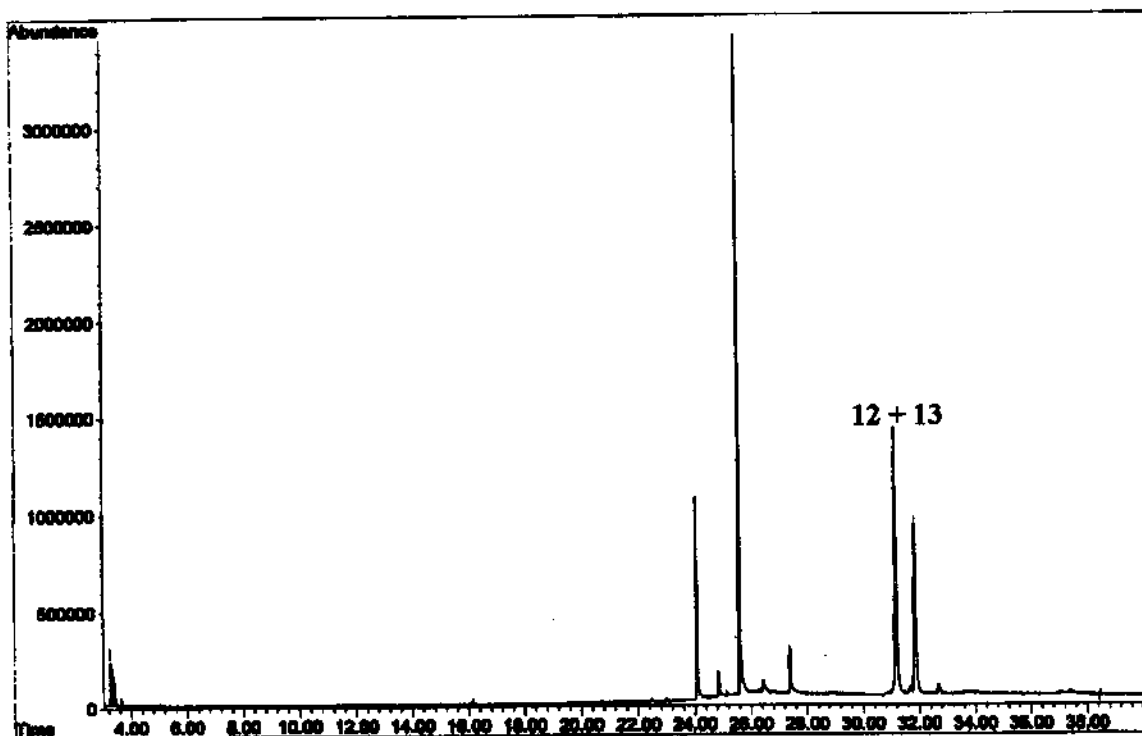


Figura 36: RMN $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de  $\beta$ -Amirina 12 + Lupeol 13.

Cromatograma



Espectro de Massas

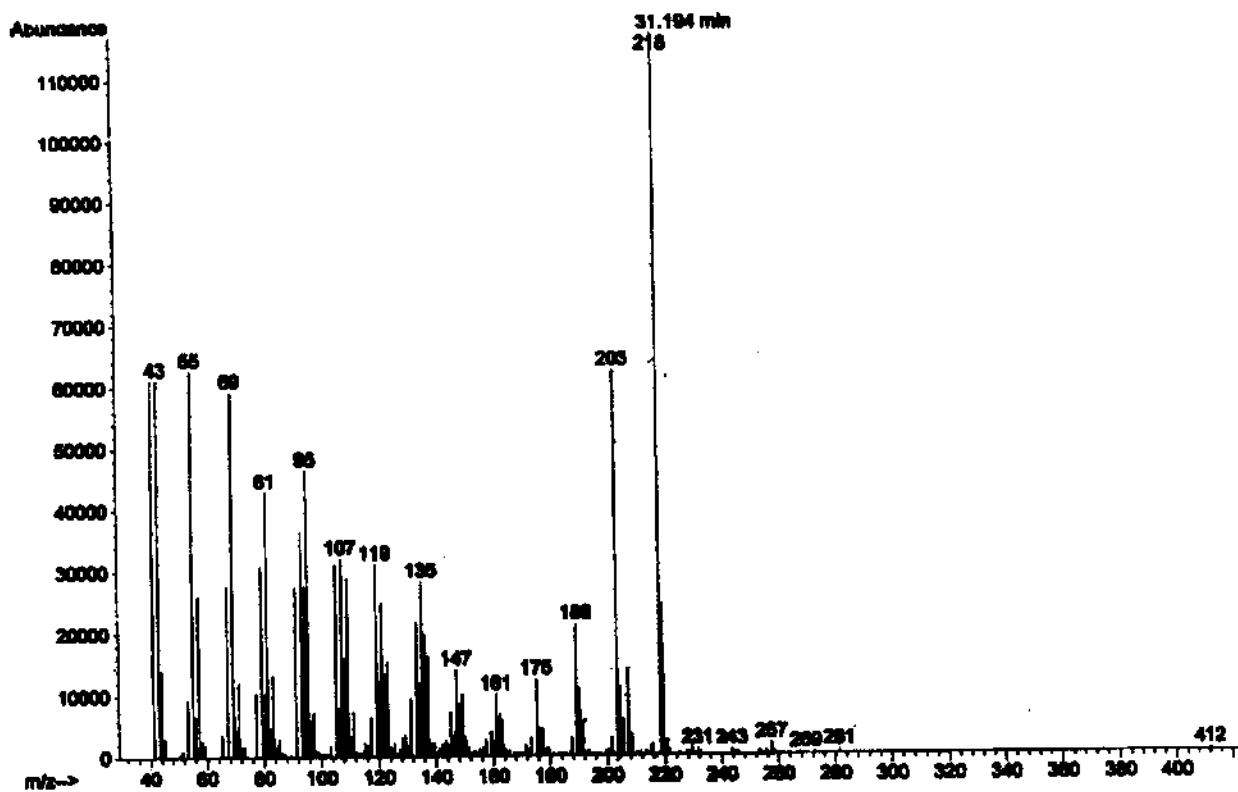


Figura 37: CG/EM de  $\beta$ -Amirina 12 + Lupeol 13.

## 1. Introdução:

A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação muito usada para compostos como terpenóides, todos os tipos de fenóis, alcalóides, lípides e açúcares em misturas complexas; também tem sido usada para análise qualitativas e quantitativas, quando é importante conhecer as quantidades isoladas. Como técnica para separação de flavonóides e compostos correlatos, tem sido usada para separação de antocianidinas, xantonas, isoflavonas, procianidinas e taninos; o sistema de separação mais amplamente empregado é formado por coluna de C-18 (fase reversa) e, como eluentes, as misturas metanol/água ou acetonitrila/água em diferentes proporções.

Na literatura<sup>1, 2, 3</sup> encontram-se diversos exemplos de condições e de uso desta técnica para separação e quantificação de flavonóides. A quantificação também pode servir como ferramenta no auxílio para estudos de quimiotaxonomia, pois fornece uma visão da distribuição dos flavonóides ao longo da planta.

Neste Capítulo procurou-se estudar o perfil cromatográfico de *L. atropurpureus* através da análise dos extratos das raízes, casca do caule, folhas, sementes e flores; além disso foi feita também a quantificação dos flavonóides isolados do extrato éter de petróleo das raízes. Realizou-se também a análise qualitativa do extrato diclorometânico das raízes de *Poecilanthé parviflora*.

---

<sup>1</sup> TOMÁS-BARBERAN, F.A.; FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, M.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. and TOMÁS-LORENTE, F. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography* 634: 41-46, 1993.

<sup>2</sup> CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M. E. J. and McDONALD, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 761 (1+2): 315-321, 1997.

<sup>3</sup> CONDE, E.; CADAHIA, E. and GARCIAVALLEJO, M.C. High-performance liquid chromatography analysis of flavonoids and phenolic-acids and aldehydes in *Eucalyptus* spp. *Chromatographia* 41 (11-12): 657-660, 1995.

## 2. Materiais e Métodos:

As análises qualitativa e quantitativa foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência HP 1090 série II/M com:

**Detetor:** espectrofotométrico UV/VIS arranjo de diodos.

**Coluna:** HP de fase reversa Hypersil ODS (5  $\mu\text{m}$ , 100 x 4,6 mm).

Para o extrato diclorometânico das raízes de *Poecilanthe parviflora* foram testadas as condições:

**Fase Móvel Isocrática:** MeOH, MeOH/H<sub>2</sub>O 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55% e 60%.

**Fase Móvel Gradiente:** 70:30 (H<sub>2</sub>O/MeOH) - 100 (MeOH) em 30 min + 20 min a 100 (MeOH).

**Fluxo:** 0,8 mL/min.

**Volume de injeção:** 20  $\mu\text{L}$ .

**Detetor:** 230 e 250 nm.

Para os extratos de *Lonchocarpus atropurpureus*, após vários testes, utilizou-se:

**Fase Móvel Gradiente** 70:30 (MeOH/H<sub>2</sub>O) - 100 (MeOH) em 30 min.

**Fluxo:** 0,8 mL/min.

**Volume de injeção:** 2  $\mu\text{L}$ .

**Detetor:** 270 nm.

As purificações dos flavonóides isolados do extrato éter de petróleo das raízes de *L. atropurpureus*, usados como padrões, foram feitas num cromatógrafo líquido de alta eficiência semi-preparativo Waters 600E, com:

**Detetor:** Espectrofotométrico de comprimento de onda variável UV/VIS modelo 484.

**Coluna:** preparativa Octadecyl Spherisorb S50DS Hy-Chrom Preparative HPLC Column (5  $\mu\text{m}$ , 25 cm x 10 mm, ID).

**Fase Móvel:** Gradiente linear MeOH/H<sub>2</sub>O 20% em 50 min.

**Fluxo:** 2,0 mL/min.

**Volume de Injeção:** 250  $\mu$ L.

**Detetor:** 270 nm.

Todas as amostras foram dissolvidas em solvente grau HPLC e filtradas em filtro tipo Millex®. Os solventes foram filtrados e desgaseificados antes do início de cada análise, sendo a água destilada e deionizada.

## 2. 1. Análise Qualitativa:

As análises qualitativas dos extratos das raízes de *Poecilanthe parviflora* e de *Lonchocarpus atropurpureus* foram realizadas a fim de verificar o perfil cromatográfico de cada extrato.

No caso do extrato éter de petróleo de *L. atropurpureus* baseou-se esta análise na co-injeção de quatro dos cinco flavonóides isolados desse mesmo extrato. Para identificação dos picos nos cromatogramas comparou-se o tempo de retenção e o espectro de UV correspondente; o equipamento também permitiu verificar a pureza de cada pico no cromatograma pela varredura dos espectros de UV correspondente.

### 2. 1. 1. Seleção da Fase Móvel:

A escolha da coluna e da fase móvel foi baseada na literatura<sup>4</sup> e nas análises anteriormente realizadas pelo grupo<sup>5</sup>.

Para o extrato diclorometânico das raízes de *P. parviflora* foram testadas as seguintes condições isocráticas (gradiente linear) MeOH 100%, MeOH/H<sub>2</sub>O 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55% e 60% e a condição gradiente de 70:30 (H<sub>2</sub>O/MeOH) - 100 (MeOH) em 30 min + 20 min a 100 (MeOH).

A fase móvel escolhida para a análise dos extratos de *L. atropurpureus* foi metanol e água, cujas proporções foram determinadas após testar condições isocráticas

<sup>4</sup> CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M. E. J. and McDONALD, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 761 (1+2): 315-321, 1997.

<sup>5</sup> NOGUEIRA, M.A. Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Wild) DC - Isolamento, determinação estrutural, testes biológicos e análise sazonal. Campinas, 1998, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.



de metanol 100% e metanol/água 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% verificando-se ao final que a última proporção era quase a ideal; montou-se então o gradiente iniciando-se a eluição com metanol:água (70:30) aumentando-se a concentração de metanol até 100:0 em 30 minutos, assim resultando uma melhor separação dos compostos.

### **2. 1. 2. Seleção do comprimento de onda:**

A escolha do comprimento de onda que detectasse o maior número de compostos do extrato baseou-se no comportamento dos flavonóides, que apresentam bandas de deslocamento relativas aos sistemas benzoíla (banda II, 240 a 280 nm) e cinamoíla (banda I, 300 a 380 nm), aumentando-se o comprimento de onda gradativamente de 220 a 360 nm. Para *P. parviflora* o detetor foi ajustado para 230 nm; para *L. atropurpureus*, o comprimento de onda com melhor detecção para os extratos testados foi 270 nm.

### **2. 1. 3. Condições de análise:**

As condições utilizadas para as análises qualitativas e quantitativas estão resumidas na pág. 112 deste capítulo.

## **2. 2. Análise Quantitativa:**

O método de avaliação utilizado foi o de calibração externa obtendo-se curvas analíticas com coeficiente de correlação de no mínimo 0,999. A seleção da fase móvel, do comprimento de onda e as demais condições utilizadas na construção das curvas analíticas foram as mesmas empregadas nas análise qualitativa dos extratos de *Lonchocarpus atropurpureus*.

### **2. 2. 1. Preparação das soluções padrões:**

Para a preparação das curvas analíticas foram feitas diluições dos padrões em balões volumétricos.

## 2. 2. 2. Construção das curvas analíticas:

As curvas analíticas foram construídas com base na seguinte equação :

$$y = a + bx$$

onde:  $y$  = área absoluta dos picos (fornecida pelo integrador);

$x$  = concentração do padrão (mg amostra/ mL solvente);

$a$  e  $b$  foram calculadas por regressão linear com auxílio do programa Microcal Origin versão 5.0.

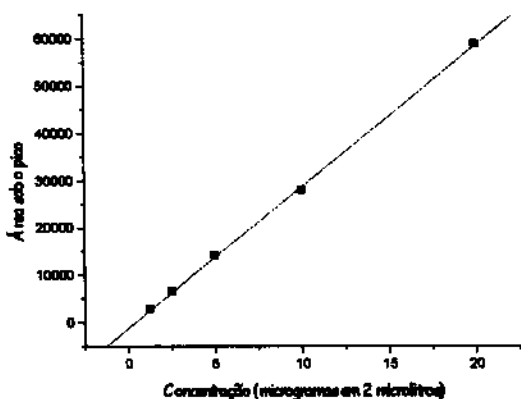
Os respectivos dados estão apresentados nas Tabelas de 1 e 2 e na Figura 1.

**Tabela 1:** Dados utilizados para a construção das curvas analíticas de quatro flavonóides (7 a 10) isolados do extrato éter de petróleo das raízes de *Lonchocarpus atropurpureus*.

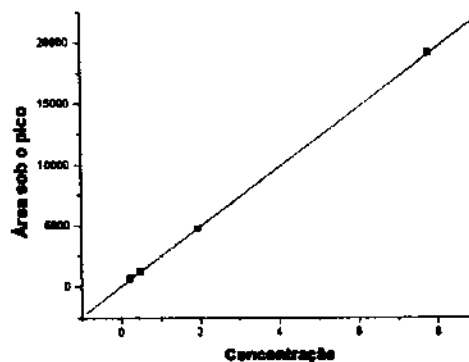
Padrão	Concentração $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$ (x)	Área sob o pico (y)	Área sob o pico EPLA
7	20	58866	7511
	10	28012	
	5	14146	
	2,5	6399	
	1,25	2825	
8	12,1	25999	6021
	6,05	13083	
	3,025	6573	
	1,5125	3299	
	0,75625	1671	
9	7,8	19141	3667
	1,95	4768	
	0,4875	1256	
	0,24375	655,95	
10	14,6	32416	1652
	7,3	16539	
	3,65	7901	
	1,825	3978	
	0,9125	1860	
	0,45645	971,39	
	0,228125	455,02	

Tabela 2: Equações da reta para os quatro flavonóides (7 a 10) isolados do extrato éter de pe-tróleo das raízes de *L. atropurpureus*.

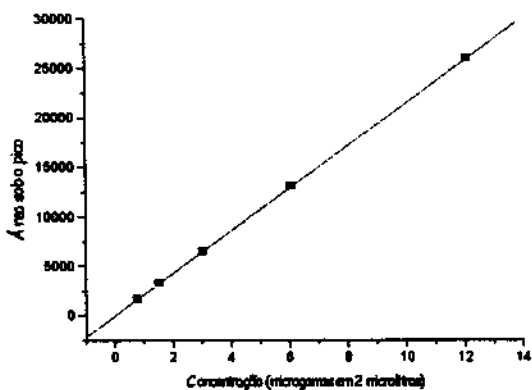
Padrões	Equação da Reta $y = a + bx$	Coefficiente de correlação
7	$y = -1059,625 + 2981,83548x$	0,99982
8	$y = 60,6667 + 2145,20572x$	1,0
9	$y = 42,75406 + 2447,22087x$	0,99999
10	$y = -85,00298 + 2233,7175x$	0,99991



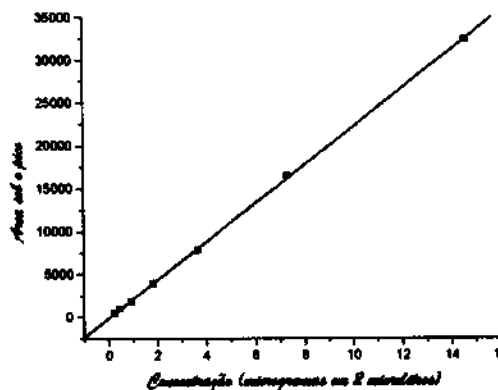
Curva Analítica de *Minimiflorin* (7)



Curva Analítica da Substância 9



Curva Analítica da Substância 8



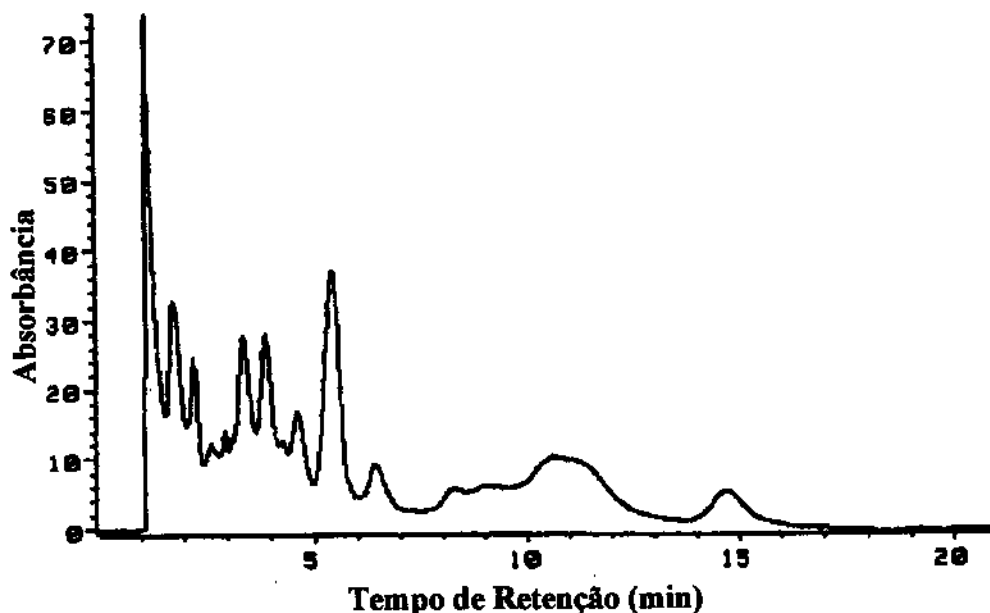
Curva Analítica de *Mundulinol* (10)

Figura 1: Gráficos de regressão linear (curvas analíticas) dos flavonóides 7 a 10

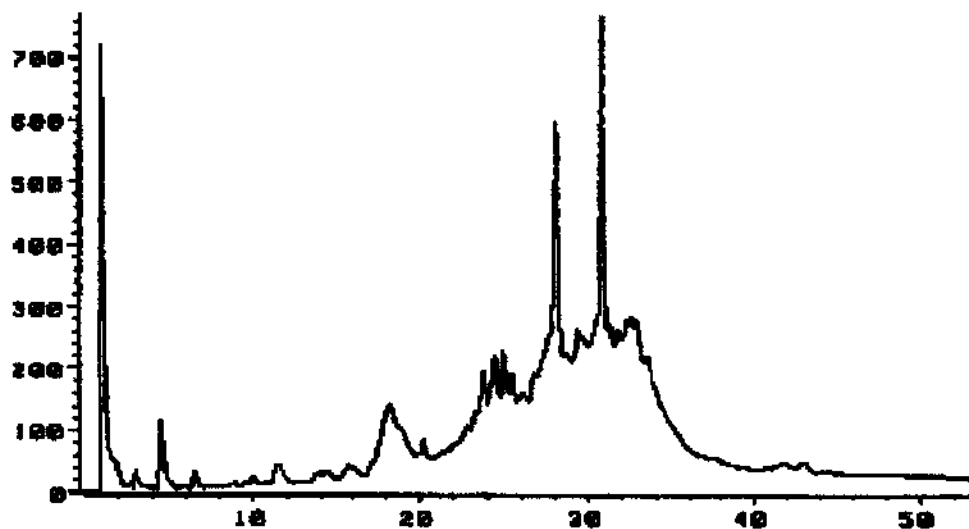
### 3. Resultados e Discussão:

#### 3. 1. *Poecilanthe parviflora*:

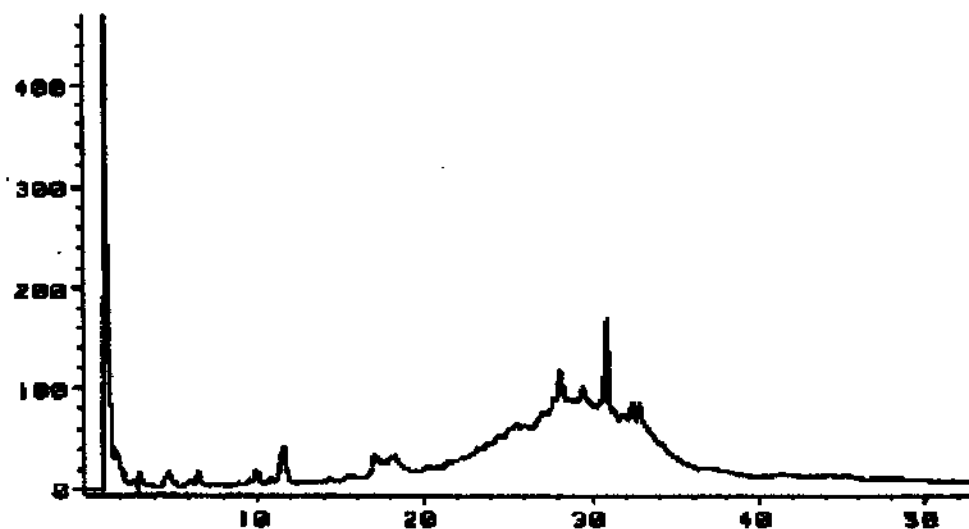
Das tentativas isocráticas, a que forneceu melhor resultado foi com F.M. MeOH/H<sub>2</sub>O 50% (Fig. 2). O sistema de eluição em gradiente testado (MeOH/H<sub>2</sub>O 30:70 aumentando-se gradativamente a proporção de metanol até 100% em 30 min, mantendo este eluente por mais 23 min) não mostrou uma boa separação. Em ambos, o detector foi ajustado para 230 nm, o qual não é o comprimento de onda usado para identificar flavonóides; quando utilizou-se  $\lambda$  254 nm (Banda II dos flavonóides) os sinais diminuíram muito de intensidade com alguns até retornando à linha de base (Fig. 3).



**Figura 2:** Cromatograma do Ext. Diclorometânico das raízes de *Poecilanthe parviflora*  
Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersil 4,6x100 mm, diâmetro interno 5  $\mu$ m, fase móvel: 1:1 (MeOH/H<sub>2</sub>O) isocrática, volume de injeção 20  $\mu$ L, comprimento de onda: 254 nm e fluxo: 0,8 mL/min.



A: Cromatograma a 230 nm



B: Cromatograma a 254 nm

**Figura 3:** Cromatogramas do Ext. Diclorometânico das raízes de *Poecilanthe parviflora*  
Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersil 4,6x100 mm, diâmetro interno 5 µm, fase móvel: 70:30 (H<sub>2</sub>O/MeOH) - 100 (MeOH) em 30 min mais 20 min em MeOH 100%, volume de injeção 20 µL, comprimento de onda: 230 (A) e 254 (B) nm e fluxo: 0,8 mL/min.

### 3. 2. *Lonchocarpus atropurpureus*:

#### 3. 2. 1. Análise Qualitativa:

Das cinco substância isoladas, quatro foram identificadas no cromatograma (Fig. 4). O extrato diclorometânico mostrou-se muito semelhante ao éter de petróleo tanto por CCD quanto por CLAE (Fig. 5). O extrato metanólico não forneceu um cromatograma com boa resolução não sendo possível encontrar as condições ideais de análise e para efeitos de comparação seu cromatograma foi feito sob as mesmas condições dos extratos anteriores.

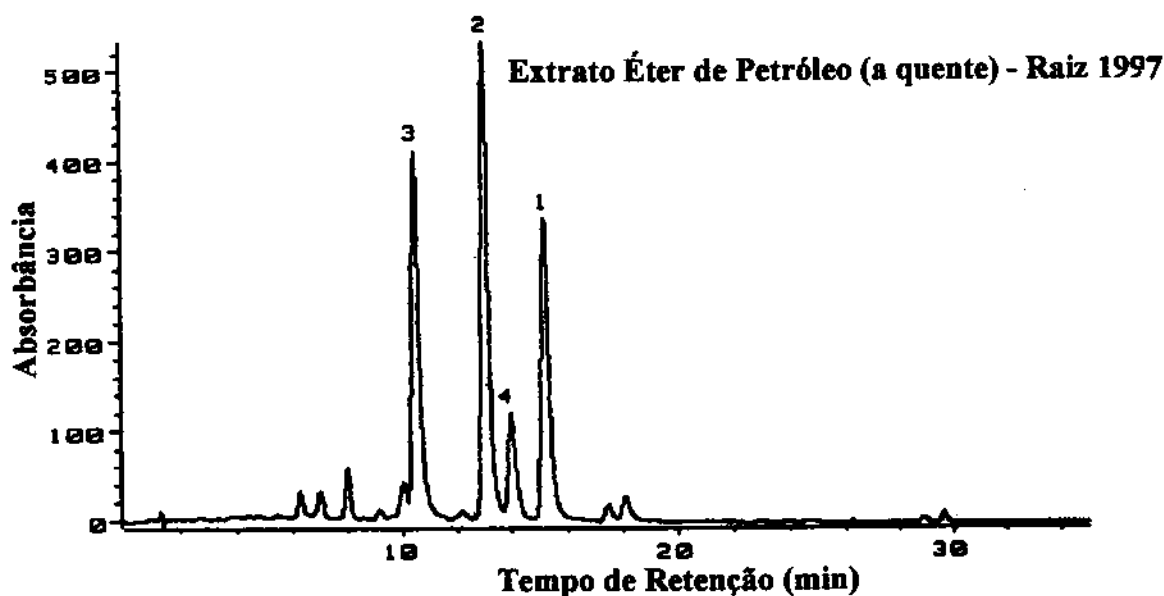


Figura 4: Cromatograma do Extrato Éter de Petróleo de *L. atropurpureus*, 1: Minimiflorina (7), 2: Substância inédita 8; 3: Substância inédita 9; 4: Mundulinol (10)  
Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersil 4,6x100 mm, diâmetro interno 5 µm, fase móvel: gradiente 70:30 (MeOH/H<sub>2</sub>O) - 100(MeOH) em 30 min, volume de injeção 2 µL, comprimento de onda: 270 nm e fluxo: 0,8 mL/min.

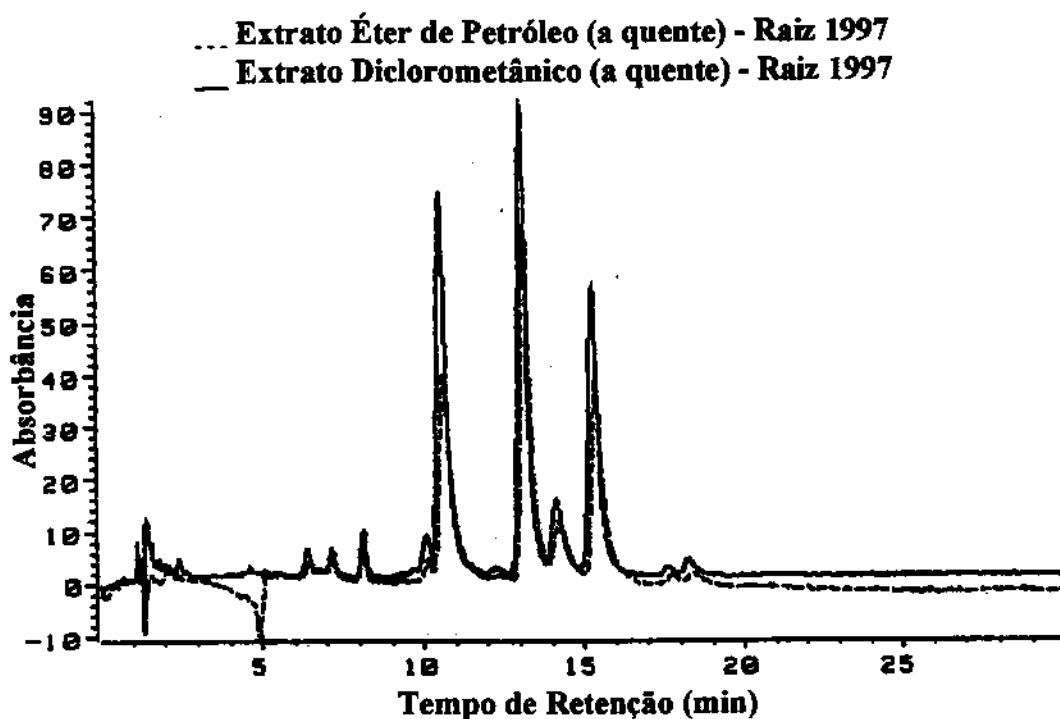
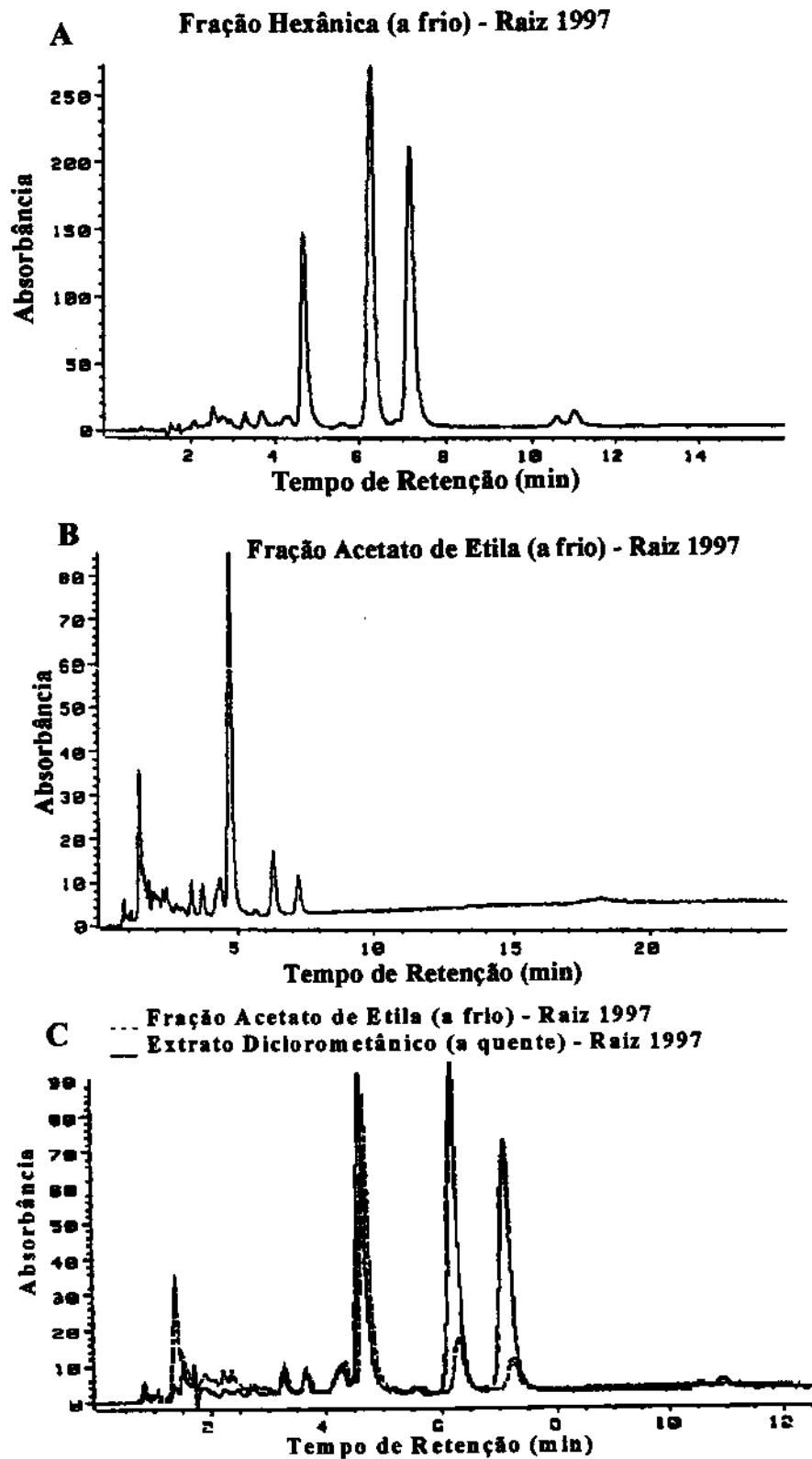


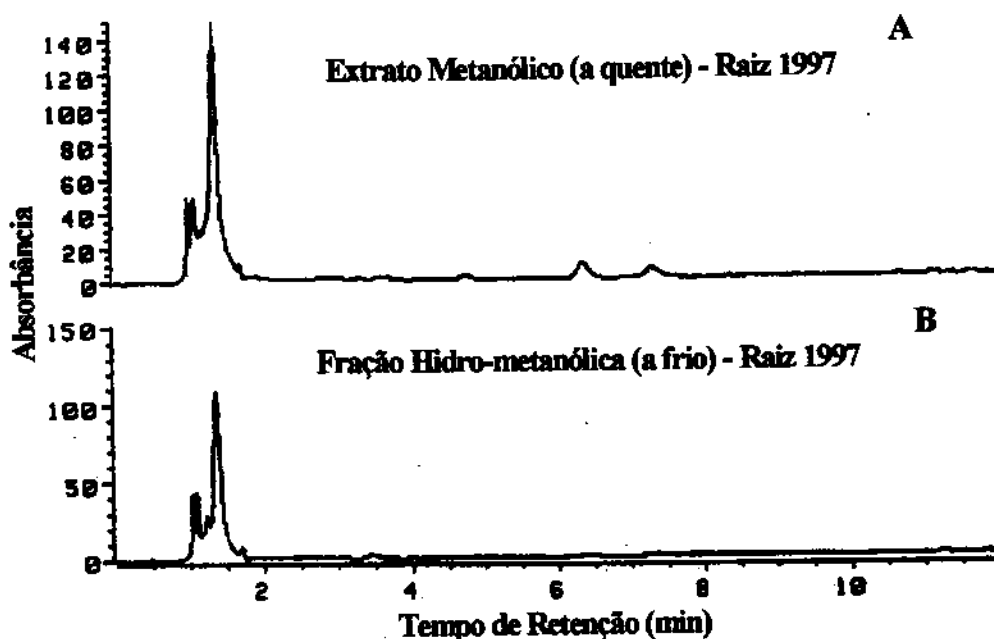
Figura 5: Sobreposição dos cromatogramas do extrato éter de petróleo (linha tracejada) e do extrato diclorometânico (linha cheia). Mesmas condições utilizadas anteriormente.

As frações obtidas a partir da extração por maceração (a frio) das raízes coletadas durante a primeira coleta (Cap. II, pag. 56) foram analisadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os cromatogramas obtidos mostraram que havia uma grande similaridade entre o extrato éter de petróleo (a quente) (Fig. 4) e a fração hexânica (a frio) (Fig. 6); o extrato diclorometânico (a quente) e a fração acetato de etila (a frio) mostraram-se um pouco diferente (Fig. 6), sendo que a fração AcOEt contém maior concentração do flavanono 9. O extrato metanólico (a quente) e a fração hidro-metanólico (a frio) também foram muito semelhantes (Fig. 7). Estes resultados demonstraram que ambos os métodos de extração mostraram-se eficientes quanto à composição qualitativa dos extratos havendo um menor rendimento (massa extrato/massa de raiz) de extração quando se utilizou o método de maceração.



**Figura 6:** Análise dos extratos obtidos por extração a quente (Soxhlet) e a frio (Maceração) A) Fração Hexânica a frio; B) Fração Acetato de Etila a frio; C) Sobreposição dos cromatogramas da fração acetato de etila e do extrato diclorometânico das raízes de 1997 (raiz coletada no Pq. Ecológico da Unicamp). Mesmas condições anteriores





**Figura 7:** Análise dos extratos obtidos por extração a quente (Soxhlet) e a frio (Maceração) A) Extrato Metanólico a quente das raízes (Unicamp, 1997) de *L. atropurpureus*; B) Fração Hidro-metanólica a frio das raízes (Unicamp, 1997) de *L. atropurpureus*; Mesmas condições anteriores

Já a fração hexânica resultante da extração a frio da segunda coleta de raízes (1998) foi também analisada sob as mesmas condições anteriores e apresentou um perfil bastante diverso do observado nos cromatogramas do extrato éter de petróleo e da fração hexânica das raízes 1997 (Fig. 8). As diferenças macroscópicas observadas entre essas duas amostras de raízes foram a presença de nódulos de fixação de nitrogênio apenas na primeira amostra (Fig. 3, Cap. II, pag. 47) e o lugar de cultivo das espécimes (Parque Ecológico da Unicamp - 1ª. coleta; Mata do Monjolinho do IAC - 2ª. coleta).

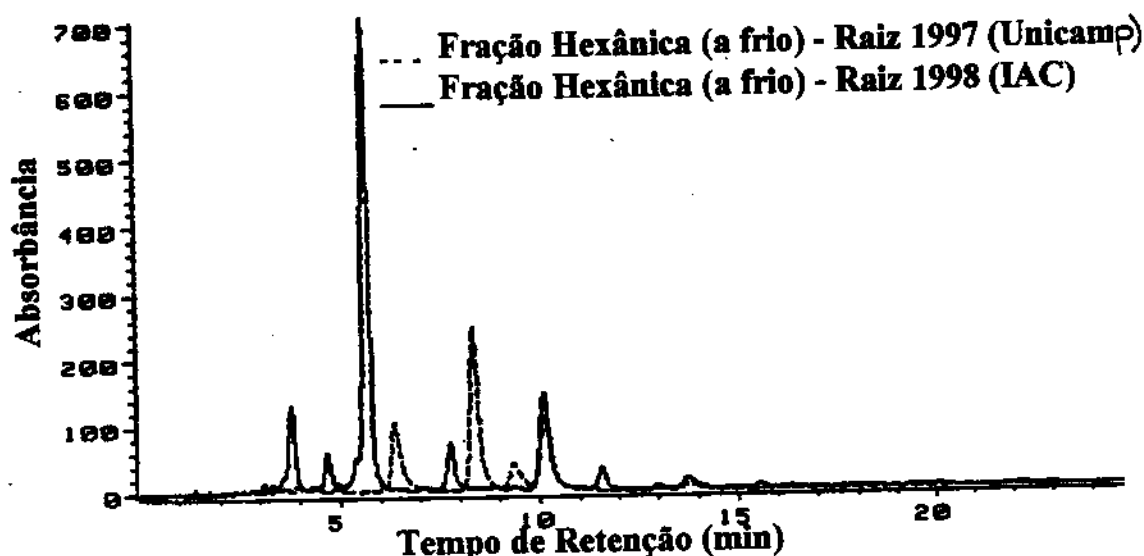


Figura 8: Análise dos extratos obtidos a partir da 1ª. amostra e da 2ª. amostra de raiz. Sobreposição dos cromatogramas da fração hexânica a frio das raízes de *L. atropurpureus* cultivado no Parque Ecológico da Unicamp (1ª. coleta) e da fração hexânica a frio das raízes de *L. atropurpureus* cultivado na mata do Monjolinho (2ª. coleta). Mesmas condições anteriores.

Recentemente uma análise<sup>6</sup> por CLAE dos extratos éter de petróleo das raízes de dois espécimes de *Lonchocarpus latifolius* cultivados um no Campus da Unicamp e outro na Mata do Monjolinho demonstrou a grande similaridade entre os cromatogramas indicando haver, nesse caso, pequena influência do local de cultivo. Por outro lado, vários relatos na literatura<sup>7, 8, 9, 10</sup> indicam que os flavonóides (flavanonas em particular<sup>11</sup>,

<sup>6</sup> NOGUEIRA, M.A. Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Wild) DC - Isolamento, determinação estrutural, testes biológicos e análise sazonal. Campinas, 1998, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.

<sup>7</sup> COHN, J.; DAY, R.D. and STACEY, G. Legume nodule organogenesis. *Trends in Plant Science* 3 (3): 105-110, 1998.

<sup>8</sup> CLEYETMAREL, J.C.; ROME, S.; SALDUCCI, X. and WERY, J. Host-specific regulation of nodulation mediated by flavonoids compounds present in plant. *Acta Botanica Gallica* 143 (6): 521-529, 1996.

<sup>9</sup> RECOURT, K.; VERKERKE, M.; SCHRIPEMA, J.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; LUGTENBERG, B.J.J. and KIJNE, J.W. Major flavonoids in uninoculated and inoculated roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* are four conjugates of the nodulation gene-inhibitor kaempferol. *Planta Molecular Biology* 18 (3): 505-513, 1992.

<sup>12)</sup> promovem o início da indução dos genes de nodulação de bactérias do gênero *Rhizobium*.

Com base nessas ponderações postulou-se que, provavelmente, os flavanóis e flavanonas isolados do extrato éter de petróleo da primeira amostra de raízes (com nódulos) poderiam estar relacionados com o processo de indução dos genes de nodulação das bactérias *Rhizobium* sp. Para comprovar essa hipótese, uma terceira coleta foi realizada, desta vez foram coletados segmentos de raiz do espécime cultivado no Pq. Ecológico da Unicamp, e observou-se que essa nova amostra apresentava poucos nódulos de fixação de N<sub>2</sub>.

A fração hexânica da terceira amostra de raízes apresentou um perfil cromatográfico (por CCD e por CLAE) praticamente idêntico ao observado para a fração hexânica da primeira amostra de raízes (Fig. 9), o que reforça a idéia de que os flavonóides isolados estejam envolvidos no processo de simbiose entre a planta e bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>.

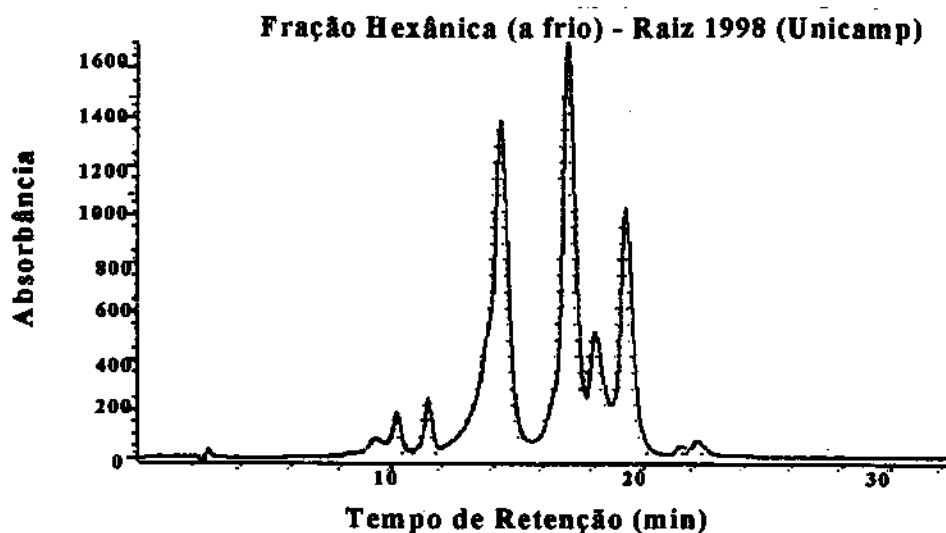
O fato de o espécime cultivado no Parque Ecológico da Unicamp apresentar nódulos de fixação de nitrogênio enquanto o da Mata do Monjolinho do IAC não apresentá-los pode ser explicado pelo tipo de solo e tipos de plantas vizinhas aos espécimes estudados. Assim, segundo BEGON, HARPER e TOWNSEND<sup>13</sup>, as leguminosas procuram estabelecer a relação de simbiose com as bactérias do gênero *Rhizobium* quando há outras espécies, por exemplo gramíneas, competindo pelo nitrogênio presente no solo sob a forma de íons nitrato; quando a competição é menor ou inexistente as leguminosas captam o NO<sub>4</sub><sup>-</sup> e promovem sua redução a amônia uma vez que esta última rota metabólica é menos dispendiosa (a formação e manutenção da simbiose consome cerca de 13,5 moles de ATP/ mol NH<sub>3</sub> formada).

---

<sup>11</sup> ZAAT, S.A.J.; WIJFFELMAN, C.A.; SPAINK, H. P.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; OKKER, R.J.H. and LUGTENBERG, B.J.J. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid pRL1J1 by plant Flavanones and Flavones. *Journal of Bacteriology* 169 (1): 198-204, 1987.

<sup>12</sup> RECOURT, K.; SCHRIPSEMA, J.; KIJNE, J.W.; VAN BRUSSEL, A.A.N. and LUGTENBERG, B.J.J. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of the *nod* gene activating flavanones and chalcones. *Planta Molecular Biology* 16 (5): 841-852, 1991.

<sup>13</sup> BEGON, M.; HARPER, J.L. and TOWNSEND, C.R. Ecology - Individuals, Populations and Communities. Blackwell Scientific Publications, Chapter 13: 488-492, 1986.



**Figura 9:** Análise dos extratos obtidos a partir da 3ª. amostra de raiz

Fração Hexânica a frio das raízes de *L. atropurpureus* cultivado no Pq. Ecológico da Unicamp (3ª. coleta, 1998). Notar a semelhança com os cromatogramas obtidos para a 1ª. coleta. Mesmas condições anteriores

Os cromatogramas dos extratos éter de petróleo do caule e das folhas coletados durante a primeira coleta (1997, Pq. Ecológico da Unicamp, Fig. 10) demonstraram um perfil cromatográfico diferente para cada uma destas partes da planta, com uma predominância de compostos mais polares (menor tempo de retenção) quando comparados ao cromatograma do extrato éter de petróleo da raiz.

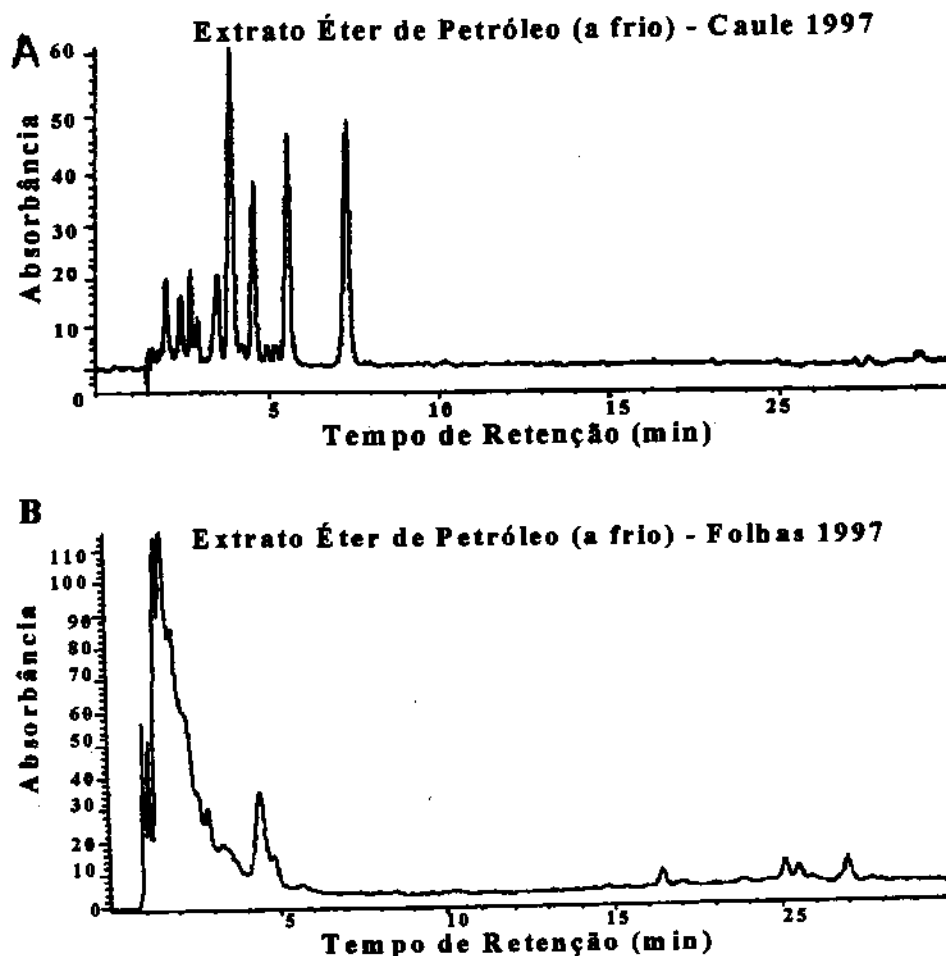
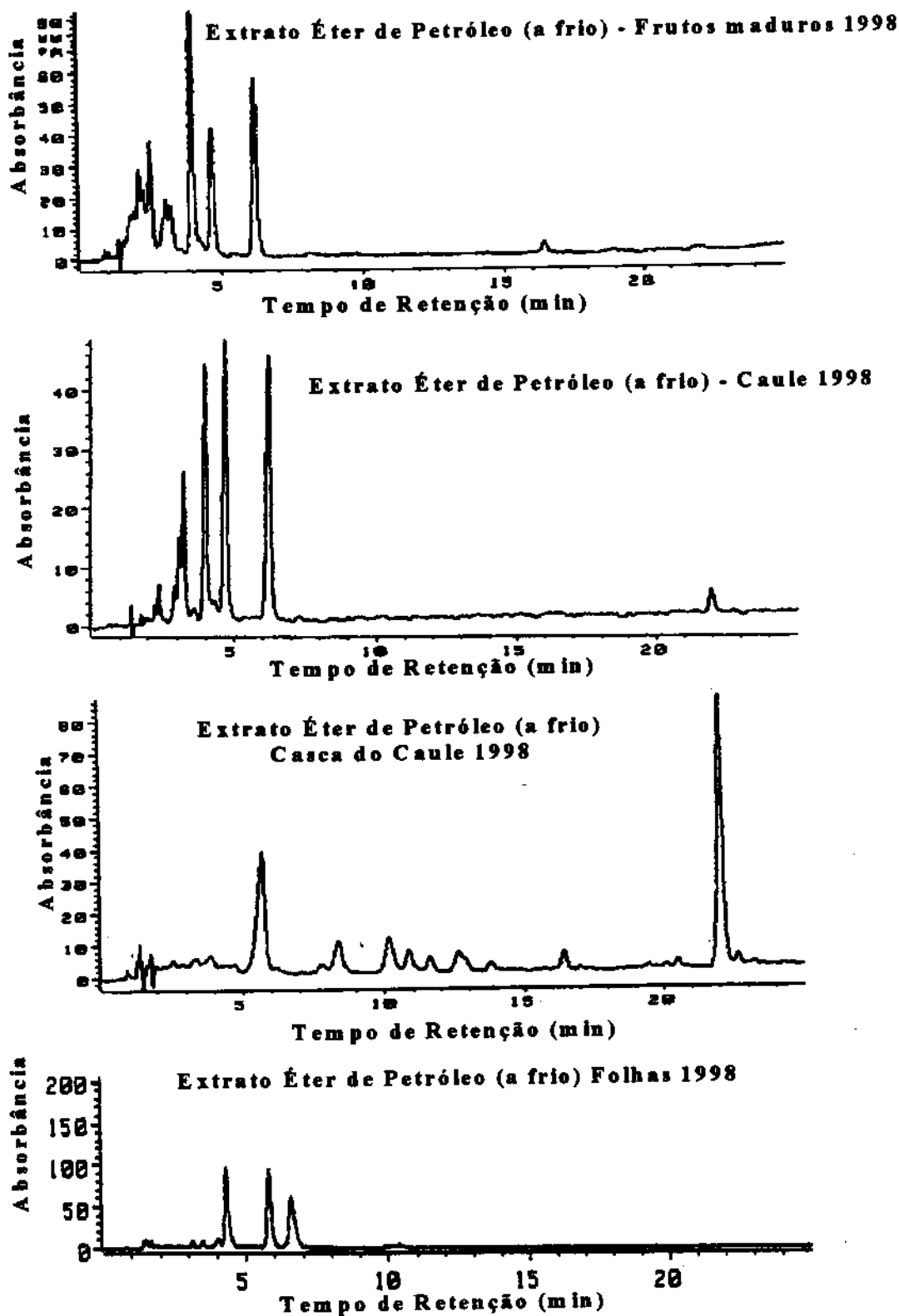


Figura 10: Análise do perfil cromatográfico de *Lonchocarpus atropurpureus* cultivado no Parque Ecológico da Unicamp (1997). A) Extrato éter de petróleo a frio do caule; B) Extrato éter de petróleo a frio das folhas. Mesmas condições anteriores.

Da mesma forma, os cromatogramas dos extratos éter de petróleo dos frutos maduros, do caule e das folhas (Fig. 11) também indicaram a presença de compostos mais polares (menor  $T_R$ ) e apresentaram sobreposições, enquanto o cromatograma do extrato éter de petróleo da casca do caule (Fig. 11) apresentou compostos menos polares (maior  $T_R$ ).

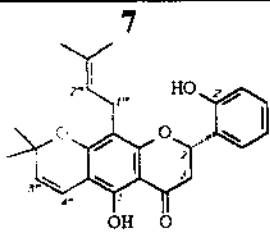
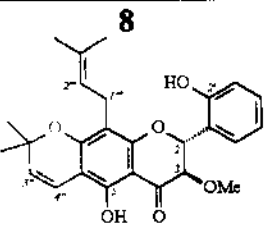
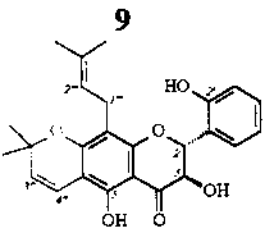
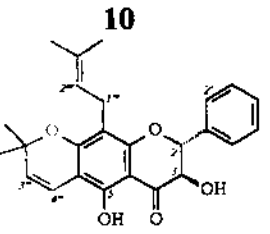


**Figura 11:** Análise do perfil cromatográfico de *Lonchocarpus atropurpureus* cultivado na Mata do Monjolinho do IAC (1998). De cima para baixo: Extrato éter de petróleo a frio dos frutos maduros; Extrato éter de petróleo a frio do caule; Extrato éter de petróleo a frio da casca do caule; Extrato éter de petróleo a frio das folhas. Mesmas condições anteriores.

## 3. 2. 2. Análise Quantitativa:

Foram quantificados os quatro compostos (7 a 10) identificados no extrato éter de petróleo obtido à partir das raízes (primeira coleta); na tabela 2 estão colocadas as equações da reta para cada um dos compostos e na tabela 3 encontram-se as concentrações destes em um grama de raiz.

**Tabela 3:** Concentração das substâncias 7 a 10 isoladas do extrato éter de petróleo das raízes de *L. atropurpureus*

	7	8	9	10
				
<i>mg/g raiz</i>	3,1	4,2	2,3	0,8

## 1. Introdução:

Atualmente a aplicação de bioensaios visando o isolamento de substâncias ativas vem sendo cada vez mais apreciada pelos fitoquímicos, não só pelo número de metabólitos secundários biologicamente ativos isolados de plantas, como também pelo desenvolvimento de inúmeros testes biológicos sensíveis e simples.

Os flavonóides são responsáveis por um amplo espectro de funções biológicas, atuando como um fator de integração entre a planta e o meio ambiente, compreendendo, entre outras atividades, a proteção contra raios UV<sup>1</sup>, a regulação do crescimento do tubo polínifero no estigma<sup>2</sup> e como sinais regulatórios na transcrição dos genes de nodulação de bactérias do gênero *Rhizobium*<sup>3</sup>. Vários flavonóides apresentam também atividades antifúngica e antibacteriana.<sup>4</sup>

Em uma recente revisão<sup>5</sup>, LACAILLEDUBOIS e WAGNER descrevem alguns dos testes biológicos *in vitro* e *in vivo* para atividades anti-oxidante, anti-hipertensivo, anti-flogístico, antiviral, antitumoral e atividade quimiopreventiva de flavonóides e outros derivados fenólicos.

Neste capítulo buscou-se estudar a atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana) dos extratos de *Poecilanthe parviflora* e de *Lonchocarpus atropurpureus* e potencial atividade antitumoral dos extratos e da substância 8 das raízes de *L. atropurpureus* através dos testes de toxicidade com *Artemia salina*, ação sobre receptor de insulina (proteína tirosina quinase) e citotoxicidade *in vitro*.

---

<sup>1</sup> KOES, R.E.; QUATTROCCHIO, F. and MOI, J.N.M. *apud* CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M. E. J. and McDONALD, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 761 (1+2): 315-321, 1997.

<sup>2</sup> VOGT, T.; POLAK, P.; TARLYN, N. and TAYLOR, L.P. *apud* CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M. E. J. and McDONALD, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 761 (1+2): 315-321, 1997.

<sup>3</sup> CLEYETMAREL, J.C.; ROME, S.; SALDUCCI, X. and WERY, J. Host-specific regulation of nodulation mediated by flavonoids compounds present in plant. *Acta Botanica Gallica* 143 (6): 521-529, 1996.

<sup>4</sup> EVANS, W.C. *apud* NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* - Isolamento, identificação, determinação estrutural, testes biológicos e análise sazonal - Campinas, 1998, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

<sup>5</sup> LACAILLEDUBOIS, M.A. and WAGNER, H. Pharmacological significance of polyphenol derivatives. *Acta Botanica Gallica* 143 (6): 555-562, 1996.



## 2. Materiais e Métodos:

### 2. 1. Bioautografia:

Este teste foi implantado em nosso laboratório, com algumas modificações, segundo o protocolo descrito por SAXENA<sup>6</sup>. Os extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico foram dissolvidos nos respectivos solventes na concentração de 1mg/ml. Foram aplicados em duas placas de CCD (Merck Sílica gel GF<sub>254</sub>, 6 x 6 cm) 20 µg de cada extrato e 2 µg de antibiótico (cloranfenicol para bactérias e ciclopirox olamina para os fungos) e desenvolvidas com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 2,5%. Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Na placa controle as manchas que absorveram nestes comprimentos foram marcadas e em seguida esta foi pulverizada com revelador específico (anisaldeído modificado). A outra placa de CCD foi colocada numa placa de Petri de 90 mm de diâmetro, na qual foi adicionado 20 mL de meio de cultura específico ao microorganismo testado; após solidificação do meio, inoculou-se 100 µL da suspensão contendo cerca de 10<sup>6</sup> células/mL fazendo-se o espalhamento com auxílio de uma alça de Digralski. Foram preparadas, também, uma placa de Petri contendo uma placa de CCD apenas desenvolvida com o solvente (sem aplicação de extrato) e uma outra apenas com meio de cultura (branco) para avaliar o crescimento microbiano. Todas as placas foram incubadas na temperatura e pelo tempo específicos para cada microorganismo, sendo ao final observados os halos de inibição e comparados com a placa de CCD controle.

Foram testados os seguintes microorganismos:

⇒ Bactérias: *Bacillus subtilis* (CCT 0089, ATC 6633, gram +), *Staphilococcus aureus* (CCT 4295, ATCC 6538, gram +), *Salmonella tiphymurium* (CCT 0528, gram -), *Micrococcus luteus* (CCT 2720, gram +) - incubados por 24h, a 37°C em meio NA (Ágar Nutriente: peptona 5,0 g, extrato de carne 3,0 g, ágar 15 g e água destilada 1000 mL);

<sup>6</sup> SAXENA, G., FARNER, S., TOWERS, G. H. N., HANCOCK, R. E. W. *apud* NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* - Isolamento, identificação, determinação estrutural, testes biológicos e análise sazonal - Campinas, 1998, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

⇒ Fungos: *Aspergillus niger* (CCT 1435), *Penicillium funiculosum* (CCT 0490), *Fusarium oxysporum* (CCT 3244), *Alternaria alternata* (CCT 1250), *Rhizopus orizae* (CCT 4964), *Aspergillus fumigatus* (CCT 01277), *Cladosporium* sp. (CCT 0279), *Candida albicans* (CCT 0776) - incubados durante 7 dias, exceto *P. funiculosum* que necessitou de 14 dias de incubação, a 25°C em meio MA (Malte Ágar: extrato de malte 20,0 g, ágar 20,0 g e água destilada 1000 mL).

Tanto os microrganismos quanto os meios de cultura utilizados neste ensaio foram fornecidos pela Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tozzelo”.

## 2. 2. Bioensaio de Letalidade com *Artemia salina* (“Brine Shrimp Letality Test”):

O ensaio foi desenvolvido de acordo com técnica proposta por MCLAUGHLIN<sup>7</sup> e o resultado positivo indica toxicidade.

Ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em solução de sal marinho (38 g/L), num pequeno recipiente (p. ex. saboneteira plástica) coberto parcialmente, para que os ovos fiquem na parte escura e os camarõezinhos na parte iluminada. Esperou-se dois dias (48 h) para que os ovos se convertessem em larvas tipo nauplii.

Os extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico e os compostos 8 e 9 foram então diluídos conforme mostrado na Figura 1; por questões de quantidade disponível, os dois últimos foram testados em concentrações menores (400, 40 e 4 ppm para 8 e 330, 33 e 3,3 ppm para 9). Após evaporação total do solvente, cada um dos nove frascos recebeu uma gota de dimetilsulfóxido (DMSO), cerca de 3ml de solução de sal marinho (38 g/L), 10 larvas de camarão e o volume final foi ajustado para 5ml. Depois de 24 h em repouso, procedeu-se a contagem do número de camarões sobreviventes; estes dados foram analisados em programa Finney, o qual foi cedido pelo Dr. McLaughlin, para análise estatística e assim determinar os valores de DL<sub>50</sub>.

<sup>7</sup> MCLAUGHLIN, J.L., SAIZARBITORIA, T-C., ANDERSON, J. E. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Quimica* 18 (4): 13-18, 1995.

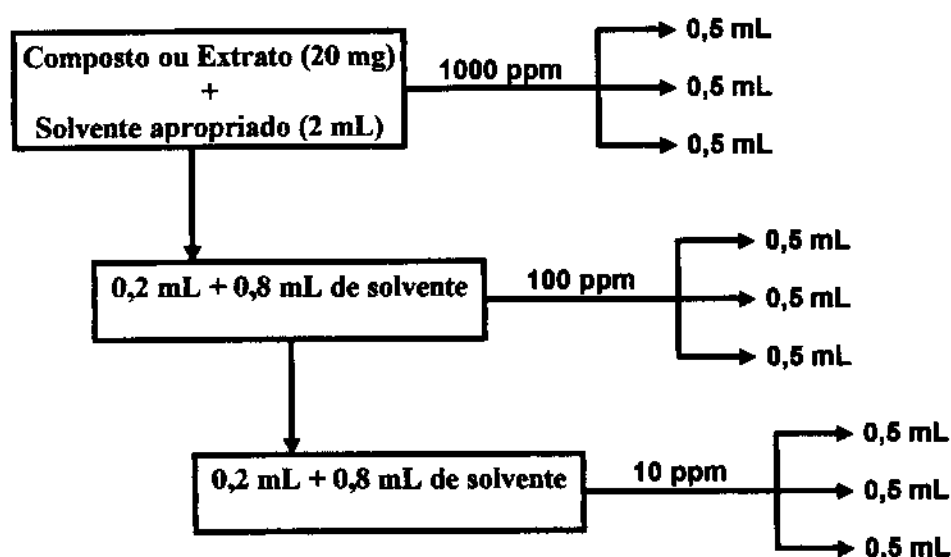


Figura 1: Procedimento para diluição da amostra

### 2. 3. Efeitos de Flavonóides nas Etapas Iniciais da Ação Insulínica e Immunoblotting:

Este experimento foi realizado pela Dr.<sup>a</sup> Carla Roberta de Oliveira Carvalho bolsista de pós-doutoramento que trabalha em colaboração com o Prof. Dr. Mário José Abdala Saad, do Laboratório de Biologia Molecular e Celular, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, segundo a metodologia descrita a seguir.

Injetou-se, via peritoneal, 0,5 mL de solução salina contendo o composto (50mM) a ser testado e uma gota de DMSO, para facilitar a solubilização, em dois ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) da linhagem Wistar-Hannover. Após trinta minutos, o primeiro rato foi anestesiado com éter etílico (via inalatória) e procedeu-se a retirada do músculo gastrocnêmico (pata, M1) e de um fragmento do fígado (F1). Em seguida injetou-se na veia porta 60 µg de insulina regular e, após 30 minutos, retirou-se outro fragmento hepático (F2) e após 1,5 min retirou-se o músculo gastrocnêmico (M2). Com o segundo rato tratado e anestesiado procedeu-se apenas a segunda parte do experimento (retirada de fígado (F3) e músculo (M3) após injeção de insulina. Repetiu-se este proce-

dimento substituindo os ratos por ratos não tratados (grupo controle, F4, F5, F6, M4, M5 e M6). Fez-se o teste em triplicata.

Cada fragmento de tecido (M1 a 6 e F1 a 6) era imediatamente submetido à homogeneização por aproximadamente 30 seg. com processador tipo Politron PTA20S generator, operando em velocidade máxima, em solução tampão para extração (1:10, fragmento/sol. tampão) contendo Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100mM, SDS 1%, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 10 mM, água deionizada e Ortovanadato de sódio 10 mM (acrescentado no momento da coleta), mantida em banho-maria a 100°C. Após homogeneização, o material foi deixado em banho-maria por mais 10 min com a finalidade de desnaturar completamente as fosfatases que poderiam desfosforilar o receptor de insulina e seus substratos. Em seguida os frascos foram mantidos sob gelo.

O material foi centrifugado a 12000 rpm, a 4°C por 40 min, em centrífuga refrigerada tipo Beckmanm 70 Ti para remoção do material insolúvel e o sobrenadante era então utilizado como amostra.

Uma parte do sobrenadante foi usada para determinação de quantidade de proteínas por método colorimétrico e outra preparada para aplicação no gel, com a adição de tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 20% e 100mM de DTT) e então fervida (100°C) por 10min em banho-maria. Aliquotas deste último material contendo quantidades padronizadas de proteínas (250µg, volume obtido através da dosagem colorimétrica) foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 6% Tris acrilamida) em aparelho de minigel "Bio-Rad" (Mini-Protean), banhadas pelo tampão de corrida (Trisma base 0,2M, glicina 0,152M, EDTA 7,18M, SDS 0,4% e água deionizada).

No mesmo gel aplicou-se também uma amostra padrão de proteínas (marcador) com pesos moleculares conhecidos assim estabelecidos: miosina (208 kDa), β-galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (80 kDa) e ovalbumina (49 kDa). Estas proteínas são previamente coradas e aparecem em azul no gel de eletroforese e na membrana de nitrocelulose, servindo para orientação quanto ao peso molecular das bandas observadas. Os géis receberam voltagem constante de 20 volts por 1h e a seguir de

100 volts por aproximadamente 2,5h, para que ocorresse a separação adequada das proteínas. Após o término da separação, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose, em voltagem constante de 90 volts por 2h no equipamento de minigel para eletrotransferência da Bio-Rad utilizando-se o tampão para transferência (Trisma base 25mM, glicina 129mM, metanol 20%, SDS 0,02%) para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular.

A ligação inespecífica de anticorpos à membrana de nitrocelulose foi reduzida pela pré-incubação do filtro com a solução bloqueadora, constituída por caseína (leite desnatado a 5%) e azida sódica 0,02% dissolvidos em solução basal (Tris 10mM, Tween 20 0,02%, NaCl 150mM), por um período de 2 a 3h a temp. amb. ou 12h a 4°C. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpos antifosfotirosina, diluídos em tampão bloqueador por 4h à temp. amb. ou 14h à 4°C, e então lavados a cada 10 min por 5 vezes com solução salina.

Após lavagem, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com proteína A marcada com  $^{125}\text{I}$  por 1h à temp. amb. ou 12h à 4°C e em seguida lavadas novamente com solução basal a cada 10min, por 2h. A ligação do material radioativo à membrana foi detectada por auto-radiografia, procedendo-se a exposição das membranas em filme tipo Kodak XAR e intensificador tipo Cronex Lightning Plus, a -80°C por aproximadamente 5 dias.

Testou-se o efeito do composto 8 sobre o receptor de insulina, que é uma enzima tirosina proteína quinase.

#### 2. 4. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*:

Este ensaio foi realizado pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Pizão no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA, segundo procedimento MTT<sup>8</sup>

<sup>8</sup> ALLEY, M.C.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; HURSEY, M.L.; CZERWINSKI, M.J.; FINE, D.L.; ABBOTT, B.J.; MAYO, J.G.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48: 589-601, 1988.

(baseado na redução metabólica do sal de tetrazolium (S) em formazan (InS) por produtos da atividade da desidrogenase mitocondrial das células) do *National Cancer Institute*. Testou-se a atividade de citotoxicidade do composto **8** frente a três linhagem celulares, a saber câncer de pulmão (A549), leucemia (K562) e câncer de colon (WiDR).

### 3. Resultados e Discussão:

#### 3. 1. Bioautografia:

Levando-se em conta que isoflavonóides e flavonóides são mais seletivamente tóxicos para bactérias gram-positivas sendo as gram-negativas bem menos sensíveis, escolheu-se um número maior de cepas gram-positivas; foram feitos bioensaios com alguns fungos e bactérias de cepas mais conhecidas.

Os extratos de *P. parviflora* mostraram-se inativos frente aos microrganismos testados; em suas placas observou-se apenas o halo de inibição do antibiótico usado como padrão (Fig. 2). Da mesma forma, os três extratos de *L. atropurpureus* foram testados contra fungos e mostraram-se inativos (ausência do halo de inibição, Fig. 3); infelizmente não houve tempo hábil para finalizar os teste dos extratos de *L. atropurpureus* com bactérias. Os resultados estão resumidos na tabela 1.

#### 3. 2. Ensaio de Letalidade com *Artemia salina*:

O resultado positivo deste ensaio é um indicador de toxicidade tanto para screening de substâncias com atividade antitumoral<sup>9,10</sup> quanto para compostos com atividade pesticida. Este ensaio apresenta uma correlação positiva com os ensaios sobre células 9kb (carcinoma nasofaríngeo humano,  $p = 0,036$  e  $kappa = 0,56$ ), onde os valo-

<sup>9</sup> HOOP, D.C.; ALALI, F.Q.; GU, Z-M. and McLAUGHLIN, J.L. Mono-THF ring annonaceuos acetogenins from *Annona squamosa*. *Phytochemistry* 47 (5): 803-809, 1998.

<sup>10</sup> RATNAYAKE, S.; GU, Z-M.; MIESBAUER, L.R.; SMITH, D.L.; WOOD, K.V.; EVERT, D.R. and McLAUGHLIN, J.L. Parvifloracin and parviflorin: cytotoxic bistetrahydrofuran acetogenins with 35 carbons from *Asimina parviflora* (Annonaceae). *Canadian Journal of Chemistry* 72 (2): 287-293, 1994.

res de ED<sub>50</sub> para citotoxicidade são geralmente próximos a uma décima parte dos valores ED<sub>50</sub> encontrados nos ensaios com *Artemia salina* (McLaughlin, 1991)<sup>11</sup>.

Após análise estatística dos dados, obteve-se que os extratos éter de petróleo e diclorometânico foram mais ativos que o metanólico (Tab. 2), dentro da faixa de interesse ( $\leq 1000$  ppm). Os flavonóides inéditos isolados, o éter 3-O-metilico de minimiflorina (8) e a 3-hidroxi-minimiflorina (9) também mostraram-se ativos.

Tabela 1: Resultados da Bioautografia

Microrganismos	<i>Lonchocarpus atropurpureus</i>			<i>Poecilanthe parviflora</i>		
	1	2	3	1'	2'	3'
<i>Bacillus subtilis</i> <sup>a</sup>				-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>b</sup>				-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> <sup>c</sup>				-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> <sup>d</sup>				-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> <sup>e</sup>				-	-	-
<i>Penicillium funiculosum</i> <sup>f</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> <sup>g</sup>				-	-	-
<i>Alternaria alternata</i> <sup>h</sup>	-	-	-			
<i>Rhizopus orizae</i> <sup>i</sup>	-	-	-			
<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>j</sup>	-	-	-			
<i>Cladosporium cladosporioides</i> <sup>k</sup>	-	-	-			
<i>Candida albicans</i> <sup>m</sup>	-	-	-			

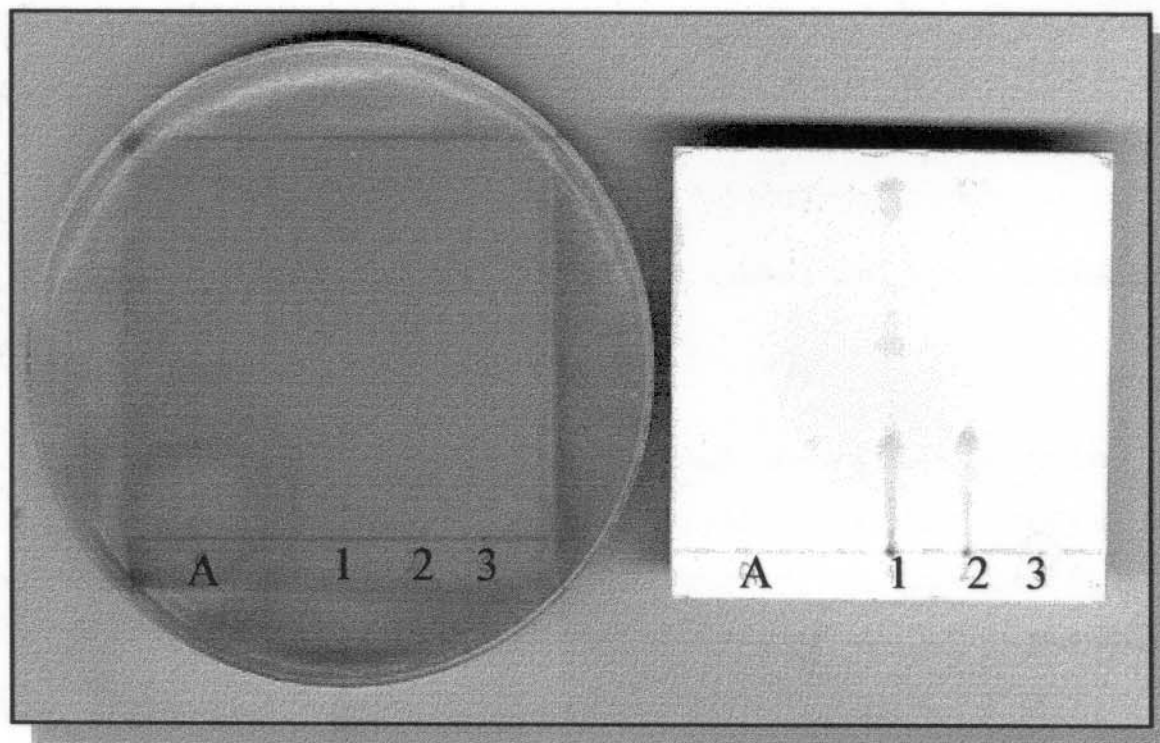
<sup>a</sup> CCT 0089 (gram +), <sup>b</sup> CCT 4295 (gram +), <sup>c</sup> CCT 0528, <sup>d</sup> CCT 2720, <sup>e</sup> CCT 1435, <sup>f</sup> CCT 0490, <sup>g</sup> CCT 3244, <sup>h</sup> CCT 1250, <sup>i</sup> CCT 4964, <sup>j</sup> CCT 01277, <sup>k</sup> CCT 0279, <sup>m</sup> CCT 0776.

*Lonchocarpus atropurpureus*: 1 (Ext. Éter de Petróleo), 2 (Ext. Diclorometânico) e 3 (Ext. Metanólico); *Poecilanthe parviflora*: 1' (Ext. Éter de petróleo), 2' (Ext. Diclorometânico) e 3' (Ext. Metanólico).

Tabela 2: Resultados obtidos para os extratos de *L. atropurpureus* com o ensaio com *Artemia salina*

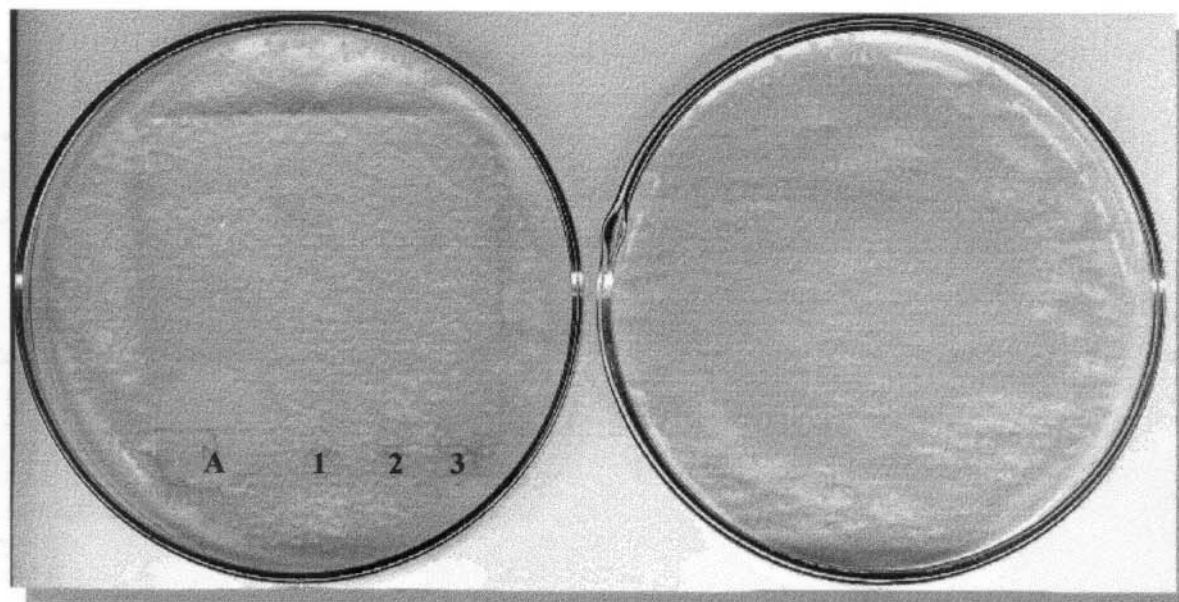
Extrato	ED <sub>50</sub> (µg/mL)	
Éter de Petróleo	3,27	ativo
Diclorometânico	8,05	ativo
Metanólico	> 421 000	inativo
8	10,60	ativo
9	42,96	ativo

<sup>11</sup> McLAUGHLIN, J.L. *apud* NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* - Isolamento, identificação, determinação estrutural, testes biológicos e análise sazonal - Campinas, 1998, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.



**Figura 2: Bioautografia**

Extratos éter de petróleo (1), diclorometânico (2) e metanólico (3) (1ª. extração) de *Poecilanthus parviflorus*; Microrganismo: *Staphylococcus aureus*; Antibiótico: Cloranfenicol (A); Observar halo de inibição sobre o antibiótico.



**Figura 3: Bioautografia**

Extratos éter de petróleo (1), diclorometânico (2) e metanólico (3) (1ª. extração) de *Lonchocarpus atropurpureus*; Microrganismo: *Candida albicans*; Antibiótico: Ciclopirox olamina (A); Observar halo de inibição sobre o antibiótico.



Estes resultados com *Artemia salina* indicam uma possível atividade citotóxica dos flavanonóis inéditos, o que motivou a realização dos testes seguintes.

### 3. 3. Efeitos de Flavonóides nas Etapas Iniciais da Ação Insulínica e Immunoblotting:

A insulina tem um papel central na regulação de glicemia e age de uma maneira coordenada no metabolismo lipídico e proteico; age a nível celular através de seu receptor transmembrana que tem atividade tirosina proteína quinase. Em células de culturas e no animal intacto, a ativação do receptor de insulina (IR) leva a uma subsequente fosforilação dos resíduos tirosina de uma proteína citoplasmática com PM aparente de 160 a 185 KDa denominado IRS-1; esta atividade tirosina proteína quinase é fundamental para os efeitos biológicos finais da insulina<sup>12</sup>. A importância da atividade das enzimas tirosina proteína quinases na regulação do crescimento celular fez com que elas se tornassem importante alvo na descoberta e desenvolvimento de inibidores específicos que serviriam tanto como potentes agentes quimioterápicos quanto como ferramentas farmacológicas nos estudos do mecanismo de ação das tirosina quinases<sup>13</sup>. Algumas classes de flavonóides, como por exemplo flavonas, são potentes inibidores de tirosina proteína quinase<sup>14</sup> enquanto outras, como as flavanonas, têm a capacidade de estimular estas enzimas<sup>15</sup>. Os resultados obtidos (auto-radiografia, Fig. 4) revelam um aumento na fosforilação dos resíduos tirosina de IRS-1 após injeção do composto 8; isto pode estar correlacionado com

<sup>12</sup> CARVALHO, C.R.O.; BRENELLI, S.L.; SILVA, A.C.; NUNES, A.L.B.; VELLOSO, L.A. and SAAD, M.J.A. Effects of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrine* 137 (1): 151-159, 1996.

<sup>13</sup> GEAHLEN, R.L.; KOONCHANOK, N.M. and MCLAUGHLIN, J.L. Inhibition of protein-tyrosine kinase activity by flavonoids and related compounds. *Journal of Natural Products* 52 (5): 982-986, 1989.

<sup>14</sup> AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; RÉMÉSY, C.; CHAP, H. and PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology* 53: 1649-1657, 1997.

<sup>15</sup> MIDDLETON JR, E. and KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer in HARBONE, J.B. The flavonoids - Advances in research since 1986. 1<sup>th</sup> Edition, Chapman & Hall, chapter 15, page 621, 1996.

uma possível atividade potencializadora da insulina, isto é, o composto poderia aumentar o efeito da insulina em ratos.

### 3. 4. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*:

A substância testada (8) mostrou-se inativa frente a três linhagem de células de câncer humanos (fig. 5) e a curva dose/resposta para as concentrações testadas mostra a inexistência de efeito antitumoral nas condições empregadas no teste (fig. 6).

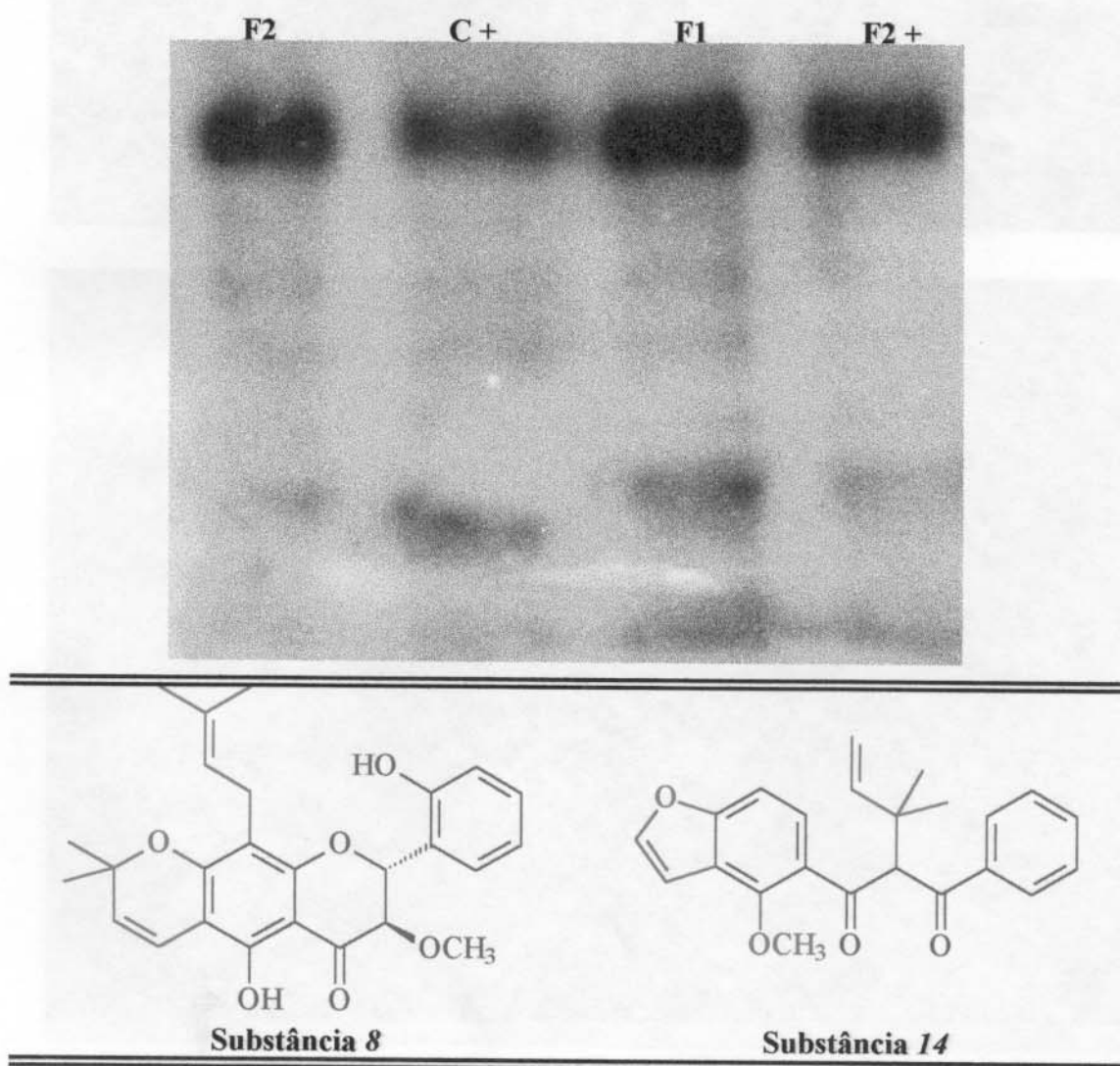
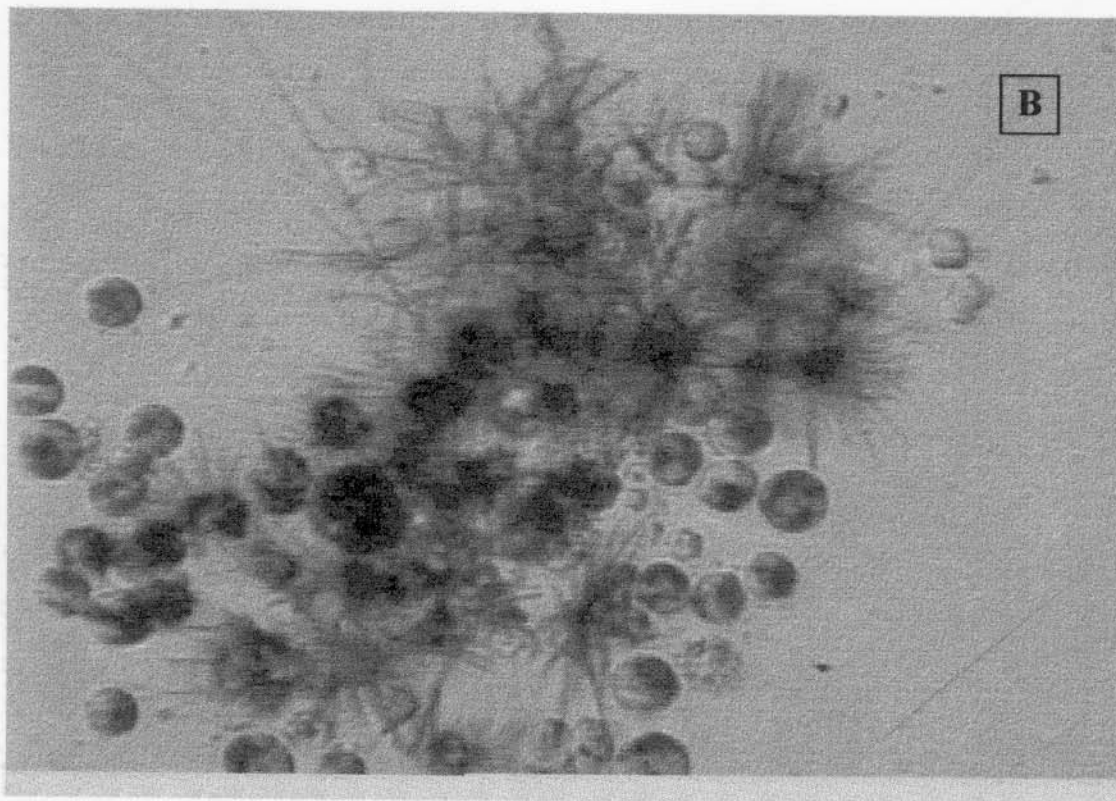
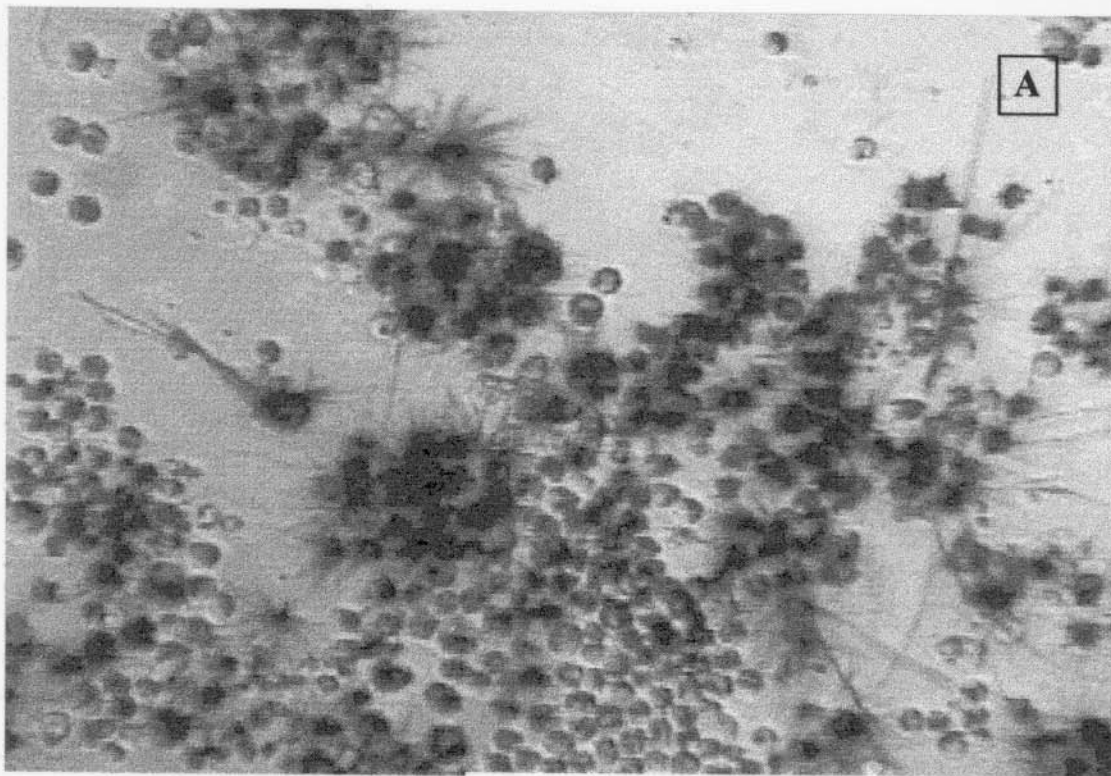


Figura 4: Immunoblotting (autoradiografia):

F2 e F2 +: Fragmentos de fígado tratado com derivado de dibenzoilmetano 14 após injeção de insulina; C +: Fígado controle após injeção de insulina; F1: Fígado tratado com flavanonol 8 após da injeção de insulina.

Notar o aumento de intensidade da mancha indicando aumento na fosforilação dos resíduos tirosina quando o animal tratado com o flavanonol 8 recebeu a injeção de insulina.



**Figura 5:** Teste de Citotoxicidade *in vitro*

A: Teste em Branco; B: Teste com o flavanonol 8.

Notar a grande semelhança entre os testes e a grande presença de cristais de formazan indicando ausência de atividade citotóxica. Células de câncer de colon (WiDR)

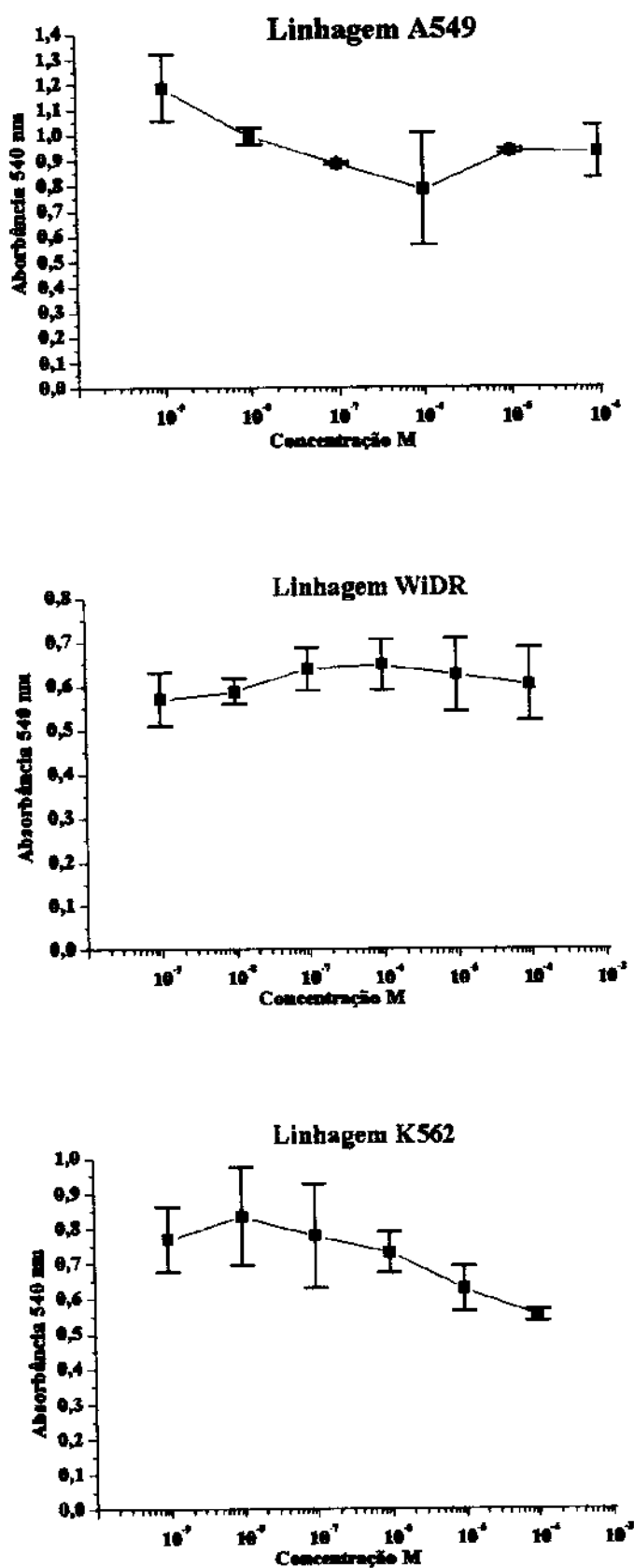


Figura 6: Curva dose versus resposta do bioensaio de Citotoxicidade *in vitro*.

## Considerações Finais:

### 1. *Poecilanthe parviflora*:

Como exposto na Introdução Geral (pag. 3) os resultados fitoquímicos levantados nesta dissertação reforçam as investigações botânicas no sentido de colocar o gênero *Poecilanthe* isolado dos gêneros *Deguelia*, *Pongamia*, *Tephrosia* e *Lonchocarpus* dentro da tribo *Milletia*, uma vez que *Poecilanthe parviflora* não contém flavonóides como os outros gêneros.

O ensaio de bioautografia demonstrou que os extratos de *P. parviflora* não apresentam atividade antifúngica e/ou atividade antibacteriana nas condições empregadas.

### 2. *Lonchocarpus atropurpureus*:

Os resultados obtidos acrescentaram novos dados fitoquímicos auxiliando assim na comprovação da tese botânica de que as espécies pertencentes ao subg. *Lonchocarpus* são menos evoluídas que as pertencentes ao subg. *Punctatii*; isso foi prontamente observado através do gráfico de grau de oxidação versus grau de metilação dos metabólitos isolados dessas espécies, proposto por GOTTLIEB<sup>1</sup> (Fig. 1). Neste gráfico foi igualmente interessante verificar a distribuição das espécies do subg. *Lonchocarpus* seção *Lonchocarpus* (*L. atropurpureus*, *L. campestri* e *L. guilleminiana*).

Dos cinco flavonóides isolados do EPLA, minimiflorina (7) e os flavanóis inéditos 8 e 9 apresentam um grupo hidroxila em C-2' (anel B), um padrão de oxidação do anel B bastante incomum entre os flavonóides naturais. A análise quantitativa por CLAE de quatro, dos cinco flavonóides isolados, demonstrou que o flavanonol 8 inédito é majoritário no extrato éter de petróleo das raízes de *L. atropurpureus*.

A observação da presença de nódulos de fixação de nitrogênio é uma evidência do papel ecológico para os flavonóides isolados de *L. atropurpureus* pois eles es-

---

<sup>1</sup> GOTTLIEB, O. R. *Micromolecular Evolution, Systematic and Ecology*. Springer-Verlog, Berlin, Germany, Cap. 14, 1982.

tão ausente quando a raiz não apresenta essa simbiose e, segundo a literatura, as flavanonas são importantes indutores dos genes de nodulação presentes nas bactérias do gênero *Rhizobium*.

Os ensaios de bioautografia mostraram que os extratos de *L. atropurpureus* não apresentam atividade contra os fungos testados, enquanto que o ensaio de toxicidade com *Artemia salina* demonstrou potencial efeito tóxico dos extratos e dos flavanonóis inéditos 8 e 9. Através do ensaio de citotoxicidade *in vitro* concluiu-se que, frente as três linhagens de células de cancer testadas, o flavanonol 8 não apresenta atividade citotóxica. Uma provável atividade de potencializar o efeito da insulina foi observada para este mesmo flavanonol (majoritário e inédito) no modelo *in vivo* que permite estudar as etapas iniciais da ação insulínica.

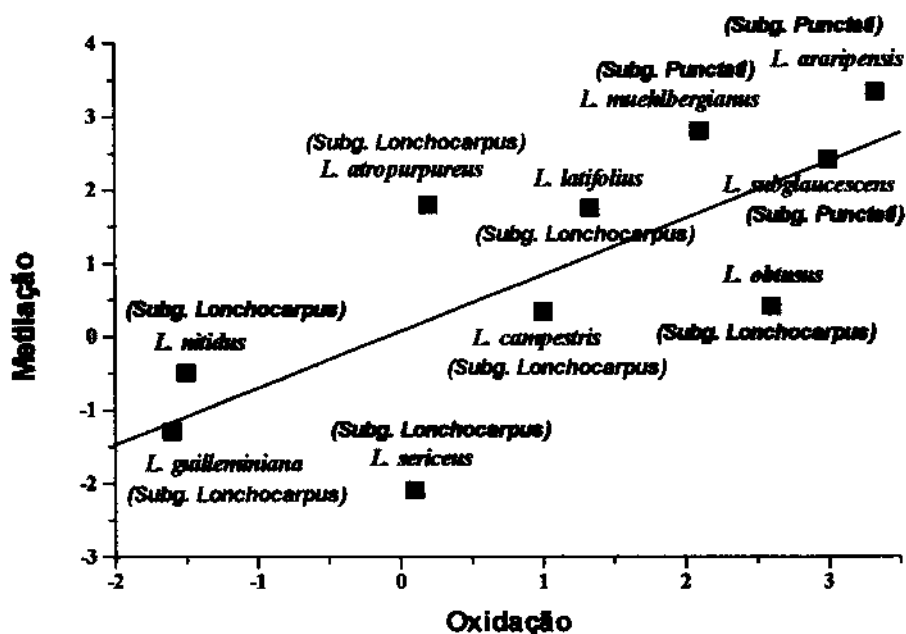


Figura 1: Gráfico mostrando os valores médios de oxidação/metilação de algumas espécies do gênero *Lonchocarpus*.

As espécies escritas em vermelho são aquelas já estudadas em nosso grupo de pesquisa<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> NOGUEIRA, M.A. Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus atropurpureus* (Wild) DC - Isolamento, determinação estrutural, análise sazonal e atividade biológica. Campinas, 1998, Tese Doutor em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.