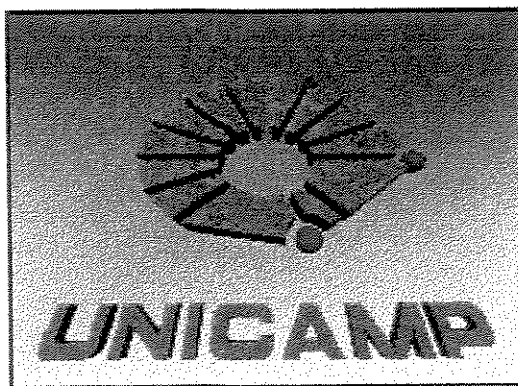




UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Estudo Fitoquímico de Deguelia hatschbachii A.M. G.
Azevedo, Isolamento, Determinação Estrutural, Análise por
CLAE e Testes Biológicos*

Valéria Regina de Souza Moraes

Tese apresentada à Universidade
Estadual de Campinas, como parte das
exigências do Curso de Química
Orgânica para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Profa. Dra. Eva Gonçalves Magalhães
Orientadora

Agosto de 2000
UNICAMP

UNIDADE	30
N.º CHAMADA	T/ UNICAMP
	M791e
V.	Ex.
TOMBO BC	44800
PROC.	16-392/01
C	☐
D	☒
PRECOS	R\$ 11,00
DATA	2-10-01
N.º CPD	

CM00158315-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA

M791e

Moraes, Valéria Regina de Souza

Estudo fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo, isolamento, determinação estrutural, análise por CLAE e testes biológicos / Valéria Regina de Souza Moraes.-- Campinas, SP: [s.n], 2000.

Orientadora: Eva Gonçalves Magalhães.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Quimiossistemática 2. Leguminosae.
3. Flavonóides. I. Magalhães, Eva Gonçalves.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Agradecimentos Especiais

... Ao nosso 'Pai Maior', pelo Dom da Vida e Saúde

... Aos meus queridos pais Edegar e Dirce, por todo amor e ensinamentos sábios

... Aos meus queridos irmãos Wladimir e Wânia

... À minha “sorella” Rita, pela carinhosa amizade

... Ao vovô Gallo e vovó “Lúcia”, com Amor

... Ao vovô Olegário (*in memorian*) e vovó Luzia (*in memorian*), com Amor

... Às minhas tias, Magdalena, Geraldina e Zélia, que como “mães” sempre estão por perto...

... À TODA minha FAMÍLIA, pelo amor e momentos de descontração

Ao Paulo, pelo amor e ensinamentos

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudo.

À Prof.^a Dr.^a Eva Gonçalves Magalhães pela dedicação nos ensinamentos e na orientação deste trabalho e, principalmente pelo carinho e amizade.

À Profa. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi pela sua amizade, colaboração na parte botânica e seu carinhoso interesse neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães pela ajuda e amizade.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial as técnicas do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Paula Pilli, Sônia Crisóstomo e Sônia Fanelli pelos excelentes trabalhos.

Às amigas Ivani Blanco, Valéria Bittencourt, Daniela Y. Ogata e Eliani pela amizade e bons momentos.

Aos colegas de grupo Alexandre, Anne, Carlos, Celira, Fernanda, Lourdes, Luiz Marcos, Maria del Pilar, Marisa, Mary Angela, Míriam e Rogers pelo ótimo convívio; e em especial a Ana Lúcia e Giordano pelas valiosas colaborações que enriqueceram este trabalho.

Aos amigos André, Bira, Catarina, Cecília, Clarinha, Cláudio, Denise Rodrigues, Domingos, Elaine, Gelson, Inês, Laverde, Luiz Antônio, Mariza, Péricles, Regina, Renato, Rosana, Samísia e Zeca pela **amizade** dentro e fora da UNICAMP; e aos novos amigos Beatriz, Ricardo e Sérgio.

À pequena grande família Conceição, Jair e Guilherme, por tudo o que ainda iremos realizar....

Em especial, aos amigos André Jorge, Carlinha, Cristina, Marcelo, Marystela, Maira, Rosângela, Rose e Sílvia, pelo constante carinho, apoio e amizade que nem a distância conseguiram destruir. Obrigada !!!

Aos meus queridos primos Juliana e Sérgio pelo constante carinho e momentos de descontração.

Às Famílias **Bruni e Placco Queiroz** (com carinho !!), representadas pelas amigas Aline e Denise, que formam a minha “**Família Campineira**” e à Luciana Sabino pela amizade e inúmeras ajudas.

Aos Professores e Amigos (em especial a Lis Olmo) do grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar, pelos primeiros e preciosos ensinamentos durante a minha Graduação.

Aos dedicados funcionários da CPG, em especial à Bel, André, Denise e Celi.

À D. Maria pelo seu ótimo apoio técnico e pela amizade.

Resumo

**Estudo Fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo-
Isolamento, Determinação Estrutural, Análise por CLAE e Testes Biológicos.**

Valéria Regina de Souza Moraes, Eva Gonçalves Magalhães.

Palavras Chaves: Flavonóides, Quimiossistemática, CLAE, Testes Biológicos (toxicidade e bioautografia)

O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico das raízes de *Deguelia hatschbachii* permitiu o isolamento de dez flavonóides, dos quais escandenina (**1**), ácido robústico (**2**), robustato de metila (**3**), 4',5- diidroxi-6-(3,3-dimetilalila)-7-metoxi flavanona (**4**), lupinifolina (**5**), osajina (**6**) e escandinona (**7**) correspondem aos sete que já foram anteriormente isolados de outras fontes, três inéditos 3- (4'-hidroxifenil) - 5- metoxi - 6 - (3,3-dimetilalila) - 2",2"-dimetilcromeno -(5",6":8,7)-3-(propil-2-ona)- 4H-1-benzo-2,3-diidropiran- 2,4- diona (**8**); 6,4'- diidroxi- 3- (3,3-dimetilalila) -2",2"- dimetilcromeno (5",6":5,4) -2- metoxi desoxibenzoína (**9**) e 6,4'- diidroxi- 3- (3,3-dimetilalila)- 2",2"-dimetilcromeno (5",6":5,4) -2- metoxi-8- (propil-2-ona) desoxibenzoína (**12**), além de dois novos derivados de estilbenos [6-(3,3-dimetilalila)-2",2"-dimetilcromeno (5",6":4,5)-4'-hidroxi-3-metoxi estilbeno (**10**) e 3',5'-dimetoxi-4-hidroxi-4'-(3,3-dimetilalila) estilbeno (**11**)]. Analogamente do extrato éter de petróleo foram isolados os estilbenos (**10** e **11**), as duas flavanonas (**4** e **5**) e o triterpeno Lupeol (**13**). As estruturas moleculares das substâncias inéditas (**8-12**) foram determinadas através da análise detalhada dos dados espectrais de UV, IV, EM (Baixa e Alta Resolução e experimentos de EM/EM), RMN (¹H, ¹³C, DEPT, diferença de NOE e técnicas bidimensionais com correlações Homonucleares e Heteronucleares a uma ou a várias ligações), enquanto as substâncias conhecidas foram identificadas pela comparação com dados publicados. Com exceção de osajina (**6**), para as demais substâncias conhecidas (**1-5** e **7**) este trabalho acrescenta dados espectroscópicos ainda não relatados na literatura. A análise por CLAE permitiu a quantificação de quatro flavonóides (**1**, **4**, **5** e **8**) no extrato diclorometânico e dois (**4** e **5**) no extrato éter

de petróleo, além de identificar as substâncias inéditas (**8** e **9**) no extrato diclorometânico confirmando tratarem-se de substâncias naturais e não artefatos. Escandenina (**1**) e lupinifolina (**5**) são as substâncias mais abundantes. Os extratos (éter de petróleo, diclorometânico e metanólico) das raízes de *D. hatschbachii* e algumas substâncias isoladas (**1**, **4** e **5**) deram resultado positivo no teste de Letalidade com *Artemia salina*. Tanto os extratos como as substâncias **1**, **4**, **5**, **8** e **9** foram submetidos ao teste de bioautografia contra 6 bactérias (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus* e *Rodococcus equi*) e 9 fungos (*Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium oxalicum* e *Candida albicans*), mostrando que o extrato diclorometânico e a substância **1** são ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, enquanto as substâncias **4**, **5** e **11** contra *Bacillus subtilis*. O extrato metanólico mostrou atividade fungicida contra *Cladosporium cladosporioides*.

A reação da escandenina (**1**) com iodeto de metila em meio básico (hidróxido de lítio em tetrahidrofurano) forneceu uma mistura complexa que foi analisada por CG/EM, permitindo detectar o derivado metilado na posição C-3, cujo padrão de fragmentação no espectrômetro de massas é inteiramente análogo ao da substância (**8**), fornecendo mais uma evidência em favor da estrutura proposta.

A predominância de 4-hidroxi-3-fenilcumarinas (1-3, 8) em *Deguelia hatschbachii* corrobora a sua inclusão na seção *Multiovulis* sendo, portanto mais um exemplo do uso do perfil flavonoídico para complementar dados morfológicos em estudos de taxonomia e filogenia das espécies vegetais.

Abstract

Phytochemistry of *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo- Isolation, Structural Determination, HPLC analysis and Biological Activity.

Valéria Regina de Souza Moraes, Eva Gonçalves Magalhães.

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

Chromatography analysis of dichloromethane extract from *Deguelia hatschbachii* roots allowed the isolation of ten flavonoids (1-9 and 12) and two stilbenes derivatives (10 and 11). Scandenin (**1**), robustic acid (**2**), methyl robustate (**3**), 4',5- dihydroxy-6-(3,3-dimethylallyl)-7-methoxy flavanone (**4**), lupinifolin (**5**), osajin (**6**) and scandinone (**7**) had been previously isolated from other sources while 3- (4'-hydroxyphenyl) - 5- methoxy - 6 - (3,3-dimethylallyl) - 2'',2''-dimethylchromene -(5'',6'':8,7)-3-(propyl-2-one)- 4H-1-benzo-2,3-dihydropyran-2,4- dione (**8**); 6,4'- dihydroxy- 3- (3,3-dimethylallyl) -2'',2''- dimethylchromene (5'',6'':5,4) -2- methoxy deoxybenzoin (**9**); 6-(3,3-dimethylallyl)-2'',2''-dimethylchromene (5'',6'':4,5)-4'-hydroxy-3-methoxy stilbene (**10**); 3',5'-dimethoxy-4-hydroxy-4'-(3,3-dimethylallyl) stilbene (**11**) and 6,4'-dihydroxy-3-(3,3-dimethylallyl)- 2'',2''- dimethylchromene (5'',6'':5,4)- 2-methoxy-8-(propyl-2-one) deoxybenzoin (**12**) are new compounds. Analogously the light petroleum extract furnished the pentacyclic triterpene Lupeol (**13**) besides the flavanones **4** and **5** and the stilbenes **10** and **11** which have been also isolated from the dichloromethane extract. The molecular structures of the new compounds (**8-12**) were determined by the analysis of the respective spectral data (UV, IR, EIMS, HREIMS, MS/MS and 1D- and 2D-NMR experiments) while the known ones were identified by comparison of their spectral data with those published. It's important to mention that some new spectral data of known compounds (**1-5** and **7**) are now given for the first time.

Quantitative analysis of dichloromethane and light petroleum extracts of *Deguelia hatschbachii* roots by using HPLC reversed phase showed that scandenin (**1**) and lupinifolin (**5**) are the most abundant flavonoids. The roots's

extracts (petrol, dichloromethane and methanol) and some compounds of *D. hatschbachii* were tested against nine fungi (*Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium oxalicum* and *Candida albicans*) and six bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus* and *Rodococcus equi*) through the bioautography method. The methanol extract showed fungicide activity against *Cladosporium cladosporioides*. Scandenin (**1**) was active against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, while stilbene **11** and flavanones **4** and **5** were active only against *Bacillus subtilis*. All the extracts of *D. hatschbachii* roots mentioned above as well as flavonoids **1**, **4** and **5** showed activity in the *Artemia salina* Lethality bioassay.

The reaction of scanenin (**1**) with methyl iodide in the presence of lithium hydroxide and tetrahydrofuran furnished a complex mixture which was analyzed by GC/MS, allowing the detection of the methylated derivative on C-3, following the same fragmentation pathway observed for compound (**8**), supporting its molecular structure determination.

The occurrence of 4-hydroxy-3-phenylcoumarins in *Deguelia hatschbachii* reinforces its inclusion in *Deguelia* sect. *Multiouvulis*. These data came to support the use of flavonoids characters in studies of taxonomy.

Curriculum Vitæ

1. Graduação:

Curso de Bacharelado em Química pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

2. Pós-Graduação:

Doutorado em Química Orgânica pela Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP.

3. Trabalhos em Congressos

3.1 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* (Leguminosae- Papilionoideae- Millettieae). Livro de Resumos da XVII Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. Academia Brasileira de Ciências, 26 a 28 de abril de 1995.

3.2 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Estudo Fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* (Leguminosae- Papilionoideae- Millettieae). Livro de Resumos da XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG, de 27 a 30 de maio de 1996.

3.3 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Nova 3-fenil cumarina C-alquilada das raízes de *Deguelia hatschbachii* (Leguminosae- Papilionoideae- Millettieae). Livro de Resumos da XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG, de 27 a 30 de maio de 1996.

3.4 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Novos Flavonóides de *Deguelia hatschbachii* (Az- Tozzi sp. nov). Livro de Resumos da XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG, de 24 a 27 de maio de 1997.

3.5 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Isolamento do Lupeol e atividade antimicrobiana dos flavonóides de *Deguelia hatschbachii* (Az-Tozzi sp. nov.). Livro de Resumos da XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG, de 25 a 28 de maio de 1998.

3.6 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Flavonóides de *Deguelia hatschbachii* Az- Tozzi e suas correlações quimiotaxonômicas. Livro de Resumos da XX Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares , Fiocruz- RJ, de 19 a 21 de agosto de 1998.

3.7 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Alquilação da escandenina e Análise Qualitativa por CLAE dos flavonóides de *Deguelia hatschbachii* Az- Tozzi. Livro

de Resumos da XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG, de 25 a 28 de maio de 1999. (Painel Premiado)

3.8 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Uma revisão do Gênero *Deguelia*, Sistemática e Fitoquímica. Livro de Resumos da XXI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, de 23 a 25 de agosto de 1999. (Apresentação oral)

3.9 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Novo derivado de desoxibenzoína das raízes de *D. hatschbachii* Az- Tozzi, Livro de Resumos da III Reunião da Sociedade Latino-Americana de Fitoquímica, Gramado- RS, de 14 a 17 de setembro de 1999.

3.10 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Quantitative analysis of the flavonoids in extracts from *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo. Abstract Publication of the 22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products, São Carlos-SP, de 3 a 8 de setembro de 2000.

3.11 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; **Moraes, V.R.S.** Synthetic analog of a new deoxybenzoin derivative from *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo. Abstract Publication of the 22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products, São Carlos-SP, de 3 a 8 de setembro de 2000.

4. Artigo publicado:

4.1 Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G. e Moraes, V. R. S. Prenylated flavonoids from *D. hatschbachii* A. M. G. Azevedo and their systematic significance in *Deguelia*, *Phytochemistry* (in press).

5. Cursos:

5.1 XV Escola de Verão em Química Orgânica no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos no período de 6 a 17 de fevereiro de 1995, frequentando os cursos: "Tópicos em RMN de Alta Resolução" (20 hs); "Modern Methods on Chromatography Separations" (20 hs); "Comunicação Química entre os Insetos" (20 hs); "Biotecnologia: Produção de Metabólitos Secundários em Plantas" (20 hs).

5.2 UFSCar- Ciclo de Seminários do Programa de Pós- Graduação no período de 23 a 27 de março de 1998.

" Biodiversidade: um enfoque Químico- Biológico" (12,5 hs).

Ministrado por: Dr. Otto R. Gottlieb e Dra. Maria Renata de M. B. Borin.

“When you have excluded the impossible whatever remains however
improbable, must be the truth.”

Sherlock Holmes

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e
infantil- e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

Índice

	Páginas
Lista de Abreviaturas.....	xxxiii
Lista de Figuras.....	xxdii
Lista de Fluxogramas.....	xxv
Lista de Quadros.....	xxvii
Lista de Tabelas.....	xxix
Capítulo I- Estudo fitoquímico de <i>Deguelia hatschbachii</i>	xxxv
1. Introdução	1
1.1 Descrição morfológica da planta em estudo	11
2. A Família Leguminosae	13
3. Os flavonóides	13
4. Objetivos deste trabalho	19
5. Parte experimental	20
5.1 Materiais e Métodos	20
5.2 Estudo Fitoquímico	22
5.2.1 Coleta do material vegetal	22
5.2.2 Obtenção dos extratos	22
5.2.3 Estudo do extrato diclorometânico	23
5.2.4 Estudo do extrato éter de petróleo	39
5.2.5 Segundo estudo do extrato diclorometânico	46
5.3 Alquilação da escandenina (1)	55
5.4 Hidrólise da escandenina (1)	55
5.5 Reação de Gibbs	56
5.6 Acetilação da lupinifolina (5) e osajina (6)	56
6. Resultados e Discussão	58
6.1 4-hidroxi-3-fenil cumarinas	60
6.1a Escandenina (1)	64
6.1b Ácido Robústico (2)	68
6.1c Robustato de metila (3)	72
6.1d Novo derivado da escandenina (1) alquilada no carbono C-3 (8)	76

	Páginas
Apêndice A- Tabelas das 4-hidroxi-3-fenil cumarinas (1-3, 8 e 20)	97
6.2 Flavanonas	104
6.2a Flavanona (4)	106
6.2b Lupinifolina (5)	114
Apêndice B- Tabelas das flavanonas (4 e 5)	118
6.3 Isoflavonas	123
6.3a Osajina (6)	124
6.3b Escandinona (7)	128
Apêndice C- Tabelas das isoflavonas (6 e 7)	132
6.4 Derivados de desoxibenzoínas	134
6.4a Desoxibenzoína (9)	135
6.4b Desoxibenzoína alquilada no carbono C-8 (12)	140
Apêndice D- Tabelas das desoxibenzoínas (9 e 12)	146
6.5 Estilbenos	149
6.5a Estilbeno (10)	150
6.5b Estilbeno (11)	157
Apêndice E- Tabelas dos estilbenos (10 e 11)	160
6.6 Triterpenos	163
6.6a Lupeol (13)	163
Apêndice F- Tabela do Lupeol (13)	166
Capítulo II- Análise por CLAE	167
1. Introdução	169
2. Materiais e Métodos	170
2.1 Análise Qualitativa	171
2.1.1 Seleção da fase móvel	172
2.1.2 Seleção do comprimento de onda	172
2.2 Análise Quantitativa	173
2.2.1 Preparação das soluções padrões	173
2.2.2 Construção das curvas analíticas	173
3. Resultados e Discussão	178
3.1 Análise Qualitativa	178
3.2 Análise Quantitativa	182

	Páginas
Capítulo III- Testes Biológicos.....	183
1. Introdução	185
2. Material e Métodos	189
2.1 Bioensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> ("Brine shrimp lethality Test").....	189
2.2 Teste para atividade bactericida e fungicida (Bioautografia)	190
3. Resultados e Discussão	193
3.1 Bioensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> ("Brine shrimp lethality Test")	193
3.2 Teste para atividade bactericida e fungicida (Bioautografia)	194
Capítulo IV- Considerações Finais.....	197
1. Considerações Finais	199
Anexo A- Espectros.....	203

Lista de Figuras

	Páginas
1- Inflorescências dos gêneros <i>Lonchocarpus</i> e <i>Deguelia</i>	3
2- Área de ocorrência do gênero <i>Deguelia</i>	9
3- Foto do espécime estudado e detalhes de sua inflorescência	10
4- <i>Deguelia hatschbachii</i> A. M. G. Azevedo: a. ramo; b. inflorescência (HATSCHBACH 31393 & AHUMADA); c. botão floral; d. flor; e. cálice; f. estandarte; g. asas; h. quilha; i. androceu; j. gineceu (H. C. de Lima 272).....	12
5- Frações reunidas da coluna de G-1 à G-21	41
6- Frações reunidas da coluna de G-22 à G-44	42
7- Frações reunidas da coluna de G-45 à G-77	42
8- Placas analíticas de algumas frações interessantes da coluna do extrato éter de petróleo, comparadas com substâncias já isoladas do extrato diclorometânico.....	43
9- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico.....	50
10- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico.....	51
11- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico.....	52
12- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico.....	53
13- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico.....	54
14- Experimento de RMN bidimensional HETCOR (expansão) do composto 8	82
15- Experimento DEPT (135°) do composto 8	82
16- Cromatograma da mistura de produtos obtido da reação de alquilação da escandenina (1)	86
17- Espectro de massas do pico com 18,909 min.....	87
18- Espectro de massas do pico com 20,404 min.....	88
19- Espectro de massas do pico com 23,860 min.....	89
20- Espectro de massas do pico com 25,074 min.....	92

21- A: Placa Cromatográfica analítica obtida através da revelação com anisaldeído (Flav: Flavanona 4; Lupi: Lupinifolina 5); B: Placa Cromatográfica analítica obtida através do Teste de Gibbs. (1: Flavanona (4), 2: Mistura de Flavanona (4) com Lupinifolina (5), 3: Lupinifolina (5), 4: Flavanona (4)).....	110
22- Espectro de CD para a flavanona (4)	113
23- Placa de CCDA das flavanonas 4 e 5 e da desoxibenzoína 12	144
24- Curvas de calibração pelo método de regressão linear dos flavonóides 1, 2, 4, 5 e 7 para o extrato diclorometânico	177
25- Curvas de calibração pelo método de regressão linear das flavanonas 4 e 5 para o extrato éter de petróleo	178
26- Cromatograma do extrato diclorometânico das raízes de <i>D. hatschbachii</i> . 1: Escandenina, 2: Ácido Robústico, 3: Robustato de metila, 4: Flavanona, 5: Lupinifolina, 7: Escandinona, 8: Derivado de 4-OH-3-fenil cumarina, 9: Desoxibenzoína. Condições utilizadas: Coluna HP Nova-Pack, 3 µm, fase móvel: gradiente 80: 20 (H ₂ O: CH ₃ CN)- 100 (CH ₃ CN) em 45 min., fluxo: 0,8 mL/min.....	179
27- Cromatograma da flavanona (λ= 230 nm) e seu respectivo espectro no UV Condições utilizadas: Coluna HP Nova-Pack, 3 µm, fase móvel: gradiente 80: 20 (H ₂ O: CH ₃ CN)- 100 (CH ₃ CN) em 45 min., fluxo: 0,8 mL/min	180
28- A: Cromatograma do extrato diclorometânico (λ= 230 nm), B: Cromatograma da co-injeção da flavanona (4) no extrato diclorometânico (λ=230 nm) Condições utilizadas: Coluna HP Nova-Pack, 3 µm, fase móvel: gradiente 80: 20 (H ₂ O: CH ₃ CN)- 100 (CH ₃ CN) em 45 min., fluxo: 0,8 mL/min	180
29- Cromatogramas dos extratos diclorometânico (λ= 260 nm) e éter de petróleo (λ= 230 nm). Condições utilizadas: Coluna HP Nova-Pack, 3 µm, fase móvel: gradiente 80: 20 (H ₂ O: CH ₃ CN)- 100 (CH ₃ CN) em 45 min., fluxo: 0,8 mL/min	181
30- Placas, testemunha e do resultado do teste para <i>Bacillus subtilis</i> , contendo as substâncias escandenina (1), (8), a desoxibenzoína (9) e o antibiótico (A)	194
31- Placas, testemunha e do resultado do teste para <i>Cladosporium cladosporioides</i> , contendo o antibiótico (A) e os extratos éter de petróleo (EEP), diclorometânico (ED) e metanólico (EMe)	195

Lista de Fluxogramas

	Páginas
1- Extração em Soxhlet das raízes de <i>D. hatschbachii</i>	23
2- Sequência de purificações dos estilbenos (10 e 11)	25
3- Sequência de purificações da flavanona (4) e da lupinifolina (5)	27
4- Sequência de purificações do ácido robústico (2) e do robustato de metila (3).....	29
5- Sequência de purificações da osajina (6)	31
6- Sequência de purificações da desoxibenzoína (9)	32
7- Sequência de purificações de escandenina (1)	34
8- Sequência de purificações da fração 2G-17-3	35
9- Sequência de purificações da substância (8)	36
10- Sequência de purificações de escandinona (7)	38
11- Sequência de purificações do triterpeno lupeol (13)	43
12- Sequência de purificação da lupinifolina (5)	44
13- Sequência de purificação da flavanona (4)	44
14- Sequência de purificações dos estilbenos (10 e 11)	45
15- Etapas da Acetilação	57
16- Frações obtidas da CCP do produto da reação de alquilação	95
17- Procedimento para diluição da amostra no teste com <i>Artemia salina</i>	190

Lista de Quadros

	Páginas
1- Flavonóides isolados de espécies de <i>Deguelia</i> sect. <i>Multiovulis</i>	6
2- Flavonóides isolados de espécies de <i>Deguelia</i> sect. <i>Deguelia</i>	8
3- Biossíntese dos Flavonóides	15
4- Mecanismo da migração enzimática arila: intermediário espiro- dienona formado na substituição <i>ipso</i> , envolvendo a enzima P ₄₅₀ na forma do seu híbrido de ressonância eletrofílico Fe ^{III} O ⁺	16
5- Substâncias isoladas já conhecidas na literatura	58
6- Substâncias inéditas isoladas	59
7- Tautomerismo das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas	61
8- Formação de ponte de hidrogênio nas 5-metoxi- 4-hidroxi-3-fenilcumarina	61
9- Formação de ponte de hidrogênio nas 5-hidroxi- 2-hidroxi isoflavona	62
10- Formas tautoméricas das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas	63
11- Clivagem RDA do anel C das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas na sua forma β-dicetona (b).....	63
12- Proposta de fragmentação da escandenina (1) no espectrômetro de massas.....	67
13- Proposta de fragmentação do ácido robústico (2) no espectrômetro de massas.....	71
14- Tautomerismo das 4-OH-3-fenilcumarinas	74
15- Proposta de fragmentação do robustato de metila (3) no espectrômetro de massas	75
16- Possíveis rotâmeros para a ligação entre C-3 e C-11 da substância 8	81
17- Proposta de fragmentação do composto 8 no espectrômetro de massas	84
18- Proposta de biogênese da substância 8	85
19- Proposta de fragmentação do derivado de uma α-metil desoxibenzoína (16) no espectrômetro de massas	87
20- Proposta de fragmentação do derivado (17) no espectrômetro de massas	88
21- Proposta de fragmentação do derivado (18) no espectrômetro de massas	90
22- Proposta de fragmentação do derivado (8) no espectrômetro de massas	91
23- Proposta de fragmentação do derivado 4-metoxi escandenina (19) no espectrômetro de massas	93

	Páginas
24- Proposta de fragmentação do robustato de metila (3) no espectrômetro de massas	94
25- Proposta de rotas alternativas para explicar a formação dos principais produtos obtidos da reação de metilação da escandenina (1)	96
26- Caminhos de fragmentação para flavanonas	104
27- Proposta do mecanismo da reação de Gibbs com base nas referências	109
28- Proposta de fragmentação da flavanona (4) no espectrômetro de massas	112
29- Proposta de fragmentação da lupinifolina (5) no espectrômetro de massas	117
30- Proposta de fragmentação da osajina (6) no espectrômetro de massas	127
31- Proposta de fragmentação da escandinona (7) no espectrômetro de massas.....	131
32- Proposta biogenética para a desoxibenzoína (9)	137
33- Proposta de fragmentação da desoxibenzoína (9) no espectrômetro de massas....	139
34- Fragmentação esperada para a flavanona (12a) no espectrômetro de massas.....	141
35- Comparação dos dados de RMN ¹³ C do substituinte na substância (8) e (12).....	142
36- Proposta de fragmentação da desoxibenzoína (12) no espectrômetro de massas ..	143
37- Estruturas das desoxibenzoínas 12 (isolada) e 30 (modelo)	144
38- Proposta de biossíntese para os estilbenos	150
39- Proposta de fragmentação do estilbeno (10) no espectrômetro de massas.....	155
39a- Proposta de formação do íon de m/z 213 a partir do íon de m/z 333	156
39b- Proposta de formação do íon de m/z 107 a partir do íon molecular de m/z 376..	156
40- Proposta de fragmentação do estilbeno (11) no espectrômetro de massas.....	159
41- Triterpeno Lupeol isolado do extrato éter de petróleo	163
42- Proposta de fragmentação do Lupeol (13) no espectrômetro de massas	165
43- Estruturas dos rotenóides Deguelina de Rotenona	187
44- Estruturas da genisteína, daidzeína, coumestrol e biochanina A	188
45- Derivados de desoxibenzoínas encontrados na literatura.....	200
46- Derivados de 4-hidroxi-3-fenilcumarinas encontrados na literatura.....	200

Lista de Tabelas

	Páginas
1- Espécies do gênero <i>Deguelia</i> sect. <i>Multiovulis</i> e <i>Deguelia</i> sect. <i>Deguelia</i> e suas respectivas sinonímias	4
2- Revisão das espécies do gênero <i>Deguelia</i> , seção <i>Multiovulis</i>	5
3- Revisão das espécies do gênero <i>Deguelia</i> , seção <i>Deguelia</i>	7
4- Frações obtidas da coluna do extrato diclorometânico das raízes de <i>D. hatschbachii</i>	24
5- Frações obtidas da coluna do extrato éter de petróleo das raízes de <i>D. hatschbachii</i>	39
6- Frações obtidas da segunda coluna do extrato diclorometânico das raízes de <i>D. hatschbachii</i>	47
7- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da escandenina (1)	97
8- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do ácido robústico (2)	97
9- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do robustato de metila (3)	98
10- Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) da escandenina (1), do ácido robústico (2) e robustato de metila (3)	99
11- Correlações observadas nos espectros de HETCOR (C-H, 1J) e COLOC (C-H, nJ) (CDCl_3 , 7 Tesla) da escandenina (1)	100
12- Correlações observadas no espectro de COSY (H-H) para o robustato de metila (3).....	100
13- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 8	101
14- Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 8	102
15- Correlações observadas nos espectros de HETCOR (C-H, 1J) (CDCl_3 , 7 Tesla) e gHMBC (C-H, nJ) (CDCl_3 , 11 Tesla) do composto 8	103
16- Correlações observadas no espectro de COSY (H-H) para 8	103
17- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do derivado 20	103
18- Dados de deslocamento químico para H-3" e H-4" nos produtos acetilados.....	116
19- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da flavanona (4)	118
20- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da flavanona lupinifolina (5)	118
21- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) das flavanonas (4) e (5)	119

22- Correlações observadas nos espectros de HETCOR (C-H, 1J) e COLOC (C-H, nJ) (CDCl ₃ , 7 Tesla) da flavanona (4)	120
23- Correlações observadas no espectro de COSY para a flavanona (4)	120
24- Dados de RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) da flavanona lupinifolina bi-acetilada.....	121
25- Dados de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 75 MHz) da flavanona lupinifolina bi-acetilada.....	122
26- Dados de RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) para a isoflavona osajina (6)	132
27- Dados de RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) para a isoflavona escandinona (7)	132
28- Dados de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 75 MHz) para as isoflavonas (6 e 7)	133
29- Dados de RMN 1H e RMN ^{13}C dos compostos 12 e 30	145
30- Dados de RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) da desoxibenzoína (9)	146
31- Dados de RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) da desoxibenzoína (12)	147
32- Dados de RMN ^{13}C (75 e 125 MHz, CDCl ₃) das desoxibenzoínas (9 e 12).....	148
33- Dados de RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) do estilbeno (10)	160
34- Dados de RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) do estilbeno (11)	160
35- Dados de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 75MHz) dos estilbenos (10) e (11)	161
36- Correlações observadas no espectro de HETCOR (CDCl ₃ , 7 Tesla) para o estilbeno (10)	162
37- Correlações observadas no espectro COSY (H-H) do estilbeno (10)	162
38- Dados de RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) e de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 75 MHz) para o Lupeol (13).....	166
39- Valores utilizados para a construção das curvas analíticas dos cinco flavonóides isolados do extrato diclorometânico das raízes de <i>Deguelia hatschbachii</i>	174
40- Valores utilizados para a construção das curvas analíticas das duas flavanonas isoladas do extrato éter de petróleo das raízes de <i>Deguelia hatschbachii</i>	175
41- Equações da reta para os sete flavonóides quantificados no extrato diclorometânico de <i>D. hatschbachii</i>	175
42- Equações da reta para as duas flavanonas quantificados no extrato éter de petróleo de <i>D. hatschbachii</i>	176

	Páginas
43- Quantidade determinada das cinco substâncias no extrato diclorometânico.....	182
44- Quantidade determinada das duas flavanonas no extrato éter de petróleo.....	182
45- Valores obtidos de doses letais médias efetivas (DL ₅₀) dos extratos e dos compostos (1, 4 e 5) para o teste com <i>Artemia salina</i>	193
46- Resultados dos testes de bioautografia dos extratos e alguns compostos isolados das raízes de <i>D. hatschbachii</i>	196

Lista de Abreviaturas

$[\alpha]^{20}_D$ Rotação ótica específica a 20°C

Co Carbono não hydrogenado

CC Cromatografia em Coluna

CCDA Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCP Cromatografia em Camada Preparativa

CDCl₃ Clorofórmio deuterado

CG/EM Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CH₃CN acetonitrila

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COLOC Correlation spectroscopy via Long range Coupling (Correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono a várias ligações)

COSY Correlated Spectroscopy (Correlação homonuclear de hidrogênio e hidrogênio a várias ligações)

d dubleto

DC Dicroísmo Circular

dd duplo dubleto

DEPT Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Espectro de RMN ¹³C intensificado sem distorção por transferência de polarização)

DL₅₀ Dose Letal média efetiva

δ deslocamento químico em partes por milhão do hidrogênio e carbono

$\Delta\delta$ diferença de deslocamento químico

E- Espectro

ED Extrato diclorometânico

EEP Extrato Éter de petróleo

EM Espectro de massas

EM/EM Experimento de Espectro de Massas de Espectro de massas

EMAR Espectro de Massas de Alta Resolução

EMe Extrato Metanólico

eV elétron volts

HETCOR Heteronuclear Chemical Shift Correlation (Correlação Heteronuclear de hidrogênio e carbono a uma ligação)

HMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation [Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HxC) a várias ligações]

Hz Hertz

IV Espectrometria no Infravermelho

J Constante de Acoplamento

m multipeto

M⁺. Íon molecular

m/z Relação massa/carga

NOE Efeito Overhauser Nuclear

ppm partes por milhão

RMN ¹H Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C Ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN-2D Ressonância magnética nuclear bidimensional

RDA Retro Diels- Alder

s singleto

sl singleto largo

t tripleto

tl tripleto largo

t_R Tempo de retenção

UV Espectrometria no Ultravioleta

λ_{máx} Comprimento de onda máximo



Capítulo I

Estudo Fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo



1. INTRODUÇÃO

O gênero *Deguelia* foi descrito por Aublet em 1775, com a espécie *Deguelia scandens* Aubl., da Guiana Francesa. Sua história está intimamente relacionada com a de *Derris* Lour., gênero estabelecido em 1790, a partir de um exemplar asiático, e *Lonchocarpus* Kunth, estabelecido em 1825. Em 1860, *Deguelia* foi sinonimizado com *Derris* por Bentham.

As espécies de *Derris* e de *Lonchocarpus* apresentavam grande semelhança vegetativa e floral, sendo que apenas algumas características do fruto foram utilizadas como caracteres diagnósticos. Deste conceito decorreram problemas de identificação botânica e de posicionamento de novas espécies, principalmente no que se referia as espécies conhecidas como “*Derris* americanas”. Consequentemente, o posicionamento dos autores que se dedicaram ao estudo do complexo acima citado (ou parte dele) foi controvertido, sendo verificado na literatura que, enquanto alguns botânicos descreveram e/ou restabeleceram gêneros para o complexo, outros sinonimizaram parte deles. Assim, em 1942 Ducke transferiu as “*Derris* americanas” para *Lonchocarpus* subg. *Phacelanthus* (= *Lonchocarpus* sect. *Fasciculati*) e, Macbride, em 1943, considerando a grande similaridade entre estes gêneros e a grande dificuldade em diferenciá-los, os reuniu em um único gênero, *Derris*. No entanto, não houve um consenso entre os botânicos posteriores sobre este procedimento, de forma que *Lonchocarpus* e *Derris* continuaram sendo reconhecidos como gêneros distintos por vários autores.

O conceito do gênero *Derris* foi redefinido por Geesink, em 1984, numa visão mais restrita, onde os subgêneros de *Derris* (*Paraderris* e *Brachypterum*) foram elevados ao nível genérico e o gênero *Deguelia* foi reestabelecido, compreendendo as espécies conhecidas como “*Derris* americanas” mais as espécies de *Lonchocarpus* subg. *Phacelanthus*.

Deguelia, como definido atualmente, constitui-se em um agrupamento natural, que se diferencia de *Lonchocarpus* por suas flores fasciculadas, cinco ou mais agrupadas em braquiblastos constituindo pseudo-racemos e pelo hábito

trepador da maioria de suas espécies (Figura 1).

Em 1989, foi apresentado por Tozzi¹ um levantamento completo das espécies de *Lonchocarpus* e *Deguelia* que ocorrem no Brasil, considerando a análise de vários caracteres morfológicos, mas ressaltando a estrutura da inflorescência como sendo um ótimo caráter diagnóstico na identificação das espécies de cada gênero. Neste trabalho, foi detectada a ocorrência de 17 espécies brasileiras de *Deguelia*, das quais **três** ainda não haviam sido classificadas e foram então, denominadas: *D. hatschbachii* A. M. G. Azevedo, *D. glaucifolia* A. M. G. Azevedo e *D. duckeana* A. M. G. Azevedo.

Através deste estudo as 17 espécies de *Deguelia* também foram divididas em duas seções, *Deguelia* sect. *Multiovulis* A. M. G. Azevedo, com 5 espécies, e *Deguelia* sect. *Deguelia*, com 12 espécies (Tabela 1). Foi ainda proposto que o gênero *Deguelia* é mais evoluído do que *Lonchocarpus*.

¹ Tozzi, A. M. G. A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth. e *Deguelia* Aubl. no Brasil. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia- UNICAMP, Campinas-SP, 1989.

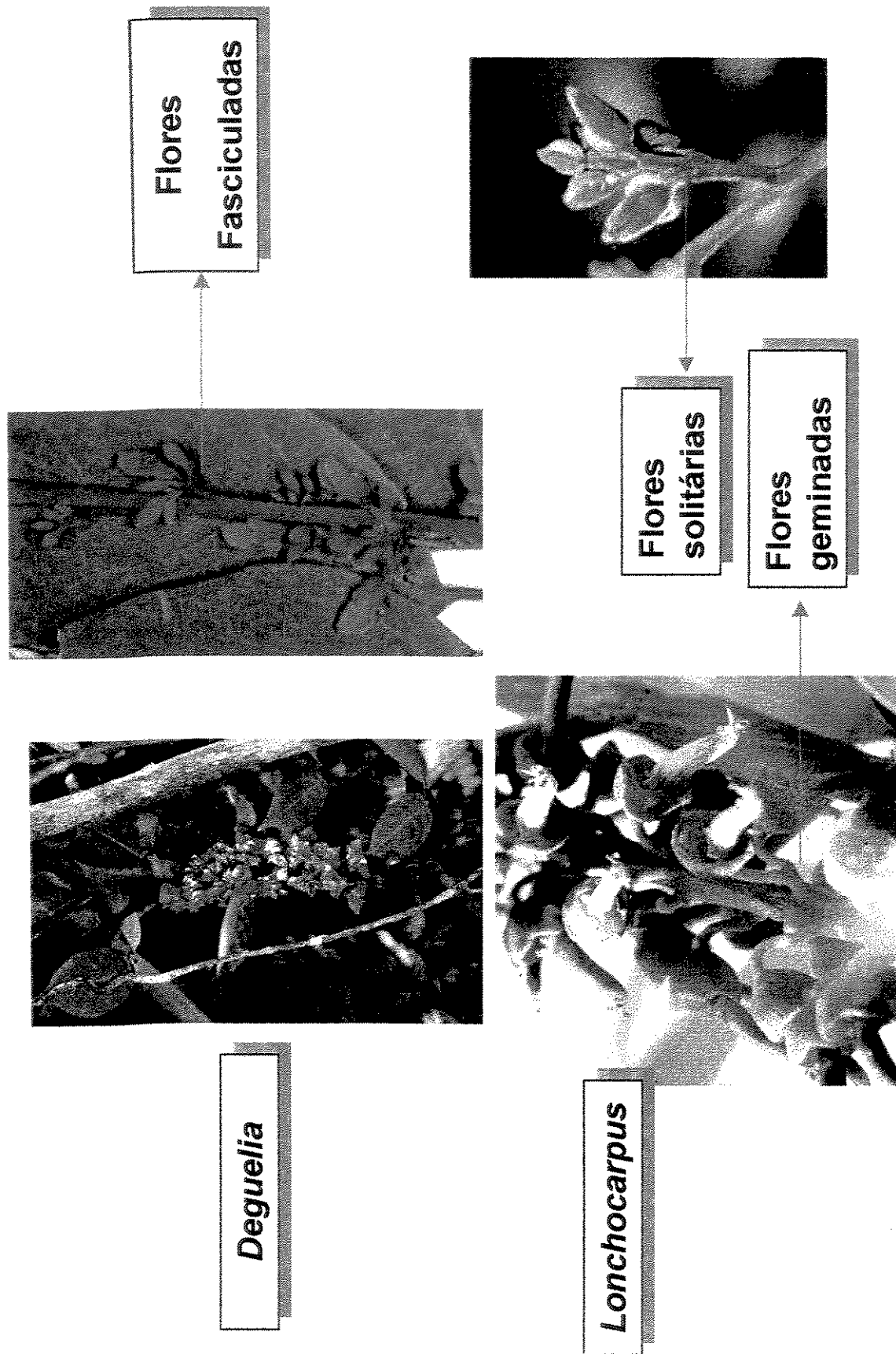


Figura 1 - Inflorescências dos gêneros *Lonchocarpus* e *Deguelia*.

Tabela 1- Espécies do gênero *Deguelia* sect. *Multiovulis* e *Deguelia* sect. *Deguelia* e suas respectivas sinônimas.

ESPÉCIES DE <i>DEGUELIA</i>	
SEÇÃO <i>MULTIOVULIS</i>	
ESPÉCIE	SINÓNIMA
<i>Deguelia spruceana</i>	<i>Derris spruceana</i> <i>Lonchocarpus spruceanus</i>
<i>Deguelia densiflora</i>	<i>Derris glabrescens</i> <i>Lonchocarpus boliviensis</i> <i>Lonchocarpus densiflorus</i> <i>Lonchocarpus glabrescens</i>
<i>Deguelia hatschbachii</i>	--
<i>Deguelia longeracemosa</i>	<i>Lonchocarpus neuroscapha</i> var. <i>longeracemosa</i>
<i>Deguelia costata</i>	<i>Lonchocarpus costatus</i>
SEÇÃO <i>DEGUELIA</i>	
ESPÉCIE	SINÓNIMA
<i>Deguelia rufescens</i> var. <i>urucu</i>	<i>Derris urucu</i> <i>Lonchocarpus nicou</i> var. <i>urucu</i> <i>Lonchocarpus urucu</i>
<i>Deguelia rufescens</i> var. <i>rufescens</i>	<i>Derris rufescens</i> <i>Lonchocarpus nitidulus</i> var. <i>sehomburgkii</i> <i>Lonchocarpus rufescens</i>
<i>Deguelia nitidula</i>	<i>Derris floribunda</i> <i>Lonchocarpus floribundus</i> <i>Lonchocarpus nitidulus</i>
<i>Deguelia rariflora</i>	<i>Derris rariflora</i> <i>Lonchocarpus rariflorus</i>
<i>Deguelia negrensis</i>	<i>Deguelia longifolia</i> <i>Derris longifolia</i> <i>Derris negrensis</i> <i>Lonchocarpus killipii</i> <i>Lonchocarpus longifolius</i>
<i>Deguelia amazonica</i>	<i>Derris amazonica</i> <i>Lonchocarpus negrensis</i>
<i>Deguelia utilis</i>	<i>Lonchocarpus utilis</i> <i>Lonchocarpus nicou</i> var. <i>languidus</i> <i>Lonchocarpus nicou</i> var. <i>utilis</i> <i>Derris utilis</i>
<i>Deguelia dasycalyx</i>	<i>Lonchocarpus dasycalyx</i>
<i>Deguelia angulata</i>	<i>Derris angulata</i> <i>Derris sylvestris</i> <i>Lonchocarpus angulatus</i> <i>Lonchocarpus sylvestris</i>
<i>Deguelia duckeana</i>	--
<i>Deguelia occidentalis</i>	<i>Millettia occidentalis</i>
<i>Deguelia glaucifolia</i>	--

Após um levantamento bibliográfico minucioso (1937 a 2000), constatamos que das 17 espécies brasileiras de *Deguelia*, 8 já foram quimicamente estudadas, sendo 2 pertencentes à seção **Multiovulis** (Tabela 2, Quadro 1) (*Deguelia spruceana* (Benth) A. M. G. Azevedo e *D. densiflora* (Benth.) A. M. G. Azevedo)^{2,3} e 6 pertencentes à seção **Deguelia** (Tabela 3, Quadro 2) (*Deguelia utilis*, *D. rufescens* var. *urucu*, *D. nitidula*, *D. rariflora*, *D. negrensis* e *D. amazonica*)^{4,5,6,7,8}.

Tabela 2- Revisão das espécies do gênero *Deguelia*, seção *Multiovulis*

ESPÉCIE	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS (QUADRO 1)	REFERÊNCIA
<i>Deguelia spruceana</i>	Fenilcumarinas (I-III); isoflavona (IV) e estilbeno (V)	2
<i>Deguelia densiflora</i>	Fenilcumarinas (VI, IX) e isoflavonas (VII, VIII)	3

² Garcia, M.; Kano, M. H. C.; Vieira, D. M.; Do Nascimento, M. C. e Mors, W. B. Isoflavonoids from *Derris spruceana*. *Phytochemistry*, 25 (10), p. 2425-2427, 1986.

³ Delle Monache, F.; Valera, G. C.; Zapata, D. S. e Marini-Bettolo, G. B. 3-Aryl-4-methoxycoumarins and isoflavones from *Derris glabrescens*. *Gazz. Chim. Ital.*, 107 (7-8), p. 403-407, 1977.

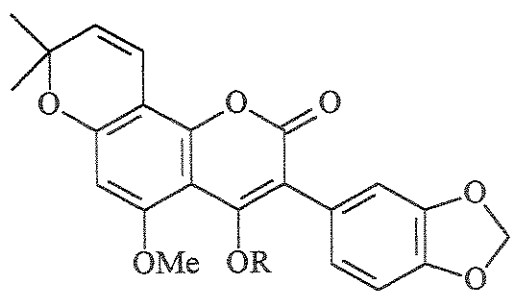
⁴ Gottlieb, O. R.; Gomes, C. M. R.; Marini Bettolo, G. B.; Delle Monache, F. e Polhill, R. M. Systematic significance of flavonoids in *Derris* and *Lonchocarpus*. *Biochem. Syst. and Ecol.*; 9 (2/3), p. 129-147, 1981.

⁵ Filho, R. B.; Gottlieb, O. R.; Mourão A. P.; Da Rocha, A. I. e Oliveira, F. S. Flavonoids from *Derris* species. *Phytochemistry*, 14, p. 1454-1456, 1975.

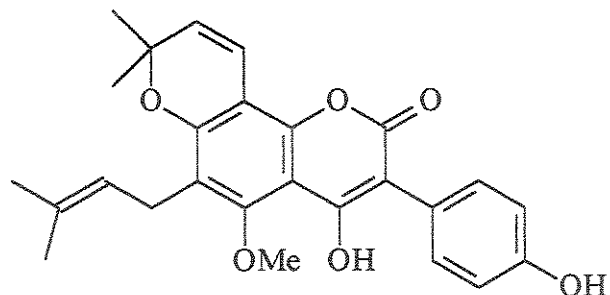
⁶ Filho, R. B.; Gottlieb, O. R. e Mourão, A. P. A stilbene and two flavanones from *Derris rariflora*. *Phytochemistry*, 14, p. 261-263, 1975.

⁷ Fang, N. e Casida, J. E. New bioactive flavonoids and stilbenes in cubé resin insecticide. *J. Nat. Prod.* 62 (2), p. 205-210, 1999.

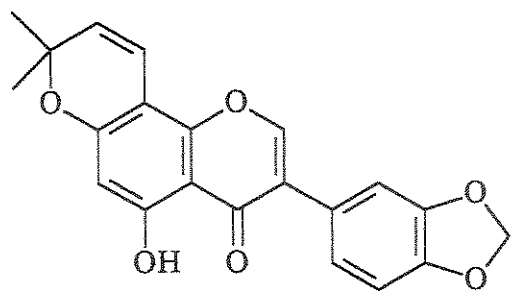
⁸ Vasconcelos, M. N. L.; Maia, J. G. S. Estudo químico de *Derris negrensis*. *Acta Amazonica*, 6(1), p. 59-61, 1976.



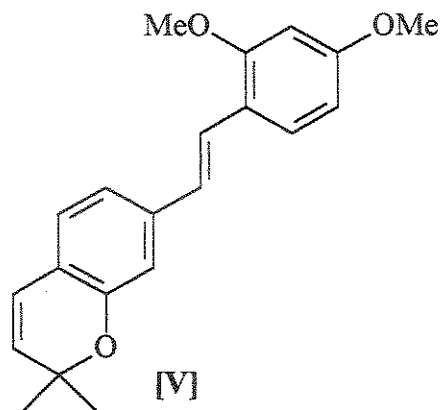
[I] R=H
[II] R=Me



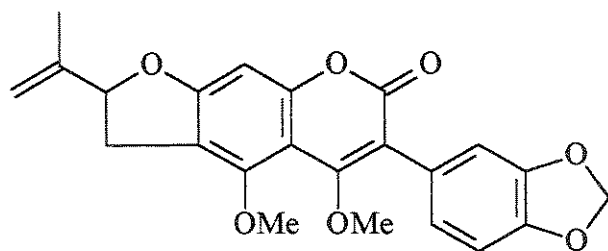
[III] Escandenina



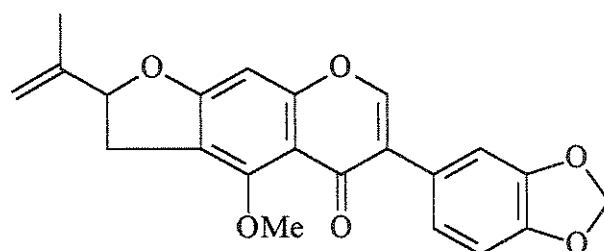
[IV]



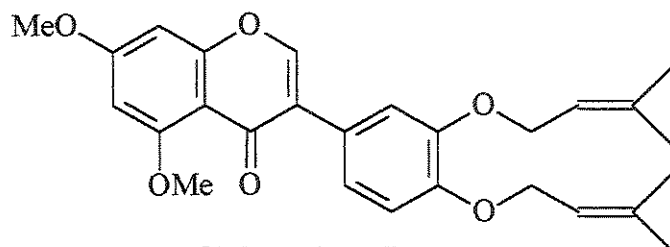
[V]



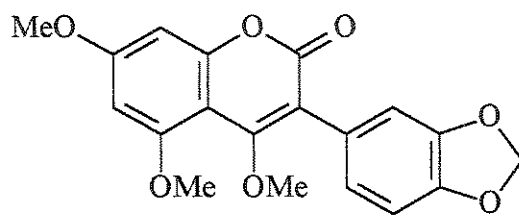
[VI] Glabrescina



[VII] Glabresciona A



[VIII] Glabresciona B

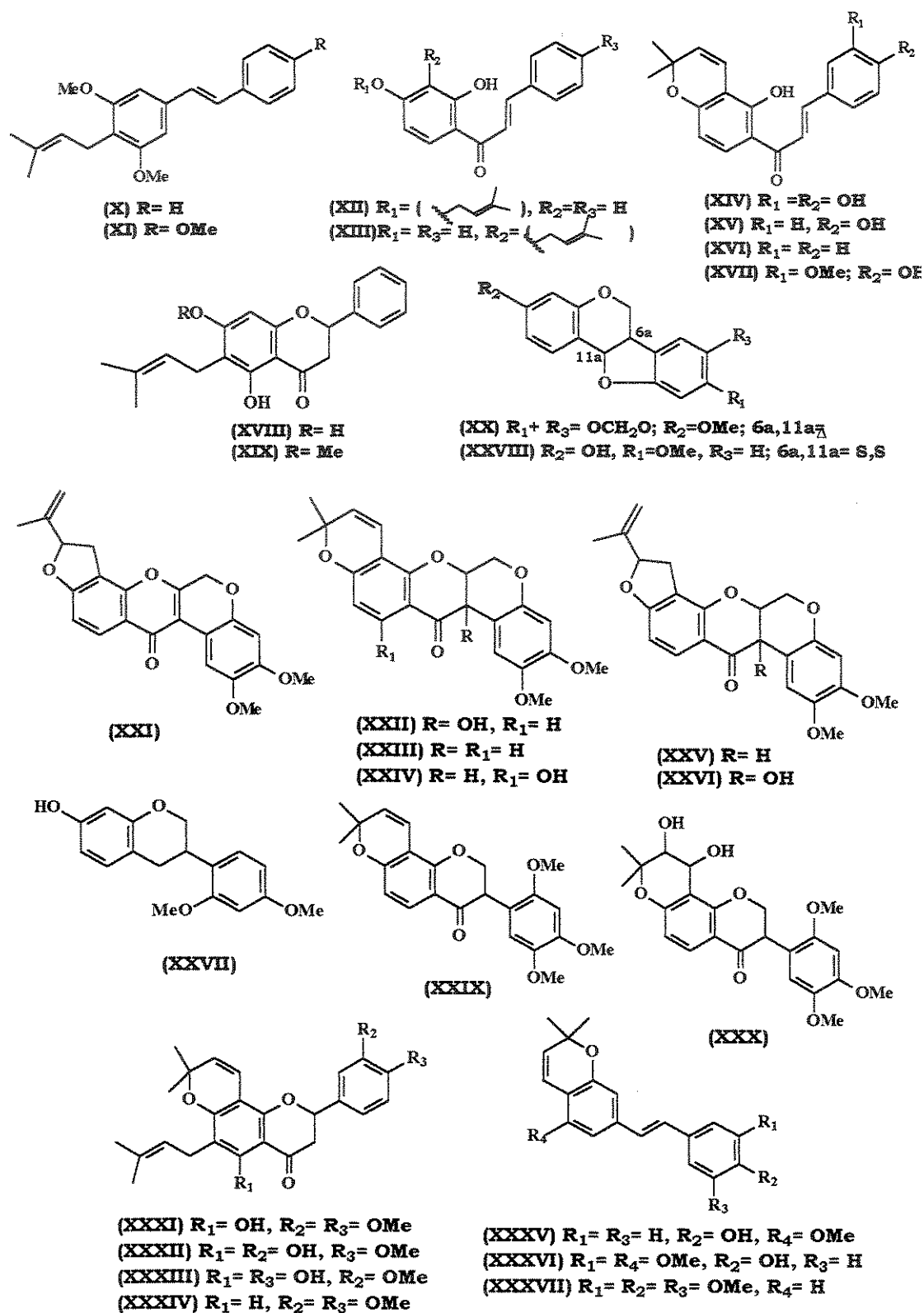


[IX] Derrusnina

Quadro 1- Flavonóides isolados de espécies de *Deguelia* sect. *Multiovulis*

Tabela 3- Revisão das espécies do gênero *Deguelia*, seção *Deguelia*

ESPÉCIE	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS (QUADRO 2)	REFERÊNCIA
<i>Deguelia rufescens</i> var. <i>urucu</i>	Pterocarpano (XX), rotenóides (XXI-XXIII, XXV, XXVI), isoflavanonas (XXIX, XXX), flavanonas (XXXI-XXXIV), estilbenos (XXXV-XXXVII), chalconas (XV-XVII)	4,5, 7
<i>Deguelia nitidula</i>	Estilbenos (X, XI), flavanona (XVIII), chalconas (XII- XVI)	4,5
<i>Deguelia rariflora</i>	Estilbeno (X), flavanonas (XVIII e XIX)	6
<i>Deguelia negrensis</i>	Rotenóides (XXI-XXVI)	4,8
<i>Deguelia amazonica</i>	Isoflavana (XXVII), pterocarpano (XXVIII)	5
<i>Deguelia utilis</i>	Chalconas (XV, XVII), isoflavanonas (XXIX, XXX), flavanonas (XXXI-XXXIV), estilbenos (XXXV-XXXVII)	7

Quadro 2- Flavonóides isolados de espécies de *Deguelia* sect. *Deguelia*

O gênero *Deguelia* é neotropical, tendo seu limite sul no trópico de Capricórnio, na região leste do Brasil, estendendo-se ao longo da costa Atlântica em direção à região Amazônica, dispersando-se pelo norte da América do Sul até atingir o istmo do Panamá⁹ (Figura 2).

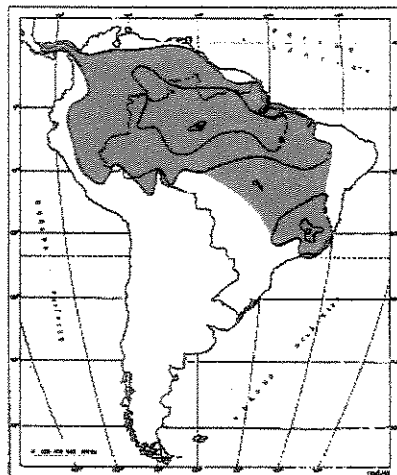


Figura 2- Área de ocorrência do gênero *Deguelia*

Suas espécies apresentam grande afinidade com as de *Lonchocarpus* e as de *Derris* (este último agora reunindo as espécies asiáticas), evidenciando o fato de que várias delas foram referidas na literatura como epítetos específicos combinados aos nomes genéricos *Lonchocarpus* ou *Derris*.

Deguelia hatschbachii (Figura 3) ocorre em florestas estacionais semidecíduas, tendo sido constatada sua presença na região sudeste de Minas Gerais, onde é frequente nas proximidades do rio Manhuaçu e nas formações de Mata Atlântica no Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.

D. hatschbachii é classificada da seguinte forma:

Família: Leguminosae

Subfamília: Papilionoideae

Tribo: Millettieae

Gênero: *Deguelia*

Seção: *Multiovulis*

Espécie: *D. hatschbachii* A. M. G. Azevedo

⁹ Tozzi, A. M. G. A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth. e *Deguelia* Aubl. no Brasil. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia- UNICAMP, Campinas-SP, 1989.

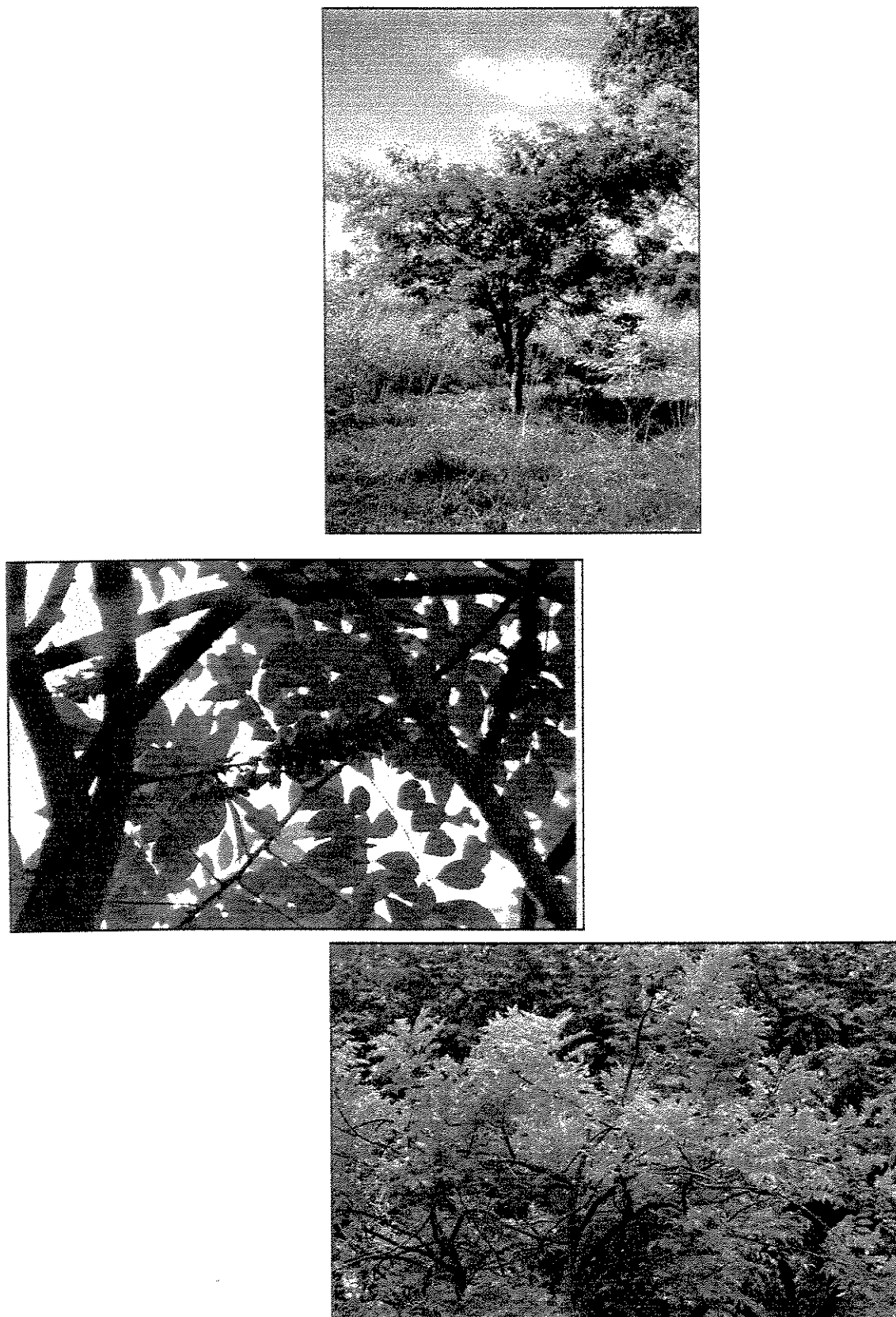


Figura 3- Foto do espécime estudado e detalhes de sua inflorescência

1.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA PLANTA EM ESTUDO¹⁰

Arvoreta de 3-6m de altura; ramos cilíndricos, lenhosos, estriados, lenticelados, glabros ou pubérulos. Folhas 11- ou 13-folioladas, alternas, espiraladas, com ou sem estípelas lineares, menores de 0,1cm compr.; pecíolo estriado, com um sulco visível na face superior, tomentoso, 3,5-7,5cm compr.; ráquis semelhante ao pecíolo, subangular, esparso-tomentosa glabrescente e lenhosa nas folhas mais velhas, 8,0-17,5cm compr.; peciólulo rugoso, tomentoso, 0,3-0,5cm compr.; folíolos opostos, papiráceos, discolors, opacos, 3,5-13,0 x 2,0-6,0cm; face adaxial esparso-serícea; face abaxial mais pálida, serícea, com nervuras secundárias conspícuas; folíolos basais ovados, os intermediários oblongos, oblongo-ovados a elípticos, os terminais elípticos ou levemente obovados, de base aguda a arredondada, ápice acuminado, de tamanho crescente da base para o ápice da folha. Pseudo-racemos infrafoliares, densifloros, fasciculados desde a base, tornando-se ligeiramente esparsifloros e afilados no ápice, mais curtos que as folhas; eixo de 1ª ordem lenhoso, estriado, pubérulo, 14,0-30,0cm compr.; eixo de 2ª ordem filiforme, multifloro (10-15 flores) com bráctea caduca na base; pedicelo delgado, seríceo, 0,4-0,7cm compr.; bractéola oval, serícea; cálice de lacínios agudos, seríceo, com pontuações esparsas e pequenas, 0,3-0,5cm compr., persistente na frutificação; corola rósea, púrpura a violácea, com pontuações esparsas, de 0,8-1,3cm compr.; estandarte arqueado, oboval, ápice arredondado e levemente retuso, base atenuada e breve apendiculada, incano-seríceo na face abaxial, 0,9-1,3 x 0,7-1,0cm; asas falcadas, oblongo-lanceoladas, subseríceas no ápice e centro da face abaxial, plicadas, 0,9-1,3 x 0,2cm; pétalas da quilha mais largas que as asas, seríceas, adnatas também na margem vexilar, 0,9- 1,2 x 0,3- 0,5cm; filetes glabros; ovário denso-seríceo, 9-11 ovulado, estilete pubescente. Fruto compresso, dilatado apenas na região da semente, oblongo e alongado, ápice truncado, base atenuada e

¹⁰ Tozzi, A. M. G. A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth. e *Deguelia* Aubl. no Brasil. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia- UNICAMP, Campinas-SP, 1989.

margens levemente onduladas, paleáceo, tomentoso, até 14,5 x 1,7cm; sementes 8-10 reniformes, 1,0 x 0,7cm (Figura 4).

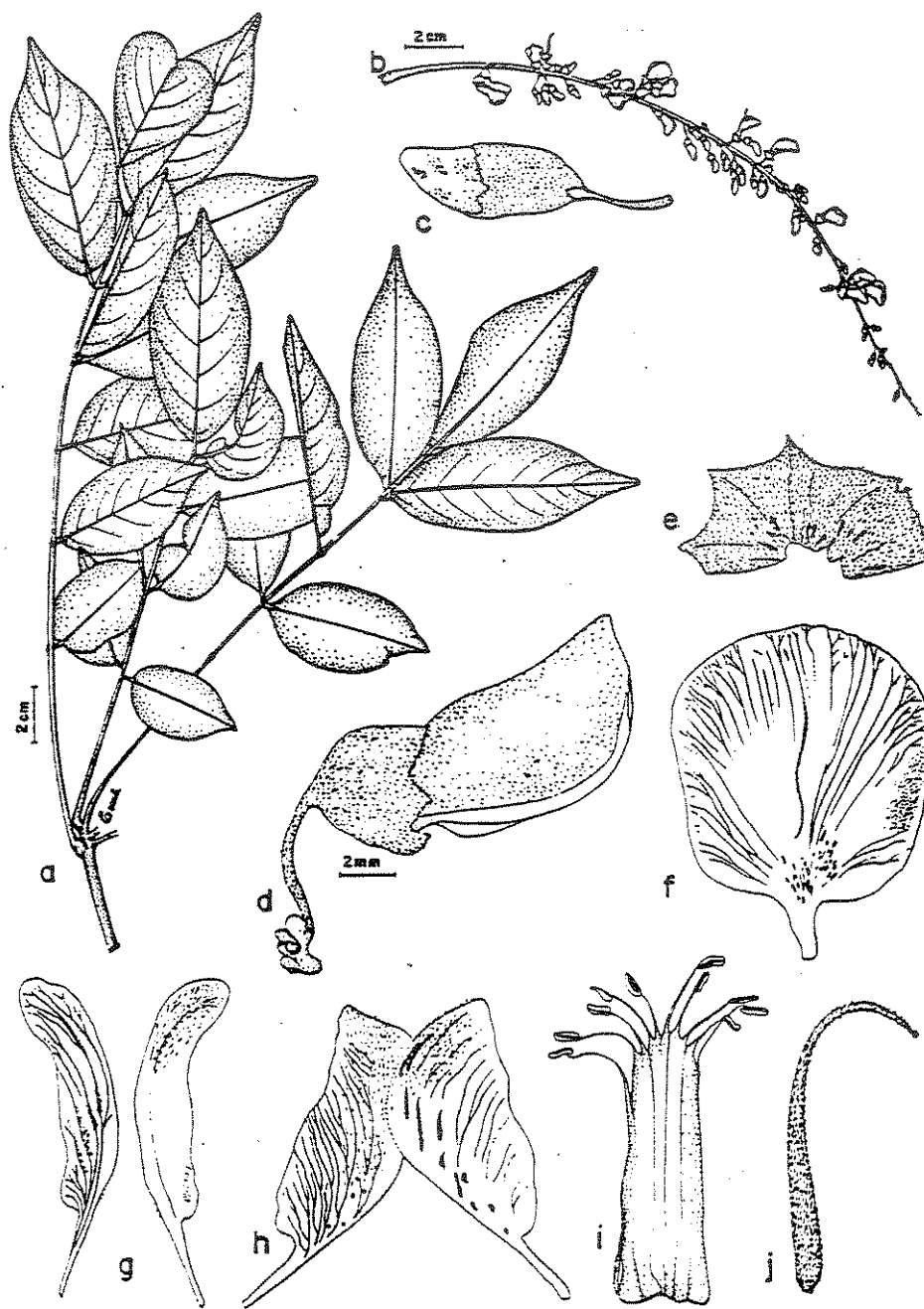


Figura 4- *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo: a. ramo; b. inflorescência (HATSCHBACH 31393 & AHUMADA); c. botão floral; d. flor; e. cálice; f. estandarte; g. asas; h. quilha; i. androceu; j. gineceu (H. C. de Lima 272)

2. A FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae (ou Fabaceae) é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreendendo cerca de 670 gêneros e 17500 espécies espalhadas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Suas espécies são de extrema importância para o homem pois fornecem alimento, madeira de valor, fibra, cola, resinas, taninos, substâncias corantes, inseticidas, moluscocidas e um grande número de matérias-primas usadas como drogas medicinais.

A família Leguminosae é particularmente rica em flavonóides e derivados, sendo responsável pela produção de 28 % de todos os flavonóides e 95 % de todas as agliconas isoflavonóidicas conhecidas no reino vegetal. A maioria dos flavonóides e isoflavonóides de caules, raízes e sementes de Leguminosae contém grupos isoprenila ou modificações dele, tal como um anel dimetilpirano^{11,12,13,14}.

3. OS FLAVONÓIDES

Os flavonóides representam uma grande classe de metabólitos secundários de plantas divididos em dois principais grupos, os **Flavonóides** e os **Isoflavonóides**, englobando vários tipos, tais como; anthocianinas, flavonóis, flavonas, catequinas e flavanonas, isoflavonas, isoflavanonas, 3-fenilcumarinas, pterocarpanos e rotenóides, sendo que muitos estão presentes nos tecidos das plantas em concentrações relativamente altas com açúcares conjugados, isto é na forma de glicosídeos.

¹¹ Lewis, G. P. & Owen, P. E. Legumes of the Ilha de Maracá, Royal Botanic Gardens Kew, Whitstable Litho Ltd., Whitstable, Kent, Great Britain, 6-7, 1989.

¹² Joly, A. B. Botânica Introdução à Taxonomia Vegetal. 4ta. Ed., São Paulo: Ed. Nacional, p. 371-382, 1977.

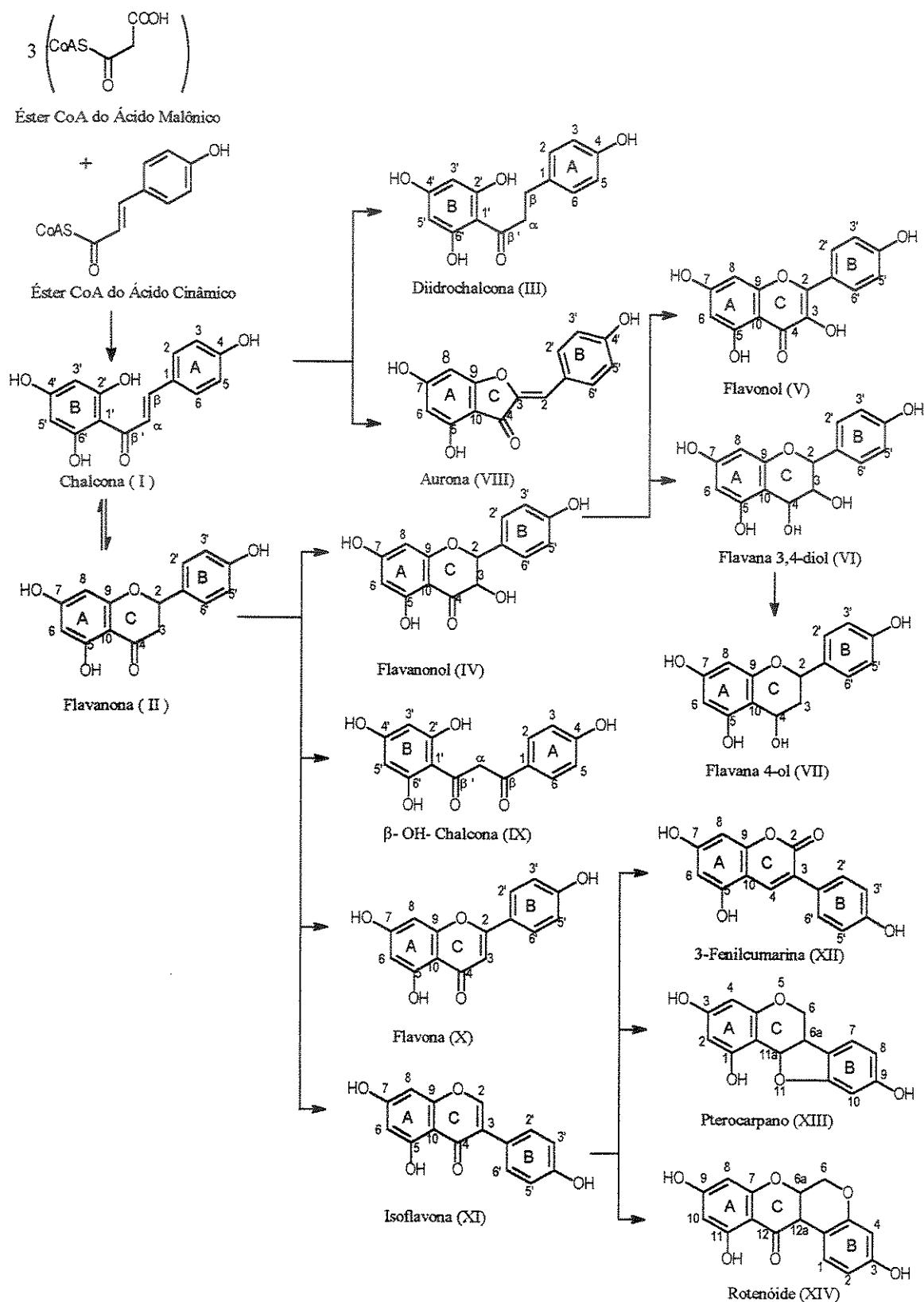
¹³ Heywood, J. The Leguminosae-A Systematic Purview in Harbone, J. B., Bouler D., Turner B. L. Chemotaxonomy of the Leguminosae. London: Academic, p. 1-29, 1971.

¹⁴ Hegnauer, R. e Grayer-Barkmeijer, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. *Phytochemistry*, 34 (1), p. 3-16, 1993.

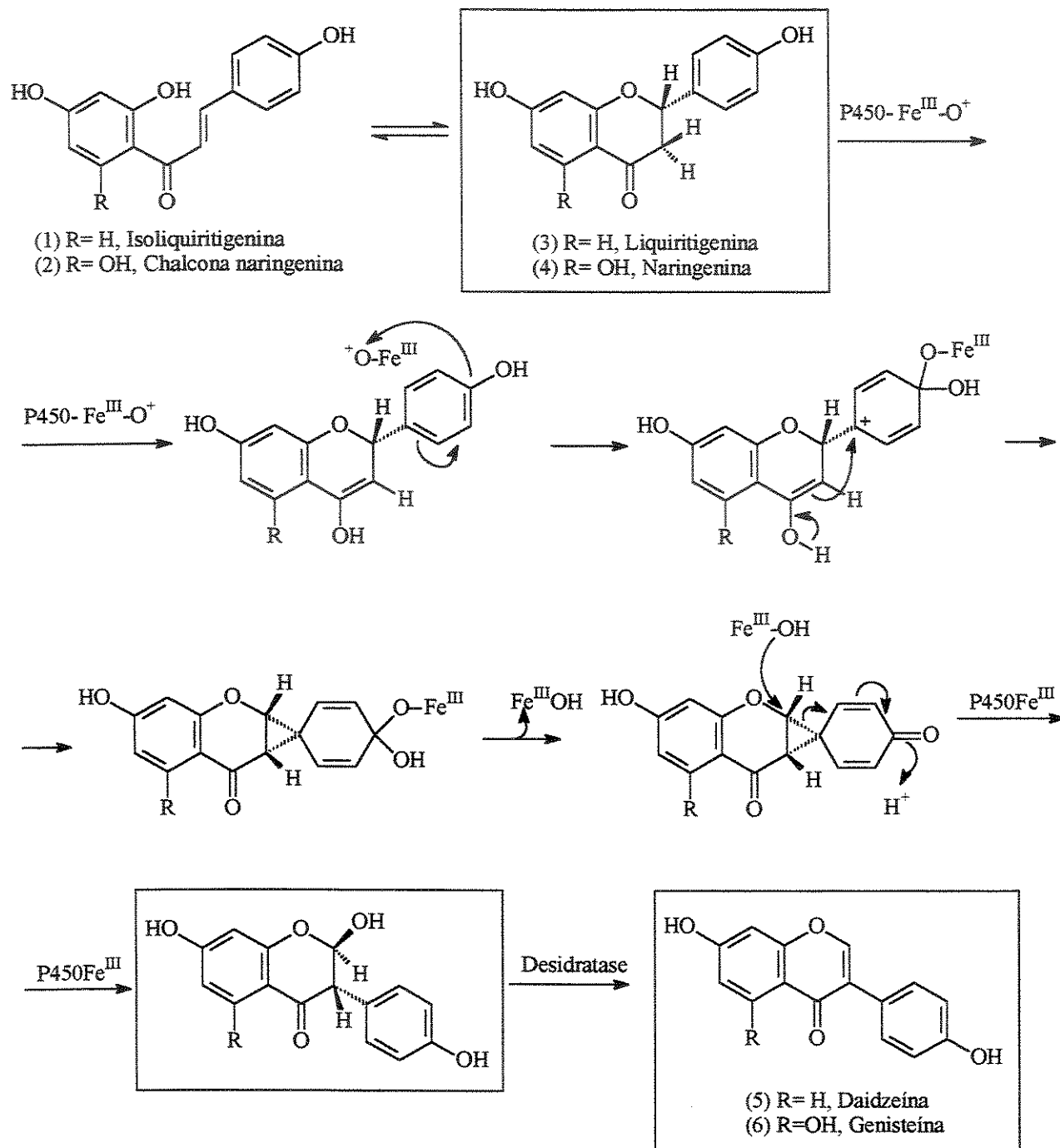
Os flavonóides constituem-se de produtos naturais, cujos esqueletos básicos são formados pelo encadeamento das unidades C₆-C₃-C₆ (bis-aril propanóide) e são biogeneticamente originados pela condensação de três moléculas do éster CoA do ácido malônico, com uma do éster CoA do ácido cinâmico, gerando uma chalcona (I), que existe em equilíbrio com a flavanona (II) correspondente¹⁵. Através de uma série de reações enzimáticas envolvendo alquilação, oxidação e redução, formam-se os diversos tipos de flavonóides. Os respectivos esqueletos são nitidamente diferenciados pela forma como apresentam a unidade propanoídica, ora ciclizando no anel C [flavona (X), flavanona (II), isoflavona (XI), flavana (VI e VII), flavonol (V), flavanonol (IV), aurona (VIII)], ora mantendo-se uma cadeia aberta [chalcona (I), diidrochalcona (III), β-hidroxichalcona (IX)]. Os rotenóides (XIV), pterocarpanos (XIII) e 3-fenil-cumarinas (XII) derivam das isoflavonas (Quadro 3), que provêm da migração do anel B (Quadro 4). Conforme o mecanismo da reação, a migração arila parece precisar de um grupo hidroxila nas posições C- 4' ou C-2'. Assim, quase todos os isoflavonóides são oxigenados nas posições C-4' ou C-2' do anel B das flavanonas e isoflavonas correspondentes ¹⁶.

¹⁵ Hahlbrock, K. e Grisebach, H. *Biosynthesis of Flavonoids*; In: Harbone, J.B.; Mabry, T. J. e Mabry, H. *The Flavonoids*; Academic Press; p. 868-871, 1975.

¹⁶ Dewick, P. M., The biosynthesis of shikimate metabolites, *Nat. Prod. Rep.* 10 (3), p. 233-263, 1993.



Quadro 3- Biossíntese dos Flavonóides



Quadro 4- Mecanismo da migração enzimática arila: intermediário espiro-dienona formado na substituição *ipso*, envolvendo a enzima P₄₅₀ na forma do seu híbrido de ressonância eletrofílico Fe^{III}O⁺ ¹⁷

¹⁷ Crombie, L. e Whiting, D. A. The mechanism of the enzymic induced flavanone-isoflavone change. *Tetrahedron Letters*, 33 (25), p. 3663-3666, 1992.

Os flavonóides são metabólitos secundários de grande interesse, pois são encontrados em frutas, nozes, sementes, caules, flores, assim como em chás e vinhos, sendo constituintes importantes da dieta humana. Primeiramente, eles foram reconhecidos como pigmentos responsáveis por muitas tonalidades de amarelos, laranjas e vermelhos em flores e alimentos¹⁸.

Em média, a dieta diária ocidental contém aproximadamente 1 grama de uma mistura de flavonóides, uma quantidade que poderia fornecer concentrações farmacologicamente significantes em fluidos corporais e tecidos, assumindo-se uma boa absorção através do trato intestinal. O ressurgimento do interesse na medicina tradicional durante duas décadas passadas juntamente com elevados esforços em farmacognosia tem reascendido o interesse nos flavonóides e a necessidade de se entender suas interações com as células mamíferas e tecidos ¹⁸.

Entre os flavonóides encontram-se, por exemplo, vários inibidores de enzimas, fitoalexinas, antibióticos, antioxidantes, protetores da radiação UV, captadores de radicais-livres, inseticidas, anti-alérgicos, anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anti-carcinogênicos ^{19,20,21}.

¹⁸ Middleton Jr., E. e 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*, 1th. Edition. Chapman & Hall, p. 619-652, 1993.

¹⁹ Mc Clure, J. W.; In: Harbone, J. B.; Mabry, T. J. e Mabry, H.; *The Flavonoids*. Academic Press, p. 1011-1038, 1975.

²⁰ Evans, W. C. *apud* Nogueira, M. A. Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae- Isolamento, Determinação estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal. Tese de Doutorado, Instituto de Química- UNICAMP, 1998.

²¹ Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M. E. J. e McDonald, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 761, p. 315-321, 1997.

Em um estudo feito por Hertog et al.²² foi verificado que a quantidade de flavonóide ingerida era inversamente relacionada à mortalidade de doenças do coração entre os alemães de meia idade. Na Finlândia, um outro estudo também demonstrou a relação inversa entre a quantidade de flavonóide ingerida, especialmente de maçãs e cebolas, e doenças do coração.

Embora, venha sendo observado uma relação inversa entre a quantidade de flavonóide ingerida, por uma alimentação rica em frutas e vegetais e a incidência de vários tipos de câncer, ainda não foi possível estabelecer correlações de um flavonóide específico com o decréscimo de risco de câncer, em estudos epidemiológicos. Contudo, estudos feitos com animais e culturas de células sugerem que os flavonóides agem como protetores contra câncer em vários sítios.

²² Justesen, U.; Knuthsen, P. e Leth, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 799 (1+2), p. 101-110, 1998.

4. OBJETIVOS DESTE TRABALHO

1) Estudo fitoquímico de *Deguelia hatschbachii*, uma das três espécies novas detectadas no Brasil e classificada pela Dra. Ana Maria G. Azevedo Tozzi, com ênfase no isolamento e na determinação estrutural de flavonóides, visando fornecer subsídios para o embasamento da classificação infragenérica proposta pela Dra. Ana.

2) Análise qualitativa e quantitativa, por CLAE, dos extratos (diclorometânico e éter de petróleo) usando as substâncias isoladas como padrões;

3) “*Screening*” para atividades biológicas, tais como: atividade fungicida e bactericida (Bioautografia); antitumoral e/ou inseticida (Letalidade com *Artemia salina*), dos extratos e substâncias isoladas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material e Métodos

Os espectros de absorção no ultravioleta (UV) foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin- Elmer, modelo Lambda 3A. Os solventes utilizados foram clorofórmio e metanol (grau espectroscópico) e cela de quartzo de 1cm. Os valores de absorvidade molar (ϵ) foram calculados pela equação:

$$\epsilon = A/c.l$$

onde ϵ = absorvidade molar

A = absorbância em um determinado comprimento de onda

c = concentração molar da substância

l = caminho ótico da cela (1 cm)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin- Elmer, modelo 1600 com transformada de Fourier, em pastilhas de KBr.

Os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C (totalmente desacoplado e DEPT) foram obtidos em espectrômetros BRUKER AC 300/P, GEMINI 2000 (VARIAN), GEMINI 300 BB (VARIAN) com campo de 7 tesla e espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C (totalmente desacoplado, totalmente acoplado e DEPT) e bidimensionais, com detecção inversa, adquiridos em um espectrômetro INOVA 500 (VARIAN) com campo de 11 tesla, a temperatura ambiente, sendo as amostras dissolvidas em clorofórmio deuterado Merck, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Os espectros de massas (baixa resolução) foram obtidos em um espectrômetro de massas: MAT Varian 311 A, em sonda de sólido de CG/EM 5988A HP e no equipamento VG AutoSpec- Fisions Instruments, utilizando a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

O espectro de massas de alta resolução e experimentos de espectro de massas de espectro de massas (EM/EM) foram obtidos em um espectrômetro de massas VG AutoSpec- Fisions Instruments, utilizando a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

Para a cromatografia em coluna foi usada sílica gel 60 (70- 230 mesh) Merk.

As placas de CCDA e CCPA (Merck Sílica gel G e GF₂₅₄, sobre vidro) e as cromatofolhas de alumínio sílica gel GF₂₅₄ 20x20 cm (Art. 1.05554, Merck) foram reveladas sob luz UV (254 e 366 nm) e nebulizadas com solução anisaldeído modificada²³ (etanol/ anisaldeído/ácido sulfúrico/ácido acético 90:5:5:1) seguido de aquecimento.

As análises por CG/EM foram feitas num aparelho de Cromatografia Gasosa acoplado a um Espectrômetro de Massas modelo HP 5990/5970, equipado com coluna capilar de sílica fundida J& W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) na qual a temperatura programada: 80 °C – 290 °C (mantida à 290 °C durante 10 minutos) variando 15 °C/ min. A temperatura do injetor utilizada foi de 290 °C e a do detector de 285 °C. O gás de arraste usado foi Hélio (He) e os Espectros de Massas obtidos à 70 e V.

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

$$\alpha_{20} = \frac{\alpha_T}{[1 + 0,000143 (T - 20)]}$$

onde T= Temperatura na qual a medida foi realizada

$$\alpha_{Na} = \frac{\alpha_{Hg}^{20}}{1,17543}$$

onde α_{Hg}^{20} = valor de rotação ótica corrigido pela equação anterior

²³ MERCK Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E.Merck, Darmstadt, 118p. 1971.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha_{Na}^{20}}{c \cdot l}$$

onde, α_{Na}^{20} = valor corrigido na equação anterior,

$[\alpha]_D^{20}$ = valor de rotação ótica específica,

c = concentração em g/mL da substância

l = caminho ótico da cela (1 cm)

O espectro de Dicroísmo Circular (DC) foi obtido em um espectropolarímetro JASCO modelo J-720 à temperatura ambiente.

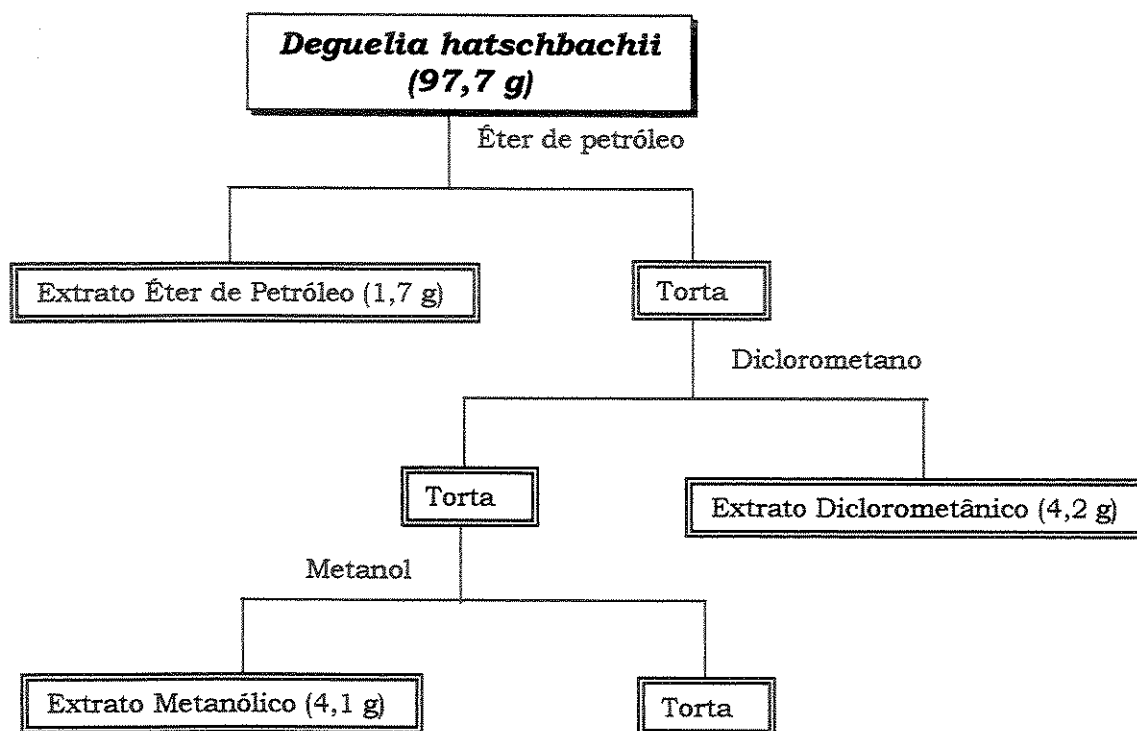
5.2 Estudo Fitoquímico

5.2.1 Coleta do material vegetal:

Segmentos de raízes (120,0 g) de um espécime de *Deguelia hatschbachii* (UEC 95-38) foram coletados no dia 14 de março de 1994 no Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), próximo ao Instituto de Economia, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi (Instituto de Biologia- Departamento de Botânica da UNICAMP).

5.2.2 Obtenção dos extratos

Os segmentos das raízes foram secas em estufa não ventilada a 40°C, seccionadas e moídas em moinho de faca Willey, fornecendo 97,7 gramas de pó extraídos em aparelho Soxhlet, por 50 horas cada, sucessivamente com Éter de petróleo, Diclorometano e Metanol, conforme o Fluxograma 1. Os três extratos foram filtrados e concentrados em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida, até a completa remoção dos solventes.



Fluxograma 1- Extração em Soxhlet das raízes de *D. hatschbachii*

Após análise por CCDA dos três extratos, optamos primeiramente pelo estudo do extrato diclorometânico, pois apresentou-se menos complexo e com um maior número de substâncias que revelavam sob luz UV (254 e 366 nm).

5.2.3 Estudo do Extrato Diclorometânico:

O extrato diclorometânico (3,0 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica-gel (70-230 mesh) (100 g.) a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciou-se com diclorometano, sendo a polaridade do eluente aumentada gradativamente pela adição de acetato de etila em diclorometano seguida de metanol em acetato de etila até metanol puro.

As 342 frações obtidas, desta coluna, foram agrupadas em 82 grupos, com base nos seus respectivos valores de R_fs, quando analisadas por CCDA (Tabela 4).

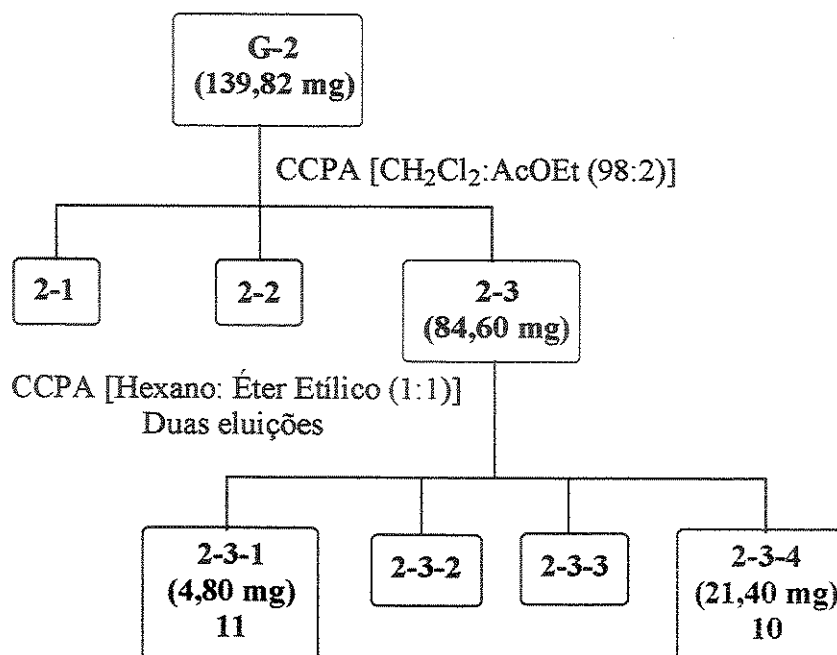
Tabela 4- Frações obtidas da coluna do extrato diclorometânico das raízes de *D. hatschbachii*

Frações	Grupo (G)	Massa (mg)	Eluente	Compostos Isolados
1-3	1	19,70	CH ₂ Cl ₂ 100%	Estilbenos 10 e 11
4-5	2	139,82		
6-7	3	28,90		
8-9	4	17,55		
10	5	16,70		
11-14	6	334,60		Flavanona 4 Lupinifolina (5) Ácido Robústico (2) Robustato de metila (3)
15	7	32,70		Osajina (6)
16-20	8	50,71		
21-28	9	24,52	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (2,5%)* (F-27)**	Desoxibenzoína 9
29-34	10	52,24		
35-37	11	16,40		
38-40	12	15,59		
41	13	7,30		
42	14	10,80		
43	15	14,50		
44-46	16	125,20		
47-50	17	365,60	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (5%)	Escandenina (1) Substância 8
51-56	18	183,44		Escandinona (7)
57-66	19	79,54		
67-80	20	95,31	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (7,5%)	
81-97	21	95,43	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (10%) (F-87)	
98-109	22	90,37	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (15%) (F-101)	
110-116	23	94,21	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (20%) (F-115)	
117-129	24	196,01	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (25%) (F-126)	
130-149	25	510,50	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (35%) (F-142)	
150-158	26	321,90		
159-164	27	180,40	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (50%)	
165-172	28	105,30	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (75%) (F-169)	
173-200	29	530,80	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (100%) (F-181) AcOEt:MeOH (2,5%) (F-191)	
201-218	30	428,20	AcOEt:MeOH (5%) AcOEt:MeOH (7,5%) (F-209)	
219-221	31	9,00	AcOEt:MeOH (10%)	
222-239	32	105,40	AcOEt:MeOH (15%) (F-226) AcOEt:MeOH (20%) (F-233)	
240-242	33	9,90		
243-246	34	25,30	AcOEt:MeOH (25%)	
247-253	35	30,00		
254-266	36	37,20	AcOEt:MeOH (35%)	
267-301	37	387,30	AcOEt:MeOH (50%) (F-276)	
302-342	38	429,20	AcOEt:MeOH (75%) MeOH 100% (F-321)	

Obs: *Porcentagens da mistura de solventes,

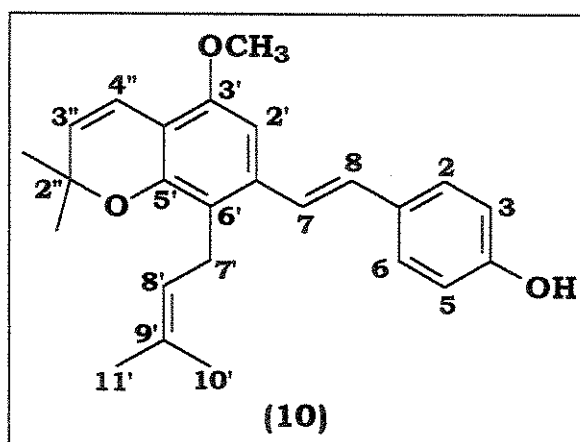
** Primeira fração coletada quando havia mudança de solvente

A sequência de fluxogramas abaixo corresponde as purificações, por Cromatografia em Camada Preparativa Analítica (CCPA) dos grupos de interesse, para o isolamento das substâncias, cujos dados espectroscópicos são relatados em seguida.



Fluxograma 2- Sequência de purificações dos estilbenos (10 e 11)

6'-(3,3-dimetilalila)-2'',2''-dimetilcromeno (5'',6'':4',5')-4-hidroxi-3'-metoxi
estilbeno (10)



Aspecto Físico: Sólido amorfo de cor amarela

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 273 (3,96); 330 (4,23) (Metanol 0,05 mg/mL)

IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3403,9 (OH); 2922,5 (C-H); 959,6 (dupla *trans*); 828,5 (anel 1,4-dissubstituído)

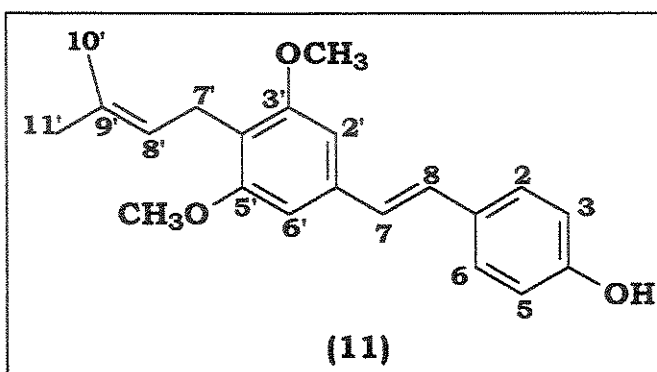
RMN¹H (300 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E105, Tabela 33.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E106, Tabela 35.

EM [m/z (%)]: 376 $[\text{M}]^+$ (21), 361 $[\text{M-Me}]^+$ (100), 333 $[\text{M-Me-CO}]^+$ (6), 213 $[\text{M-Me-CO-120}]^+$ (35), 107 $[\text{M-269}]^+$ (17), 69 (3), 55 (3).

EMAR m/z : observado 376,2039 $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_3$ calculada 376,2038).

3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi-4'-(3,3-dimetilalila) estilbeno (11)



Aspecto Físico: Óleo amarelado

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 313 (4,20), 325 (4,21) (Metanol 0,013 mg/mL)

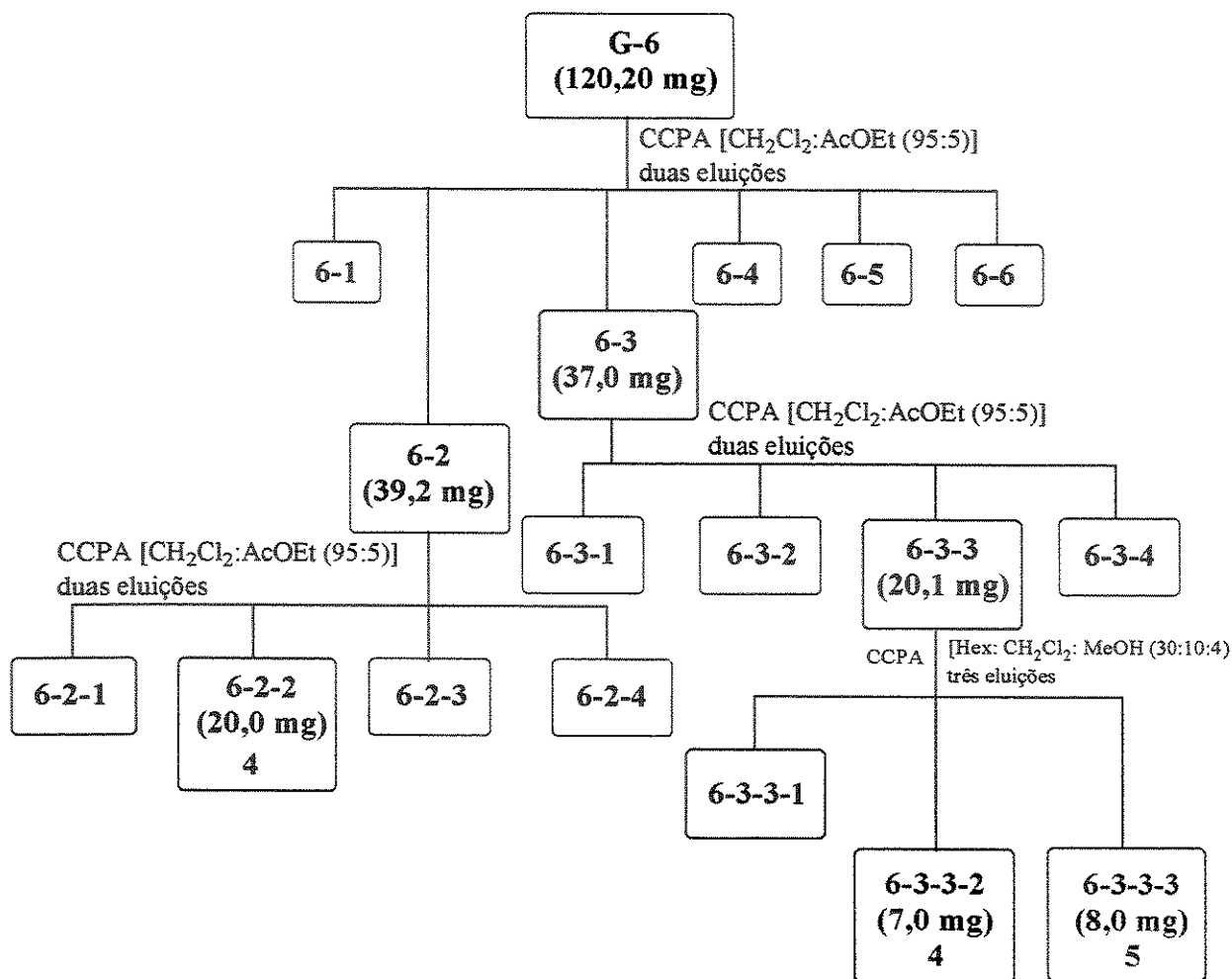
IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3407,5 (OH); 2924,0 (C-H); 958,4 (dupla *trans*); 832,6 (anel 1,4-dissubstituído)

RMN¹H (300 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E115, Tabela 34.

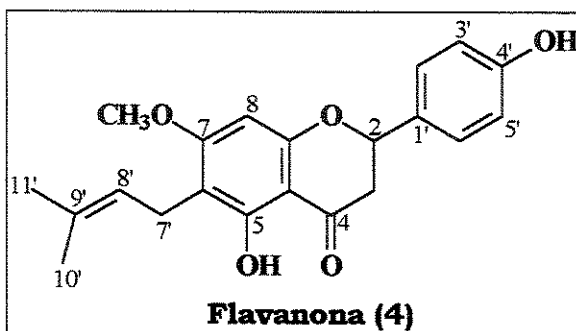
RMN¹³C (75 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E116, Tabela 35.

EM [m/z (%)]: 324 $[\text{M}]^+$ (100), 309 $[\text{M-Me}]^+$ (93), 281 $[\text{M-Me-CO}]^+$ (5), 256 $[\text{M-68}]^+$ (44), 255 $[\text{M-69}]^+$ (13), 269 $[\text{M-55}]^+$ (10), 241 $[\text{M-55-CO}]^+$ (2), 107 $[\text{M-217}]^+$ (20), 89 $[\text{M-217-H}_2\text{O}]^+$ (6), 81 $[\text{M-243}]^+$ (6), 69 (14), 55 (12).

EMAR m/z : observado 324,1725 $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_3$ calculado 324,1725).



Fluxograma 3- Sequência de purificações da flavanona (4) e da lupinifolina (5)

4',5-dihidroxi-6-(3,3-dimetilalila)-7-metoxiflavanona (4)**Aspecto Físico:** agulhas amarelas. $[\alpha]_D^{20} = -11,79^\circ$ (EtOH; c 0,0721).

CD $[\theta]_{211} + 12693$, $[\theta]_{224} + 15280$, $[\theta]_{281} - 11261$, $[\theta]_{285} - 15451$, $[\theta]_{298} - 12323$, $[\theta]_{317} + 1091$, $[\theta]_{323} + 2597$, $[\theta]_{334} + 5023$, $[\theta]_{350} + 3250$.

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 218 (4,48); 290 (4,22); 338 (3,45) (Metanol 0,012 mg/mL).

IV $\nu_{\text{máx}}$ (cela de KBr, cm^{-1}): 3376,2; 1640,0; 1519,1; 1376,2; 1339,1.

RMN¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E56, Tabela 19.

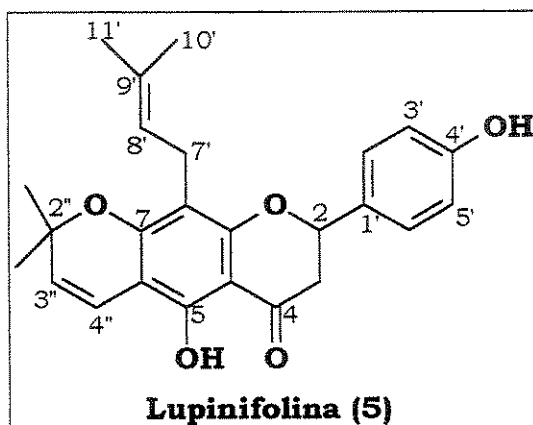
RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E57, Tabela 21.

EM [m/z (%)]: 354 [M]⁺ (100), 339 [M-Me]⁺ (29), 311 [M-Me-CO]⁺ (28), 299 [M-55]⁺ (27), 234 [M-120]⁺ (11), 219 [M-120-Me]⁺ (43), 206 [M-120-CO]⁺ (20), 191 [M-120-CO-Me]⁺ (17), 179 [M-175] (56), 120 [M-234]⁺ (18), 119 [(M+H)-234]⁺ (8), 91 [(M+H)-234-CO]⁺ (13).

EMAR m/z : observado 354,1467 [M]⁺ (C₂₁H₂₂O₅ calculado 354,1467).

5,4'-Dihidroxi-8-(3,3-dimetilalila)-2'',2''-dimetilcromeno (5'',6'':6,7)

flavanona (5, Lupinifolina)



Aspecto Físico: Cristais amarelos

$[\alpha]^{20}_D = -7.23^\circ$ (EtOH; c 0,047).

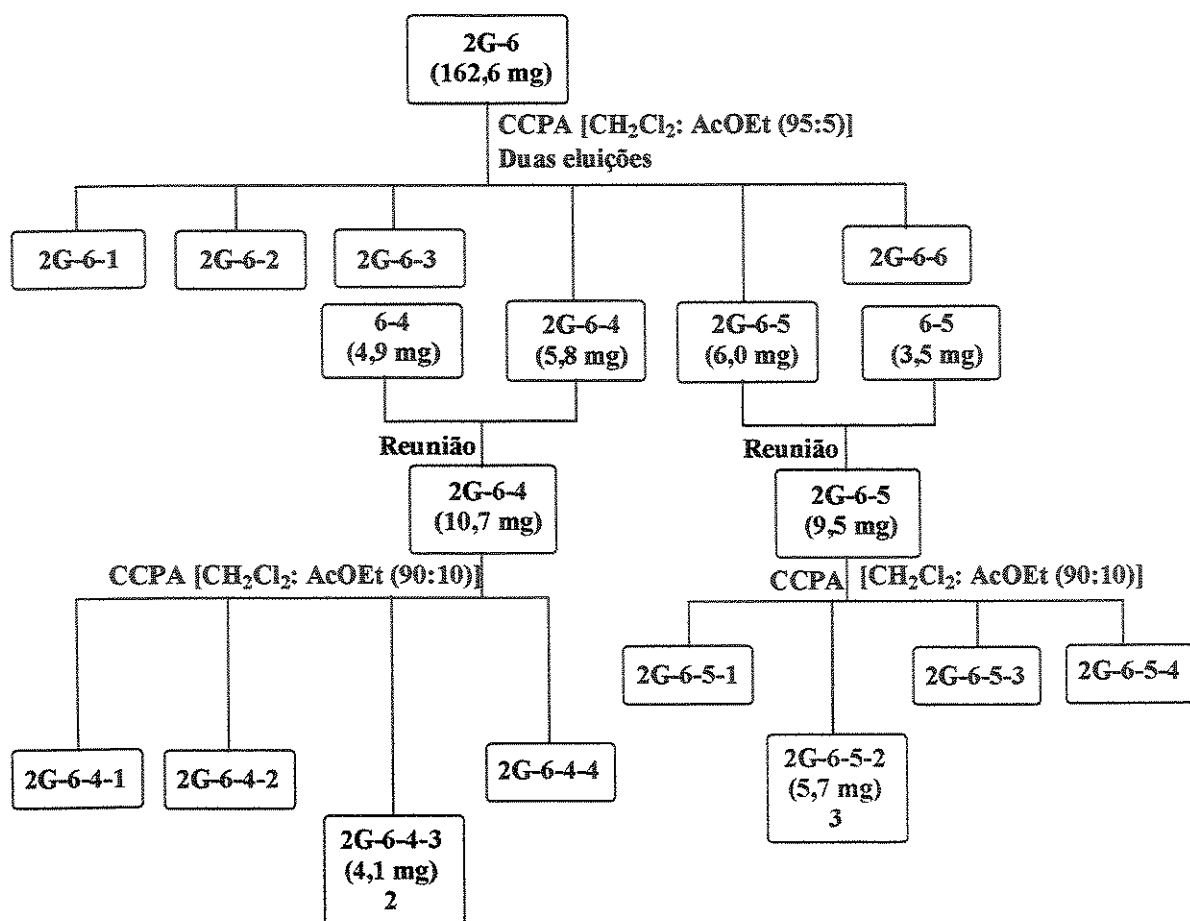
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 222 (3,91); 267 (4,10); 274 (4,13); 299 (3,58); 312 (3,57); 362 (2,91) (Metanol 0,08 mg/mL)

IV $\nu_{\text{máx}}$ (cela de KBr, cm^{-1}): 3403,8; 1642,9

RMN¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E75, Tabela 20.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E76, Tabela 21.

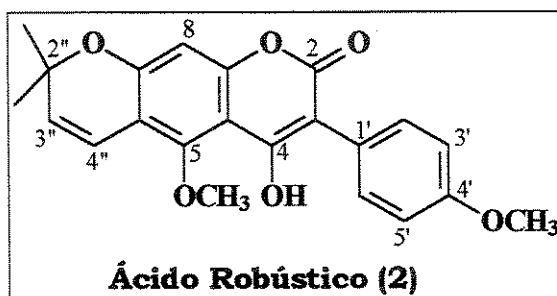
EM [m/z (%)]: 406 [M]⁺ (30), 391 [M-Me]⁺ (75), 286 [M-120]⁺ (3), 271 [M-120-Me]⁺ (32), 258 [M-120-CO]⁺ (5), 243 [M-120-CO-Me]⁺ (24), 231 [M-175]⁺ (13), 215 [M-120-Me-56]⁺ (100), 203 [M-120-CO-55]⁺ (6), 121 [(M+H)-286]⁺ (8), 120 [M-286]⁺ (14), 69 (35), 55 (32).



Fluxograma 4- Sequência de purificações do ácido robústico (2) e do robustato de metila (3)

5,4'- dimetoxi-3-fenil-4-hidroxi-2'',2''- dimetilcromeno (5'',6'':6,7)

cumarina (2, Ácido Robústico)



Aspecto Físico: agulhas transparentes.

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 230 (4,52); 250 (4,52); 258 (4,45); 332 (4,17) (Metanol 0,005 mg/mL).

IV $\nu_{\text{máx}}$ (cela de NaCl, cm^{-1}): 3263,9; 1715,2; 1626,9; 1573,9.

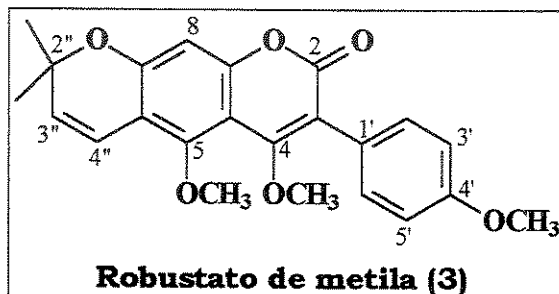
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E13, Tabela 8.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E14, Tabela 10.

EM [m/z (%)]: 380 [M]⁺ (70), 365 [M-Me]⁺ (80), 337 [M-Me-CO]⁺ (16), 233 [(M+H)-148]⁺ (28), 232 [M-148]⁺ (12), 217 [M-148-Me]⁺ (100), 189 [M-148-Me-CO]⁺ (5), 161 [M-148-Me-CO-CO]⁺ (17), 148 [M-232]⁺ (25), 133 [M-232-Me]⁺ (6), 105 [M-232-Me-CO]⁺ (6).

EMAR m/z : observado 380,1259 [M]⁺ (C₂₂H₂₀O₆ calculado 380,1259).

4,5,4'-trimetoxi-3-fenil-2'',2''-dimetilcromeno (5'',6'':6,7) cumarina (3,
Robustato de metila)



Aspecto Físico: agulhas transparentes.

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 230 (3,87); 267 (3,87); 349 (3,64) (Metanol 0,08mg/mL).

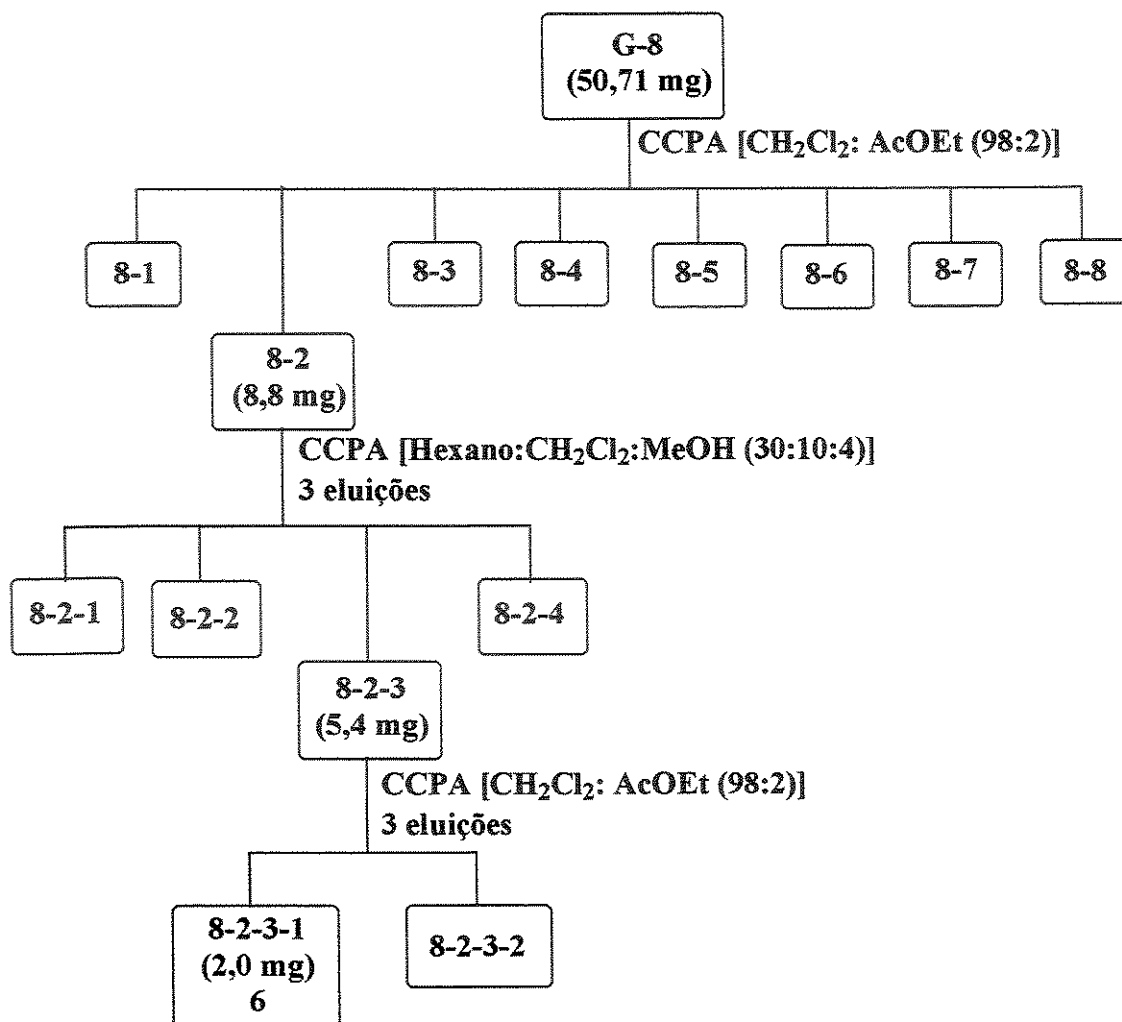
IV $\nu_{\text{máx}}$ (cela de NaCl, cm^{-1}): 3446,2; 1709,5; 1601,7; 1558,3.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E22, Tabela 9.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E23, Tabela 10.

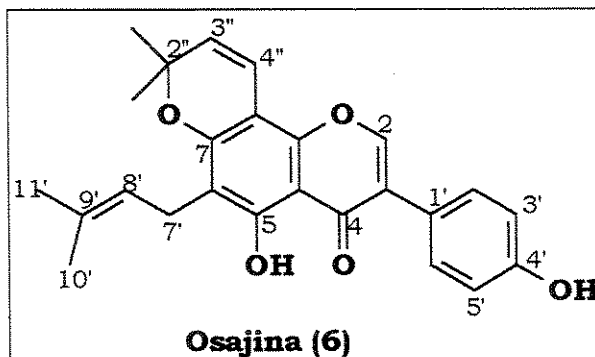
EM [m/z (%)]: 394 [M]⁺ (33), 379 [M-Me]⁺ (100), 366 [M-CO]⁺ (1), 351 [M-CO-Me]⁺ (2), 135 [M-CO-Me-216]⁺ (12).

EMAR m/z : observado 394,1416 [M]⁺ (C₂₃H₂₂O₆ calculado 394,1416).



Fluxograma 5- Sequência de purificações da osajina (6)

5,4'- dihidroxi-6-(3,3 dimetilalila)-2'',2''- dimetilcromeno (5'',6'':8,7)
isoflavona (6, osajina)



Aspecto Físico: agulhas brancas amareladas.

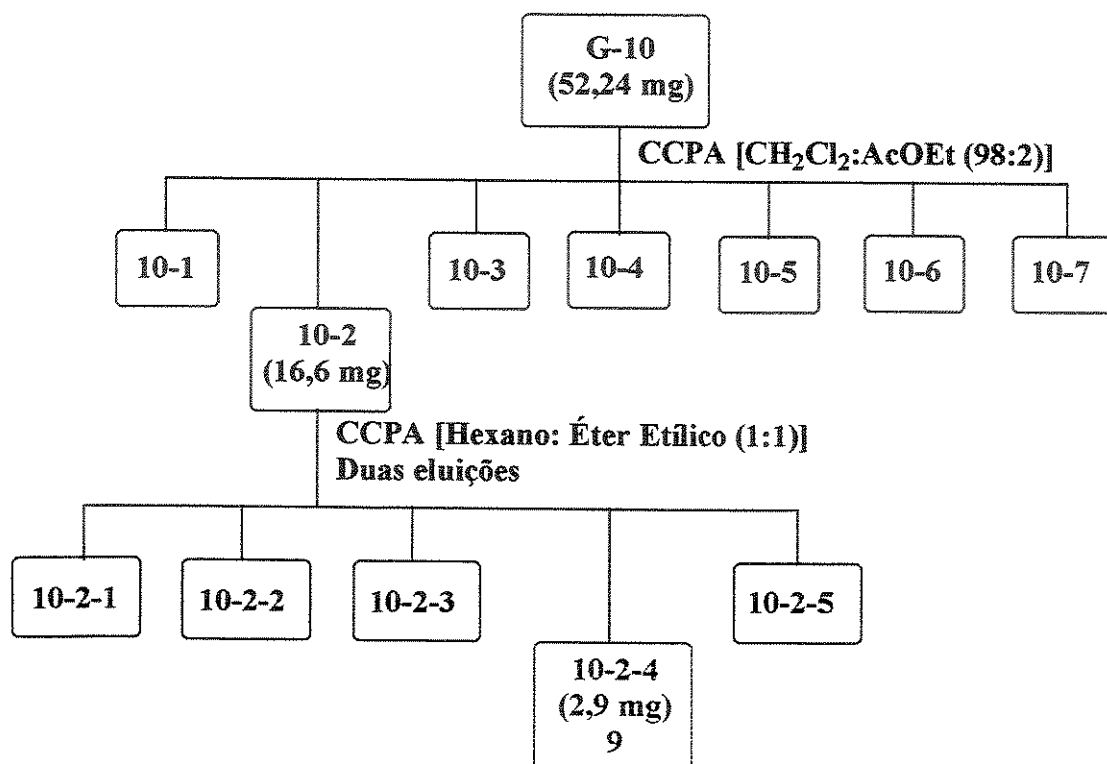
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 222 (4,28); 273 (4,61); 357 (3,28) (Metanol 0,007 mg/mL) .

IV $\nu_{\text{máx}}$ (Filme CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3373,6; 1645,9; 1607,1.

RMN¹H (300 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E83, Tabela 26.

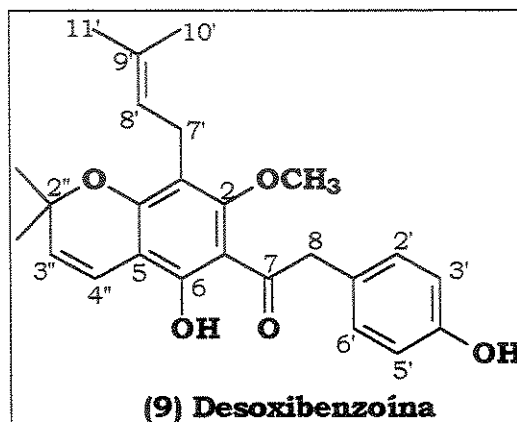
RMN¹³C (75 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E84, Tabela 28.

EM [m/z (%]): 404 $[\text{M}]^+$ (33), 389 $[\text{M-Me}]^+$ (100), 361 $[\text{M-Me-CO}]^+$ (43), 349 $[\text{M-55}]^+$ (40), 333 $[\text{M-Me-CO-CO}]^+$ (30), 321 $[\text{M-55-CO}]^+$ (5), 69 (5), 57 (3), 55 (6).



Fluxograma 6- Sequência de purificações da desoxibenzoína (9)

6,4'- dihidroxi- 3- (3,3-dimetilalila) -2'',2''- dimetilcromeno (5'',6'':5,4) -2-
metoxi desoxibenzoína (9)



Aspecto Físico: Pó Branco.

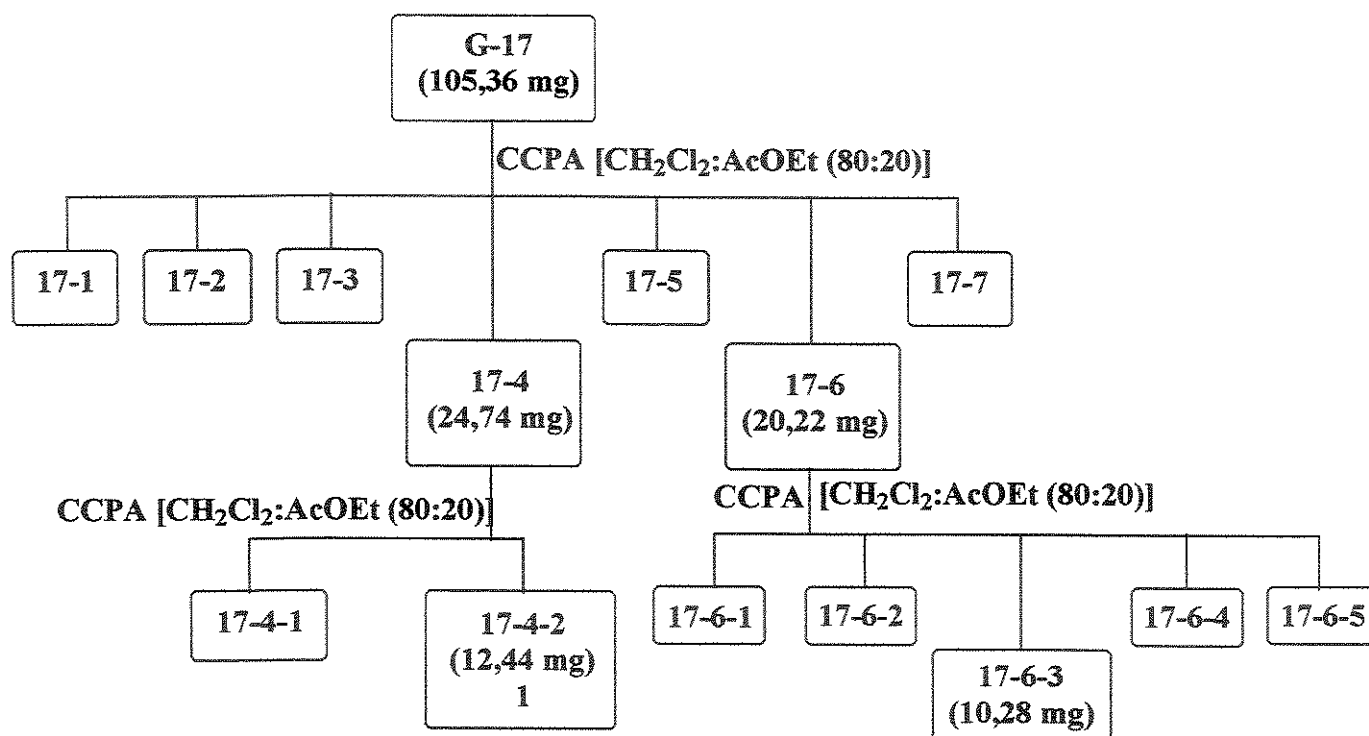
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 266 (4,14); 316,5 (3,72) (Metanol 0,029 mg/mL).

IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3388,1; 1700,1.

RMN¹H (300 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E94, Tabela 30.

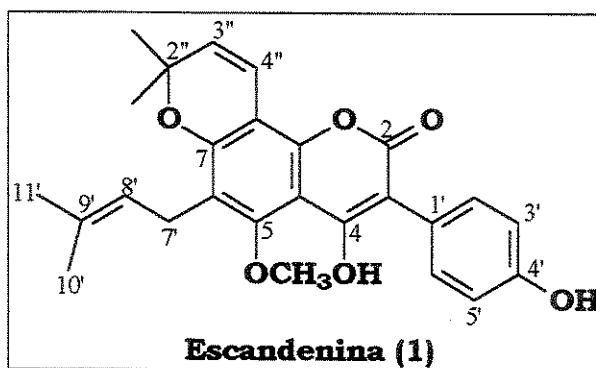
RMN¹³C (75 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E95, Tabela 32.

EM [m/z (%)]: 408 $[\text{M}]^+$ (3), 301 $[\text{M}-107]^+$ (32), 245 $[\text{M}-163]^+$ (16), 135 $[\text{M}-273]^+$ (9), 109 $[\text{M}-299]^+$ (15), 107 $[\text{M}-301]^+$ (15), 81 $[\text{M}-327]^+$ (55), 79 $[\text{M}-301-\text{CO}]^+$ (11), 69 (100), 57 (44), 55 (45).



Fluxograma 7- Sequência de purificações de escandenina (1)

4,4'-dihidroxi-3-fenil-5-metoxi-6-(3,3-dimetilalila)-2'',2''-dimetilcromeno
(5'',6'':8,7)-cumarina (1, Escandenina)



Aspecto Físico: cristal incolor.

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 241 (4,53), 289 (4,26), 293 (4,25), 344 (4,34) (Clorofórmio 0,008 mg/mL)

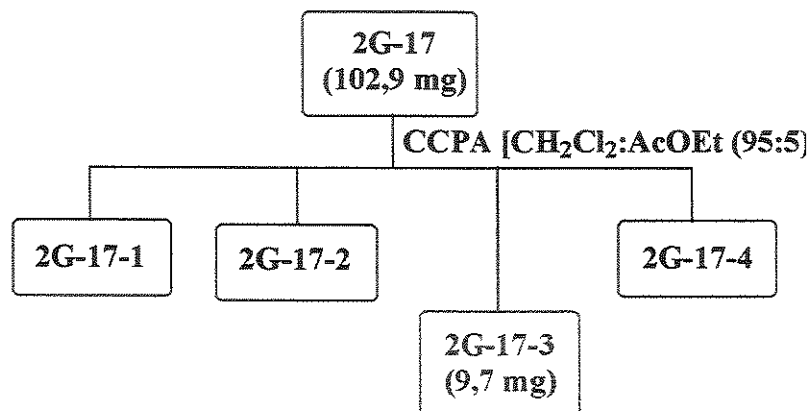
IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme de CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3253,6; 1680,5; 1630,2; 1593,8

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E1, Tabela 7.

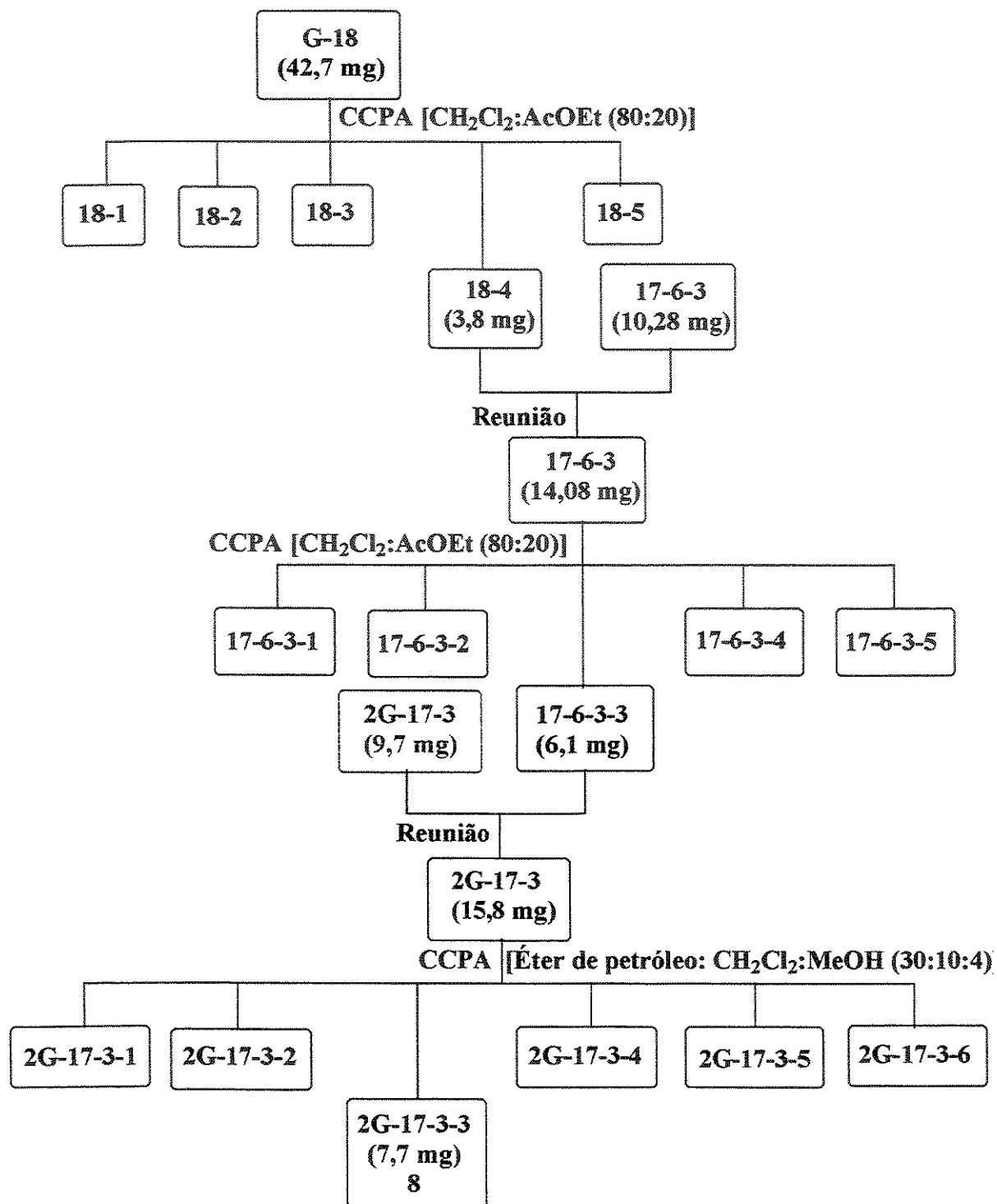
RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E2, Tabela 10.

EM [*m/z* (%)]: 434 [M]⁺ (100), 419 [M-Me]⁺ (70), 391 [M-Me-CO]⁺ (4), 379 [M-55]⁺ (3), 363 [M-Me-56]⁺ (3), 300 [M-134]⁺ (7), 285 [M-134-Me]⁺ (66), 245 [M-189]⁺ (12), 257 [M-134-Me-CO]⁺ (12).

EMAR *m/z*: observado 434,1729 [M]⁺ (C₂₆H₂₆O₆ calculado 434,1729).

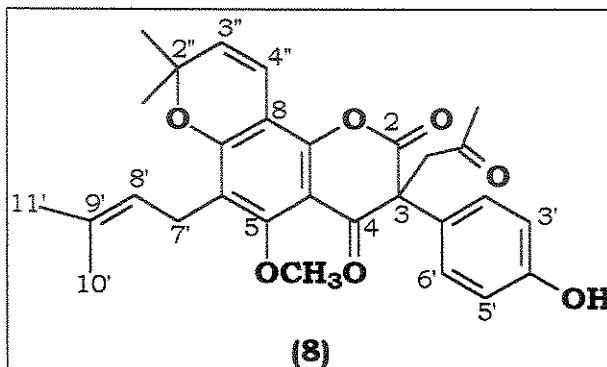


Fluxograma 8- Sequência de purificações da fração 2G-17-3



Fluxograma 9- Sequência de purificações da substância (8)

3- (4'-hidroxifenil) - 5- metoxi - 6 - (3,3-dimetilalila) - 2'',2''-
dimetilcromeno -(5'',6'':8,7)-3-(propil-2-ona)- 4H-1-benzo-2,3-dihidropiran-
2, 4- diona (8)



Aspecto Físico: óleo amarelo viscoso.

$[\alpha]^{20}_D = +6,16^\circ$ (CH_2Cl_2 ; c 0,0138).

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 257 (4,55); 305 (4,06) (Clorofórmio 0,01 mg/mL)

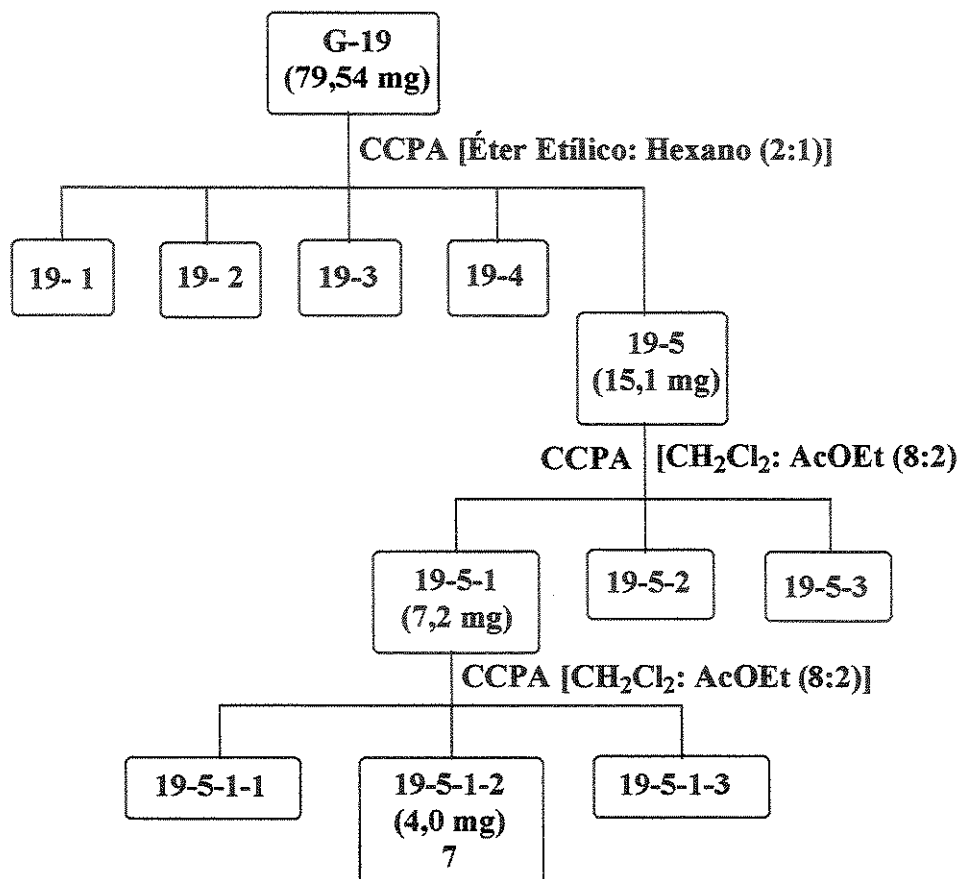
IV $\nu_{\text{máx}}$ (cela de KBr, cm^{-1}): 3410,0; 1770,6; 1704,0; 1681,8

RMN¹H (500 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E30, Tabela 13.

RMN¹³C (125 MHz, CDCl_3/TMS) δ : E31, Tabela 14.

EM [m/z (%)]: 490 $[\text{M}]^+$ (16), 475 $[\text{M}-\text{Me}]^+$ (8), 301 $[\text{M}-190+1]^+$ (100), 300 $[\text{M}-190]^+$ (38), 285 $[\text{M}-190-\text{Me}]^+$ (53), 269 $[\text{M}-221]^+$ (3), 257 $[\text{M}-190-\text{Me}-\text{CO}]^+$ (24), 245 $[\text{M}-245]^+$ (14), 242 $[\text{M}-190-\text{Me}-\text{CO}-\text{Me}]^+$ (2), 227 $[\text{M}-190-\text{Me}-\text{CO}-30]^+$ (4), 201 $[\text{M}-190-\text{Me}-\text{CO}-56]^+$ (4), 190 $[\text{M}-300]^+$ (5), 189 $[\text{M}-190-\text{Me}-\text{CO}-68]^+$ (3), 162 $[\text{M}-300-\text{CO}]^+$ (2), 159 $[\text{M}-190-\text{Me}-\text{CO}-98]^+$ (2), 147 $[\text{M}-343]^+$ (4), 135 $[\text{M}-300-\text{CO}+\text{H}-\text{CO}]^+$ (3), 119 $[\text{M}-343-\text{CO}]^+$ (22).

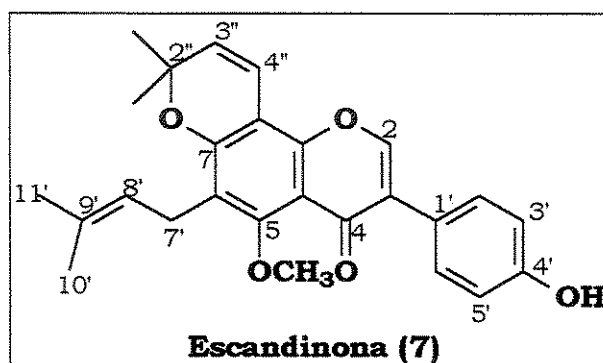
EMAR m/z : observado 490,1989 $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_7$ calculado 490,1991).



Fluxograma 10- Sequência de purificações de escandinona (7)

3- (4'-hidroxifenil)-6-(3,3-dimetilalila)-2'',2''- dimetilcromeno (5'',6'':8,7)

5-metoxi isoflavona (7, **Escandinona**)



Aspecto Físico: pó branco.

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ): 266 (4,47); 317 (3,60) (Metanol 0,01 mg/mL).

IV $\nu_{\text{máx}}$ (cela de KBr, cm⁻¹): 1636,0; 1514,9.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E88, Tabela 27.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS) δ: E89, Tabela 28.

EM [m/z (%)]: 418 [M]⁺ (34), 403 [M-Me]⁺ (100), 375 [M-Me-CO]⁺ (10), 349 [M-Me+H-55]⁺ (39), 118 [M-300]⁺ (4), 69 (28), 57 (43), 55 (25). 418 (M⁺, 34); 403 (100); 375 (10); 349 (39); 118 (4); 69 (28); 57 (43); 55 (25).

5.2.4 Estudo do Extrato Éter de Petróleo:

O extrato éter de petróleo (1,5 g) foi submetido à uma coluna cromatográfica de sílica-gel (70-230 mesh) (75,0 g) à pressão ambiente.

O eluente inicial usado foi diclorometano em éter de petróleo (25:75). A polaridade do eluente foi aumentada gradativamente com a adição de diclorometano em éter de petróleo, acetato de etila em diclorometano, posteriormente de metanol em acetato de etila, até chegar a metanol puro.

Foram coletadas 202 frações desta coluna que, após serem analisadas por CCDA foram agrupadas em 77 grupos, com base nos seus respectivos valores de R_fs e complexidades.

A Tabela 5 mostra os grupos das frações reunidas obtidas, relacionando-os com suas respectivas massas e códigos.

Tabela 5- Frações obtidas da coluna do extrato éter de petróleo das raízes de *D. hatschbachii*

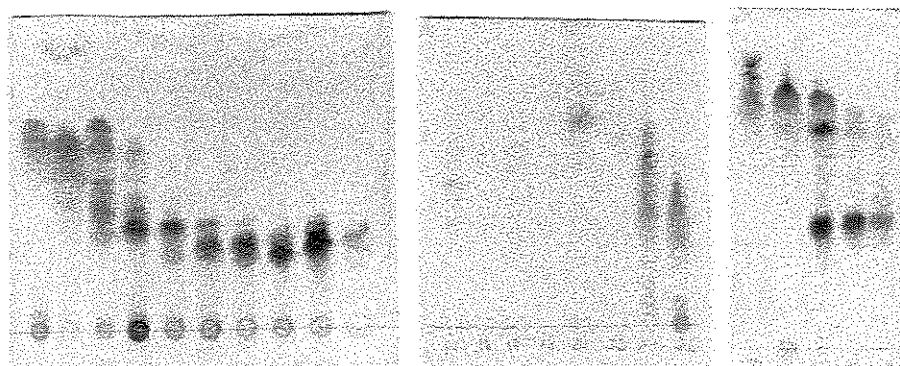
Frações	Grupo (G)	Massa (mg)	Eluente	Compostos isolados
1	1	20,1	CH ₂ Cl ₂ :Éter de petróleo (25%)	
2	2	25,7		
3	3	17,5		
4	4	7,0		
5	5	3,4		
6	6	3,3		
7	7	3,1		
8	8	2,6		
9-11	9	6,6		
12	10	2,6		
13-15	11	5,5		
16	12	2,7		
17	13	2,2		
18	14	1,3		

Frações	Grupo (G)	Massa (mg)	Eluente	Compostos isolados
19-21	15	5,9		
22	16	1,8		
23-25	17	16,4		
26	18	12,1	CH ₂ Cl ₂ :Éter de petróleo (50%)	
27-29	19	30,1		Lupeol 13
30	20	5,4		
31-33	21	9,1		
34-35	22	8,6		
36-39	23	57,2		
40	24	9,5		
41-45	25	31,4		Estilbenos 10 e 11
46	26	3,9		
47	27	4,5		
48	28	6,9		
49-53	29	18,8		
54	30	3,0		
55	31	2,8		
56	32	2,8		
57-61	33	9,4		
62	34	4,0		
63	35	6,8		
64	36	5,3		
65	37	9,3	100% CH ₂ Cl ₂	
66	38	14,6		Lupinifolina (5)
67	39	11,6		
68	40	5,6		
69-73	41	7,5		
74	42	1,8		
75-79	43	4,8		
80-91	44	18,5		Flavanona 4
92	45	58,5	AcOEt:CH ₂ Cl ₂ (25%)	
93	46	8,5		
94	47	4,9		
95-96	48	6,4		
97-98	49	4,9		
99	50	3,7		
100-103	51	8,4		
104-105	52	3,7		
106-108	53	7,8		
109	54	5,9		
110-118	55	15,1		
119-122	56	11,0	AcOEt:CH ₂ Cl ₂ (50%)	

Frações	Grupo (G)	Massa (mg)	Eluente	Compostos isolados
123-126	57	10,4	100% Acetato de Etila	
127-131	58	21,2		
132-136	59	11,3		
137-139	60	9,1	MeOH: AcOEt (10%)	
140-144	61	92,6		
145	62	9,4		
146-147	63	16,6	MeOH: AcOEt (20%)	
148-153	64	15,4		
154-155	65	22,7		
156-157	66	10,7	MeOH: AcOEt (30%)	
158-167	67	21,7		
168-173	68	22,4		
174	69	7,7	MeOH: AcOEt (50%)	
175-179	70	17,4		
180-186	71	49,1		
187	72	10,5	100% MeOH	
188	73	3,0		
189-190	74	7,3		
191-193	75	25,1		
194-197	76	14,0		
198-202	77	3,6		

Foram feitas várias placas de cromatografia em camada delgada analítica das frações reunidas, com o objetivo de auxiliar tanto numa melhor visualização dos perfis cromatográficos das frações, como na escolha para o estudo.

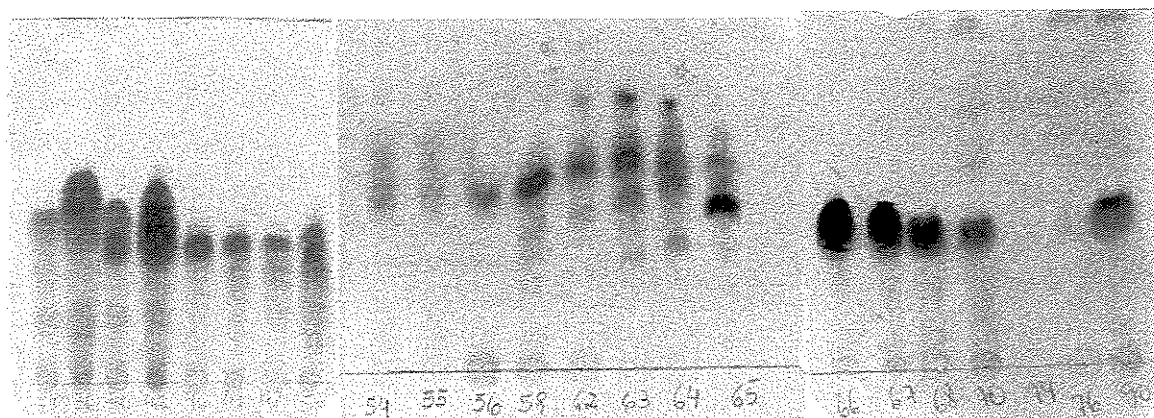
À seguir vemos as placas escaneadas, com seus respectivos sistemas de eluentes utilizados.



Placa 1- Eluente: (7:3)
(Éter de petróleo:CH₂Cl₂)

Placas 2 e 3- Eluente: Diclorometano (100%)

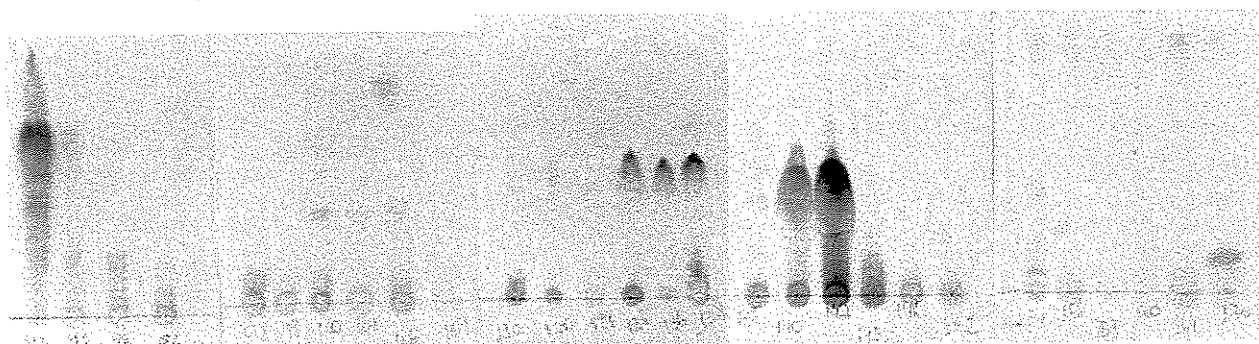
Figura 5- Frações reunidas da coluna de G-1 à G-21 (Tabela 5)



Placa 4- Eluente: Diclorometano
(100%)

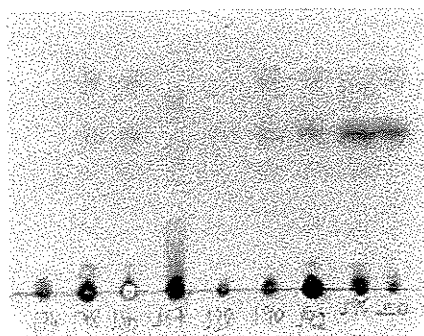
Placas 5 e 6- Eluente: (98:2) (CH_2Cl_2 :AcOEt)

Figura 6- Frações reunidas da coluna de G-22 à G-44 (Tabela 5)



Placas 7, 8 e 9- Eluente: (95:5) (CH_2Cl_2 :AcOEt)

Placas 10 e 11- Eluente: (9:1) (CH_2Cl_2 :AcOEt)



Placas 12- Eluente: (8:2) (CH_2Cl_2 :AcOEt)

Figura 7- Frações reunidas da coluna de G-45 à G-77 (Tabela 5)

Ao analisarmos, por CCDA algumas destas frações em comparação com as substâncias isoladas do extrato diclorometânico, observamos que a fração G-19 apresentava substâncias bem diferentes de todas as substâncias já isoladas (Figura 8).

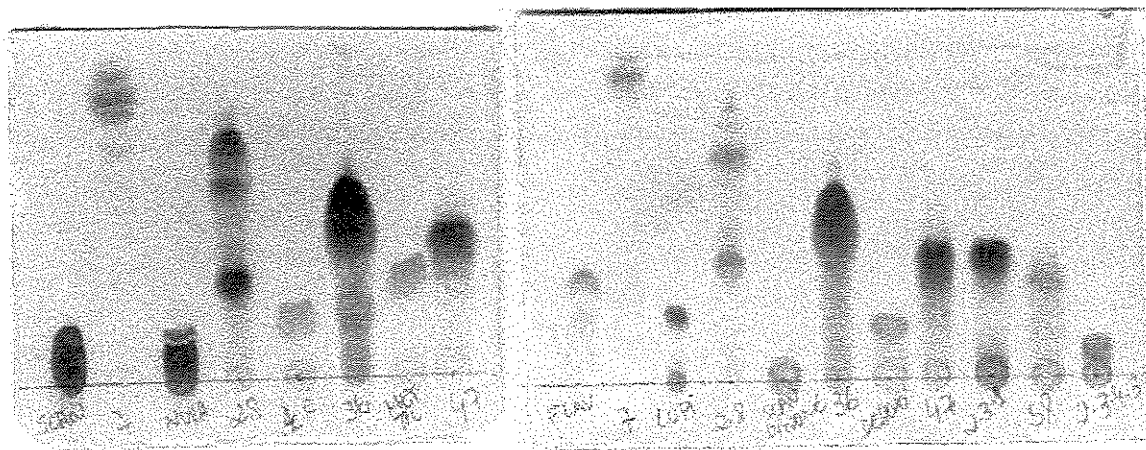
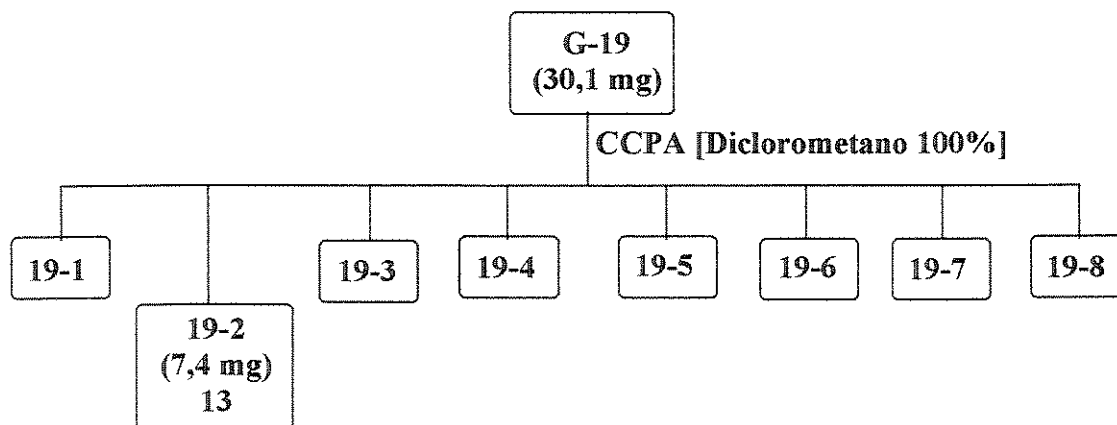


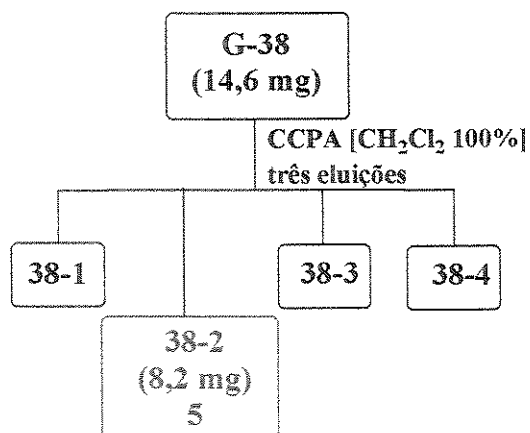
Figura 8- Placas analíticas de algumas frações interessantes da coluna do extrato éter de petróleo, comparadas com substâncias já isoladas do extrato diclorometânico. [Da esquerda para a direita temos: Escandenina (1), G-7, (8), G-19, Ácido robústico (2), G-23, Metil robustato (3), G-27, Flavanona (4), G-7, Lupinifolina (5), G-19, Escandinona (7), G-23, Desoxibenzoína (9), G-27, Estilbeno (11), G-33, Estilbeno (10)] (Quadros 5 e 6)

Optamos, então, pela realização de uma cromatografia em camada preparativa analítica (CCPA) (Fluxograma 11) desta fração, desenvolvida em diclorometano, resultando no isolamento do triterpeno lupeol (13), apresentando-se como um sólido branco.

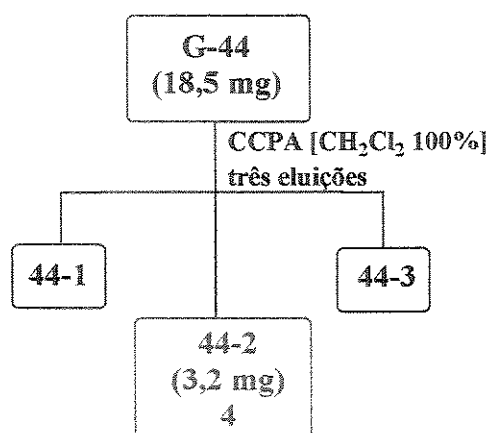


Fluxograma 11- Sequência de purificações do triterpeno lupeol (13)

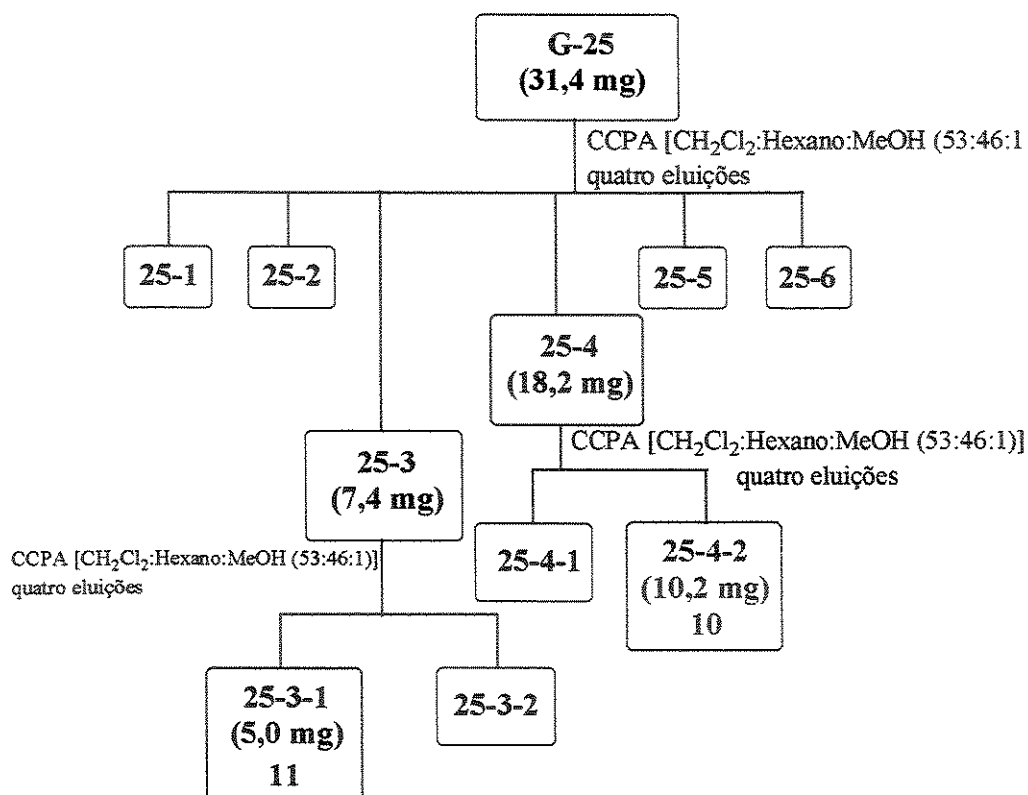
A purificação e o isolamento das flavanonas 4 e 5 e dos estilbenos 10 e 11 por CCPA seguiram os fluxogramas mostrados abaixo.



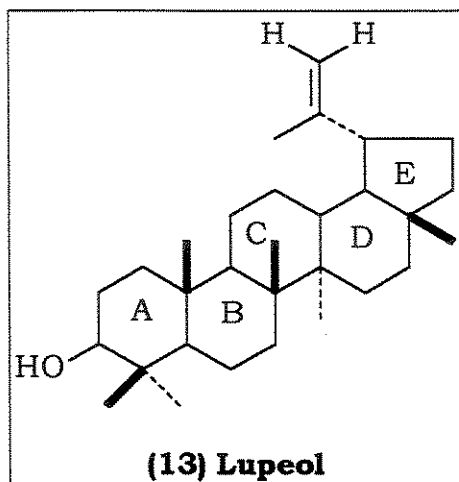
Fluxograma 12- Sequência de purificação da lupinifolina (5)



Fluxograma 13- Sequência de purificação da flavanona (4)



Fluxograma 14- Sequência de purificações dos estilbenos (10 e 11)

Lupeol (13)**Aspecto Físico:** Sólido branco cristalino.**RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS)** δ: E124, Tabela 38.**RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS)** δ: E125, Tabela 38.**EM [m/z (%)]:** 426 [M]⁺ (21), 220 [M-206]⁺ (9), 218 [M-208]⁺ (94), 207 [M-219]⁺ (49), 191 [M-235]⁺ (23).

5.2.5 Segundo estudo do Extrato Diclorometânico:

O extrato diclorometânico (1,661 g) foi submetido à uma coluna cromatográfica de sílica-gel (70-230 mesh) (80,0 g) à pressão ambiente.

A eluição da coluna iniciou-se com diclorometano, sendo a polaridade do eluente aumentada gradativamente pela adição de acetato de etila em diclorometano seguida de metanol em acetato de etila até metanol puro.

Foram coletadas 280 frações desta coluna que, após serem analisadas por CCDA foram agrupadas em 89 grupos, com base nos seus respectivos valores de Rfs e complexidades. As figuras 9 a 13 mostram as placas escaneadas das frações obtidas desta coluna, com seus respectivos sistemas de eluentes.

A Tabela 6 mostra os grupos das frações reunidas obtidas, relacionando-os com suas respectivas massas e códigos.

Tabela 6- Frações obtidas da segunda coluna do extrato diclorometânico das raízes de *D. hatschbachii*.

Frações	Grupo (G)	Massa (mg)	Eluente
1	1	1,3	Diclorometano 100%
2	2	4,3	
3	3	3,3	
4	4	2,3	
5	5	19,9	
6	6	23,7	
7-8	7	27,7	95:5 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
9	8	7,9	
10	9	7,4	
11-17	10	271,1	
18	11	7,6	
19-21	12	19,9	
22	13	9,3	
23	14	10,9	
24-25	15	31,8	
26-27	16	28,2	
28*	17	11,7	
29-37**	18	170,5	9:1 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
38	19	18,6	
39-43	20	95,0	
44-53	21	121,4	
54-63***	22	59,5	
64-70	23	45,7	
71-77	24	41,9	85:15 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
78	25	3,1	
79-87	26	104,2	
88-94	27	41,0	
95-100	28	23,6	75:25 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
101-104	29	47,1	
105-108	30	33,1	
109-117	31	17,1	
118-119	32	2,7	65:35 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
120	33	3,1	
121	34	3,2	
122	35	3,1	
123-127	36	14,4	55:45 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
128	37	2,7	
129-133	38	8,7	
134	39	2,1	
135-141	40	17,1	45:55 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
142	41	2,3	
143-151	42	15,1	
152	43	1,9	
153-160	44	9,7	
161	45	2,0	
162-168	46	12,1	
169	47	1,7	
170	48	2,1	

Frações	Grupo (G)	Massa (mg)	Eluente
171	49	1,9	
172-176	50	4,1	35:65 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
177	51	1,8	
178	52	2,7	
179	53	2,3	
180	54	3,7	
181	55	4,0	25:75 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
182-184	56	9,2	
185	57	2,2	
186-188	58	18,1	
189	59	2,4	
190-194	60	8,1	
195	61	1,3	
196-198	62	2,0	
199-206	63	10,1	
207	64	4,6	
208	65	1,3	
209-211	66	4,0	15:85 (CH ₂ Cl ₂ :AcOEt)
212	67	2,0	
213-215	68	3,1	
216	69	1,3	
217-218	70	3,3	
219-221	71	6,2	
222-223	72	3,0	
224-231	73	13,1	AcOEt (100%)
232	74	1,8	
233-243	75	14,1	
244	76	2,7	
245	77	27,1	50:50 (AcOEt:MeOH)
246	78	10,2	
247-253	79	32,1	
254	80	1,3	
255	81	1,2	
256	82	2,1	
257	83	3,0	
258	84	5,1	
259-273	85	19,7	MeOH (100%)
274	86	1,2	
275	87	2,0	
276	88	1,2	
277-280	89	2,1	

* Da fração 1 a 28 coletei amostras de 50 mL.

** À partir da fração 29 coletei amostras de 25 mL.

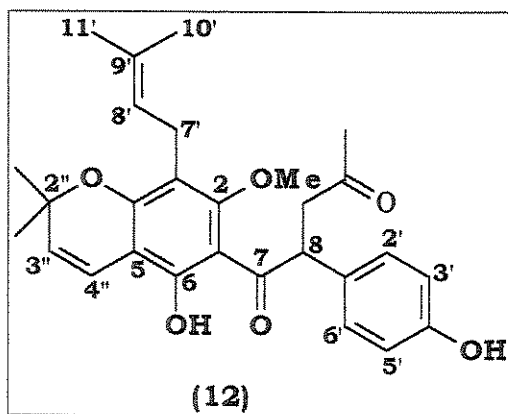
*** À partir da fração 61 coletei amostras de 50 mL.

Os grupos das frações contendo os compostos 1, 4, 5, 8 e 9 foram combinados com amostras dos grupos correspondentes da primeira coluna do

extrato diclorometânico, levando ao isolamento de uma quantidade adicional de 1 (157,5 mg), 8 (13,8 mg) e 9 (1,5 mg), juntamente com o composto 12 (2,0 mg), o qual não havia ainda sido isolado. No caso dos grupos contendo os compostos 4 e 5, amostras dos grupos correspondentes fornecidas pela coluna do extrato éter de petróleo, foram também combinadas, permitindo juntos a obtenção de 4 (144,2 mg) e 5 (33,2 mg).

O interesse em isolarmos maiores quantidades destas substâncias foi a necessidade de realizar testes de letalidade com *Artemia salina*, realizar experimentos de EM/EM e espectro de massas de alta resolução, determinar valores de $[\alpha]_D^{20}$ para as flavanonas e para o derivado da 4-hidroxi-3-fenilcumarina (8), realizar uma C-alquilação e uma hidrólise alcalina da escandenina (1) para auxiliar na determinação estrutural das substâncias (8) e do derivado da desoxibenzoína (9) respectivamente, e fazer análises quali e quantitativas dos extratos por CLAE usando estas substâncias isoladas como padrões.

6,4'-dihidroxi-3-(3,3-dimetilalila)-2'',2''-dimetilcromeno (5'',6'':5,4)-2-metoxi-8-(propil-2-ona) desoxibenzoína (12)



Aspecto Físico: óleo amarelo viscoso

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E101, Tabela 31.

RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS) δ : E102, Tabela 32.

EM [m/z (%)]: 464 [M]⁺ (16), 449 [M-Me]⁺ (2), 301 [M-163]⁺ (100), 245 [M-219]⁺ (16), 215 [M-249]⁺ (2), 163 [M-301]⁺ (2), 135 [M-301-CO]⁺ (3), 69 (6).

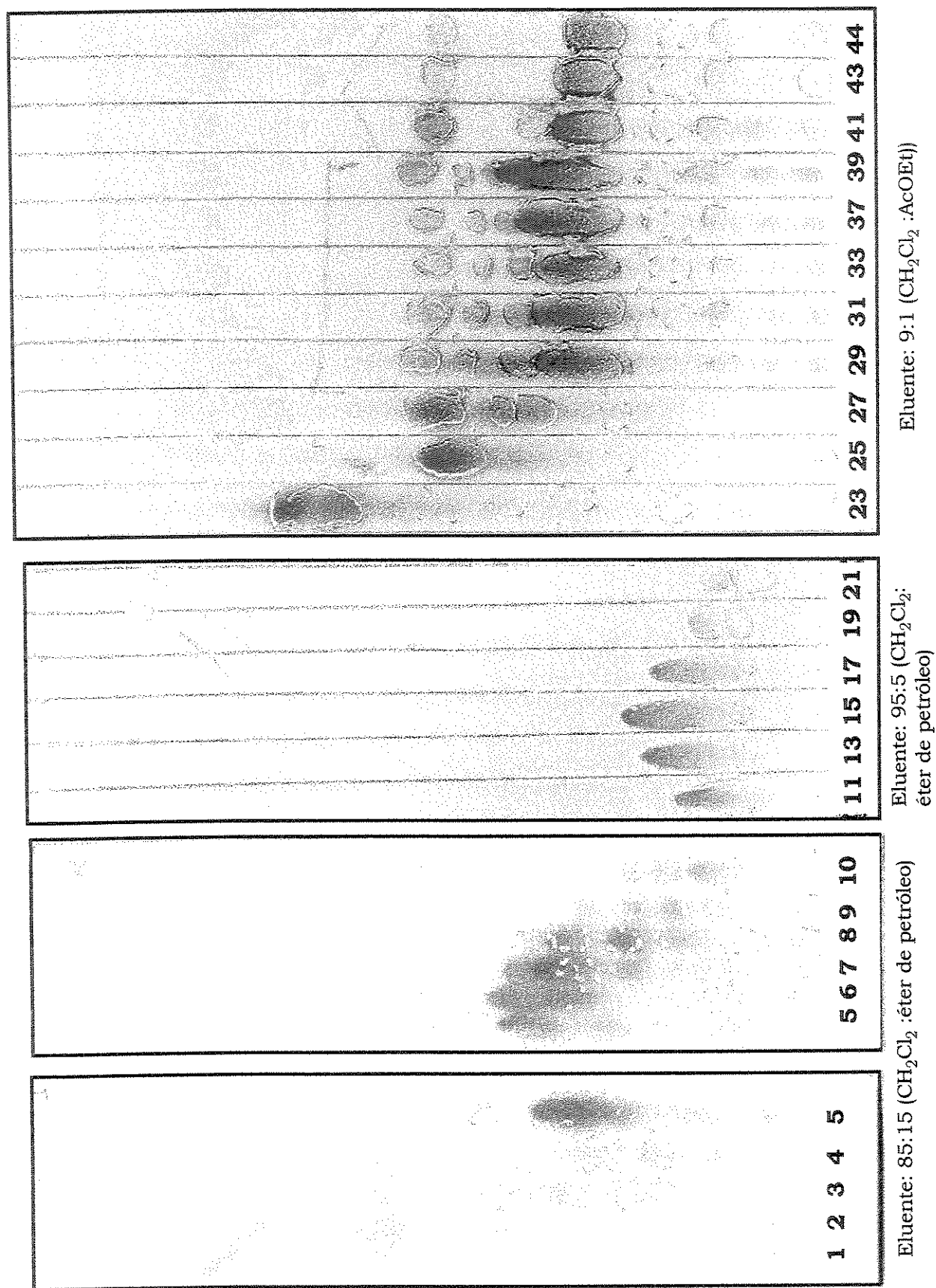
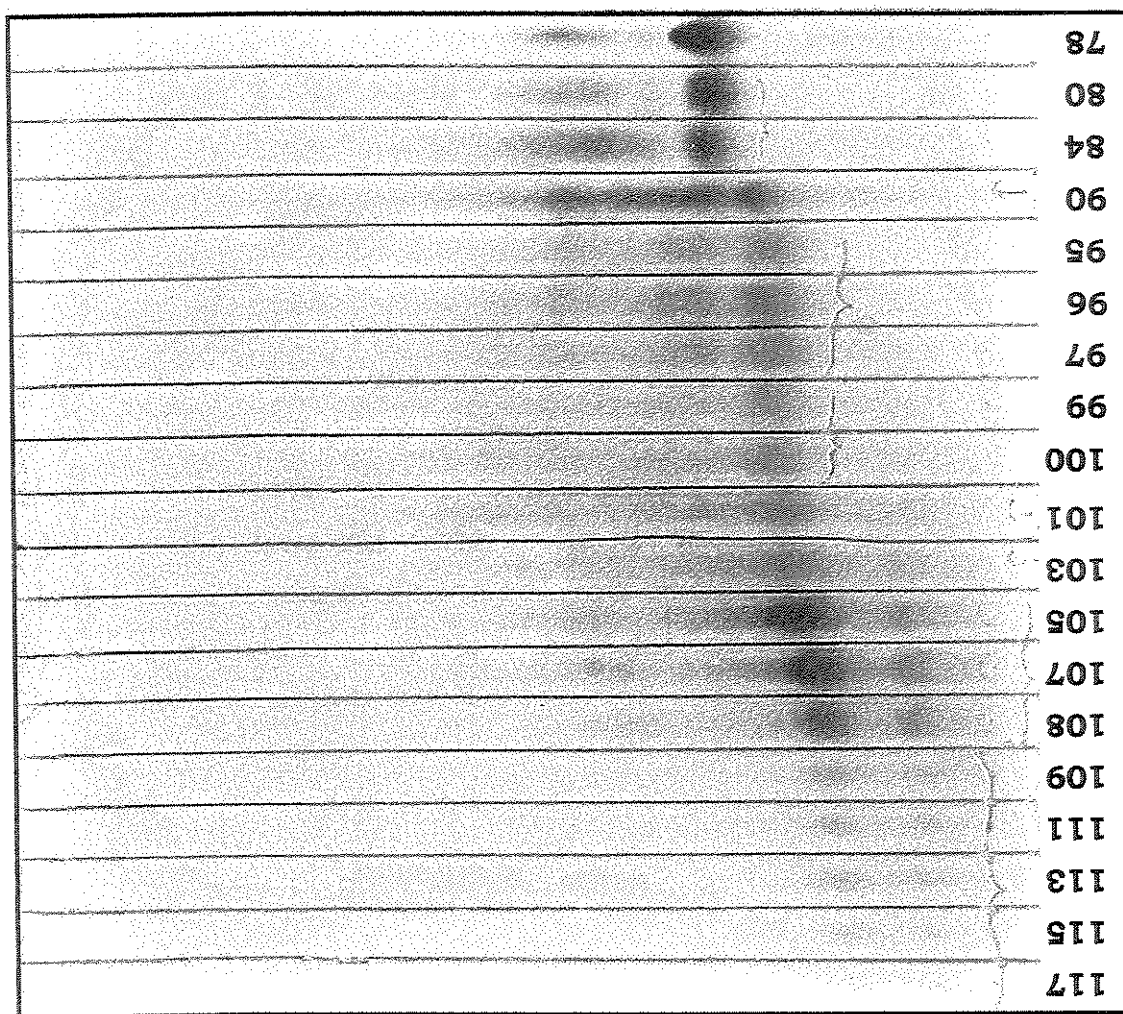
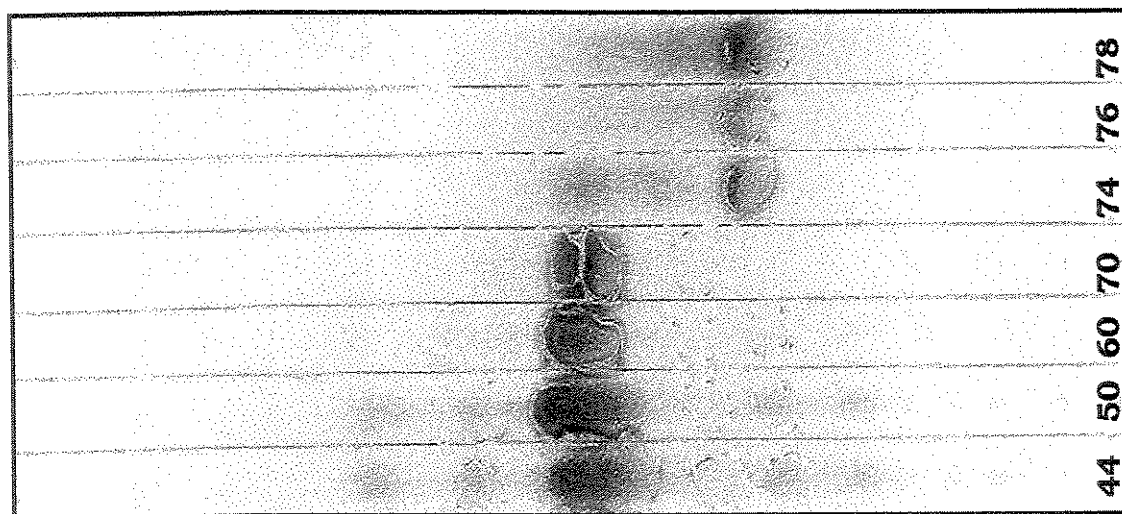


Figura 9- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico

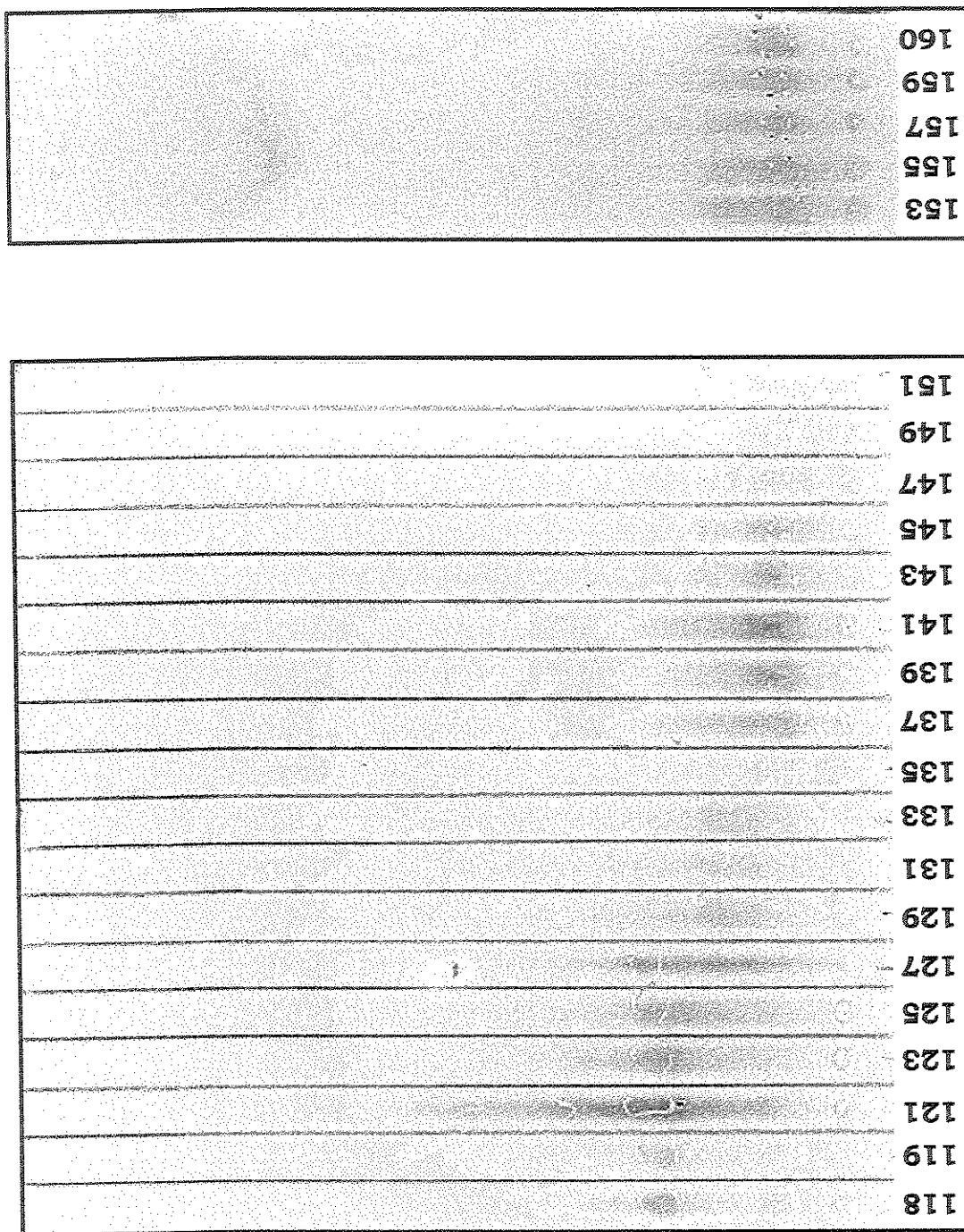


Eluente: 7:3 (CH_2Cl_2 :AcOEt)



Eluente: 8:2 (CH_2Cl_2 :AcOEt)

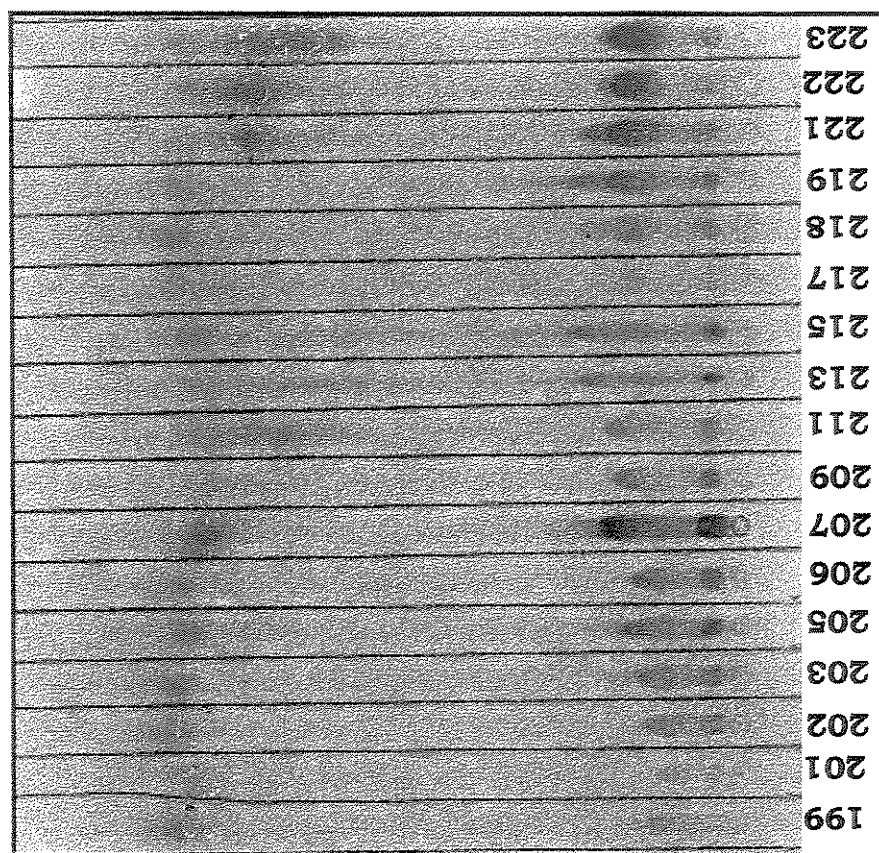
Figura 10- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico



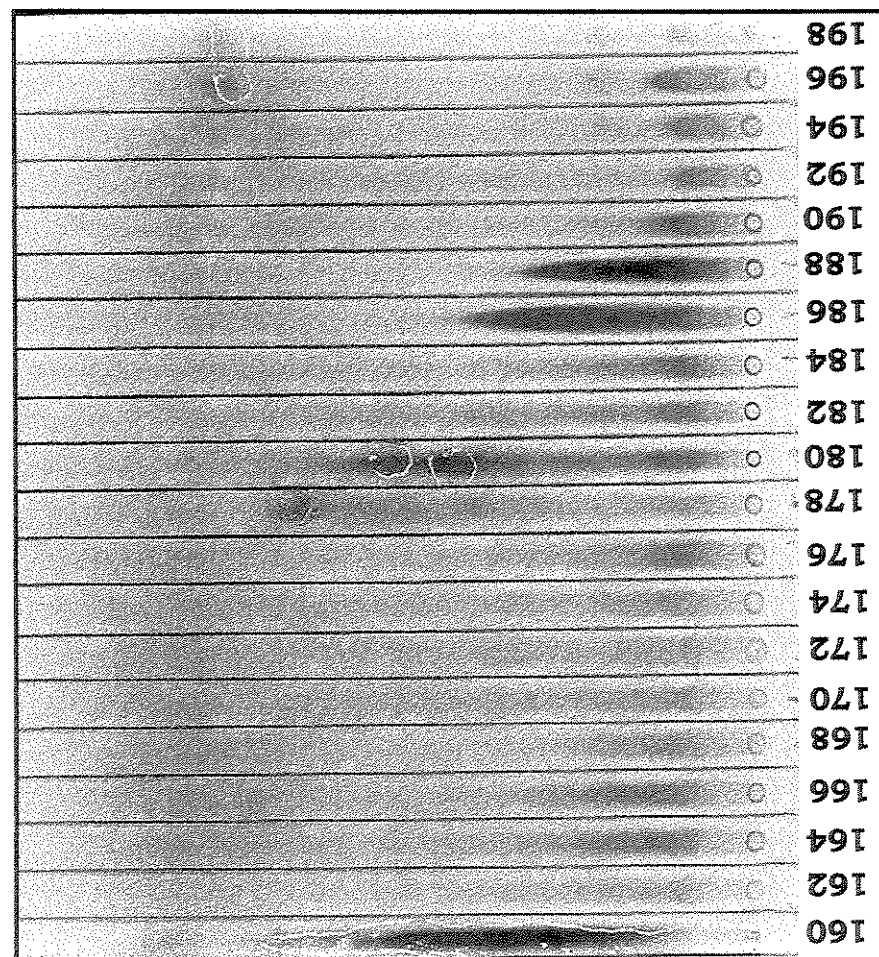
Eluente: 6:4 (CH₂Cl₂: AcOEt)

Eluente: 6:4 (CH₂Cl₂: AcOEt)

Figura 11 - Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico



Eluente: 75:25 (AcOEt: CH_2Cl_2)



Eluente: 6:4 (CH_2Cl_2 :AcOEt)

Figura 12- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico

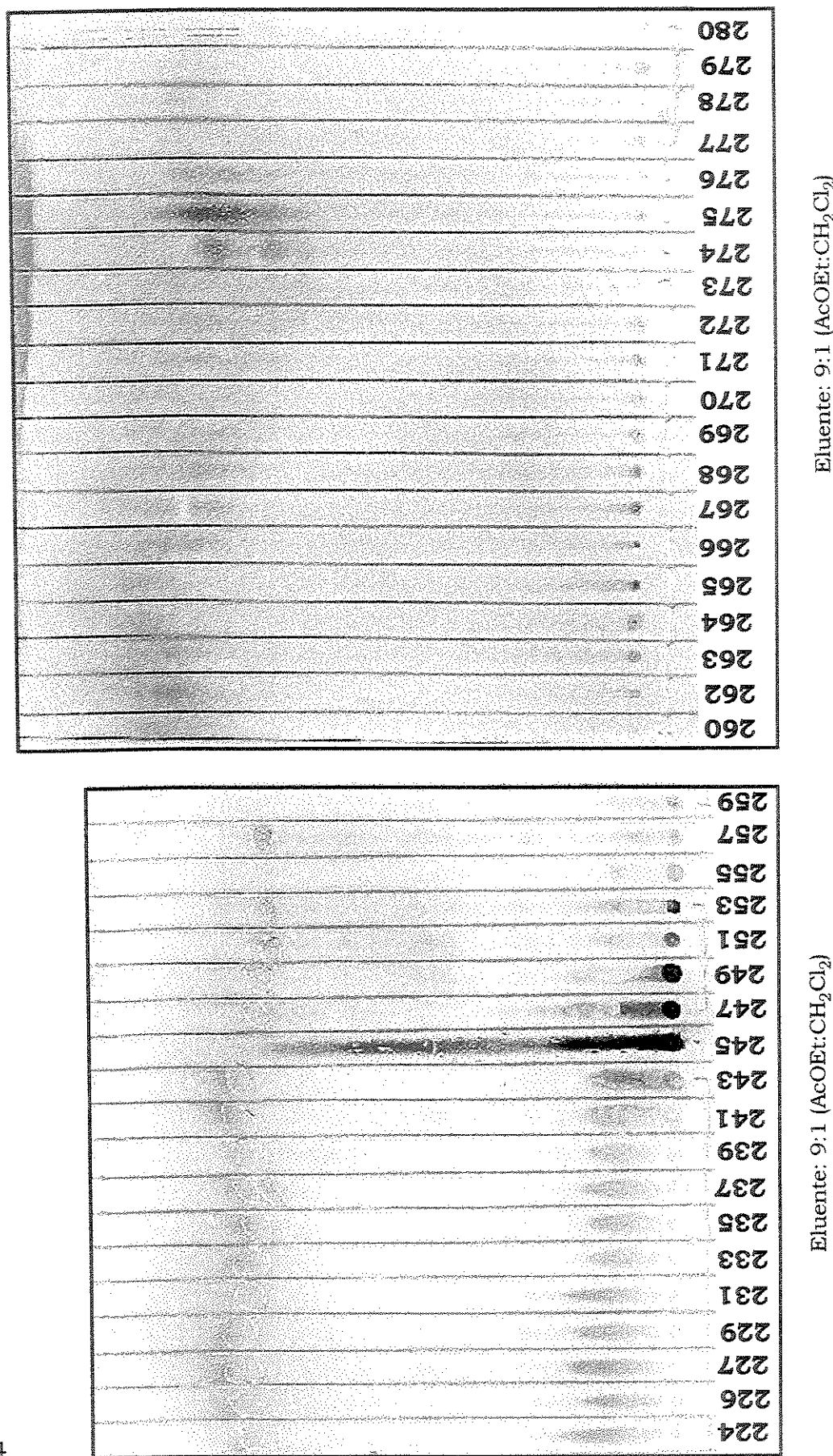
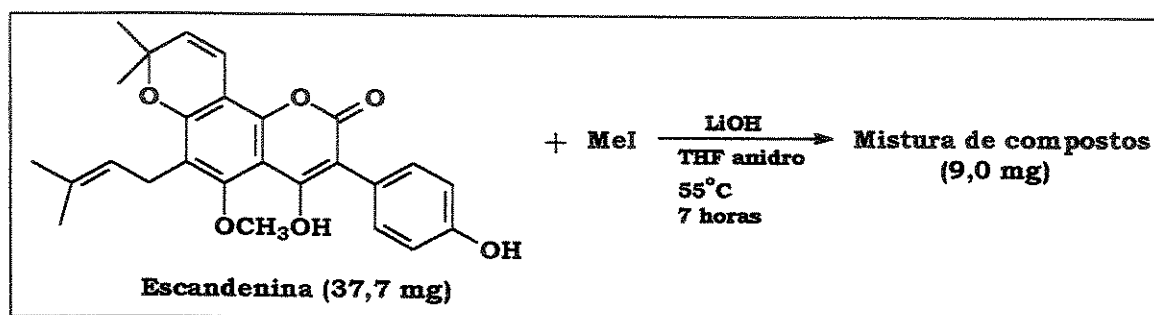


Figura 13- Placas analíticas das frações da segunda coluna do extrato diclorometânico

5.3 Alquilação da escandenina (1)

Em um balão de 1 mL selado com septum de borracha contendo hidróxido de lítio (0,087 mmol) e escandenina (0,087 mmol), foi adicionado, através de uma seringa, tetrahidrofurano (THF) anidro (1mL). Esta solução permaneceu em refluxo sob agitação magnética a uma temperatura de 55° C por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, foi adicionado o iodeto de metila (MeI) (0,3 mmol) com o auxílio de uma seringa, dando continuidade a agitação magnética durante 7 horas. Após atingir a temperatura ambiente, foi adicionado uma solução saturada de cloreto de sódio (5 mL), procedendo a extração com acetato de etila (5 mL, 4x). A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio, filtrada e concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida, fornecendo 9,0 mg de uma mistura de compostos que foi analisada por CG/EM.



5.4 Hidrólise da escandenina (1)

1ª Tentativa: Em um balão de 1 mL; 49,9 mg de escandenina (1) (0,115 mmol) foi dissolvida em uma solução de KOH metanólico (2%) (0,5 mL), que permaneceu em refluxo sob agitação magnética à uma temperatura de 90-100° C por 4 horas, fornecendo um óleo marrom. Após adição de água a mistura reacional foi extraída com CH₂Cl₂.

2ª Tentativa: Tal como na 1ª tentativa, aumentando a concentração da base, isto é, usando uma solução de KOH metanólico 4%.

3ª Tentativa: Observando que a reação de alquilação da escandenina (1), forneceu muitos derivados de desoxibenzoínas metiladas, foi tentado a hidrólise da escandenina (1) (0,105 mmol), nas mesmas condições, isto é, usando LiOH

(0,138 mmol) e THF (1,0 mL). Esta mistura foi mantida em refluxo à uma temperatura de 55° C durante 7 horas.

As três tentativas sempre resultaram na recuperação da escandenina (1).

5.5 Reação de GIBBS

Foi pesado 0,2147 g do reagente de Gibbs (2,6 dicloroquinona clorimida) e dissolvido em 50 mL de metanol.

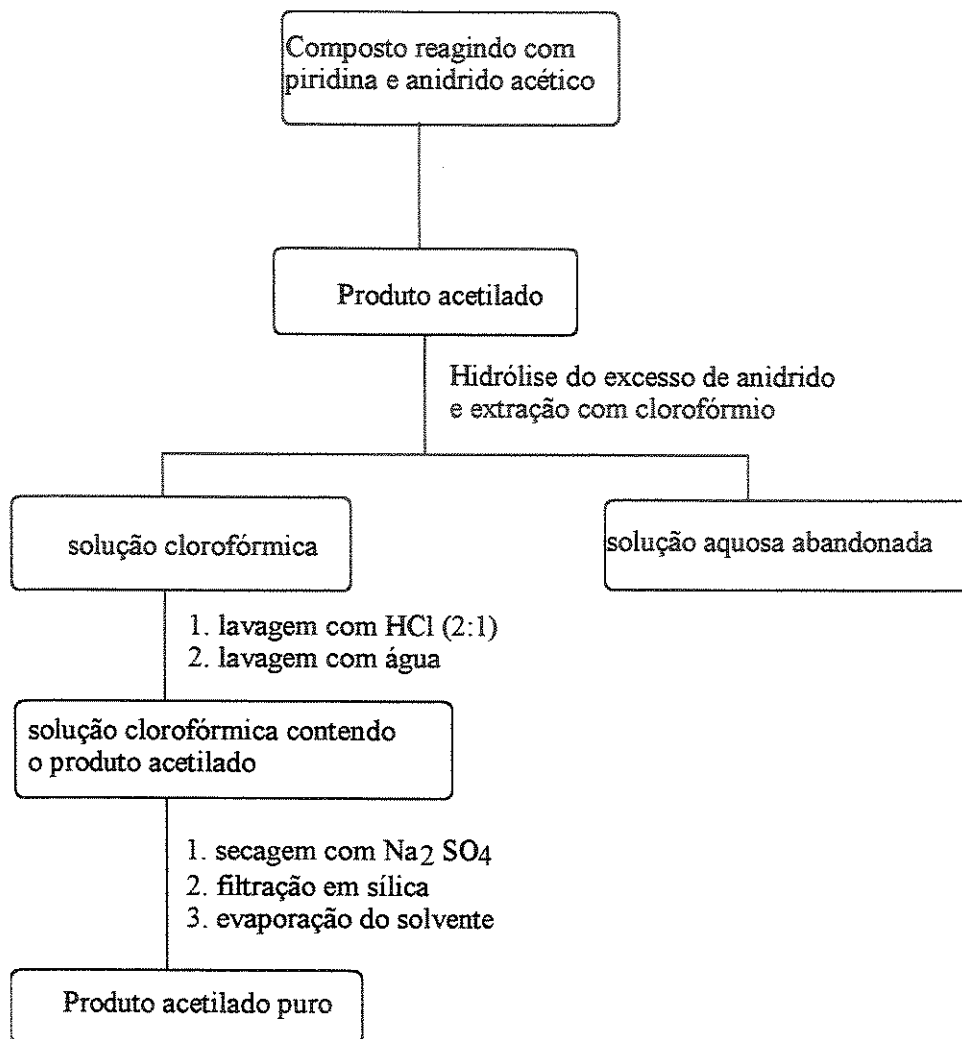
Em uma placa de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foi aplicado quatro frações: a flavanona (4), a mistura das flavanonas (4) e (5), a flavanona lupinifolina (5) e outra fração contendo a flavanona (4).

A placa foi desenvolvida com a mistura de solventes (1:1) Hexano:Éter Etílico e, posteriormente pulverizado com a solução do “Reagente de Gibbs” em metanol.

Para revelação das manchas, a placa foi colocada em uma cuba saturada com vapor de NH₄OH (25%).

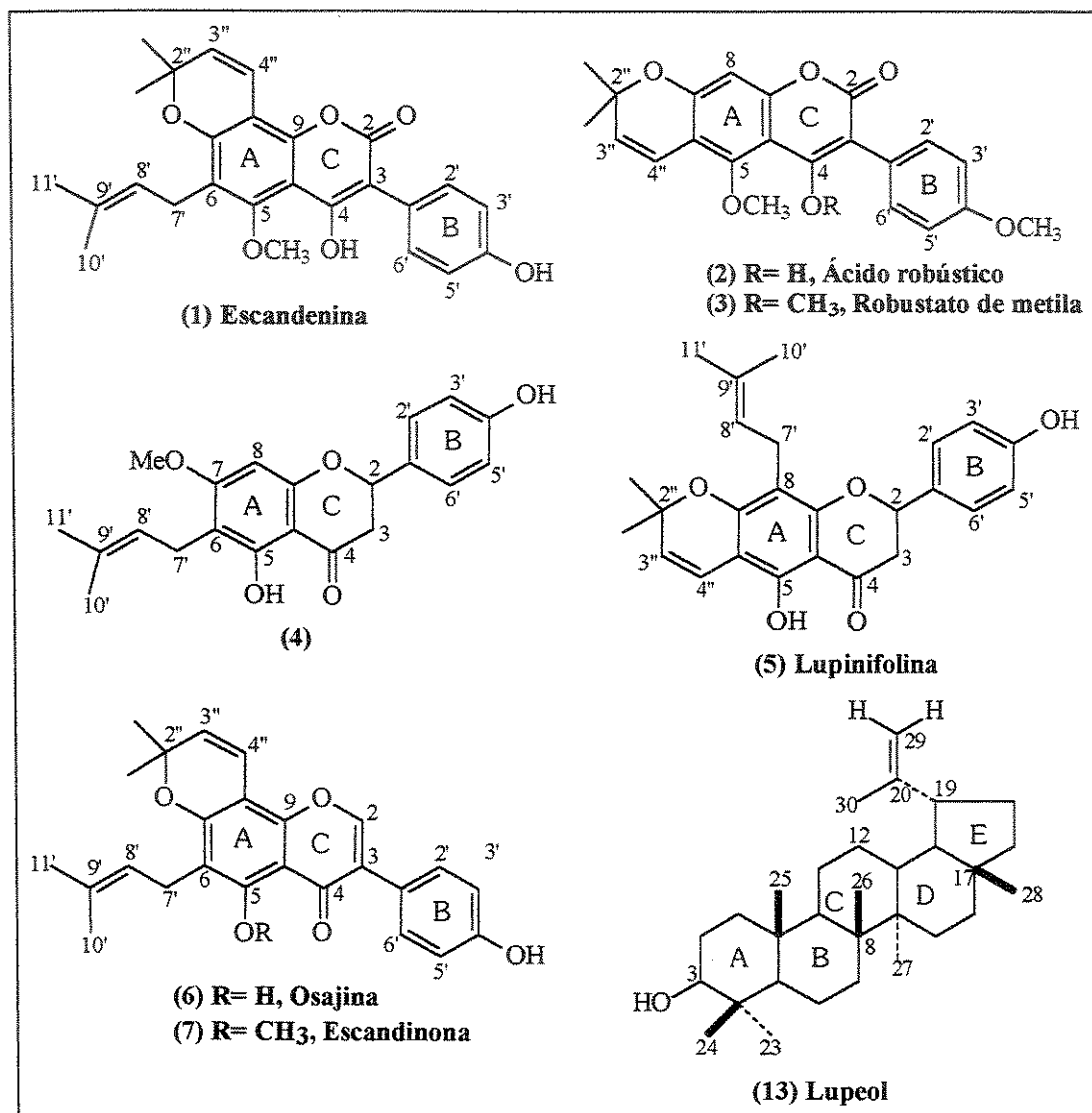
5.6 Acetilação da lupinifolina (5) e osajina (6)

A acetilação da lupinifolina (5) e da osajina (6) seguiu as etapas mostradas no fluxograma 15.

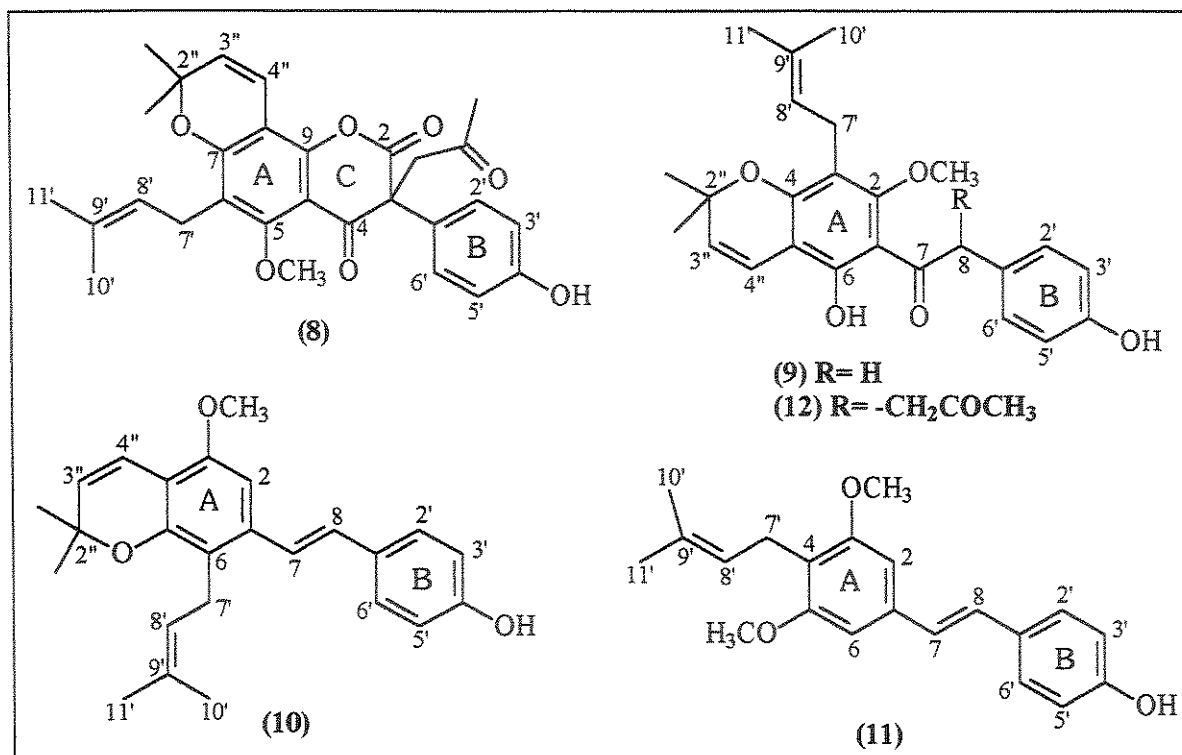
Fluxograma 15- Etapas da Acetilação

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica dos extratos diclorometânico e éter de petróleo das raízes de *Deguelia hatschbachii* levou ao isolamento de 13 substâncias, das quais oito já haviam sido isoladas de outras fontes (Quadro 5) e cinco são inéditas (Quadro 6).



Quadro 5- Substâncias isoladas já conhecidas na literatura



Quadro 6- Substâncias inéditas isoladas

Entre as substâncias isoladas encontramos 4-hidroxi-3-fenilcumarinas (1, 2, 3 e 8), flavanonas (4 e 5), isoflavonas (6 e 7), triterpeno (13), derivados de desoxibenzoínas (9 e 12) e estilbenos (10 e 11).

Analisando comparativamente os três extratos por CCDA, observamos que o extrato diclorometânico era menos complexo e continha substâncias reveladas sob lâmpada UV (254 e 366 nm).

Por isso iniciamos o estudo fitoquímico de *D. hatschbachii* com o fracionamento do extrato diclorometânico em coluna cromatográfica de sílica-gel.

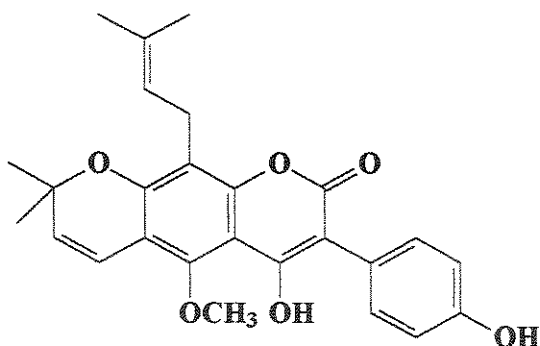
Após análises por CCDA, as frações coletadas da coluna foram agrupadas e selecionadas para subseqüentes purificações por sucessivas cromatografias em camada preparativas analíticas (CCPA).

Analogamente, prosseguimos o estudo do extrato éter de petróleo.

As estruturas moleculares das substâncias isoladas foram caracterizadas através da análise dos respectivos dados espectroscópicos conforme descrito a seguir para cada classe de compostos.

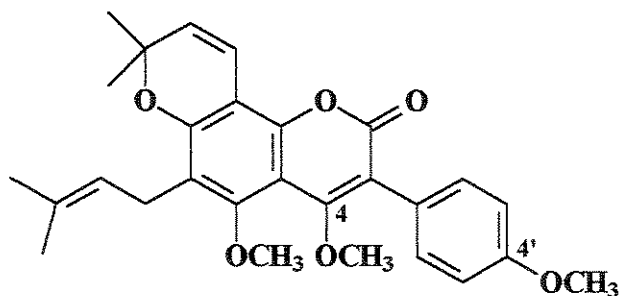
6.1 4-hidroxi-3-fenil cumarinas (1-3 e 8)

O reconhecimento desta classe de isoflavonóides como produtos naturais data de 1966, com o relato da elucidação estrutural do ácido lonchocárpico (14) e da escandenina (1) isolados de *Derris scandens*. Mais tarde, os autores isolaram e caracterizaram o ácido robústico (2) e seu éter metílico (3) de espécies de *Derris robusta*²⁴.



(14, Ácido Lonchocárpico)

As 4-hidroxi-3-fenilcumarinas são constituintes do gênero *Derris* (Dalbergieae) e um novo exemplo (4,4'-dimetoxi escandenina 15) foi relatado pela primeira vez como produto natural a partir de *D. scandens*^{25,26}, embora já conhecido sinteticamente.



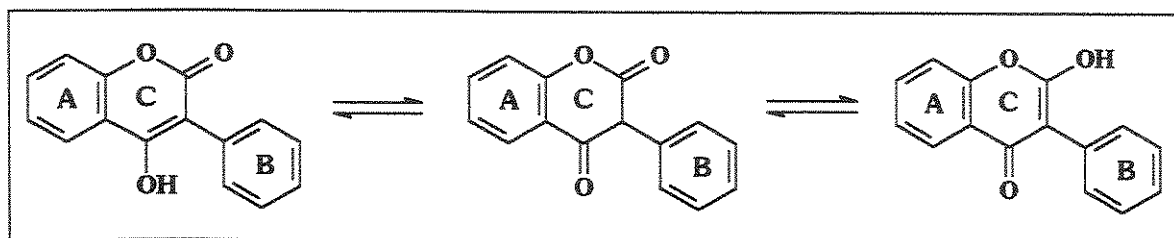
(15)

²⁴ Wong, E. The isoflavonoids. In: Harbone, J.B.; Mabry, T.J. e Mabry, H.; *The Flavonoids*; Academic Press; p. 743-800, 1975.

²⁵ Boland, G. M. e Donnelly, D. M. X., Isoflavonoids and related compounds, *Nat. Prod. Rep.*, 15 (3), p. 241-260, 1998.

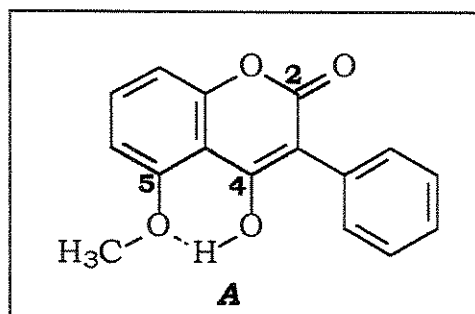
²⁶ Rao, M. N.; Krupadanam, G. L. D. e Srimannarayana, G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. *Phytochemistry*, 37(1), p. 267-269, 1994.

A estrutura das **4-hidroxi-3-fenilcumarinas** é tautomérica com a de 2-hidroxiisoflavona (Quadro 7), que se reflete, *inter alia*, por suas características espectrais no UV $\lambda_{\text{máx}} \cong 230 \text{ nm}$, $\cong 270 \text{ nm}$ e $\cong 350 \text{ nm}$, mais semelhantes àsquelas das cumarinas do que das **isoflavonas**²⁷.



Quadro 7- Tautomerismo das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas

Observações anteriores^{27,28} mostraram que nas 4-hidroxi-3-fenilcumarinas metoxiladas no carbono C-5 predomina a forma “cumárica” sobre a 2-hidroxi isoflavona tautomérica. Isto deve-se a formação de ponte de hidrogênio entre a hidroxila em C-4 e a metoxila em C-5 estabilizando a forma “cumárica” (Quadro 8).

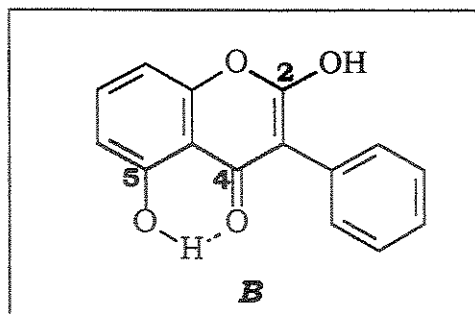


Quadro 8- Formação de ponte de hidrogênio nas 5-metoxi 4-hidroxi-3-fenilcumarina

Analogamente o contrário é observado quando ocorre hidroxilação no carbono C-5 (Quadro 9)

²⁷ Wong, E. The isoflavonoids. In: Harbone, J.B.; Mabry, T.J. e Mabry, H.; *The Flavonoids*; Academic Press; p. 743-800, 1975.

²⁸ Garcia, M.; Kano, M. H. C.; Vieira, D. M.; Do Nascimento, M. C. e Mors, W. B. Isoflavonoids from *Derris spruceana*. *Phytochemistry*, 25(10), p. 2425-2427, 1986.



Quadro 9- Formação de ponte de hidrogênio nas 5-hidroxi 2-hidroxi isoflavona

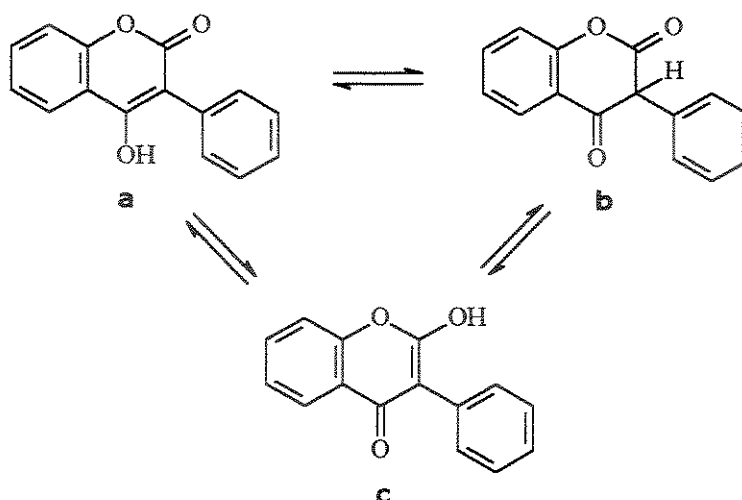
No espectro de RMN ^{13}C ²⁹ das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas, os carbonos C-2 e C-4 absorvem entre δ 160,7-162,7; enquanto C-3 absorve entre δ 102,2-103,9. Para os derivados 4-metoxi-3-fenilcumarinas, o grupo metoxila em C-4 absorve em torno de δ 60,8, como foi observado para 4,4'-dimetoxi escandenina e 4,4'-dimetoxi do ácido lonchocárpico³⁰, enquanto os carbonos C-2, C-3 e C-4 absorvem aproximadamente em δ 161,2; 112,0 e 164,0 respectivamente. Desta forma, metilação do grupo hidroxila no carbono C-4 nestes compostos em comparação com as 4-hidroxi-3-fenilcumarinas exibem deslocamentos para uma região mais desprotegida em aproximadamente 3 e 8 ppm do carbono α (C-4) e carbono β (C-3).

A caracterização das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas pelo espectro de massas, foi mostrado nos estudos feitos por Pelter et al., 1965³¹. Os autores mostraram que a existência da forma **b** (β -dicetona) (Quadro 10), permite a clivagem RDA do anel C (caminho A) (Quadro 11) fornecendo os fragmentos II e III.

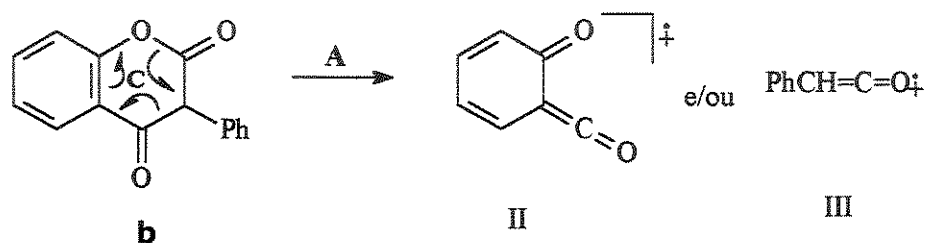
²⁹ Agrawal, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier p. 212, 1989.

³⁰ Subba Raju, K. V.; Srimannarayana, G.; Ternai, B.; Stanley, R. e Markham, K. R. ^{13}C NMR studies of some complex natural oxygen heterocycles. *Tetrahedron*, 37 (5), p. 957-962, 1981.

³¹ Pelter, A.; Stainton, P.; Johnson, A. P. e Barber, M. The mass spectra of oxygen heterocycles I. The 4-hydroxy-3-phenylcoumarins (*iso* Flavonols). *J. Heteroc. Chem.* 2, p. 256-261, 1965.



Quadro 10- Formas tautoméricas das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas

Quadro 11- Clivagem RDA do anel C das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas na sua forma β -dicetona (b)

Dos quatro derivados isolados de *D. hatschbachii*, a escandenina (1) já havia sido isolada de *Derris spruceana*³² e de *Derris scandens*³³, o ácido robústico (2) de *Derris robusta*³⁴, *Derris scandens*³⁵ e de *Millettia thonningii*³⁶ e o robustato de metila (3) de *Derris robusta*³⁴.

³² Garcia, M.; Kano, M. H. C.; Vieira, D. M.; Do Nascimento, M. C. e Mors, W. B. Isoflavonoids from *Derris spruceana*. *Phytochemistry*, 25 (10), p. 2425-2427, 1986.

³³ Clark, E.P. Scandenin- A constituent of the roots of *Derris scandens*. *J. Org. Chem.* 8, p. 489-492, 1943.

³⁴ Johnson, A.P.; Pelter, A. The structure of robustic acid, a new 4-hydroxy-3-phenylcoumarin. *J. Chem. Soc. (C)*, p. 606-612, 1966.

³⁵ Rao, M. N.; Krupadanam, G. L. D. e Srimannarayana, G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. *Phytochemistry*, 37(1), p. 267-269, 1994.

³⁶ Olivares, E.M.; Lwande, W.; Delle Monache, F. e Marini Bettolo, G. B. A pyrano-isoflavone from seeds of *Millettia thonningii*. *Phytochemistry* 21 (7), p. 1763-1765, 1982.

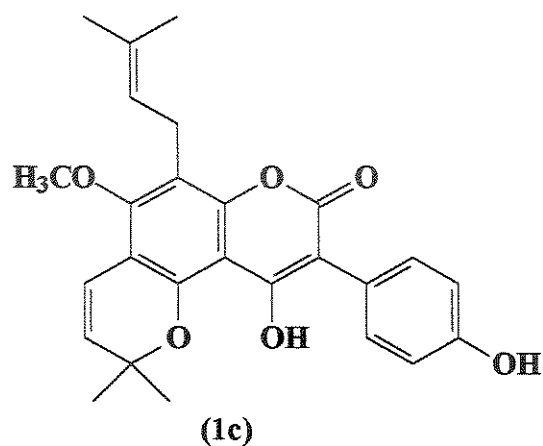
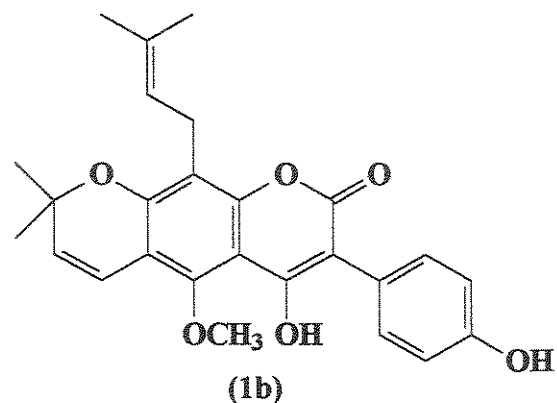
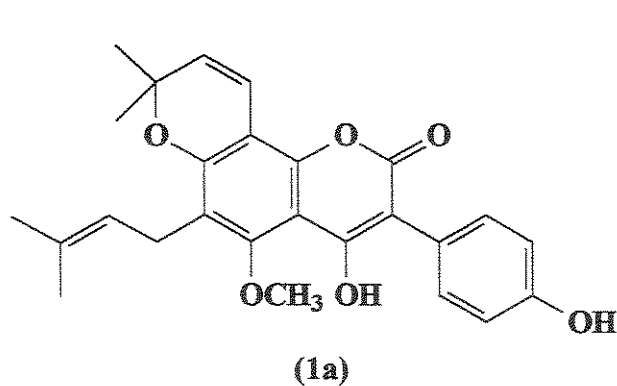
6.1a Escandenina (1)

O espectro de RMN ^1H (Anexo A- E1, Tabela 7) mostra um singlete em δ_{H} 10,21 (1H), que é atribuído a um hidrogênio de uma hidroxila no carbono C-4 característico de 4-hidroxi-3-fenilcumarinas.

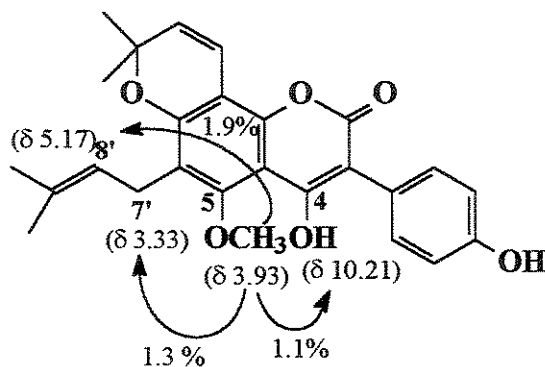
A presença de sinais característicos do anel 2,2-dimetilcromeno [δ_{H} 6,90 (1H; *d*; $J=10,0$ Hz; H-4''); 5,69 (1H; *d*; $J=10,0$ Hz; H-3''); 1,47 (6H, *s*, 2CH₃-2'')]; do grupo 3,3- dimetilalila [δ_{H} 1,79 (3H, *s*, H-10'); 1,71 (3H, *s*, H-11'); 3,33 (2H; *d*; $J=6,7$ Hz; H-7'); 5,17 (1H, *m*, H-8')] de uma metoxila aromática [δ_{H} 3,93 (3H, *s*, 5-OCH₃)], aliado a quatro sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,42 (2H, *d*, H-2' e 6') e δ_{H} 6,89 (2H, *d*, H-3' e 5') com constantes de acoplamento de 8,6 Hz e o singlete largo em δ_{H} 5,17 (1H) indicam respectivamente um anel A totalmente substituído e um anel B aromático *para*- substituído por uma hidroxila.

No espectro de RMN ^{13}C (Anexo A- E2, Tabela 10), os sinais em δ_{C} 160,8 (C=O), δ_{C} 103,5 (C=O) e δ_{C} 162,9 (C=O) são típicos dos carbonos C-2, C-3 e C-4 de um anel C de uma 4-hidroxi-3-fenilcumarina. Os sinais em δ_{C} 131,8 (2CH) e δ_{C} 115,2 (2CH) são atribuídos aos carbonos C-2' e C-6' e C-3' e C-5', comprovando um anel B aromático *para*- substituído. Os demais sinais no espectro apresentaram deslocamentos químicos característicos para o anel 2,2-dimetilcromeno, grupo 3,3- dimetilalila e metoxila aromática (todos ligados ao Anel A) (Tabela 10), que foram confirmados pelos experimentos bidimensionais de ressonância magnética nuclear HETCOR e COLOC (Anexo A- E4 e E5, Tabela 11).

Com estes dados podemos ter três estruturas regioisoméricas possíveis para esta substância (1a, 1b e 1c):



A fusão angular do anel 2,2-dimetilcromeno no Anel A (proposta 1a) foi confirmada pelo experimento de diferença de NOE (Anexo A- E3), uma vez que ao irradiar a metoxila (δ_H 3,93) foi observado um incremento nos sinais dos hidrogênios do grupo 3,3-dimetilalila e também da hidroxila em C-4.

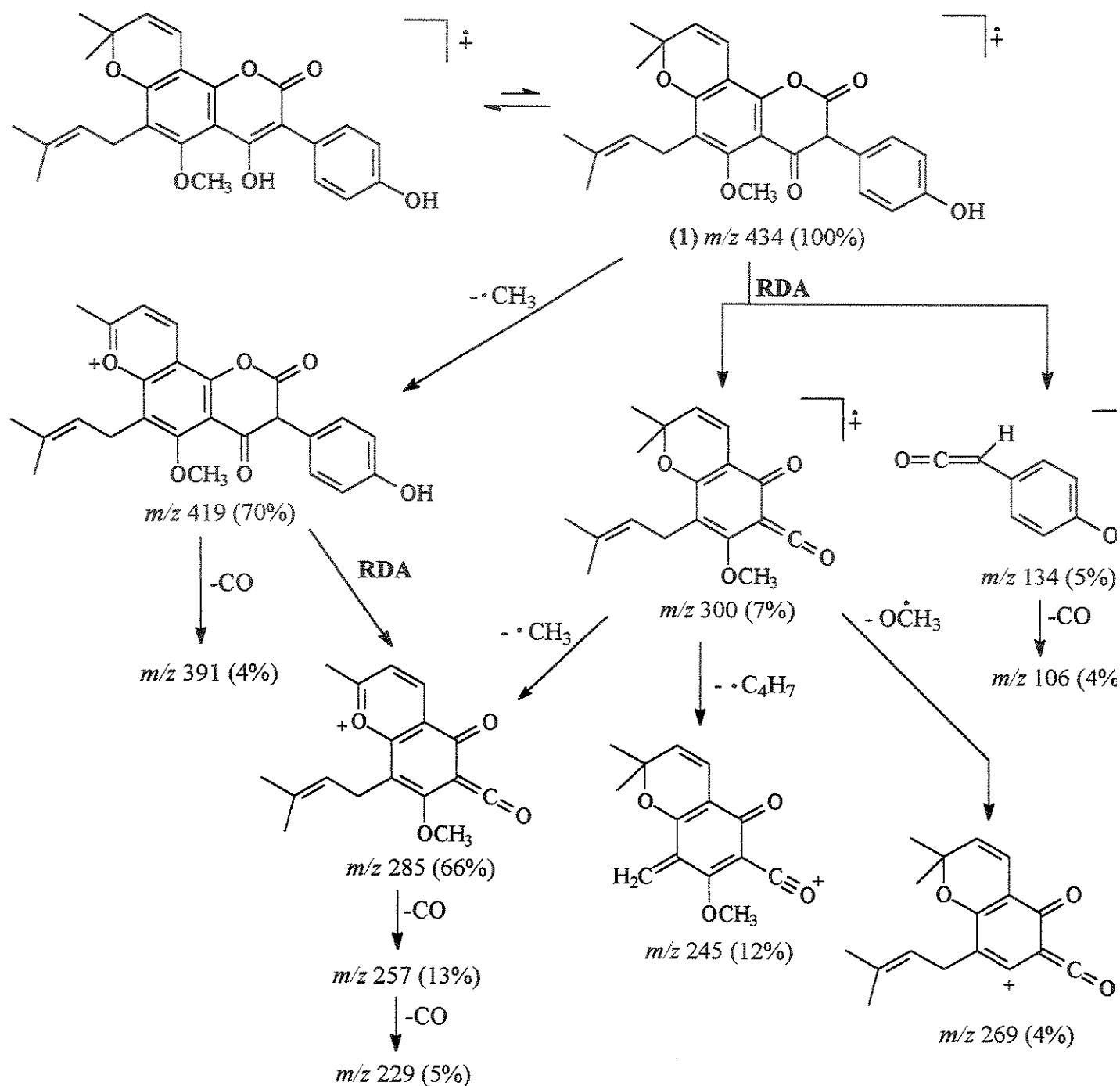


Escandenina (1)

Incrementos observados no experimento de diferença de NOE

O espectro de massas de alta resolução (Anexo A- E7) apresenta o pico do íon molecular $M^{+•}$, de m/z 434,1729 (100%) coerente com a fórmula molecular $C_{26}H_{26}O_6$ ($M = 434,1729$). Baseado nos experimentos EM/EM (Anexo A- E8 a E10) selecionando os íons de m/z 419 [391 (6%), 285 (100%)], m/z 300 [285 (100%), 269 (22%), 257 (48%), 245 (65%), 229 (17%)] e m/z 134 [106 (100%)] sugerimos o caminho de fragmentação mostrado no Quadro 12.

O principal caminho para a quebra do íon molecular (pico base) (Anexo A- E6) envolve a perda de um grupo metila característico de um anel 2,2-dimetilcromeno, formando o cátion de m/z 419 (70%), que sofre uma clivagem do tipo Retro Diels Alder (RDA) do anel C fornecendo os picos de m/z 285 (66) e m/z 134 (5%).



Quadro 12- Proposta de fragmentação da escandenina (1) no espectrômetro de massas

O espectro no UV (Anexo A- E12) mostra a presença de três bandas com máximos de absorções em 241 nm ($\log \epsilon = 4,53$), 289 nm ($\log \epsilon = 4,26$) e 344 nm ($\log \epsilon = 4,34$) compatível para um derivado de uma 4-hidroxi-3-fenilcumarina.

O espectro no IV (Anexo A- E11) apresenta uma absorção a $1680,5\text{ cm}^{-1}$ característica de uma carbonila α - β insaturada, enquanto as absorções em $1630,2$ e $1593,8\text{ cm}^{-1}$ confirmam a presença de anel aromático.

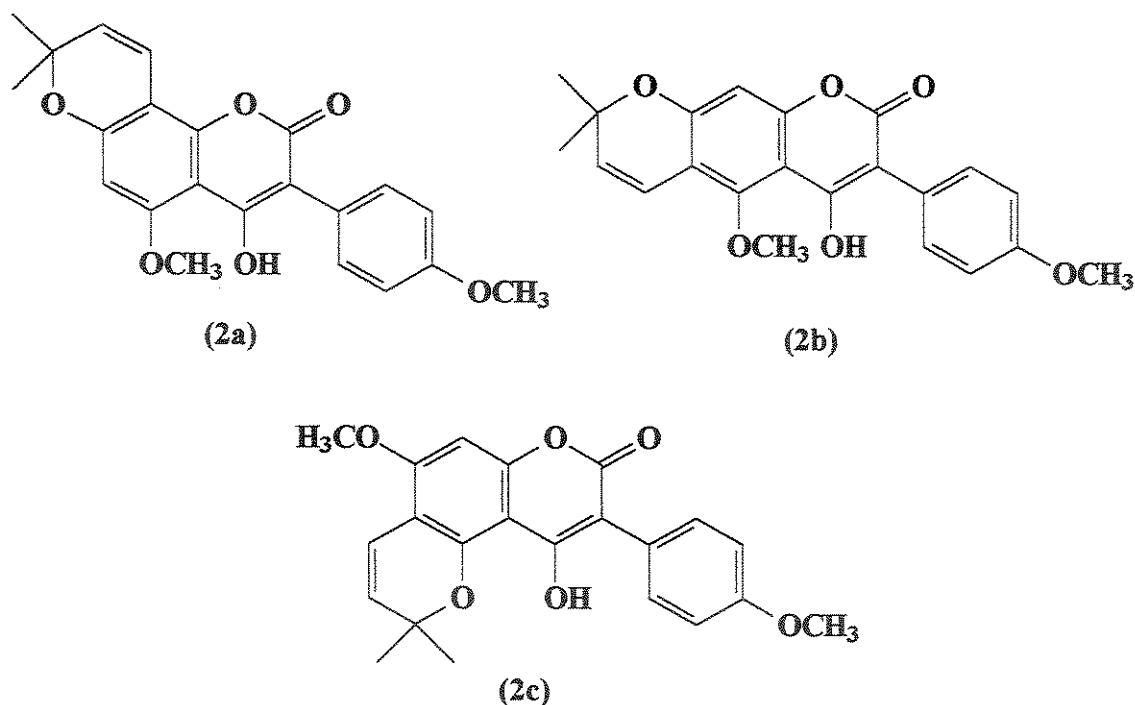
Vale a pena mencionar que a literatura não relata dados de RMN ^1H de 300 MHz, RMN ^{13}C (DEPT 90° e 135°), HETCOR a uma ligação, COLOC, diferença de NOE e Espectro de Massas de Alta Resolução e Experimento EM/EM para a escandenina (1).

6.1b Ácido Robústico (2)

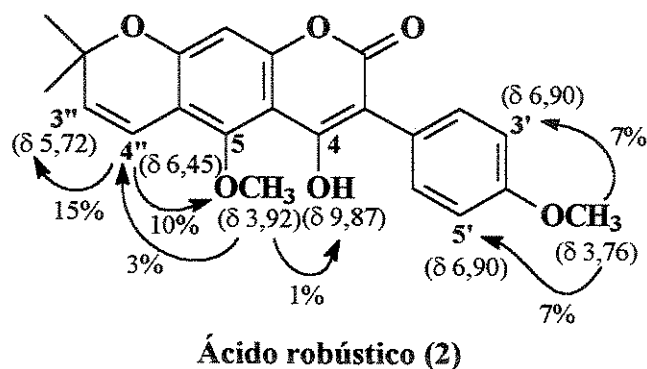
O espectro de RMN ^1H (Anexo A- E13, Tabela 8) desta substância apresentou um singleto em $\delta_{\text{H}} 9,87$ (1H), que tal como na escandenina (1) foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila no carbono C-4 característico de 4-OH-3-fenil cumarinas. Dois dubletos centrados em $\delta_{\text{H}} 7,41$ (2H, *d*, $J = 8,9\text{ Hz}$) e $\delta_{\text{H}} 6,90$ (2H, *d*, $J = 8,9\text{ Hz}$) evidenciam a presença de um anel B aromático *para*-substituído, enquanto o anel 2,2-dimetilcromeno foi caracterizado pelo singleto em $\delta_{\text{H}} 1,42$ (6H) referente as duas metilas em C-2", pelo dubleto $\delta_{\text{H}} 5,72$ (1H; $J = 10,1\text{ Hz}$) relativo ao hidrogênio H-3" e pelo duplo dubleto em $\delta_{\text{H}} 6,45$ (1H; $J = 10,1$ e $0,7\text{ Hz}$) relativo ao hidrogênio H-4", que além de acoplar com H-3" ($^3J = 10,1\text{ Hz}$), acopla com um hidrogênio aromático do anel A ($^5J = 0,7\text{ Hz}$, acoplamento a longa distância), que absorve em $\delta_{\text{H}} 6,57$ (1H; *d*; $J = 0,7\text{ Hz}$).

Os dois singletos intensos em $\delta_{\text{H}} 3,92$ (3H) e $\delta_{\text{H}} 3,76$ (3H) indicam duas metoxilas aromáticas.

Com estes dados podemos ter três estruturas regioisoméricas possíveis para esta substância (2a, 2b e 2c):



Para determinar a posição dos grupos ligados ao Anel A, foi realizado o experimento de diferença de NOE (Anexo A- E15 a E17). Irradiando as metoxilas (separadamente), foi possível, não somente diferenciá-las, como observar que uma delas (δ_H 3,92) provoca um aumento significativo no sinal de H-4'' (3%) e do hidrogênio da hidroxila em C-4 (1%), enquanto que a outra (δ_H 3,76) provoca apenas um aumento nos sinais de H-3' e H-5' (7%). Estes dados estão de acordo com o esperado para o ácido robústico (**2b=2**).



Incrementos observados no experimento NOE

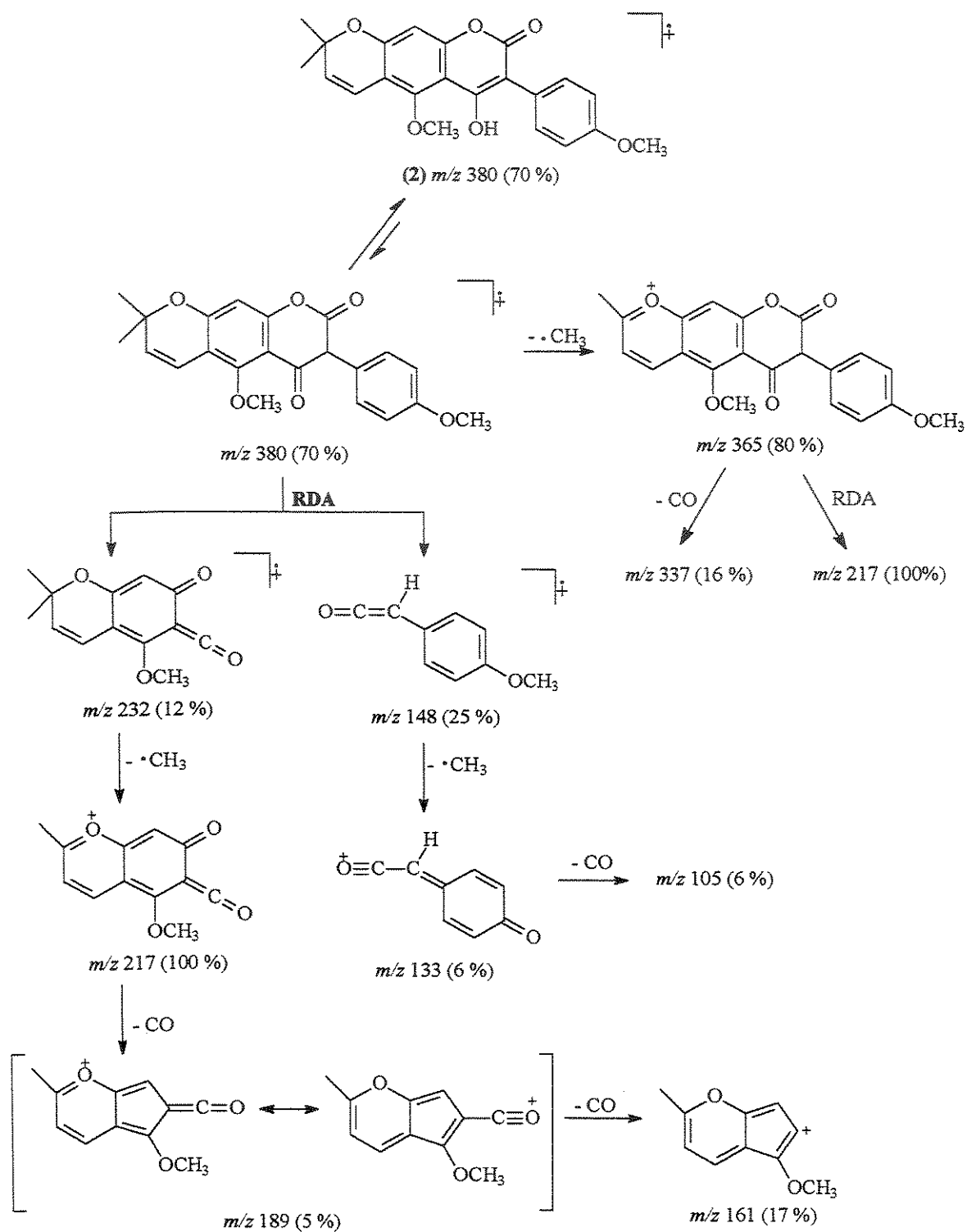
No espectro de RMN ^{13}C (DEPT) (Anexo A- E14, Tabela 10) observamos os sinais em δ_c 160,1; δ_c 103,3; δ_c 162,6 e δ_c 101,7 relativos aos carbonos C-2, C-3, C-4 e C-8, respectivamente. Os demais sinais apresentam-se coerentes com os dados da literatura para o ácido robústico³⁷.

O espectro no UV (Anexo A- E21) também mostrou perfil esperado para uma 4-hidroxi-3-fenilcumarina, com máximos de absorções em 230 nm ($\log \epsilon = 4,52$); 258 nm ($\log \epsilon = 4,45$) e 332 nm ($\log \epsilon = 4,17$). No espectro no IV (Anexo A- E20) destacam-se as bandas referentes a uma O-H ν 3263,9 cm^{-1} , C=O ν 1715,2 e anel aromático ν 1626,9 e 1573,9.

No espectro de massas (Anexo A- E18) os picos mais intensos referem-se ao íon molecular M^+ , de m/z 380 (70%) e ao íon de m/z 217 (100%), o pico base, que pode ser formado conforme a proposta de fragmentação mostrada no Quadro 13.

O espectro de massas de alta resolução (Anexo A- E19) apresenta o pico do íon molecular M^{+} , de m/z 380,1259 coerente com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ($M = 380,1259$).

³⁷ Khalid, S. A. and Waterman, P. G. Thonningine-A and thonningine-B: two 3-phenylcoumarins from the seeds of *Millettia thonningii*. *Phytochemistry* 22 (4), p. 1001-1003, 1983.



Quadro 13- Proposta de fragmentação do ácido robústico (2) no espectrômetro de massas

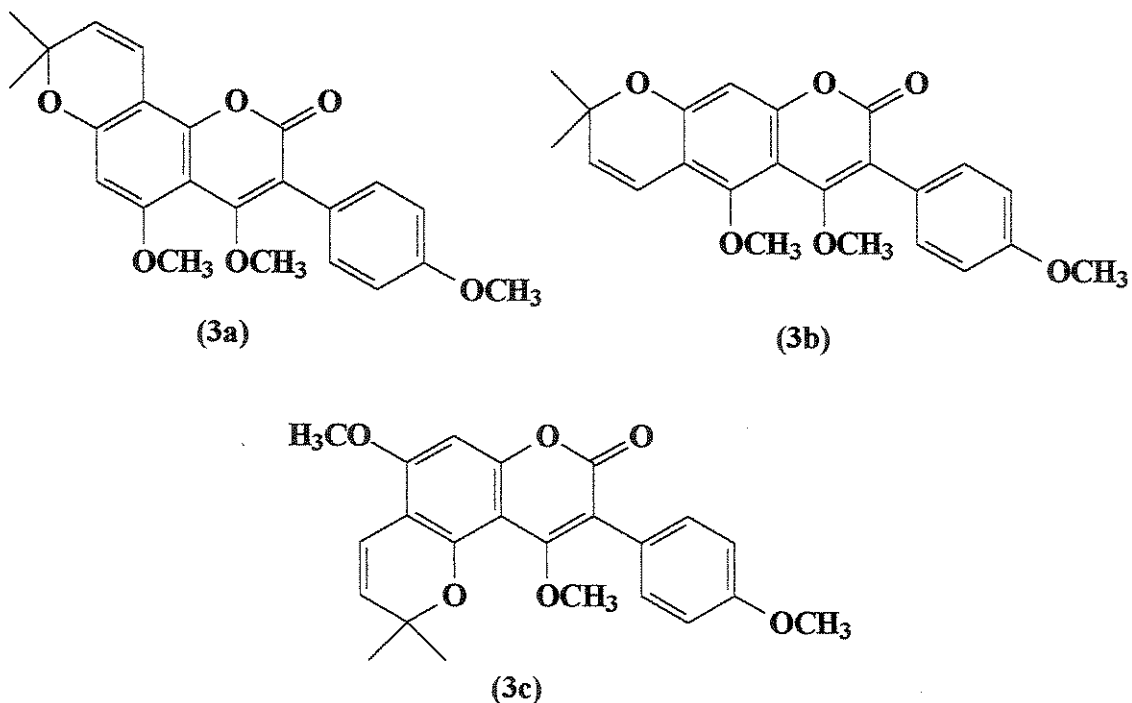
Para o ácido robústico estamos acrescentando dados espectrais, ainda não relatados na literatura, de RMN ^{13}C de 75 MHz (DEPT 90° e 135°), diferença de NOE e Espectro de Massas de Alta resolução.

6.1c Robustato de metila (3)

O espectro de RMN ^1H (Anexo A- E22, Tabela 9) deste composto é muito semelhante ao do ácido robústico, exceto pela ausência de absorção em δ_{H} 9,87 (s, 1H) relativo a um hidrogênio bastante ácido de um grupo hidroxila no carbono C-4 característico de 4-hidroxi-3-fenilcumarinas.

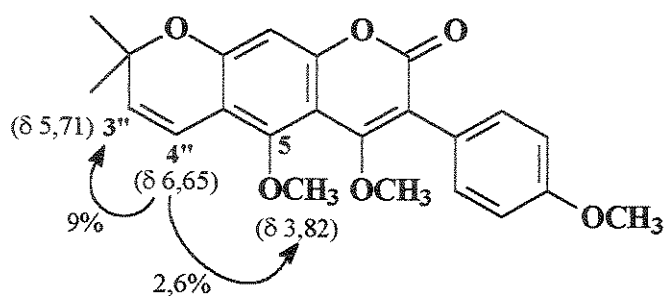
Por outro lado, neste espectro observamos a presença de mais um singlete [δ_{H} 3,56 (3H)] atribuído a uma metoxila, sugerindo tratar-se do derivado metilado do ácido robústico, o qual foi confirmado pelo espectro de RMN ^{13}C (Anexo A- E23, Tabela 10), uma vez que foi observado a presença de mais um sinal na região de absorção de metoxilas [δ_{C} 61,3 (CH_3)].

Com isso, podemos ter três estruturas regioisoméricas possíveis para esta substância (3a, 3b e 3c):



No espectro de RMN ^{13}C desta substância (Anexo A-E23), a presença dos sinais em δ_c 55,3 atribuído a metoxila em C-4', δ_c 61,3 atribuído a metoxila em C-4, e outro em δ_c 63,4; descartam as propostas estruturais 3a e 3c, pois quando uma metoxila aromática tem suas duas posições *orto* substituídas, seu sinal no espectro de RMN ^{13}C aparece acima de δ_c 60,0. Desta forma o sinal em δ_c 63,4 só pode ser referente a uma metoxila em C-5 (proposta 3b).

Aliado a isso, a proposta estrutural 3b pôde ser também confirmada pelo experimento de diferença de NOE (Anexo A- E 24), uma vez que a irradiação do H-4" provocou incremento nos sinais da metoxila em C-5 e no H-3".



Robustato de metila (3)

Incrementos observados pelo experimento de diferença de NOE

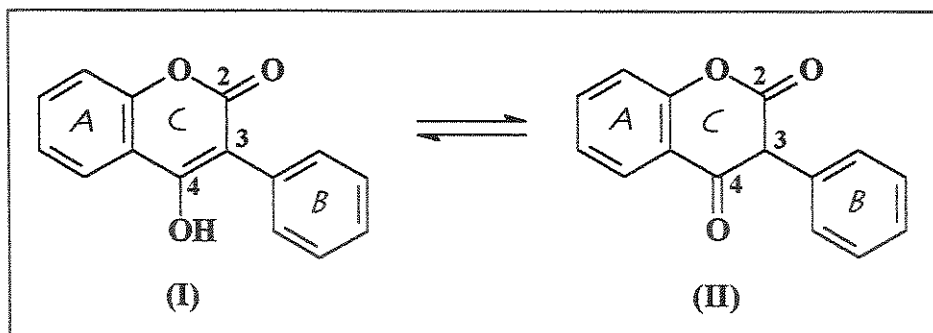
A tabela 12 mostra as correlações observadas no espectro bidimensional COSY (Anexo A- E25).

O espectro no UV (Anexo A- E29) também mostrou perfil esperado para uma 4-hidroxi-3-fenilcumarina, com máximos de absorções em 230 nm ($\log \epsilon = 3,87$); 267 nm ($\log \epsilon = 3,87$) e 349 nm ($\log \epsilon = 3,64$). No espectro no IV (Anexo A- E28) destacam-se as bandas referentes a uma $\text{C}=\text{O}$ ν 1709,5 e anel aromático ν 1601,7 e 1558,3.

O espectro de massas de alta resolução (Anexo A- E27) apresenta o pico do íon molecular M^+ , de m/z 394,1416 coerente com a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$ ($\text{M} = 394,1416$).

O espectro de massas (Anexo A- E26) desta substância apresenta principalmente o pico do íon molecular M^+ , de m/z 394 (33%) e o pico base de m/z 379 (100%) resultante da perda de um radical metila. É interessante

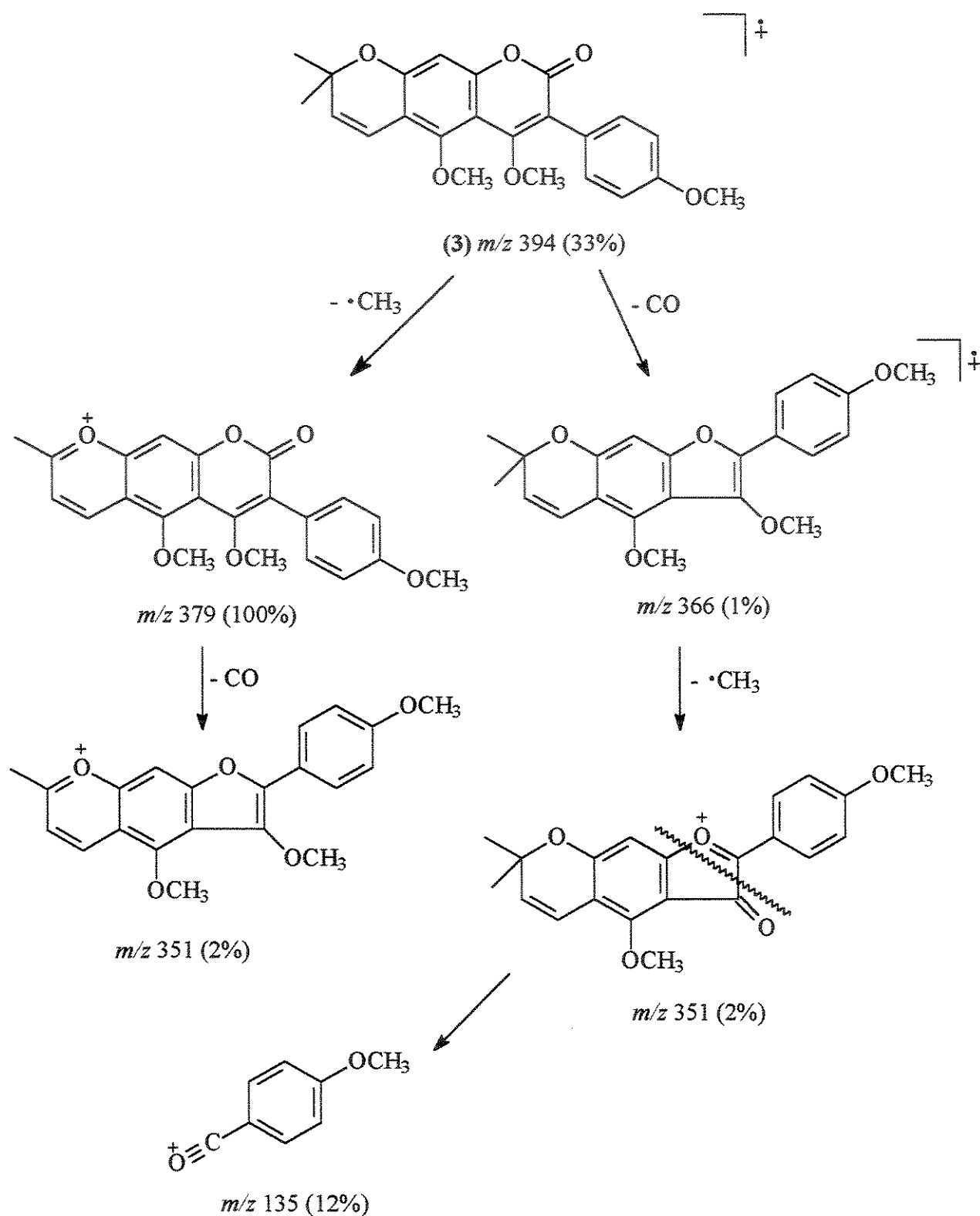
menção que os picos referentes aos fragmentos vindos da clivagem RDA do anel C não são observados, uma vez que a presença de uma metoxila no lugar de uma hidroxila no carbono C-4 deste derivado, impede a formação da β -dicetona (II) (Quadro 14) responsável pela fragmentação do anel C, via clivagem RDA, muito comum nos derivados de 4-OH-3-fenilcumarinas, como observado para a escandenina (1) e ácido robústico (2) (Quadros 12 e 13).



Quadro 14- Tautomerismo das 4-OH-3-fenilcumarinas

Através destas observações e dados da literatura³⁸ pudemos propor o caminho de fragmentação mostrado no Quadro 15.

³⁸ Pelter, A.; Stainton, P.; Johnson, A. P. e Barber, M. The mass spectra of oxygen heterocycles I. The 4-hydroxy-3-phenylcoumarins (iso Flavonols). *J. Heteroc. Chem.* 2, p. 256-261, 1965.



Quadro 15- Proposta de fragmentação do robustato de metila (3) no espectrômetro de massas

Para o robustato de metila estamos incluindo os dados espectrais, ainda não relatados na literatura, de RMN ^1H (300 MHz), RMN ^{13}C (75 MHz) (DEPT 90° e 135°), COSY, diferença de NOE e espectro de massas de baixa e alta resolução.

6.1d Novo derivado da escandenina alquilada no carbono C-3 (8)

O espectro de massas de alta resolução do composto **8** (Anexo A- E47) mostra o íon molecular $[\text{M}]^+$ de m/z 490,1989; correspondendo à fórmula $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_7$ (calculada M^+ 490, 1991).

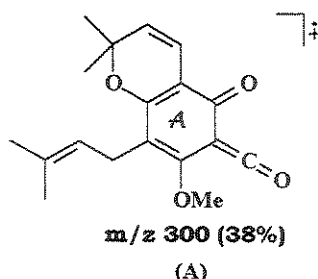
Os dados de RMN ^1H e ^{13}C (Anexo A- E30 e E31, Tabelas 13 e 14) indicam que os anéis A e B são tais como na escandenina (1), através das absorções características do grupo 3,3-dimetilalila, do anel 2,2-dimetilcromeno, do anel aromático *para*-substituído e de uma metoxila aromática. Por outro lado, um sinal correspondendo a um hidrogênio de uma hidroxila em C-4, como na escandenina (1), não foi observado.

O que nos chama a atenção neste espectro é o desdobramento do sinal dos hidrogênios H-7' do grupo 3,3-dimetilalila pois no espectro de RMN ^1H da escandenina (1) (Anexo A- E1) esses hidrogênios apresentam-se como um dubleto ($J = 6,7$ Hz) centrado em δ_{H} 3,33; enquanto no composto **8** estes hidrogênios aparecem, cada um, como um duplo dubleto, centrados em δ_{H} 3,27 e 3,21 com constantes de acoplamento igual a $J = 13,9$ e $7,2$ Hz. Estas observações, aliado à presença de dois dubletos, um centrado em δ 3,87 e outro em δ 3,53, com constantes de acoplamento de 18,1 Hz atribuídos a um CH_2 diastereotópico (C-11), indicam tratar-se de um composto contendo um centro estereogênico, o que foi confirmado pela medida de sua rotação óptica ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +6,16$; c 0,0138 g/mL). Um singleto, integrando para 3H, em δ 2,20 foi atribuído à uma metila de uma metilcetona ou acetato.

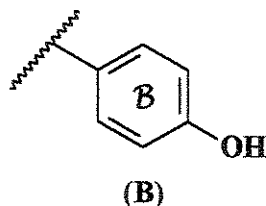
O espectro de RMN ^{13}C , juntamente com o experimento DEPT 135° e 90° (Anexo A- E31), mostrou a presença de 6 CH_3 , 2 CH_2 , 7 CH e 14 C_o . Entre os 14 C_o , dois sinais aparecem na região de carbono sp^3 , um em δ 78,3 atribuído ao carbono C-2" do anel 2,2-dimetilcromeno e outro em δ 62,1 que provavelmente

corresponde a um carbono tetrassubstituído do anel C; três sinais típicos de carbonilas em δ 206,0; 187,6 e 169,1 correspondendo respectivamente a uma alquil cetona, uma cetona α,β insaturada e uma cetona de um acetato fenílico, as quais foram reforçadas pelas intensas absorções em $\nu_{\text{máx}}$ 1704,0; 1681,8 e 1770,6 cm^{-1} no espectro no IV (Anexo A- E52).

Outra evidência de um anel A como da escandenina (1), é a presença do íon de m/z 300 (38%), no espectro de massas (Anexo A- E46), referente ao fragmento (A), originado de uma clivagem Retro Diels Alder do anel C.

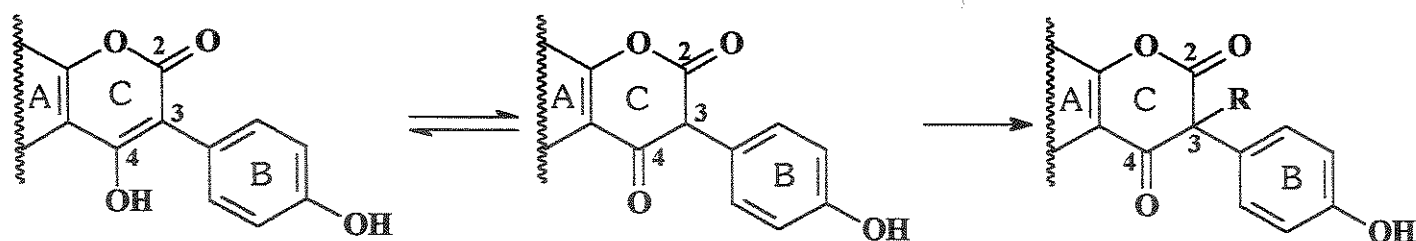


Ao contrário do obtido para a escandenina (1), um pico de m/z 190 (5%) foi observado no lugar do pico de m/z 134 relativo ao fragmento incluindo o anel B (B), sugerindo que no composto **8** o fragmento correspondente tem mais 56 u.m.a. e deve estar ligado ao carbono C-3.

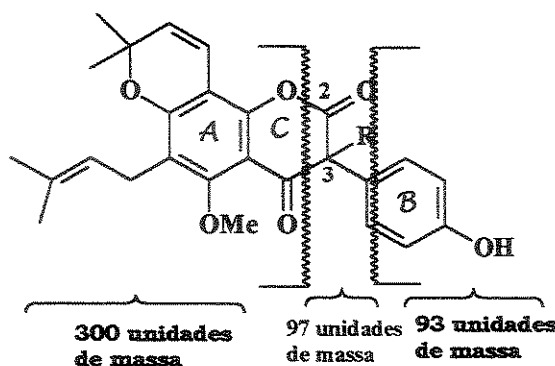


Da mesma forma, os espectros no UV (Anexo A- E53) desta substância comparada a da escandenina (1) (Anexo A- E12), também diferiram. Enquanto a escandenina apresentou três bandas de absorção [λ = 241 nm ($\log \epsilon$ = 4,53); λ = 289 nm ($\log \epsilon$ = 4,26); λ = 344 nm ($\log \epsilon$ = 4,34)], esta nova substância apresenta uma banda intensa no λ = 257 nm ($\log \epsilon$ = 4,55), e outra de menor intensidade no λ = 305 nm ($\log \epsilon$ = 4,06), sugerindo a não conjugação entre os dois anéis.

Então, a estrutura da substância **8** difere da escandenina (1) pela presença de um grupo R ligado ao carbono C-3 (estereogênico) no anel C, como mostra a sequência a seguir:



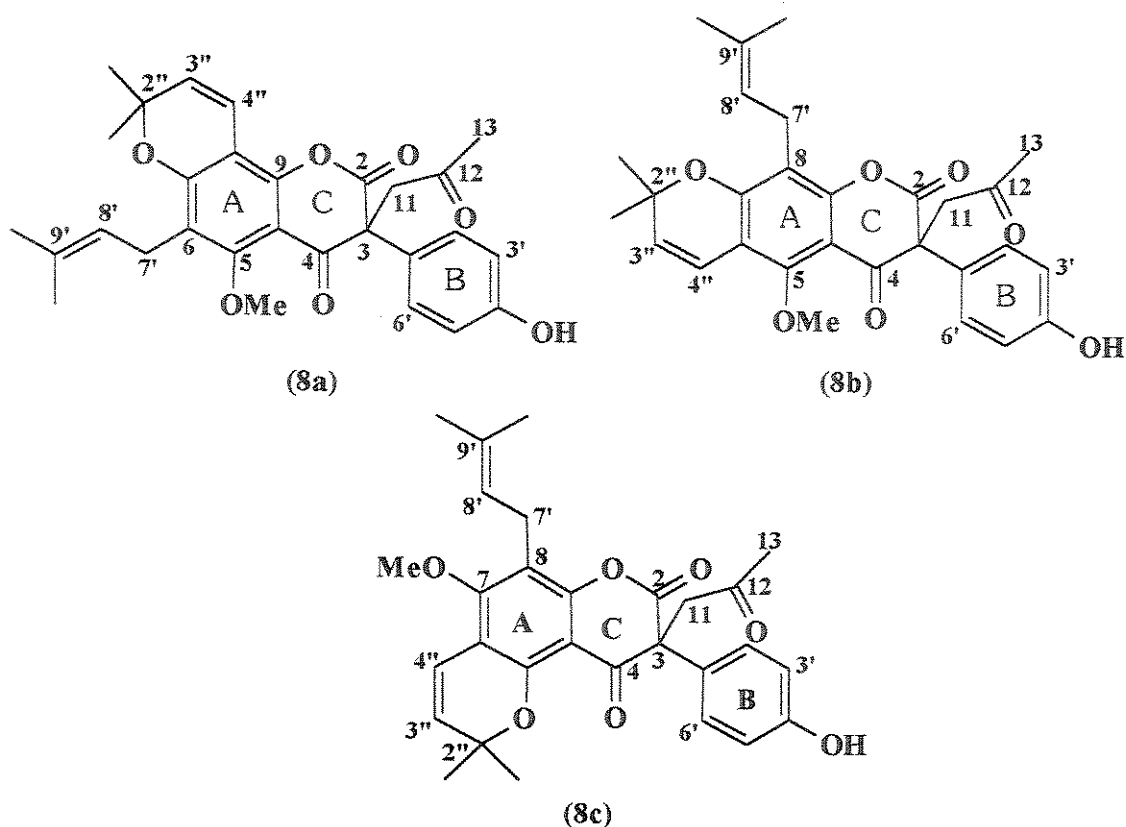
Assim, somando os fragmentos (A) e (B) temos 393 u.m.a., restando então 97 u.m.a., que devem estar distribuídas entre o grupo R em C-3 e uma parte do anel C, como ilustrado abaixo:



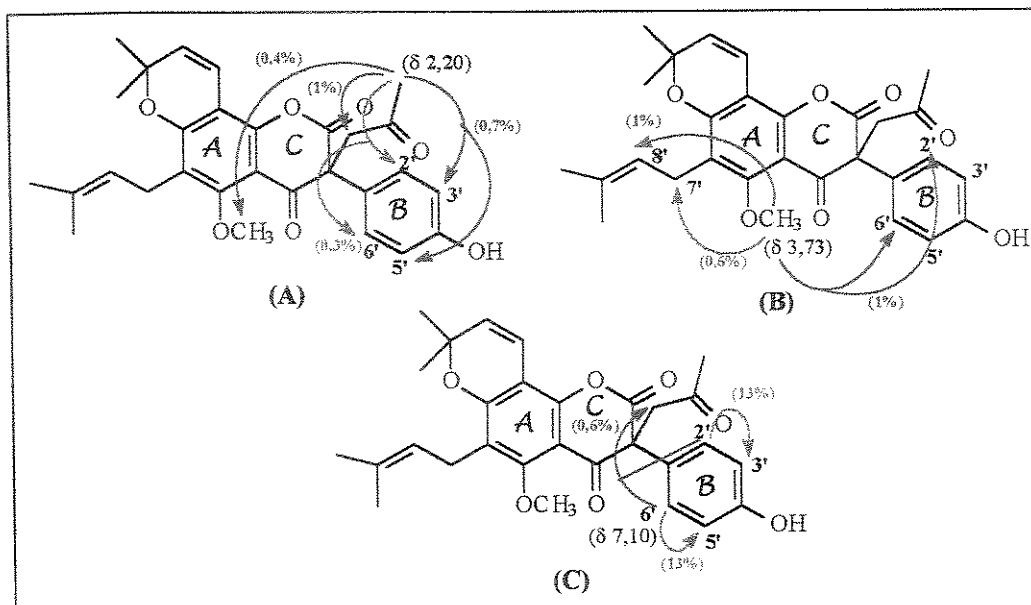
Entre estas 97 unidades de massa, podemos extrair 28 referentes à carbonila em C-2, 12 correspondentes ao carbono sp^3 (C-3), restando ainda 57 unidades de massa relativas ao grupo R em C-3.

Considerando que, pelo espectro de RMN 1H observamos a presença dos grupos metila α à carbonila ou de um acetato, e de um CH_2 vizinho a um centro estereogênico e, pelo espectro de RMN ^{13}C observamos o sinal em δ 206,0 característico de uma carbonila cetônica, concluímos que o grupo R é propil-2-ona ($R = -CH_2-CO-CH_3$)

Com base no exposto acima podemos propor três regioisômeros (8a, 8b e 8c):



Através do experimento de diferença de NOE (Anexo A- E32 a E34) observamos que a irradiação da metoxila (**ver B**) causou um incremento nos sinais dos hidrogênios H-7' e H-8' do grupo 3,3-dimetilalila e nos sinais dos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B, descartando as possibilidades estruturais 8b e 8c. Por outro lado, irradiando a metila (C-13) do grupo propil-2-ona e os hidrogênios H-2' e H-6' (**A** e **C** respectivamente), observamos resultados coerentes com a presença do grupo “-CH₂-CO-CH₃” no carbono C-3.



Incrementos observados no experimento de diferença de NOE

Os espectros bidimensionais de COSY (Anexo A- E35 a E38), HETCOR (correlação heteronuclear à uma ligação $^1J_{C,H}$) (Anexo A- E39 a E41) e gHMBC (correlação heteronuclear a mais de uma ligação $^nJ_{C,H}$) (Anexo A- E42 a E44), nos permitiu determinar com exatidão os deslocamentos químicos de todos os 6CH₃, 2 CH₂, 7CH e 14 C_o da estrutura proposta.

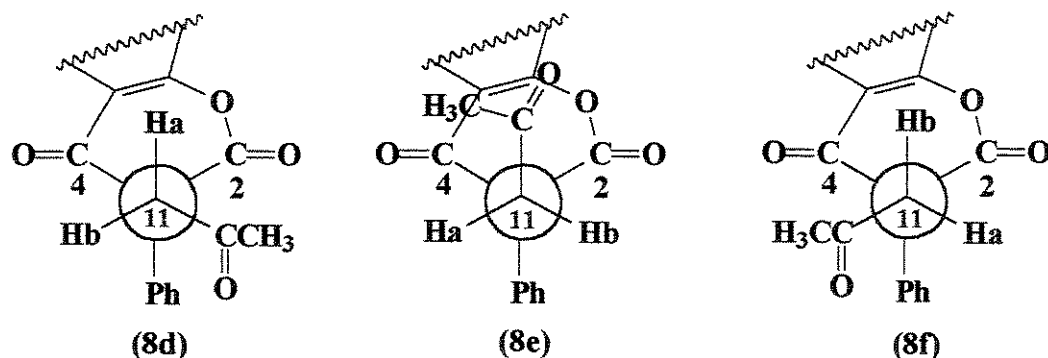
No espectro bidimensional gHMBC (Anexo A- E42 a E44, Tabela 15), vale a pena enfatizar as correlações $^nJ_{C,H}$ entre os hidrogênios metilênicos (C-11) do grupo propil-2-ona com os carbonos C-3 ($^2J_{C,H}$), C-1' ($^3J_{C,H}$), C-2 ($^3J_{C,H}$), C-4 ($^3J_{C,H}$) e com a carbonila (C-12) do grupo (-CH₂-CO-CH₃) ($^2J_{C,H}$); assim como aquelas observadas entre o carbono C-3 e os hidrogênios H-2' ($^3J_{C,H}$) e H-6' ($^3J_{C,H}$). Essas correlações são especialmente ilustrativas a respeito da constituição do anel C.

É interessante observar também que no espectro bidimensional gHMBC (Anexo A- E42 a E44) há uma correlação maior do hidrogênio em δ3,87 (H-11b) com o carbono C-2 (δ 169,1) e do hidrogênio em δ 3,53 (H-11a) com o carbono C-4 (δ 187,6).

Sabendo que tanto o carbono C-2, quanto o carbono C-4 acoplam com os hidrogênios diastereotópicos do grupo propil-2-ona (-CH₂COCH₃), no espectro de RMN ¹³C totalmente acoplado (Anexo A- E45 a E45c) deveríamos observar um

duplo dubleto para cada um desses carbonos. Na verdade, observamos para C-2 um dubleto largo com constante de acoplamento $^3J=8,8$ Hz, e para C-4 um singlete largo (Anexo A- E45a). Estes dados sugerem que cada um destes carbonos acoplam diferentemente com os hidrogênios em C-11 do grupo “**propil-2-ona**”.

Considerando que as constantes de acoplamento vicinal ^{13}C , 1H (3J) são dependentes do ângulo de diedro³⁹, estas observações nos levaram a propor que dos três rotâmeros não eclipsados (8d, 8e e 8f) possíveis para a ligação entre os carbonos C-3 e C-11, um deles (8d) prevalece sobre os demais (Quadro 16), uma vez que neste rotâmero os hidrogênios Ha e Hb apresentam ângulos de diedro semelhantes em relação a C-4 [ângulos entre 60° ($J\sim 2,0$ Hz) e 90° ($J\sim 0,5$ Hz)]. Já em relação a C-2, os hidrogênios apresentam ângulos de diedro diferentes, isto é, o ângulo formado com Ha está entre 60° ($J\sim 2,0$ Hz) e 90° ($J\sim 0,5$ Hz), enquanto aquele formado com Hb está próximo de 180° ($J\sim 9$ Hz).



Quadro 16- Possíveis rotâmeros para a ligação entre C-3 e C-11 da substância 8

Na Figura 14 destacamos a correlação heteronuclear $^1J_{C,H}$ dos hidrogênios diastereotópicos no carbono C-11 do grupo $-CH_2-CO-CH_3$ (propil-2-ona) com um único carbono em δ_c 51,7; que pelo DEPT (135°) é um carbono metilênico (Figura 15).

³⁹ Günther, H. NMR Spectroscopy- Basic principles, concepts and applications in chemistry. Second Edition, John Wiley & Sons, p. 509, 1994.

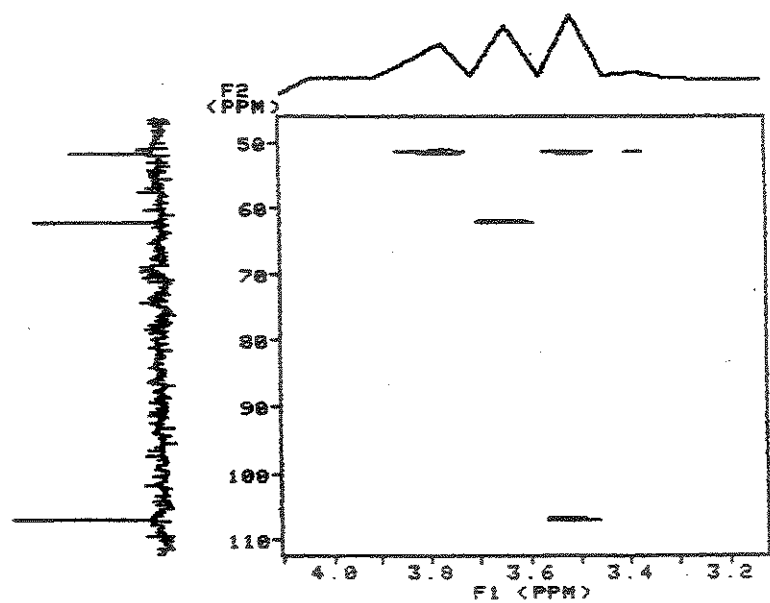


Figura 14- Experimento de RMN bidimensional HETCOR (expansão) do composto 8

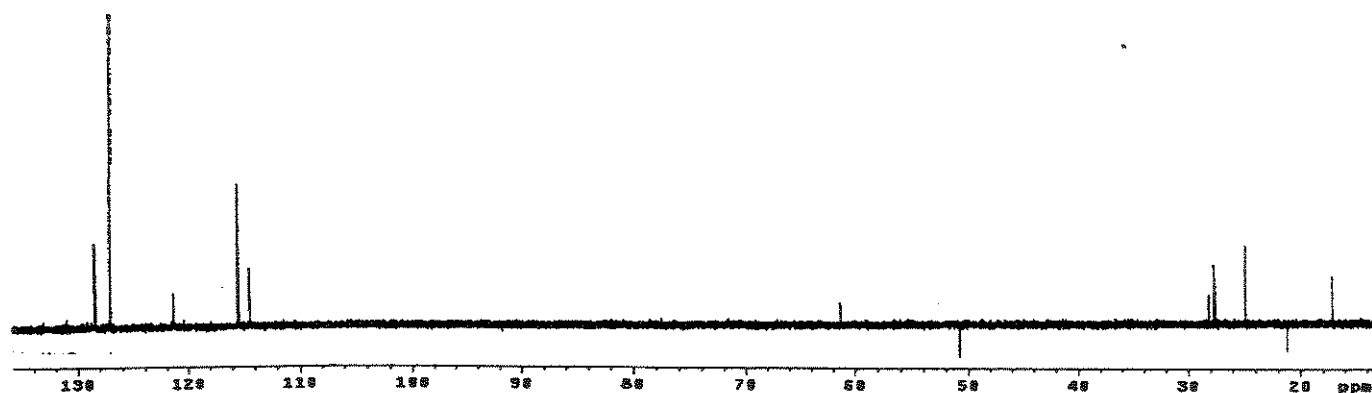


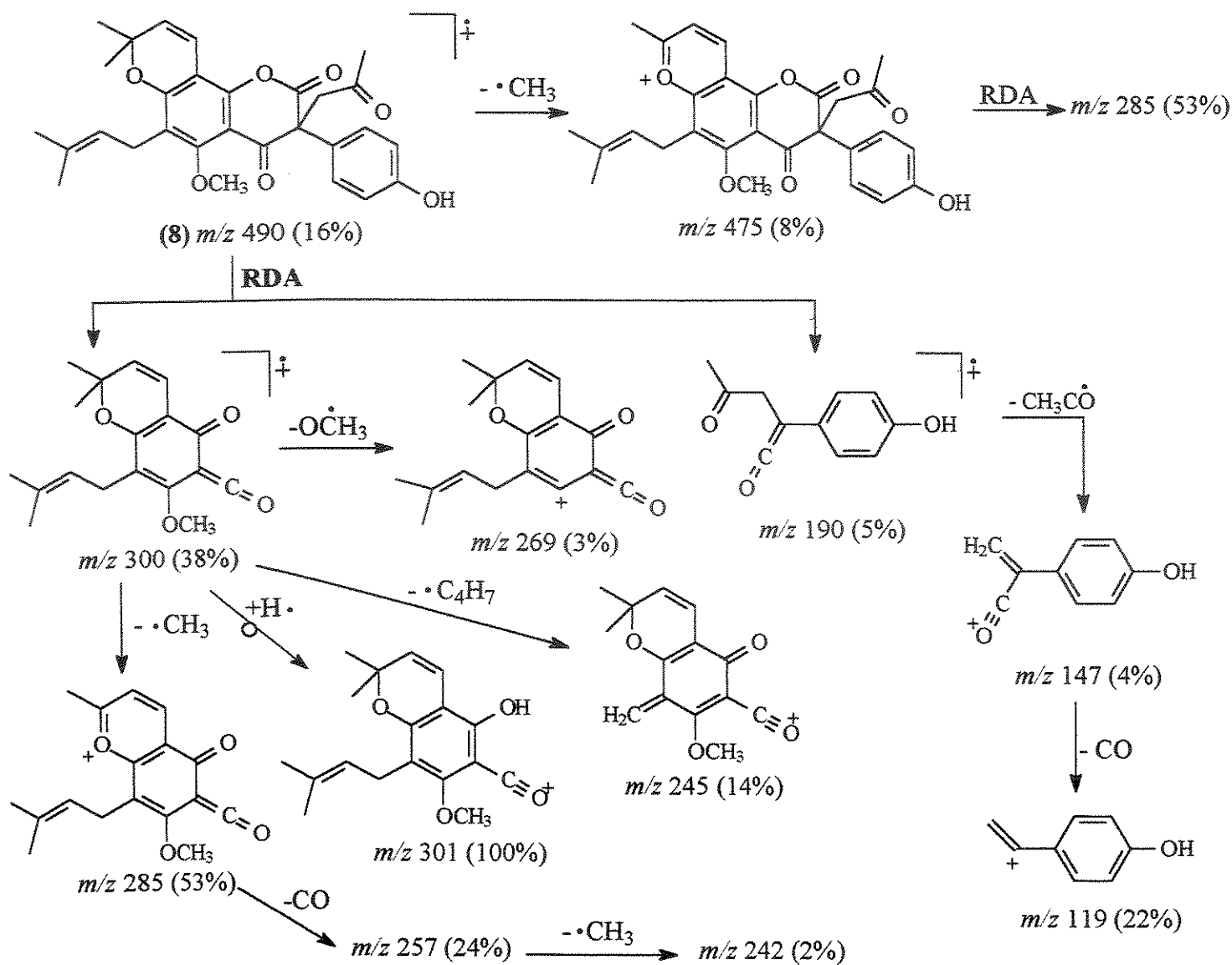
Figura 15- Experimento DEPT (135°) do composto 8

O espectro E54 (Anexo A) corresponde a uma simulação feita no programa de computador "ACD/ChemSketch" para o composto 8.

Podemos observar que este espectro simulado apresenta um feição análoga a do espectro obtido experimentalmente (Anexo A- E30), principalmente no que diz respeito aos sinais dos hidrogênios diastereotópicos (CH_2 -11), da metila (C-13) do grupo propil-2-ona ($-\text{CH}_2\text{COCH}_3$) e dos hidrogênios H-7' do grupo 3,3-dimetilalila.

A diferença no valor dos deslocamentos químicos entre os dois espectros (o simulado e o experimental) ocorre porque no espectro simulado uma série de fatores não é levada em consideração, tais como a influência do solvente, os vários rotâmeros possíveis com suas populações, anisotropia etc. Por outro lado, a variação entre algumas multiplicidades dos sinais está relacionada a capacidade do programa de simular acoplamentos maiores do que a três ligações. Para ilustrar, também obtivemos o espectro simulado da escandenina (1) (Anexo A- E54a) onde mostramos a diferença nos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-4" e do anel B.

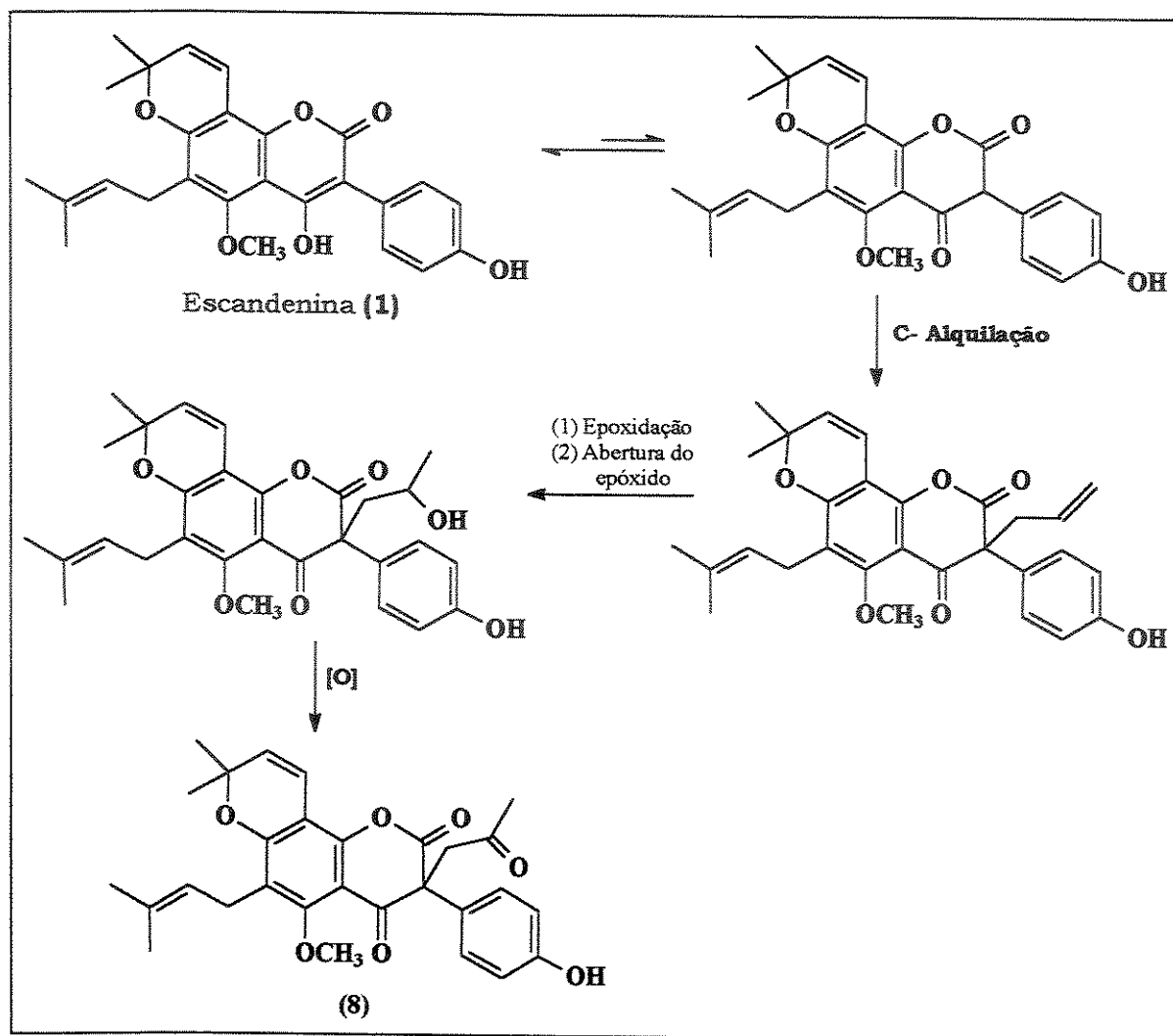
Baseado nos experimentos EM/EM (Anexo A- E48 a E51) selecionando os íons de m/z 475 [285 (100%)], m/z 300 [285 (100%), 269 (5%), 257 (54%), 245 (25%)], m/z 257 [242 (20%)] e m/z 190 [147 (100%), 119 (48%)] sugerimos o caminho de fragmentação mostrado no Quadro 17.



Quadro 17- Proposta de fragmentação do composto 8 no espectrômetro de massas

O composto **8** representa o primeiro exemplo de um derivado de 4-hidroxi-3-fenilcumarina onde o tautômero β -ceto ester é fixado pela presença de um substituinte em C-3.

Uma possível proposta de biogênese para esta substância é mostrada no Quadro 18:



Quadro 18- Proposta de biogênese da substância 8

→ Reação da escandenina com iodeto de metila:

Em busca de um modelo que auxiliasse na comprovação da estrutura proposta para este novo derivado de uma 4-OH-3-fenilcumarina (8), tentamos a C-alquilação da escandenina (1). Fizemos a reação da escandenina (1) com iodeto de metila (MeI) e hidróxido de lítio.

O produto obtido, foi analisado em um aparelho de Cromatografia Gasosa acoplado com um Espectrômetro de Massas (CG/EM), mostrando tratar-se de uma mistura complexa de compostos (Figura 16).

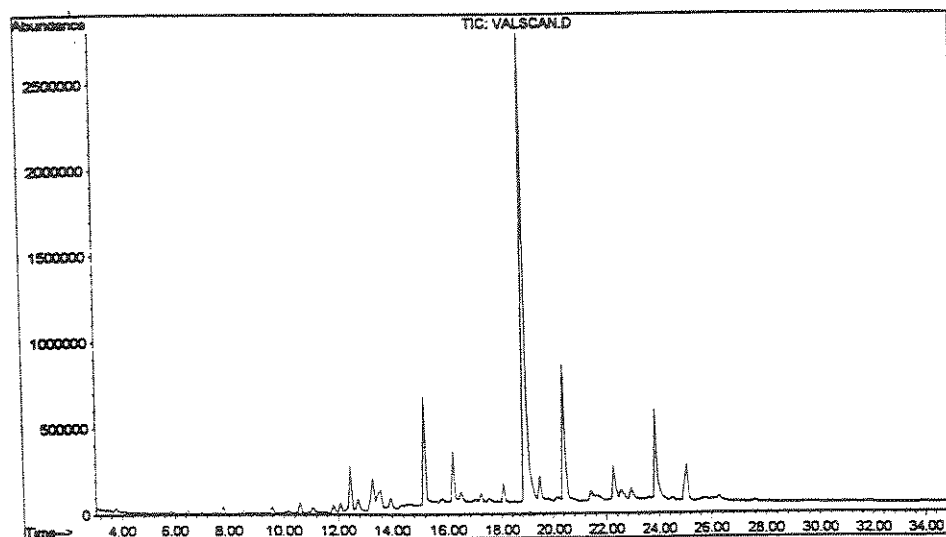


Figura 16- Cromatograma da mistura de produtos obtido da reação de alquilação da escandenina (1)

Destacamos aqui apenas a análise dos espectros de massas correspondentes aos picos com $t_R = 18,909$ minutos; $t_R = 20,404$ minutos; $t_R = 23,860$ minutos e $t_R = 25,074$ minutos.

O pico com $t_R = 18,909$ (pico majoritário) mostra um espectro de massas (Figura 17) cujo íon molecular M^+ é de m/z 450, sugere a presença de um derivado de uma α - metil desoxibenzoína (16) (Quadro 19), através dos fragmentos (a) [m/z 315 (100%)] e (b)[m/z 135 (4%)], gerados respectivamente de uma clivagem α - carbonila e da ligação benzílica.

A formação deste derivado pode ser racionalizada através da clivagem do anel C em meio básico de 3-metil-4'-metóxi escandenina, seguida de uma descarboxilação e metilação do ânion fenóxido.

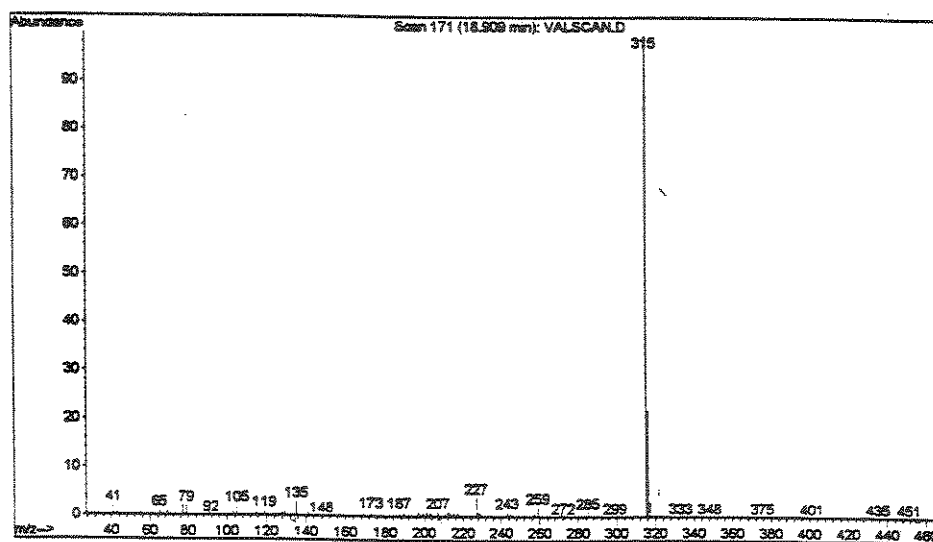
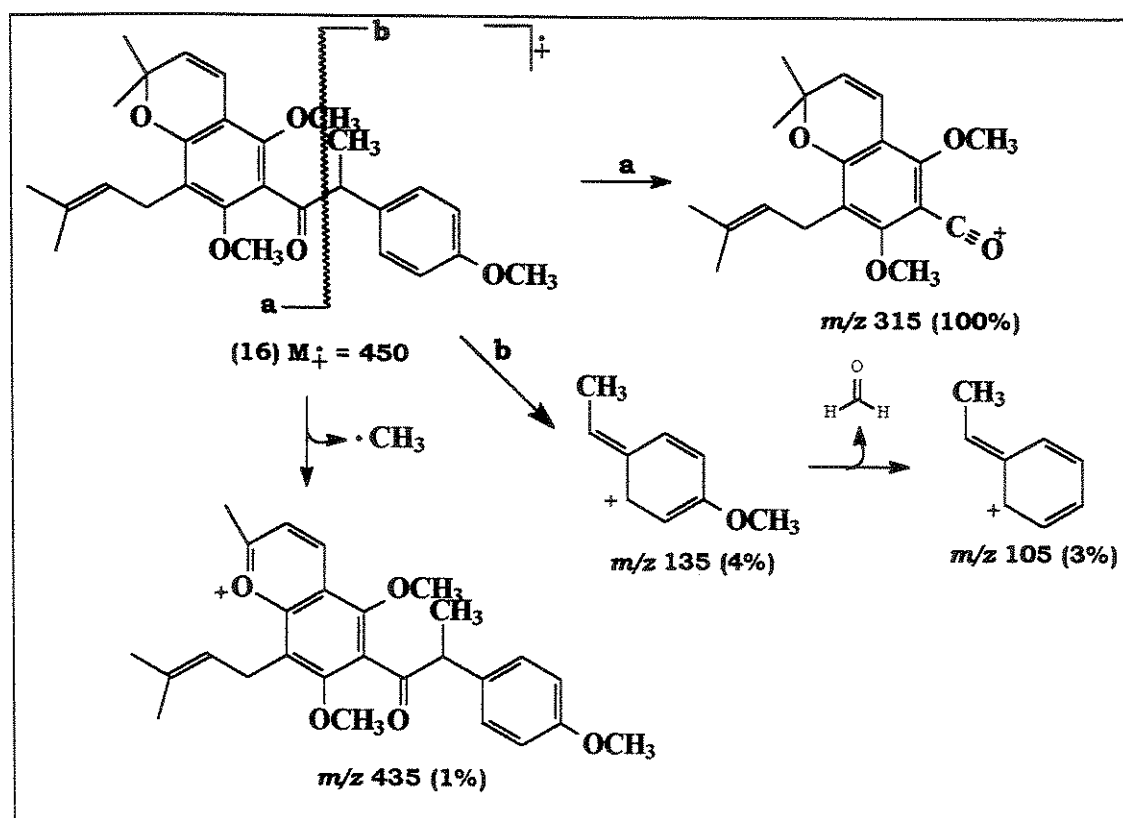


Figura 17- Espectro de massas do pico com 18,909 min.



Quadro 19- Proposta de fragmentação do derivado de uma α -metil desoxibenzoína (16) no espectrômetro de massas

O espectro de massas (Figura 18) correspondente ao pico com $t_R = 20,404$ minutos é análogo ao anterior, sendo que o íon molecular M^+ de m/z 436 (4%), o pico base (a) [m/z 301 (100%)] e o fragmento (b) [m/z 135 (10%)], indicam tratar-se de um análogo de 16, onde não ocorreu a metilação do ânion fenóxido (17) (Quadro 20).

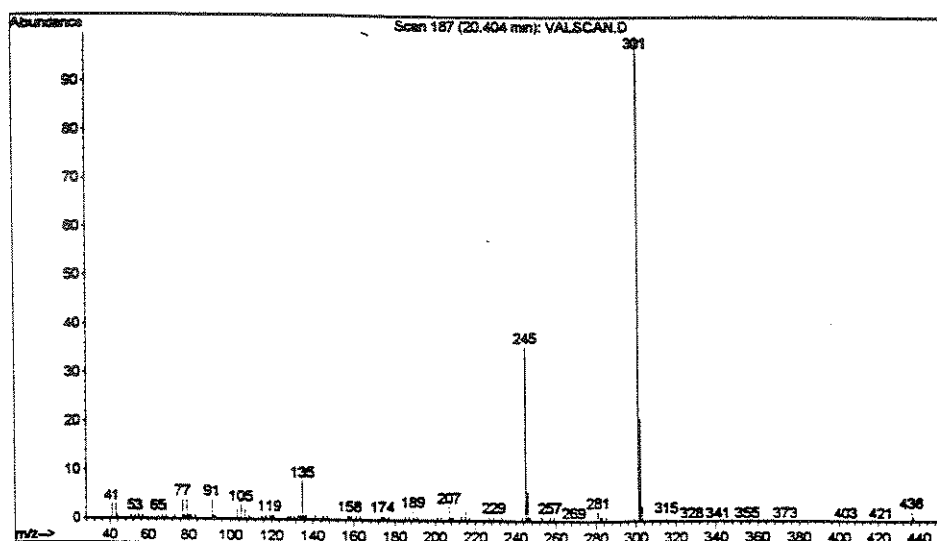
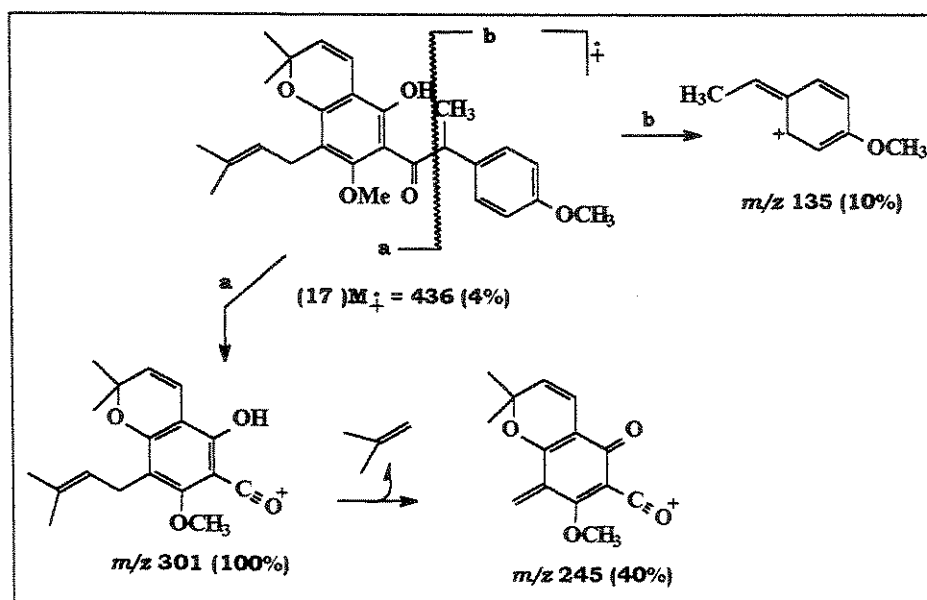


Figura 18- Espectro de massas do pico com 20,404 min.



Quadro 20- Proposta de fragmentação do derivado (17) no espectrômetro de massas

O espectro de massas (Figura 19) correspondente ao pico com $t_R = 23,860$ minutos, apresenta M^+ de m/z 462 (20%) de acordo com o esperado para 4,4'-dimetoxi escandenina (15). Entretanto, por analogia a fragmentação do robustato de metila (3) (Quadro 24), não observaríamos o pico base de m/z 300 (100%) tal como ocorre com a forma β - dicetônica do anel C da escandenina, nos levando a concluir que trata-se do produto (18), resultante da C-alkilação no carbono C-3 e da metilação da hidroxila fenólica em C-4', cuja fragmentação é perfeitamente análoga ao do produto natural 8 (Quadros 21 e 22), fornecendo mais uma evidência em favor da estrutura proposta para a substância 8 (Quadro 22), isolada do extrato diclorometânico.

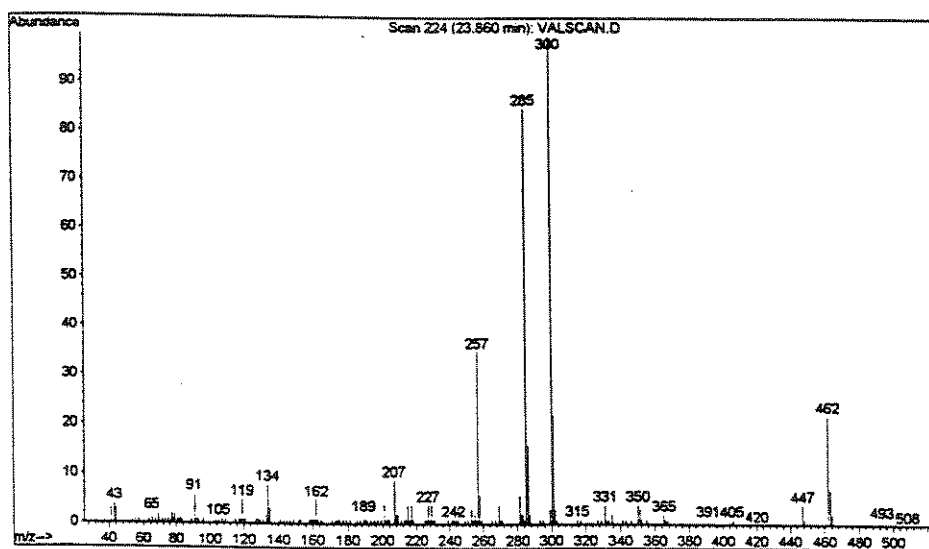
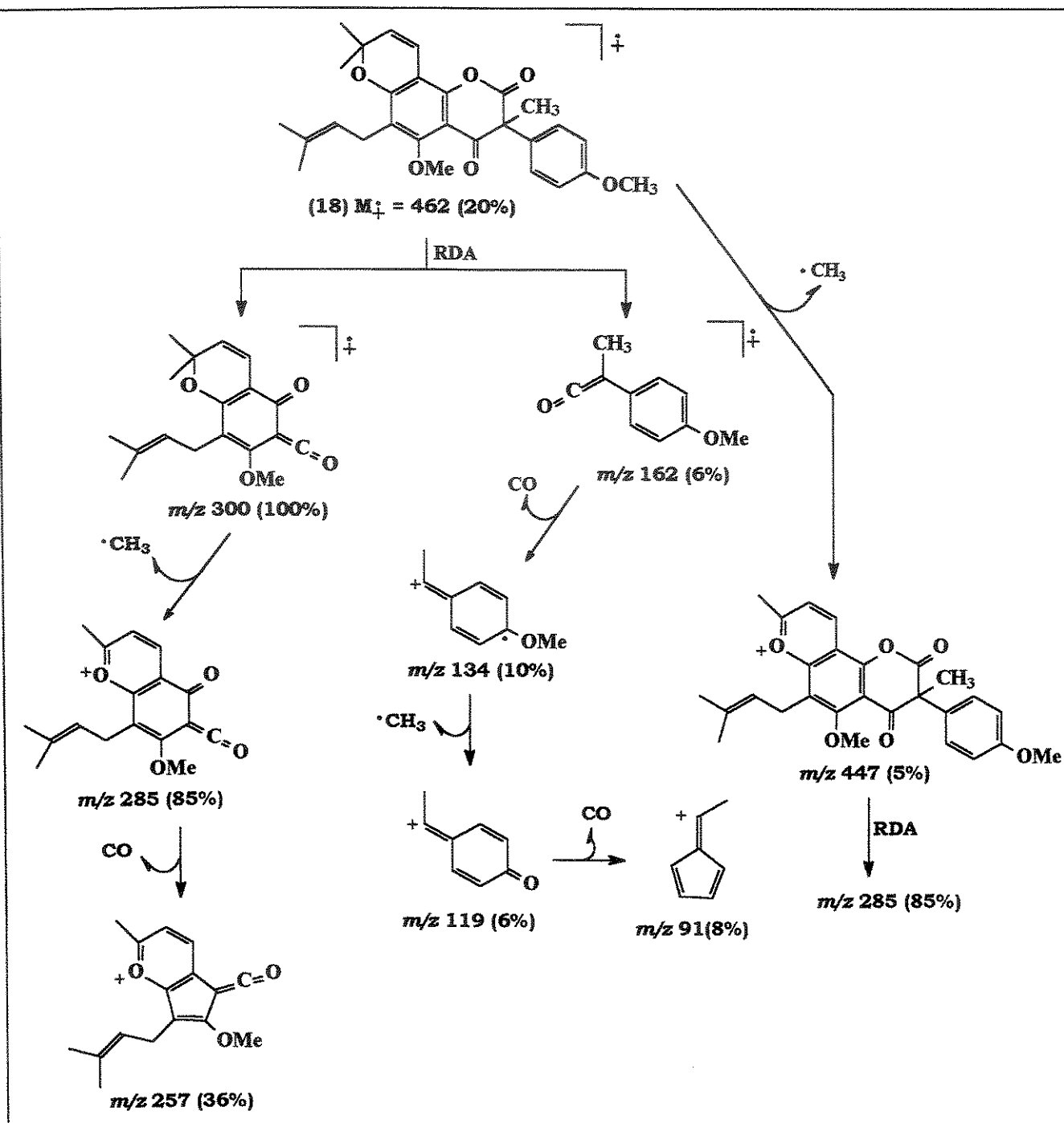
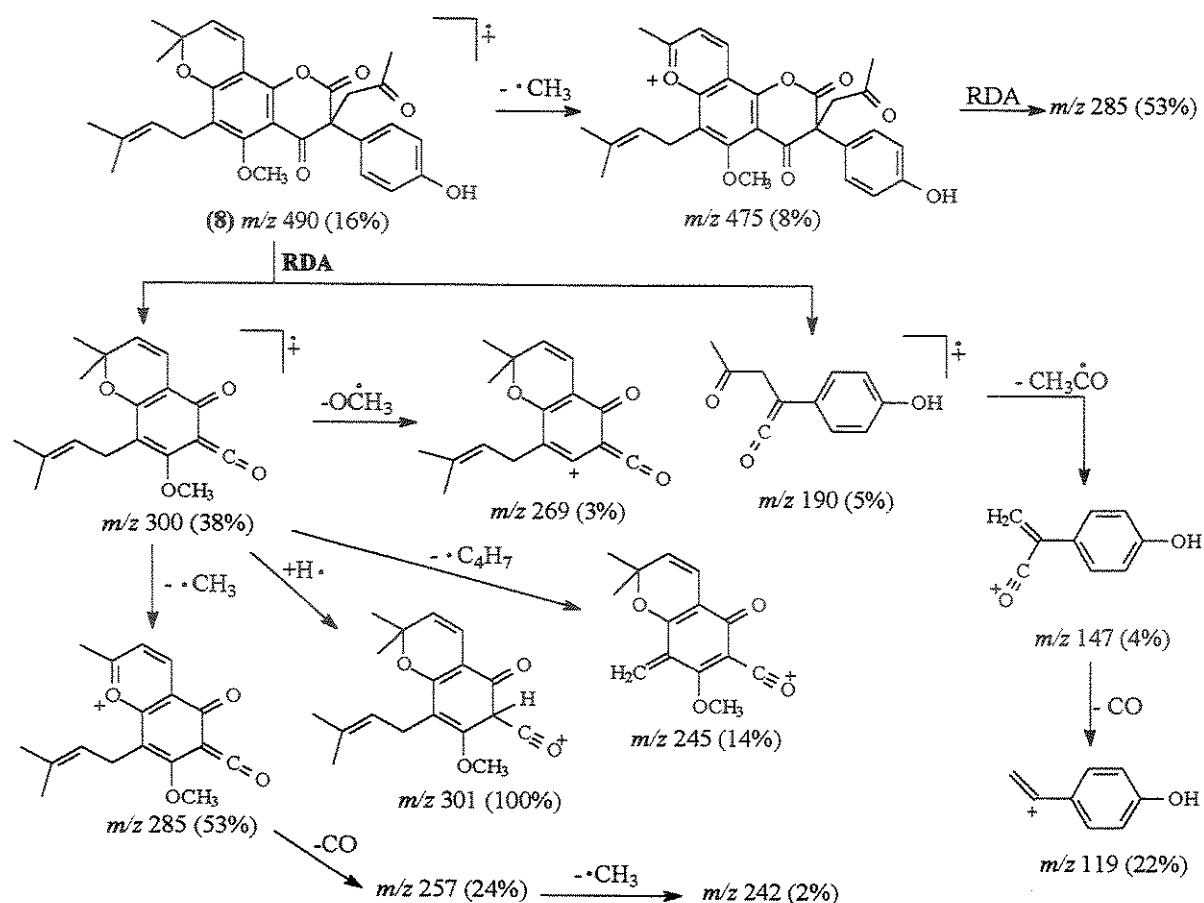


Figura 19- Espectro de massas do pico com 23,860 min.



Quadro 21- Proposta de fragmentação do derivado (18) no espectrômetro de massas



Quadro 22- Proposta de fragmentação do derivado (8) no espectrômetro de massas

Finalizando a análise, temos o pico com $t_R = 25,074$ minutos, cujo espectro de massas mostra o íon molecular M^+ de m/z 448 (65%) e o pico base de m/z 433 (100%) (Figura 20).

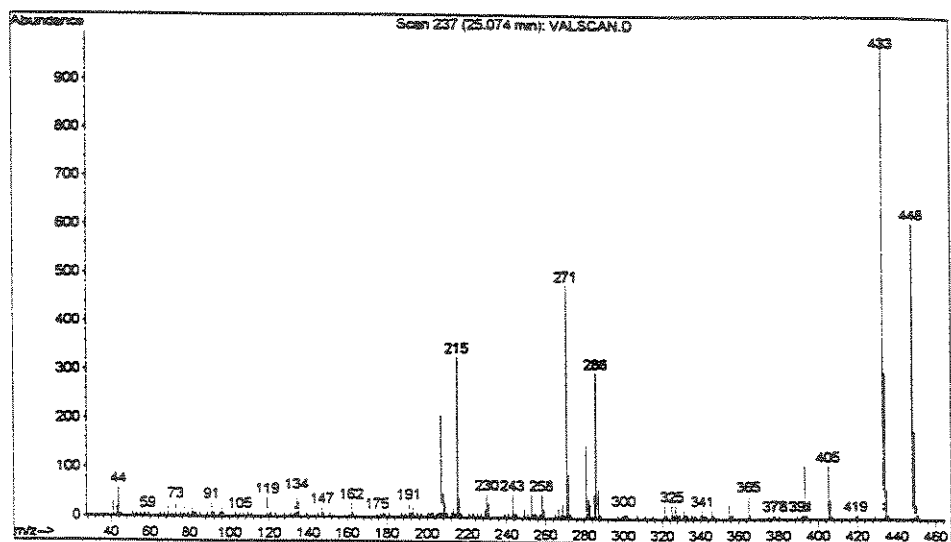
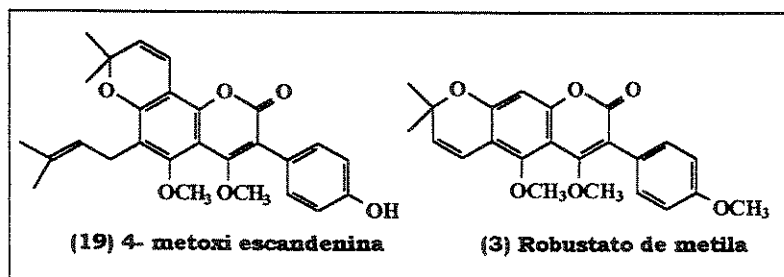
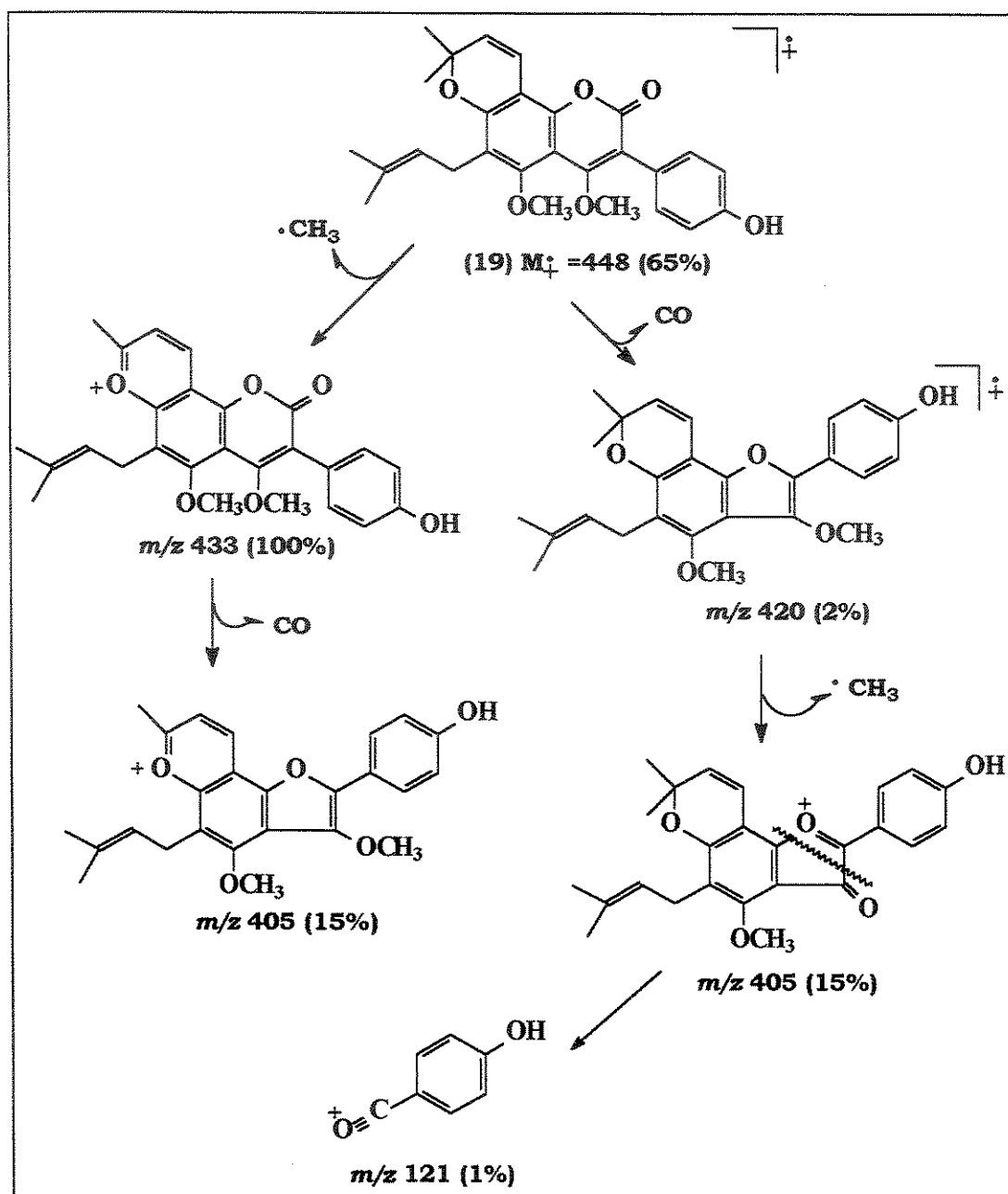


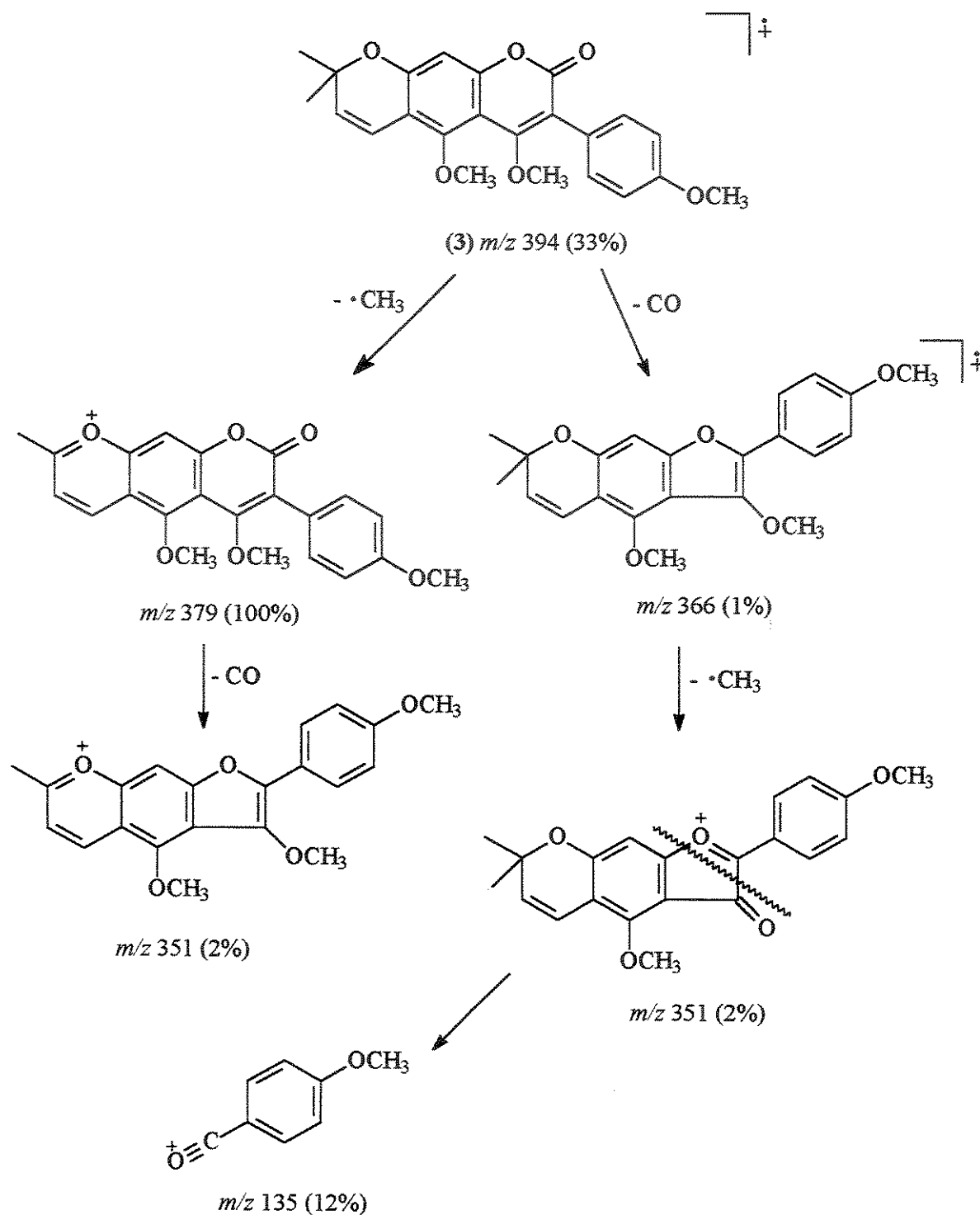
Figura 20- Espectro de massas do pico com 25,074 min.

Esta substância foi identificada como sendo 4- metoxi escandenina (19) (Quadro 23), pois apresenta padrão de fragmentação análogo ao do robustato de metila (3) (Quadro 24), isolado do extrato diclorometânico.



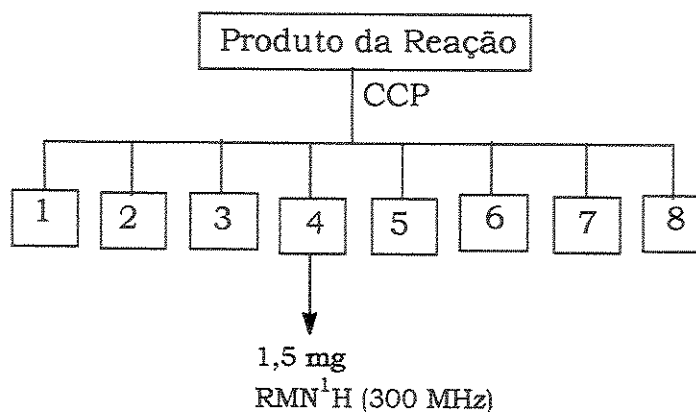


Quadro 23- Proposta de fragmentação do derivado 4-metoxi escandenina (19) no espectrômetro de massas

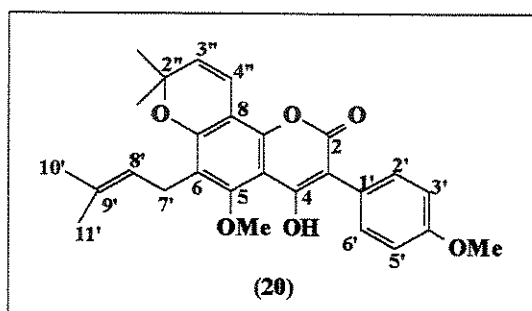


Quadro 24- Proposta de fragmentação do robustato de metila (3) no espectrômetro de massas

Em CCDA observamos que no produto da reação havia uma substância em maior quantidade, optamos, então, pela sua purificação em Cromatografia em Camada Preparativa, obtendo 8 frações, conforme Fluxograma 16:



Fluxograma 16- Frações obtidas da CCP do produto da reação de alquilação

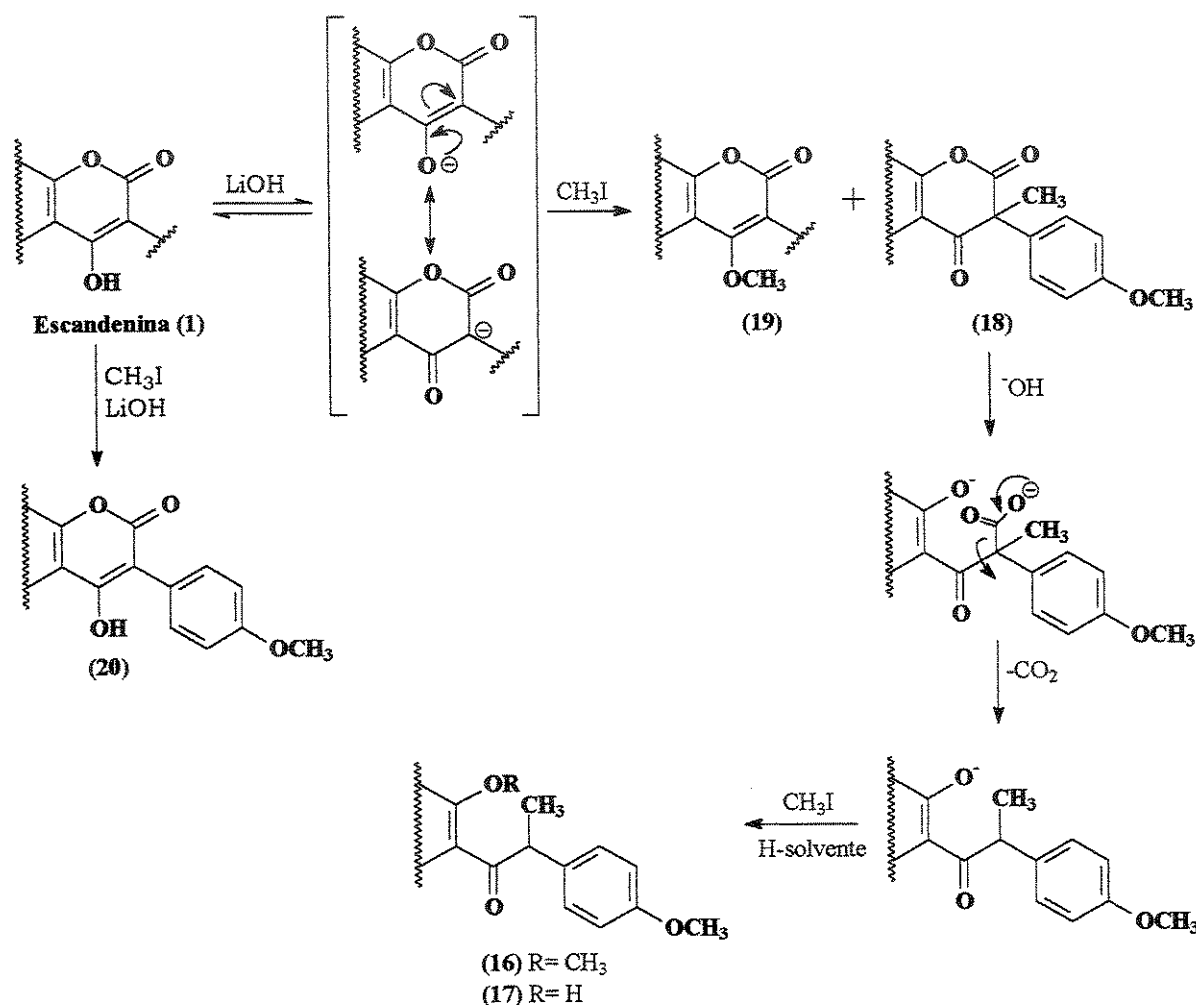


Somente a fração 4 pôde ser identificada por RMN ^1H (Anexo A- E55), como sendo um derivado 4'- metoxi escandenina (20), pois, mesmo em pequena quantidade apresentou-se pura em CCDA, enquanto as outras sete apresentaram-se como misturas em pequenas quantidades, o que inviabilizou suas identificações por métodos espectroscópicos.

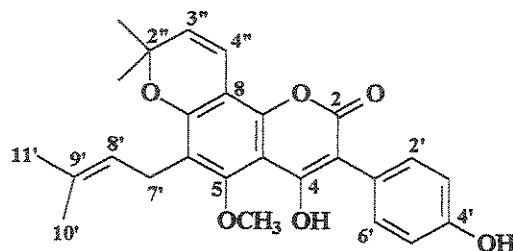
Pelo espectro de RMN ^1H (300 MHz) (Anexo A- E55, Tabela 17) observamos a presença de sinais característicos do anel 2,2- dimetilcromeno [δ_{H} 6,90 (1H; *d*; $J = 10,0$ Hz; H-4''); 5,70 (1H; *d*; $J = 10,0$ Hz; H-3''); 1,47 (6H, *s*, 2''-2CH₃), do grupo 3,3-dimetilalila [δ_{H} 3,33 (2H; *d*; $J = 6,7$ Hz; H-7'); 5,17 (1H; *tl*; $J = 6,7$ e 1,1 Hz; H-8'); 1,79 (3H, *s*, H-10'); 1,71 (3H, *s*, H-11')], um anel aromático *para*-substituído [δ_{H} 7,50 (2H; *d*; $J = 8,8$ Hz; H-2' e H-6'); 6,98 (2H; *d*; $J = 8,8$ Hz; H-3' e H-5')] e uma hidroxila no carbono C-4 [δ_{H} 10,21 (1H, *s*)], evidenciando tratar-se de uma

derivado de 4-OH-3-fenilcumarina. Por outro lado a presença de dois singletos em δ 3,93 e δ 3,84 indicam a presença de duas metoxilas aromáticas, uma em C-5 e outra em C-4'. É importante mencionar que, quando analisada por CG/EM, a substância 20 apresentou tempo de retenção maior do que todas as substâncias detectadas no cromatograma da figura 16 (página 86). Isto foi observado, porque os tempos de análise utilizados foram diferentes.

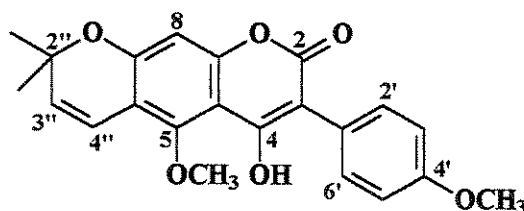
O Quadro 25 apresenta uma proposta das reações alternativas que resultaram na obtenção dos principais produtos caracterizados na mistura reacional.



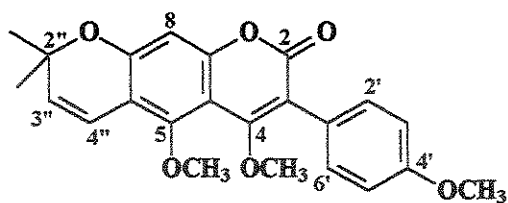
Quadro 25- Proposta de rotas alternativas para explicar a formação dos principais produtos obtidos da reação de metilação da escandenina (1)

Apêndice A- Tabelas das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas (1, 2, 3, 8 e 20)Tabela 7- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da escandenina (1).

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
2''-2CH ₃	1,47	6H, s
11'	1,71	3H, s
10'	1,79	3H, s
7'	3,33	2H, d, $J = 6,7$
5-OCH ₃	3,93	3H, s
8'	5,17	1H, m
OH-4'	5,17	1H, sl
3''	5,69	1H, d, $J = 10,0$
4''	6,90	1H, d, $J = 10,0$
3' e 5'	6,89	2H, d, $J = 8,6$
2' e 6'	7,42	2H, d, $J = 8,6$
OH-4	10,21	1H, s

Tabela 8- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do ácido robústico (2).

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
2''-2CH ₃	1,42	6H, s
4'-OCH ₃	3,76	3H, s
5-OCH ₃	3,92	3H, s
3''	5,72	1H, d, $J = 10,1$
4''	6,45	1H, dd, $J = 10,1$ e $0,7$
8	6,57	1H, d, $J = 0,7$
3' e 5'	6,90	2H, d, $J = 8,9$
2' e 6'	7,41	2H, d, $J = 8,9$
4-OH	9,87	1H, s

Tabela 9- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do robustato de metila (3).

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
2''-2CH ₃	1,47	6H, s
4-OCH ₃	3,56	3H, s
5-OCH ₃	3,82	3H, s
4'-OCH ₃	3,85	3H, s
3''	5,71	1H, d, $J = 10,2$
4''	6,65	1H, dd, $J = 10,2$ e $0,7$
8	6,62	1H, d, $J = 0,7$
3' e 5'	6,97	2H, d, $J = 8,9$
2' e 6'	7,41	2H, d, $J = 8,9$

Tabela 10- Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) da escandenina (1), do ácido robústico (2) e robustato de metila (3).

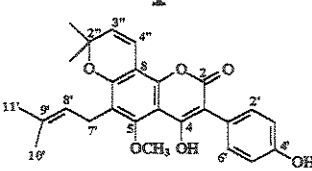
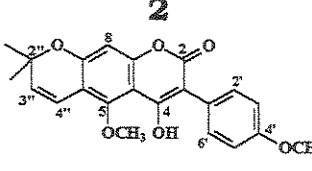
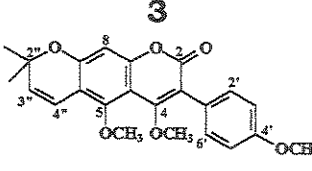
C	1  2  3 		
	1	2	3
2	160,8	160,1	163,1
3	103,5	103,3	105,3
4	162,9	162,6	164,4
5	153,9	152,1	152,8
6	106,7	110,7	112,9
7	155,2	158,9	159,3
8	119,1	101,7	101,1
9	147,2	153,7	154,8
10	101,3	103,9	112,8
1'	123,2	123,2	124,0
2'	131,8	131,7	131,8
3'	115,2	113,6	113,7
4'	155,1	157,1	157,0
5'	115,2	113,6	113,7
6'	131,8	131,7	131,8
7'	22,4	-	-
8'	121,7	-	-
9'	132,5	-	-
10'	18,0	-	-
11'	25,7	-	-
2''	78,1	77,6	77,5
3''	115,3	115,1	115,9
4''	129,6	131,4	130,6
2-CH ₃ -2''	28,1	27,9	28,2
5-OCH ₃	63,9	64,4	63,4
4'-OCH ₃	-	55,3	55,3
4-OCH ₃	-	-	61,3

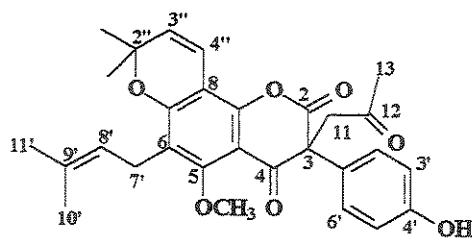
Tabela 11- Correlações observadas nos espectros de HETCOR (C-H, 1J) e COLOC (C-H, nJ) (CDCl₃, 7 Tesla) da escandenina (1).

H (δ)	C (δ, 1J)	C (δ, nJ)
HO-4 (10,21)	-	3 (103,5)
2' (7,42)	2' (131,8)	4' (155,1)
3' (6,89)	3' (115,2)	1' (123,2)
5' (6,89)	5' (115,2)	1' (123,2)
6' (7,42)	6' (131,8)	4' (155,1)
4'' (6,90)	4'' (129,6)	-
3'' (5,69)	3'' (115,3)	-
8' (5,17)	8' (121,7)	-
H ₃ CO-5 (3,93)	H ₃ CO-5 (63,9)	5 (153,9)
7' (3,33)	7' (22,4)	7 (155,2); 5 (153,9); 8' (121,7); 8 (119,1)
10' (1,79)	10' (18,0)	9' (132,5); 8' (121,7); 11' (25,7)
11' (1,71)	11' (25,7)	9' (132,5); 8' (121,7); 10' (18,0)
2''- 2CH ₃ (1,47)	2''- 2CH ₃ (28,1)	2'' (78,1); 4'' (129,6)

- : não foram observadas correlações

Tabela 12- Correlações observadas no espectro de COSY (H-H) para o robustato de metila (3).

H (δ)	H (δ, J)
2' e 6' (7,41)	3' e 5' (6,97)
4'' (6,65)	3'' (5,71)

Tabela 13- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 8.

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
2''- CH_3	1,45	3H, s
2''- CH_3	1,46	3H, s
11'	1,64	3H, s
10'	1,75	3H, s
13	2,20	3H, s
7'	3,21	1H, <i>dd</i> , $J = 13,9$ e $7,2$
7'	3,27	1H, <i>dd</i> , $J = 13,9$ e $7,2$
5- OCH_3	3,73	3H, s
11	3,87	1H, <i>d</i> , $J = 18,1$
	3,53	1H, <i>d</i> , $J = 18,1$
8'	5,07	1H, <i>tl</i> , $J = 7,2$ e $1,2$
3''	5,65	1H, <i>d</i> , $J = 10,1$
4'-OH	5,71	1H, <i>sl</i>
3' e 5'	6,70	2H, <i>d</i> , $J = 8,9$
4''	6,74	1H, <i>d</i> , $J = 10,1$
2' e 6'	7,10	2H, <i>d</i> , $J = 8,9$

Tabela 14- Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 8.

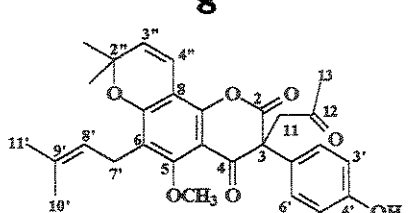
C  8	
2	169,1
3	62,1
4	187,6
5	159,2
6	106,3
7	158,3
8	120,8
9	148,9
10	105,7
11	51,7
12	206,0
13	28,9
1'	125,8
2'	127,8
3'	116,2
4'	156,0
5'	116,2
6'	127,8
7'	21,9
8'	122,1
9'	131,6
10'	17,9
11'	25,7
2''	78,3
3''	129,1
4''	115,2
2''-CH ₃	28,5
2''-CH ₃	28,4
5-OCH ₃	61,4

Tabela 15- Correlações observadas nos espectros de HETCOR (C-H, 1J) (CDCl₃, 7 Tesla) e gHMBC (C-H, nJ) (CDCl₃, 11 Tesla) do composto 8.

H (δ)	C ($\delta, ^1J$)	C ($\delta, ^nJ$)
2' (7,10)	2' (127,8)	3 (62,1); 4' (156,0)
3' (6,70)	3' (116,2)	1' (125,8); 4' (156,0)
5' (6,70)	5' (116,2)	1' (125,8); 4' (156,0)
6' (7,10)	6' (127,8)	3 (62,1); 4' (156,0)
7' (3,27 e 3,21)	7' (21,9)	5 (159,2); 7 (158,3); 9' (131,6); 8' (122,1); 8 (120,8)
8' (5,07)	8' (122,1)	10' (17,9); 11' (25,7)
10' (1,75)	10' (17,9)	8' (122,1); 9' (131,6); 11' (25,7)
11' (1,64)	11' (25,7)	8' (122,1); 9' (131,6); 10' (17,9)
3'' (5,65)	3'' (129,1)	2''-CH ₃ (28,5 ou 28,4); 2'' (78,3)
4'' (6,74)	4'' (115,2)	2'' (78,3); 9 (148,9); 7 (158,3)
H ₃ CO-5 (3,73)	H ₃ CO-5 (61,4)	5 (159,2)
2''-CH ₃ (1,46)*	2''-CH ₃ (28,5)*	2'' (78,3); 3'' (129,1)
2''-CH ₃ (1,45)*	2''-CH ₃ (28,4)*	2'' (78,3); 3'' (129,1)
11 (3,87 e 3,53)	11 (51,7)	3 (62,1); 1' (125,8); 12 (206,0); 2 (169,1); 4 (187,6)
13 (2,20)	13 (28,9)	11 (51,7); 12 (206,0)

* Valores intercambiáveis

Tabela 16- Correlações observadas no espectro de COSY (H-H) para 8.

H (δ)	H ($\delta, ^nJ$)
2' e 6' (7,10)	3' e 5' (6,70)
4'' (6,74)	3'' (5,65)
8' (5,07)	10' (1,75); 11' (1,64); 7' (3,27 e 3,21)
3-HCH'COCH ₃ (3,87)	3-HCH'COCH ₃ (3,53)

Tabela 17- Dados de RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) do derivado 20.

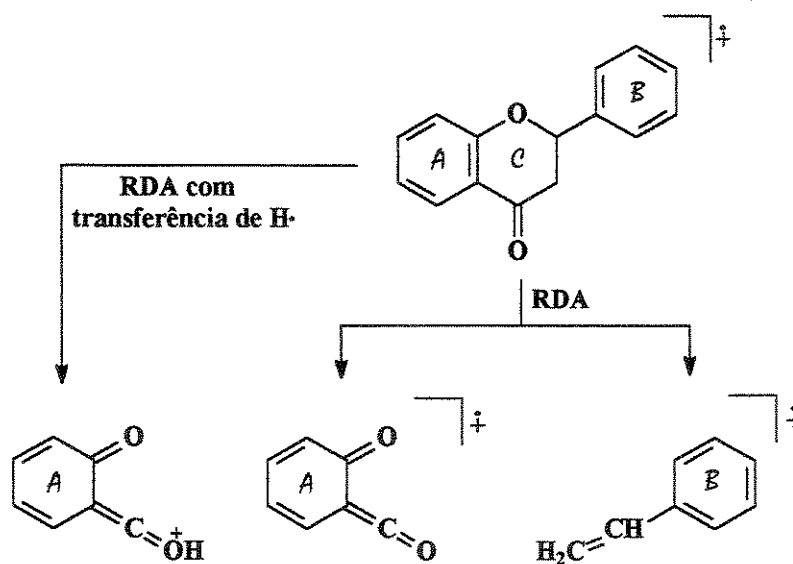
H	δ	multiplicidade e J (Hz)
4-OH	10,21	1H, s
2' e 6'	7,50	2H, d, J = 8,8
3' e 5'	6,98	2H, d, J = 8,8
4''	6,90	1H, d, J = 10,0
3''	5,70	1H, d, J = 10,0
8'	5,17	1H, tl, J = 6,7 e 1,1
5-OCH ₃	3,93	3H, s
4'-OCH ₃	3,84	3H, s
7'	3,33	2H, d, J = 6,7
11'	1,79	3H, s
10'	1,71	3H, s
2''-2CH ₃	1,47	6H, s

6.2 Flavanonas

Nas flavanonas os anéis A e B não são conjugados e por isso os seus espectros no UV apresentam apenas a Banda II (Sistema benzoíla: 270-295 nm) e um ombro na região de 300 nm referente à transição $n-\pi^*$ da carbonila.

No espectro de RMN ^1H das flavanonas, o hidrogênio ligado ao carbono C-2 aparece como um duplo dubleto ($J_{\text{trans}} = \text{ca. } 11 \text{ Hz}$ e $J_{\text{cis}} = \text{ca. } 5 \text{ Hz}$) centrado em torno de δ 5,20. Os hidrogênios ligados ao carbono C-3 aparecem, cada um, como um duplo dubleto devido as interações spin-spin entre si ($J_{\text{gem}} = \text{ca. } 17 \text{ Hz}$) e com o H-2. Estes sinais aparecem na região de δ 3,00 e 2,80.

O espectro de massas para as flavanonas apresenta principalmente os picos dos íons originados da clivagem RDA do anel C (Quadro 26). Assim como para todos os flavonóides, as intensidades dos fragmentos contendo os anéis A ou B dependem de seus padrões de substituição.



Quadro 26- Caminhos de fragmentação para flavanonas

No espectro de RMN ^{13}C das flavanonas, o carbono C-2 absorve entre δ 71,3-80,3; o C-3 entre δ 39,5-46,4 e o C-4 entre δ 186,4-198,5⁴⁰.

A absorção do sinal da carbonila (C-4) depende da ausência ou presença de um substituinte *peri*- na posição C-5. No caso de ser uma flavanona não

⁴⁰ Agrawal, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier p. 96, 1989.

substituída na posição C-5, o carbono C-4 absorve entre δ 189,7-191,7. Contudo, para flavanonas 5-hidroxiladas, C-4 absorve numa região mais desprotegida δ 195,6-197,3 devido ao seu envolvimento na formação de uma ponte de hidrogênio intramolecular com a hidroxila na posição C-5.

A flavanona lupinifolina (5) foi isolada de *Lonchocarpus minimiflorus*⁴¹, *Tephrosia lupinifolia*⁴², *Mundulea sericea*⁴³, *Derris laxiflora*⁴⁴, de *Citrus limonia*⁴⁵, de *Lonchocarpus guatamalensis*⁴⁶, de *Derris reticulata*⁴⁷, de *Eriosema tuberosum*⁴⁸, de *Flemingia wallichii*⁴⁹, de *Sophora tetraptera*⁵⁰ e de *Euchresta*

⁴¹ Mahmoud, E.N. e Waterman, P.G. Minimiflorin: a new 2'-hydroxyflavanone from *Lonchocarpus minimiflorus* seeds. *J. Nat. Prod.*, 48 (4), p. 648-650, 1985.

⁴² Smalberger, T.M.; Vleggaar, R. e Weber, J. C. Flavonoids from *Tephrosia*-VII. *Tetrahedron*, 30, p. 3927-3931, 1974.

⁴³ Van Zyl, J.J.; Rall, G. J. H. e Roux, D. G. The structure, absolute configuration, synthesis and ¹³C NMR spectra of prenylated pyranoflavonoids from *Mundulea sericea*. *J. Chem. Research (M)*, p. 1301-1309, 1979.

⁴⁴ Lin, Y-L; Chen, Y-L e Kuo, Y-H. Three new flavonoids, 3'-methoxylupinifolin, laxifolin, and isolaxifolin from the roots of *Derris laxiflora* Benth. *Chem. Pharm. Bull.*, 39 (12), p. 3132-3135, 1991.

⁴⁵ Chang, S-H. Flavonoids, coumarins and acridone alkaloids from the root bark of *Citrus limonia*. *Phytochemistry*, 29(1), p. 351-353, 1990.

⁴⁶ Ingham, J.L.; Tahara, S. e Dziedzic, S. Z. Major flavanones from *Lonchocarpus guatamalensis*. *Z. Naturforsch., C: Biosci.*, 43 (11-12), p. 818-822, 1988.

⁴⁷ Mahidol, C.; Prawat, H.; Ruchirawat, S.; Lihkitwitayawuid, K.; Lin, L-Z e Cordell, G. A. Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. *Phytochemistry*, 45 (4), p. 825-829, 1997.

⁴⁸ Ma, W. G.; Fuzzati, N. ; Lu, S. L.; Gu, D. S. e Hostettmann, K. Further chromones from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry*, 43 (6), p.1339-1343, 1996.

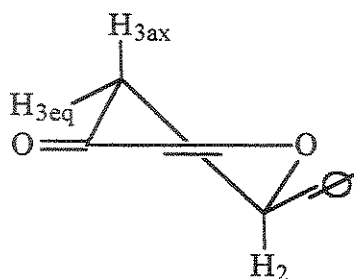
⁴⁹ Rao, J. M.; Subrahmanyam, K.; Rao, K. V. J. e Rao, M. G. New chromenoflavanones from the roots of *Flemingia wallichii* W. & A. *Indian J. Chem.*, 13 (8), p. 775-778, 1975.

⁵⁰ Shirataki, Y.; Matsuoka, S.; Komatsu, M.; Ohyama, M.; Tanaka, T. e Iinuma, M. Studies on the constituents of *Sophora* species- Part 26- Four isoflavanones from roots of *Sophora tetraptera*. *Phytochemistry*, 50 (4), p. 695-701, 1999.

*formosana*⁵¹ enquanto que a flavanona (4) foi isolada somente de *Lonchocarpus minimiflorus*⁵².

6.2a Flavanona (4) (4',5- dihidroxi-6-(3,3-dimetilalila)-7-metoxi flavanona)

O espectro de RMN ¹H (Anexo A- E56, Tabela 19) apresenta sinais em δ_H 5,30 (1H; *dd*; $J=13,4$ e $2,2$ Hz); δ_H 3,08 (1H; *dd*; $J=17,1$ e $13,4$ Hz) e δ_H 2,76 (1H; *dd*; $J=17,1$ e $2,2$ Hz) característicos, respectivamente, dos hidrogênios H-2, H-3_{ax} e H-3_{eq} do anel C de uma flavanona.



Conformação preferida do anel C de flavanonas

A presença de um singlete em δ_H 12,03 (1H) evidencia uma hidroxila em C-5 que forma ponte de hidrogênio com a carbonila em C-4. Os dois dubletos em δ_H 7,29 (2H; $J=8,2$ Hz; H-2' e H-6') e δ_H 6,88 (2H; $J=8,2$ Hz; H-3' e H-5') comprovam a presença de um anel B *para*-substituído por uma hidroxila.

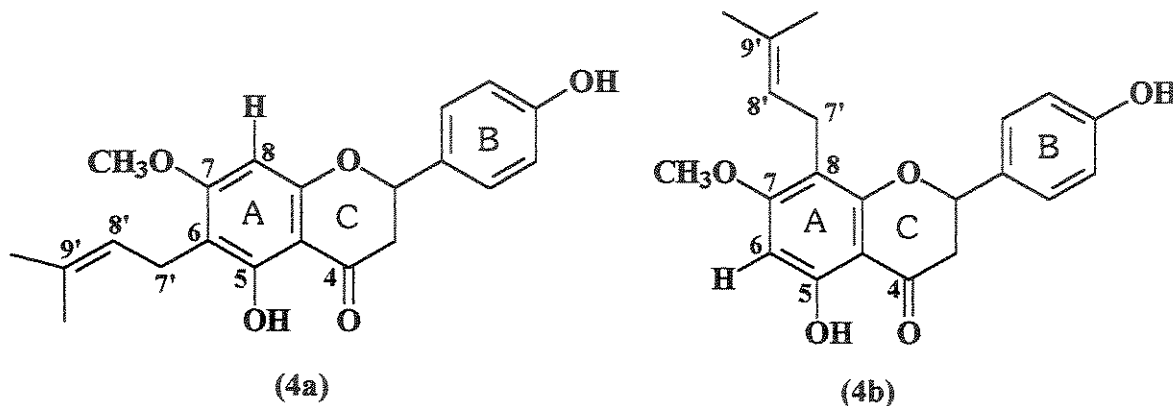
O grupo 3,3 dimetilalila foi identificado pelos seus sinais característicos em δ_H 1,78 (3H, H-10') e δ_H 1,69 (3H, H-11') referentes as metilas em C-9'; δ_H 3,27 (2H; *d*; $J=6,3$ Hz; H-7') e δ_H 5,20 (1H; *tl*; $J=6,3$ Hz; H-8').

Finalmente, dois singletos em δ_H 3,82 (3H) e δ_H 6,07 (1H) indicam respectivamente uma metoxila aromática e um único hidrogênio aromático presentes no anel A.

⁵¹ Matsuura, N.; Inuma, M.; Tanaka, T. e Mizuno, M. Chemotaxonomic approach to the genus *Euchresta* based on prenylflavonoids and prenylflavanones in roots of *Euchresta formosana*. *Biochem. Syst. and Ecol.*, 23 (5), p. 539-545, 1995.

⁵² Mahmoud, E.N. e Waterman, P.G. Minimiflorin: a new 2'-hydroxyflavanone from *Lonchocarpus minimiflorus* seeds. *J. Nat. Prod.*, 48 (4), p. 648-650, 1985.

Considerando a biossíntese dos flavonóides e sabendo que os deslocamentos químicos de H-6 (δ_H 6,10) e H-8 (δ_H 6,08) são muito próximos^{53,54} podemos ter um dos dois regioisômeros possíveis para esta substância (4a e 4b):



O espectro de RMN ^{13}C juntamente com o experimento DEPT 90° e 135° (Anexo A- E57, Tabela 21) mostra a presença de 3CH_3 , 2CH_2 , 7CH e 9C_o .

O esqueleto de uma flavanona foi também confirmado pelos sinais em δ_c 79,1 (CH), δ_c 43,3 (CH_2) e 196,1 (C_o) relativos, respectivamente aos carbonos C-2, C-3 e C-4. Os sinais em δ_c 21,0 (CH_2 , C-7'); δ_c 122,2 (CH, C-8'); δ_c 131,7 (C_o , C-9'); δ_c 25,8 (CH_3 , C-11'); δ_c 17,7 (CH_3 , C-10') comprovaram a presença do grupo 3, 3-dimetilalila, enquanto o sinal em δ_c 55,8 (CH_3) deve-se ao grupo metoxila em C-7.

Os carbonos do anel A absorvem em δ_c 160,2 (C_o , C-5); δ_c 110,0 (C_o , C-6 ou C-8); δ_c 165,5 (C_o , C-7); δ_c 91,0 (CH, C-8 ou C-6); δ_c 161,4 (C_o , C-9) e δ_c 102,9 (C_o , C-10); e do anel B absorvem em δ_c 127,9 (CH, C-2' e C-6'); δ_c 115,6 (CH, C-3' e C-5'); δ_c 156,1 (C_o , C-4') e δ_c 130,6 (C_o , C-1').

Como detectamos as flavanonas (4) e (5) em mais de uma fração e, sabendo que por RMN ^1H e RMN ^{13}C não é possível diferenciar os deslocamentos químicos

⁵³ Mahmoud, E.N. e Waterman, P.G. Minimiflorin: a new 2'-hydroxyflavanone from *Lonchocarpus minimiflorus* seeds. *J. Nat. Prod.*, 48 (4), p. 648-650, 1985.

⁵⁴ Rao, E. V.; Sridhar, P. e Prasad, Y. R. Two prenylated flavanones from *Mundulea suberosa*. *Phytochemistry*, 46 (7), p. 1271- 1274, 1997.

dos hidrogênios e carbonos nas posições C-6 e C-8 do anel A (4a e 4b), foi necessário a realização do Teste de Gibbs, uma vez que o experimento de diferença de NOE não apresentou dados conclusivos.

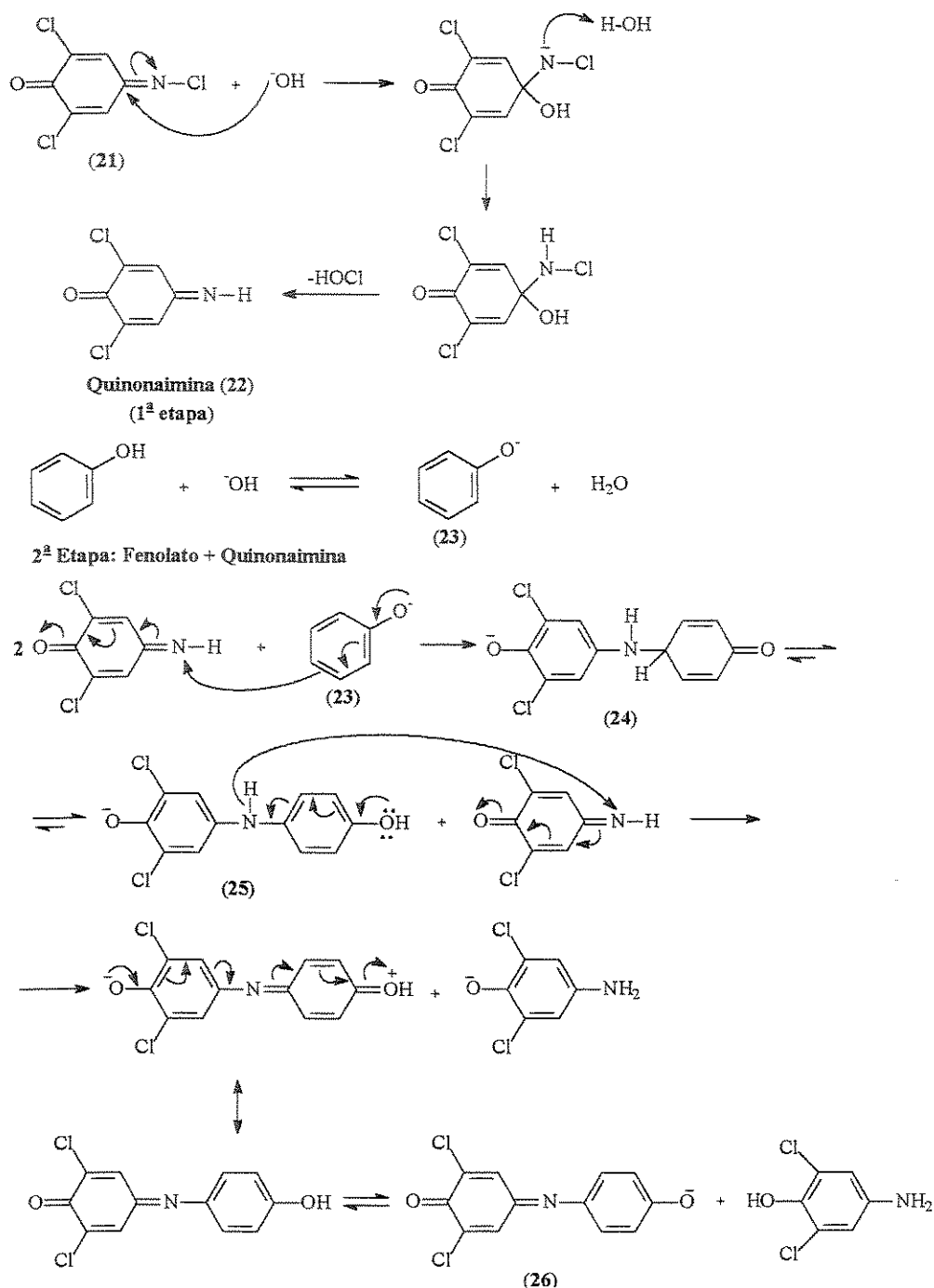
O reagente de Gibbs^{55,56} (21) (2,6 dicloro-*p*- benzoquinona 4- cloroimida) é usado para a detecção de derivados fenólicos. O reagente se adiciona a posição *para* do anel fenólico para dar um indofenol (26). Os indofenóis são fortemente coloridos e sofrem uma mudança dramática de cor com o pH devido a ionização do próton fenólico. Muitos derivados fenólicos com substituintes na posição *para* reagem facilmente com o reagente de Gibbs.

A reação dos fenóis *para*-substituídos com reagente de Gibbs ocorre via perda do substituinte *para* quando este é alcóxido, fenóxido e halogênio, não sendo observado quando o substituinte é uma metila ou alquila.

Alternativamente, com base nos dados da literatura pudemos propor o mecanismo mostrado no Quadro 27.

⁵⁵ Josephy, P. D. e Van Damme, A., Reaction of Gibbs reagent with *para*-substituted phenols. *Anal. Chem.*, vol. 56 (4), p. 813-814, 1984.

⁵⁶ Svobodová, D., Krenek, P., Fraenkl, M. e Gasparic J., The colour reaction of phenols with the Gibbs reagent. *Mikrochimica Acta*, 2 (3-4), p. 197-211, 1978.



Quadro 27- Proposta do mecanismo da reação de Gibbs com base nas referências^{57,58}

⁵⁷ Josephy, P. D. e Van Damme, A., Reaction of Gibbs reagent with *para*-substituted phenols. *Anal. Chem.*, vol. 56 (4), p. 813-814, 1984.

⁵⁸ Svobodová, D., Kreněk, P., Fraenkl, M. e Gasparic J., The colour reaction of phenols with the Gibbs reagent. *Mikrochimica Acta*, 2 (3-4), p. 197-211, 1978.

A placa **B** da Figura 21 mostra o resultado do Teste de Gibbs, onde observamos uma coloração escura dos “spots” correspondentes a flavanona 4, confirmando tratar-se do derivado contendo a posição H-8 livre (proposta 4a), enquanto que a placa **A** mostra a coloração amarela e marrom para os “spots” correspondentes as flavanonas 4 e 5 (lupinifolina) respectivamente, quando reveladas com anisaldeído.

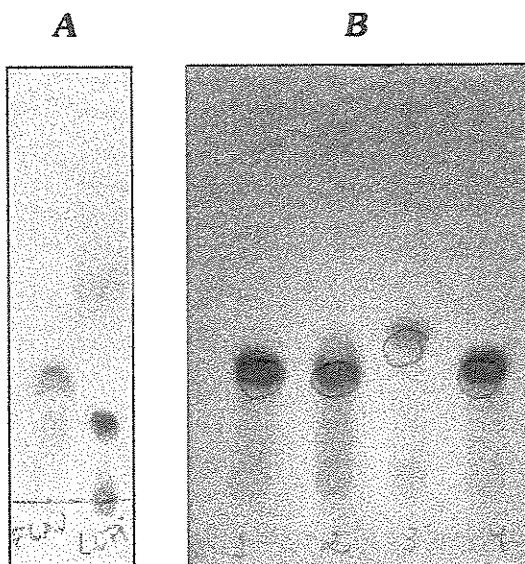


Figura 21- **A**: Placa Cromatográfica analítica obtida através da revelação com anisaldeído (Flav: Flavanona 4; Lupi: Lupinifolina 5); **B**: Placa Cromatográfica analítica obtida através do Teste de Gibbs (1: Flavanona (4), 2: Mistura de Flavanona (4) com Lupinifolina (5), 3: Lupinifolina (5), 4: Flavanona (4)).

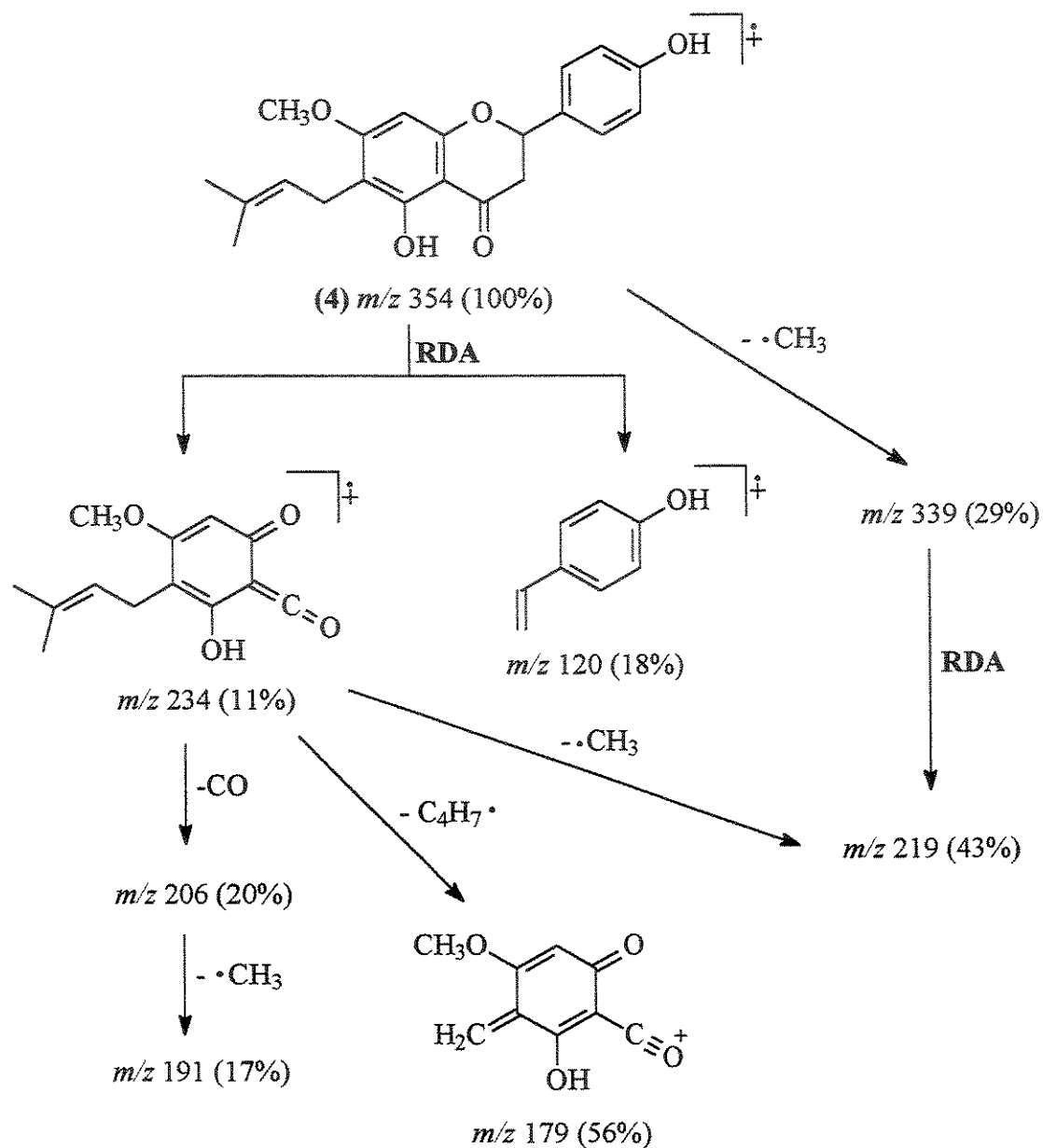
O espectro de massas de alta resolução (Anexo A- E67) apresenta o pico do íon molecular M^+ , de m/z 354,14669 (100%) coerente com a fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_5$ (M^+ 354,146724).

O espectro de massas de baixa resolução (Anexo A- E66), além de apresentar também o pico do íon molecular M^+ , que é o pico base, de m/z 354 (100%), também apresenta picos referentes aos fragmentos obtidos da clivagem do tipo Retro Diels Alder (RDA) do Anel C, que é característica dos flavonóides, e sendo o pico de m/z 120 (18%) para o fragmento contendo o anel B e outro de m/z 234 (11%) para o anel A, indicando, respectivamente, a localização de um

grupo hidroxila em C-4' e do grupo metoxila em C-7. Estes dados são mais uma evidência a favor da estrutura proposta. No quadro 28 observamos a proposta de fragmentação da flavanona (4) no espectrômetro de massas.

Com os dados obtidos pelos espectros de RMN bidimensionais de COSY (Anexo A- E58-60), HETCOR (Anexo A- E61 e E62) e COLOC (Anexo A- E63 a E65), foi possível atribuir os deslocamentos químicos de todos os carbonos e hidrogênios presentes na estrutura (Tabelas 19 e 21), além de comprovarmos que o único hidrogênio aromático (singlete, δ_H 6,07) presente no Anel A é o H-8 e não H-6, pois no experimento COLOC o hidrogênio H-8 (δ_H 6,07) apresentou somente correlações com C-8 (δ_C 91,0; 1J); C-10 (δ_C 102,9; 3J) e com C-9 (δ_C 161,4; 2J). Se este único hidrogênio do anel A fosse o H-6, certamente não observaríamos uma correlação com o C-9 (δ_C 161,4), uma vez que esta seria a quatro ligações (4J), e portanto dificilmente observada.

Baseado nos experimentos EM/EM (Anexo A- E68 a E72) selecionando os íons de m/z 339 [219 (26%)], m/z 206 [191 (27%)] e m/z 234 [219 (41%), 206 (11%), 191 (5%), 179 (24%)] sugerimos o caminho de fragmentação mostrado no quadro 28.



Quadro 28- Proposta de fragmentação da flavanona (4) no espectrômetro de massas

O espectro de Dicroísmo Circular (CD) (Figura 22) mostrou um *Efeito Cotton* positivo devido a transição $n \rightarrow \pi^*$ em 323 nm (θ +2597) e um *Efeito Cotton* negativo na região da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em 285 nm (θ -15451). Sabendo

que, o grupo 2-fenila está na equatorial ($J_{2,3ax} = 13,4$ Hz) então C-2 tem configuração S^{59} .

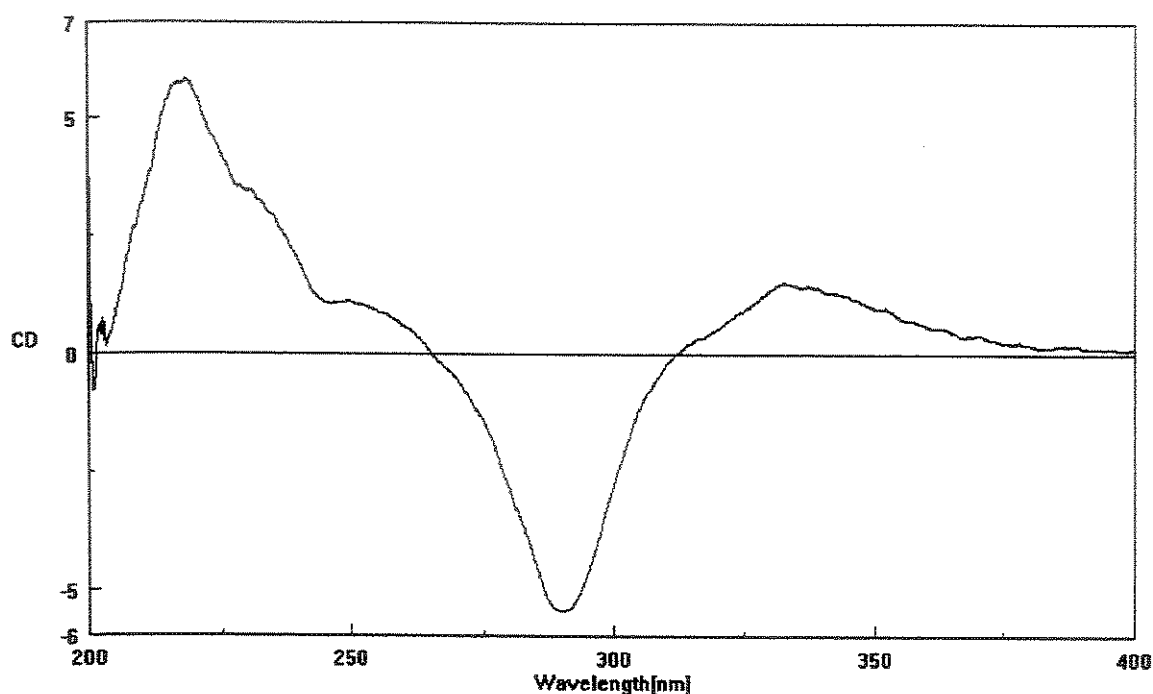


Figura 22- Espectro de CD para a flavanona (4)

O valor da rotação óptica obtida foi de $[\alpha]^{20}_D -11,79^\circ$, medido em Etanol (Grau espectroscópico) com uma concentração de 0,0721 g/mL.

O espectro no UV (Anexo A- E74) desta substância apresenta um perfil típico de flavanonas, uma vez que possui uma absorção máxima em 290 nm ($\log \epsilon = 4,22$) referente a Banda II (cromóforo Benzoila) e um ombro em 338 nm ($\log \epsilon = 3,45$) devido a excitação $n-\pi^*$ dos pares de elétrons do oxigênio da carbonila.

O espectro no IV (Anexo A- E73) apresenta bandas de absorções relativas às ligações O-H (ν 3376,2 cm^{-1}) e C=O (ν 1640,0 cm^{-1}) quelada.

Para esta flavanona, a literatura⁶⁰ somente menciona dados espectrais de RMN ^1H (90 MHz) e Espectro de massas. Neste trabalho estamos acrescentando

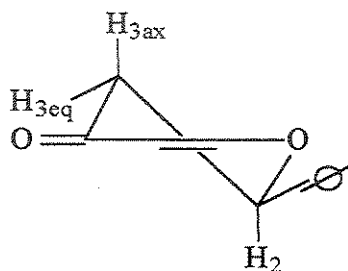
⁵⁹ Smalberger, T. M., Vleggaar, R., e Weber, J. C. Flavonoids from *Tephrosia*-VII. The constitution and absolute configuration of lupinifolin and lupinifolinol, two flavanones from *Tephrosia lupinifolia* Burch (DC). *Tetrahedron*, 30 (21), p. 3927-3931, 1974.

⁶⁰ Mahmoud, E.N. e Waterman, P.G. Minimiflorin: a new 2'-hydroxyflavanone from *Lonchocarpus minimiflorus* seeds. *J. Nat. Prod.*, 48 (4), p. 648-650, 1985.

dados de RMN ^1H (500 MHz), RMN ^{13}C (75 MHz) (DEPT 90° e 135°), COSY, HETCOR a uma ligação, HETCOR a várias ligações, UV, IV, Espectro de massas de alta resolução e experimento EM/EM.

6.2b Lupinifolina (5)

No espectro de RMN ^1H (Anexo A- E75, Tabela 20) desta substância também observamos sinais característicos dos hidrogênios H-2 (δ_{H} 5,34; *dd* J = 12,8 e 3,0 Hz); H-3_{ax} (δ_{H} 3,05; *dd*; J = 17,1 e 12,8 Hz) e H-3_{eq} (δ_{H} 2,80; *dd*; J = 17,1 Hz e 3,0 Hz) de uma flavanona, que apresenta a conformação preferida igual a mostrada abaixo.

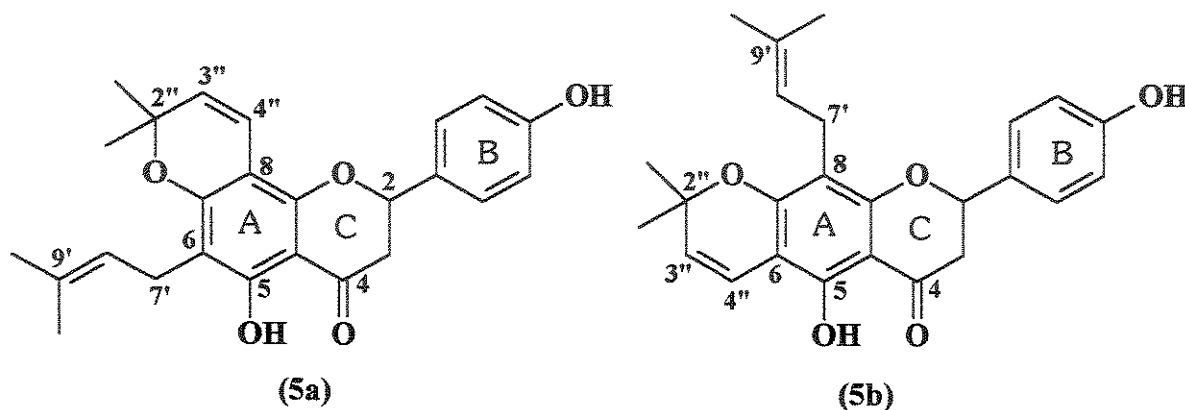


Conformação preferida do anel C de flavanonas

No espectro de RMN ^{13}C (Anexo A- E76, Tabela 21), os carbonos C-2, C-3 e C-4 absorvem respectivamente em δ_{C} 78,5; δ_{C} 43,3 e δ_{C} 196,4; confirmados pelo experimento DEPT 90° e 135° (E79).

No espectro de RMN ^1H (Anexo A- E75), a presença de sinais característicos do anel 2,2-dimetilcromeno [δ_{H} 6,64 (1H; *d*; J = 10,0 Hz; H-4''); 5,51 (1H; *d*; J = 10,0 Hz; H-3''); 1,45 (3H, *s*, CH₃-2'') e 1,44 (3H, *s*, CH₃-2'')]; do grupo 3,3- dimetilalila [δ_{H} 5,15 (1H; *tl*; J = 7,2 e 1,2 Hz; H-8'); 3,21 (2H; *d*; J = 7,2 Hz; H-7') e 1,65 (6H, *s*, 2CH₃-9')] e de um anel aromático *para*- substituído [δ_{H} 7,32 (2H; *d*; J = 8,2 Hz; H-2' e H-6') e 6,88 (2H; *d*; J = 8,2 Hz; H-3' e H-5')], aliado a um singlete em δ_{H} 12,25 (1H) atribuído a um hidrogênio de uma hidroxila quelatogênica no carbono C-5, indicam a presença de um anel A totalmente substituído e um anel B *para*-substituído, por uma hidroxila em C-4' [δ_{H} 5,57 (1H, *sl*, 4'-OH)], para esta flavanona (5).

De acordo com estes dados, podemos propor dois possíveis regioisômeros (5a e 5b):



No espectro de RMN ^{13}C (Anexo A- E76) observamos a presença de 4CH₃, 2 CH₂, 8 CH e 11 C_o, dos quais os sinais em δ_c 21,5 (CH₂, C-7'); δ_c 122,5 (CH, C-8'); δ_c 131,0 (C_o, C-9'); δ_c 25,8 (CH₃, C-11') e δ_c 17,8 (CH₃, C-10') são referentes ao grupo 3,3-dimetilalila, enquanto os sinais em δ_c 125,9 (CH, C-3''); δ_c 115,5 (CH, C-4''); δ_c 78,1 (C_o, C-2'') e δ_c 29,7 (2CH₃, 2''-CH₃) comprovam a presença do anel 2,2- dimetilcromeno.

Os demais sinais estão de acordo com a proposta de uma anel A totalmente substituído e de um anel B aromático *para*- substituído (Tabela 21).

Como, somente pela análise destes dados não é possível decidir qual dos regioisômeros foi isolado (5a ou 5b), realizamos a acetilação de uma amostra desta substância (Fluxograma 15; 5. Parte experimental) pois, segundo Arnone et al ^{61,62,63} se o anel 2,2- dimetilcromeno estiver fundido **angularmente** ao anel A (5a), os hidrogênios H-3'' e H-4'' sofrerão uma desproteção no composto acetilado, enquanto que, se ele estiver fundido **linearmente** ao anel A (5b), o

⁶¹ Arnone, A.; Cardillo, G.; Merlini, L. e Mondelli, R. NMR effects of acetylation and long-range coupling as a tool for structural elucidation of hydroxychromenes. *Tetrahedron Letters*, p. 4201-4206, 1967.

⁶² Rao, M.N.; Krupadanam, G. L. D. e Srimannarayana, G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. *Phytochemistry*, 37 (1), p. 267- 269, 1994.

⁶³ Rao, E. V.; Prasad, Y. R. e Ganapaty, S. Three prenylated isoflavones from *Milletia auriculata*. *Phytochemistry*, 31 (3), p. 1015-1017, 1992.

hidrogênio H-3" sofrerá uma desproteção e H-4" uma proteção provocada pelo cone de proteção da carbonila do acetato em C-5.

Analisando o espectro de RMN ^1H (Anexo A- E80) do produto bi-acetilado observamos uma desproteção no sinal referente ao H-3" seguida de uma proteção no sinal referente ao H-4" (Tabela 18), indicando que a proposta 5b (anel 2,2-dimetilcromeno fundido *linearmente* ao Anel A; Lupinifolina) corresponde a flavanona isolada.

Tabela 18- Dados de deslocamento químico para H-3" e H-4" nos produtos acetilados.

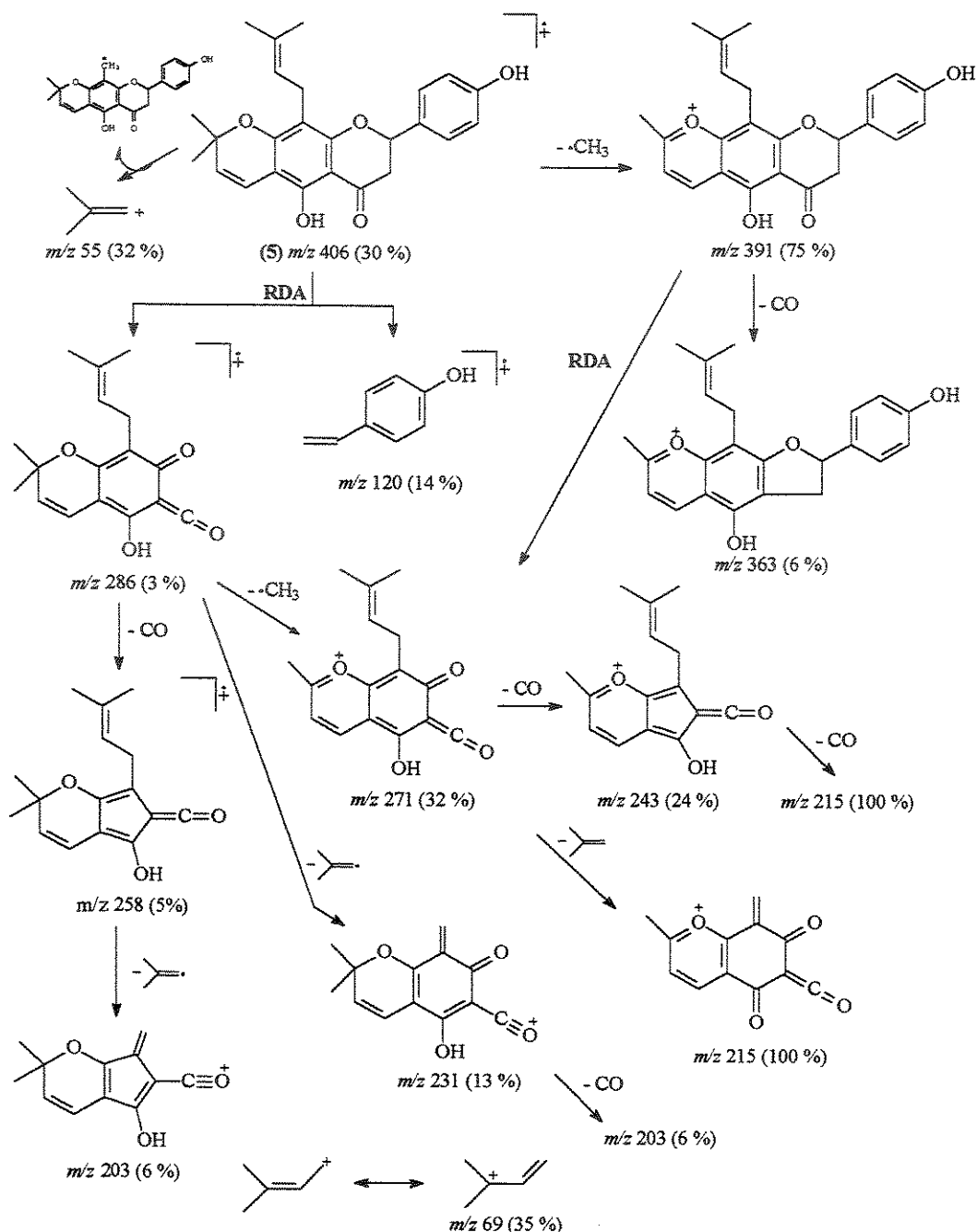
Substância	H-3" ($\Delta\delta$)	H-4" ($\Delta\delta$)
Flavanona isolada	5,65 (+0,14)	6,40 (-0,24)
Isoflavona da literatura ⁶⁴	5,80 (+0,15)	6,55 (-0,20)

O valor da rotação óptica obtida foi de $[\alpha]^{20}_D -7,23^\circ$ medido em Etanol (Grau espectroscópico) com uma concentração de 0,047 g/mL.

No espectro no UV (Anexo A- E79) observamos a presença de uma banda de absorção máxima em 274 nm ($\log \epsilon = 4,13$) referente ao cromóforo benzoíla (Banda II) e outra em 362 nm ($\log \epsilon = 2,91$), apresentando-se como um ombro, referente a absorção $n-\pi^*$ da carbonila. Por outro lado, no espectro no IV (Anexo A- E78) destacamos as absorções relativas às ligações O-H (ν 3403,8 cm^{-1}) e C=O (ν 1642,9 cm^{-1}) quelada.

Pelo espectro de massas (Anexo A- E77), observamos o pico do íon molecular M^+ . de m/z 406 (30%), o pico base de m/z 215 (100%) e os principais fragmentos originados da Retro- Diels Alder do anel C, como mostramos no quadro 29.

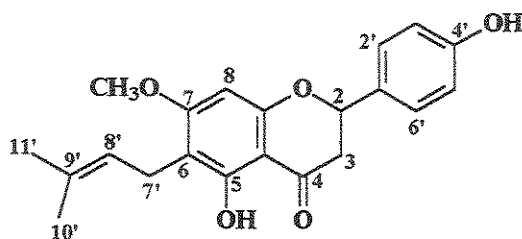
⁶⁴ Rao, E. V.; Prasad, Y. R. e Ganapaty, S. Three prenylated isoflavones from *Milletia auriculata*. *Phytochemistry*, 31 (3), p. 1015-1017, 1992.



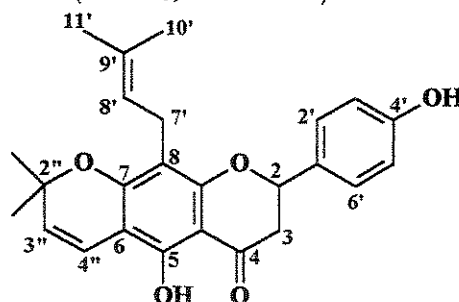
Quadro 29- Proposta de fragmentação da lupinifolina (5) no espectrômetro de massas

Para a lupinifolina estamos acrescentando apenas os dados espectrais de RMN ¹H (500 MHz), pois em 1997, Mahidol et al.⁶⁵ a isolou de *Derris reticulata*, fornecendo vários dados espectroscópicos.

⁶⁵ Mahidol, C.; Prawat, H.; Ruchirawat, S.; Lihkitwitayawuid, K.; Lin, L-Z e Cordell, G. A. Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. *Phytochemistry*, 45 (4), p. 825-829, 1997.

Apêndice B- Tabelas das flavanonas (4 e 5)Tabela 19- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da flavanona (4).

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
11'	1,69	3H, s
10'	1,78	3H, s
3 eq	2,76	1H, dd, J= 17,1 e 2,2
3 ax	3,08	1H, dd, J= 17,1 e 13,4
7'	3,27	2H, d, J= 6,3
7- OCH ₃	3,82	3H, s
8'	5,20	1H, tl, J= 6,3
2	5,30	1H, dd, J= 13,4 e 2,2
8	6,07	1H, s
3' e 5'	6,88	2H, d, J= 8,2
2' e 6'	7,29	2H, d, J= 8,2
5-OH	12,03	1H, s

Tabela 20- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da flavanona lupinifolina (5).

H	δ	Multiplicidade e J (Hz)
2"-CH ₃	1,44	3H, s
2"-CH ₃	1,45	3H, s
10' e 11'	1,65	6H, s
3 eq	2,80	1H, dd, J= 17,1 e 3,0
3 ax	3,05	1H, dd, J= 17,1 e 12,8
7'	3,21	2H, d, J= 7,2
8'	5,15	1H, tl, J= 7,2 e 1,2
2	5,34	1H, dd, J= 12,8 e 3,0
3"	5,51	1H, d, J= 10,0
4'- OH	5,57	1H, sl
4"	6,64	1H, d, J= 10,0
3' e 5'	6,88	2H, d, J= 8,2
2' e 6'	7,32	2H, d, J= 8,2
5-OH	12,25	1H, s

Tabela 21- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) das flavanonas (4 e 5).

C	4 5 	
	4	5
2	79,1	78,5
3	43,3	43,3
4	196,1	196,4
5	160,2	155,8
6	110,0	108,6
7	165,5	159,3
8	91,0	102,8
9	161,4	159,8
10	102,9	102,6
1'	130,6	130,8
2'	127,9	127,7
3'	115,6	115,6
4'	156,1	156,6
5'	115,6	115,6
6'	127,9	127,7
7'	21,0	21,5
8'	122,2	122,5
9'	131,7	131,0
10'	17,7	17,8
11'	25,8	25,8
2''	-	78,1
3''	-	125,9
4''	-	115,5
2CH ₃ -2''	-	29,7
7-OCH ₃	55,8	-

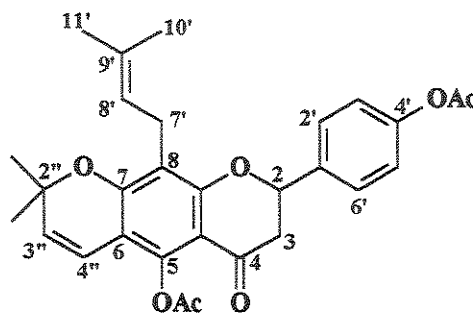
Tabela 22- Correlações observadas nos espectros de HETCOR (C-H, 1J) e COLOC (C-H, nJ) (CDCl₃, 7 Tesla) da flavanona (4).

H (δ)	C ($\delta, ^1J$)	C ($\delta, ^nJ$)
<u>H</u> O-5 (12,03)	-	5 (160,2); 6 (110,0)
2 (5,30)	2 (79,1)	-
3 <i>ax</i> (3,08)	3 (43,3)	2 (79,1); 4 (196,1)
3 <i>eq</i> (2,76)	3 (43,3)	4 (196,1)
8 (6,07)	8 (91,0)	10 (102,9); 9 (161,4)
2' (7,29)	2' (127,9)	4' (156,1)
3' (6,88)	3' (115,6)	1' (130,6)
5' (6,88)	5' (115,6)	1' (130,6)
6' (7,29)	6' (127,9)	4' (156,1)
7' (3,27)	7' (21,0)	5 (160,2); 6 (110,0)
8' (5,20)	8' (122,2)	-
<u>H</u> ₃ CO-7 (3,82)	<u>H</u> ₃ CO-7 (55,8)	7 (165,5)
10' (1,78)	10' (17,7)	8' (122,2); 9' (131,7)
11' (1,69)	11' (25,8)	8' (122,2); 9' (131,7)

Tabela 23- Correlações observadas no espectro de COSY para a flavanona (4).

H (δ)	H (δ, J^a)
2' e 6' (7,29)	3' e 5' (6,88)
2 (5,30)	3 <i>ax</i> (3,08) e 3 <i>eq</i> (2,76)
8' (5,20)	7' (3,27)
3 <i>ax</i> (3,08)	3 <i>eq</i> (2,76)
7' (3,27)	10' (1,78); 11' (1,69)

Tabela 24- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da flavanona lupinifolina bi-acetilada.



H	δ	Multiplicidade e J (Hz)
2"-CH ₃	1,45	3H, s
2"-CH ₃	1,46	3H, s
10' e 11'	1,66	6H, s
4'-OCOCH ₃	2,33	3H, s
5-OCOCH ₃	2,42	3H, s
3 <i>eq</i>	2,73	1H, <i>dd</i> , $J = 15,7$ e $2,6$
3 <i>ax</i>	2,95	1H, <i>dd</i> , $J = 15,7$ e $12,8$
7'	3,30	2H, <i>dl</i> , $J = 7,3$
8'	5,16	1H, <i>tl</i> , $J = 7,3$
2	5,44	1H, <i>dd</i> , $J = 12,8$ e $2,6$
3"	5,65	1H, <i>d</i> , $J = 10,2$
4"	6,39	1H, <i>d</i> , $J = 10,2$
3' e 5'	7,15	2H, <i>d</i> , $J = 8,6$
2' e 6'	7,47	2H, <i>d</i> , $J = 8,6$

Tabela 25- Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) da flavanona lupinifolina bi-acetilada.

C	δ
2	78,5
3	45,2
4	189,3
5	143,9
6	115,3
7	157,3
8	109,4
9	160,7
10	107,4
2'	127,1
3'	121,9
4'	150,6
5'	121,9
6'	127,1
7'	22,0
8'	121,7
9'	136,5
10'	17,8
11'	25,8
2''	78,1
3''	129,8
4''	115,4
2''-CH ₃	28,4
2''-CH ₃	28,3
5-OCOCH ₃ *	21,1
4'-OCOCH ₃ *	21,0

* Valores intercambiáveis

6.3 Isoflavonas

As isoflavonas constituem o maior e o mais comum grupo de isoflavonóides naturais⁶⁶.

O espectro no UV⁶⁷ das isoflavonas apresenta um perfil idêntico ao das flavanonas, uma vez que também não possuem conjugação entre os anéis A e B. Desta forma, apresentam uma intensa absorção na região de 245-270 nm (Banda II- Sistema benzoíla) e outra de menor intensidade na região de 300-340 nm.

No espectro de RMN ¹H, o hidrogênio ligado ao carbono C-2 em isoflavonas aparece como um singlete na região de δ 7,60- 7,88; mais desprotegido do que a maioria dos hidrogênios aromáticos. Isto ocorre em função da sua relação β com grupo carbonila e ao fato de estar ligado à um átomo de carbono carbinólico.

O espectro de massas para as isoflavonas apresenta principalmente picos referentes ao íon molecular [M]⁺, [M-H]⁺ e [M-CH₃]⁺. Os picos referentes aos fragmentos originados da clivagem RDA do anel C, muito comum nos EM dos flavonóides, apresentam-se pouco intensos para as isoflavonas com 4 ou mais substituintes.

⁶⁶ Dewick, P. M. *Isoflavonoids*. In: Harbone, J. B. *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, p. 120, 1993.

⁶⁷ Markham, K. R. e Mabry, T. J. *Ultraviolet- visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids*. In: Harbone, J. B.; Mabry, T. J. e Mabry, H. *The Flavonoids*, Academic Press, p. 45-77, 1975.

No espectro de RMN ^{13}C ⁶⁸ das isoflavonas, o carbono C-2 absorve entre δ 150,6-155,4; o C-3 entre δ 122,0-126,1 e o C-4 entre δ 174,2-181,2. O deslocamento químico do carbono C-2 permanece mais ou menos intacto pelo substituição nos anéis aromáticos. Contudo, deslocamento químico do C-3 e C-4 exibem dependência de substituição no anel aromático B assim como em A, particularmente por uma substituinte “oxy”.

A presença de um grupo hidroxila em C-5 também influencia nos deslocamentos químicos dos carbonos do anel C através das interações intramoleculares de ponte de hidrogênio. Assim, o carbono C-4 aparece entre δ 179,2-181,5 e o carbono C-2 sofre uma desproteção de aproximadamente 3 ppm.

Entre as duas isoflavonas, osajina (6) já foi isolada de *Maclura pomifera*⁶⁹, *Euchresta japonica* Hook.⁷⁰, *Erythrina variegata*⁷¹, *Derris scandens*⁷² e *Euchresta horsfieldii* ⁷³, e a escandinona (7) de *Derris scandens*⁷².

6.3a Osajina (6)

No espectro de RMN ^1H (Anexo A- E83, Tabela 26), a presença de um singlete com integração para 1H, em δ 7,87 caracteriza o hidrogênio H-2 de uma isoflavona, enquanto que no espectro de RMN ^{13}C (Anexo A- E84, Tabela 28) os sinais em δ 152,2; 123,4 e 180,9 confirmam este tipo de esqueleto, uma vez que são típicas dos carbonos C-2, C-3 e C-4 respectivamente.

⁶⁸ Agrawal, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier p. 192, 1989.

⁶⁹ Mahmoud, Z.F. Antimicrobial components from *Maclura pomifera* fruit. *Planta Medica*, 42, p. 299-301, 1981.

⁷⁰ Shirataki, Y.; Manaka, A.; Yokoe, I. e Komatsu, M. Two prenylflavanones from *Euchresta japonica*. *Phytochemistry*, 21 (12), p. 2959-2963, 1982.

⁷¹ Deshpande, V.H.; Pendse, A. D. e Pendse, R. Erythrinins A, B & C, Three new isoflavones from the bark of *Erythrina variegata*. *Indian J. Chem.*, 15B, p. 205-207, 1977.

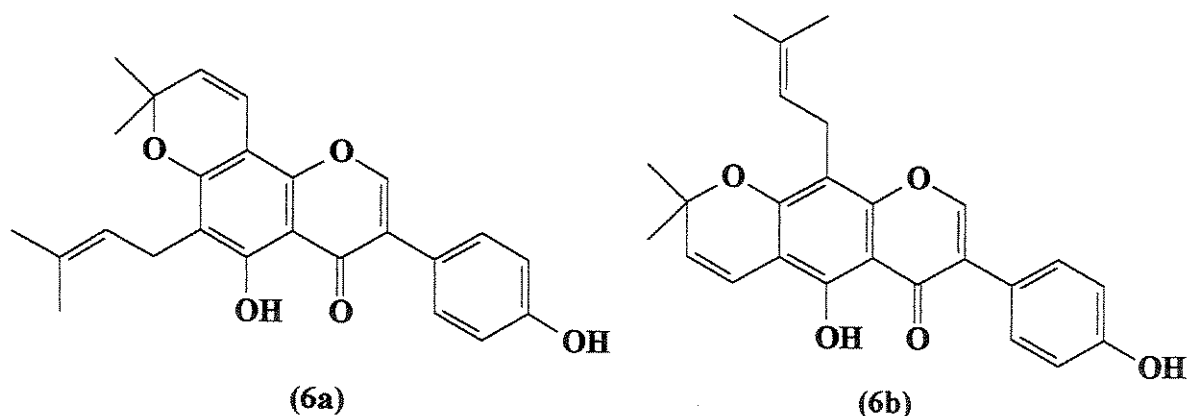
⁷² Pelter, A. e Stainton, P. The extractives from *Derris scandens*. Part II. The isolation of osajin and two new isoflavones, scandenone and scandinone. *J. Chem. Soc. (C)*, p. 701-704, 1966.

⁷³ Mizuno, M.; Matsuura, N.; Iinuma, M.; Tanaka, T. e Phengklai, C. Isoflavones from stems of *Euchresta horsfieldii*. *Phytochemistry*, 29 (8), p. 2675-2677, 1990.

O espectro de RMN ^1H (Anexo A- E83, Tabela 26) também apresenta sinais característicos de uma hidroxila quelada [δ_{H} 13,13 (1H, s)]; do anel 2, 2-dimetilcromeno [δ_{H} 6,70 (1H; *d*; $J=10,0$ Hz; H-4''); 5,60 (1H; *d*; $J=10,0$ Hz; H-3''); 1,48 (6H, s, 2CH₃-2'')]; do grupo 3,3- dimetilalila [δ_{H} 5,24 (1H; *tl*; $J=7,3$ e 1,5 Hz; H-8'); 3,35 (2H; *d*; $J=7,3$ Hz; H-7'), 1,81 (3H, s, CH₃-10') e 1,68 (3H, s, CH₃-11')] e de um anel B aromático *para*-substituído por uma hidroxila [δ_{H} 7,40 (2H; *d*; $J=8,6$ Hz; H-2' e 6'); 6,90 (2H; *d*; $J=8,6$ Hz; H-3' e H-5') e 5,12 (1H, *sl*, 4'-OH)].

O espectro de RMN ^{13}C (Anexo A- E84, Tabela 28) além de apresentar sinais típicos para uma isoflavona, também confirmou as presenças do grupo 3,3- dimetilalila [δ_{C} 21,3 (CH₂, C-7'); 121,9 (CH, C-8'); 131,6 (C_O, C-9'); 25,8 (CH₃, C-11') e 17,9 (CH₃, C-10')], do anel 2,2- dimetilcromeno [δ_{C} 127,2 (CH, C-4''); 114,9 (CH, C-3''); 77,8 (C_O, C-2'') e 28,1 (CH₃, 2CH₃-2'')]] e de um anel aromático *para*-substituído [δ_{C} 130,4 (2H, C-2' e C-6'); 115,6 (2CH, C-3' e C-5'); 123,3 (C_O, C-1') e 157,2 (C_O, C-4')].

Com estes dados, podemos ter duas estruturas regioisoméricas possíveis para esta substância (6a e 6b):



Seguindo, novamente, os estudos feitos por Arnone et al.^{74,75} para determinar a fusão angular ou linear do anel 2,2-dimetilcromeno no anel A,

⁷⁴ Arnone, A.; Cardillo, G.; Merlini, L. e Mondelli, R. NMR effects of acetylation and long-range coupling as a tool for structural elucidation of hydroxychromenes. *Tetrahedron Letters*, p. 4201-4206, 1967.

⁷⁵ Rao, M.N.; Krupadanam, G. L. D. e Srimannarayana, G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. *Phytochemistry*, 37 (1), p. 267- 269, 1994.

acetilamos (Fluxograma 15; 5. Parte Experimental) as 3,9 mg do composto isolado, a fim de obtermos o produto bi-acetilado.

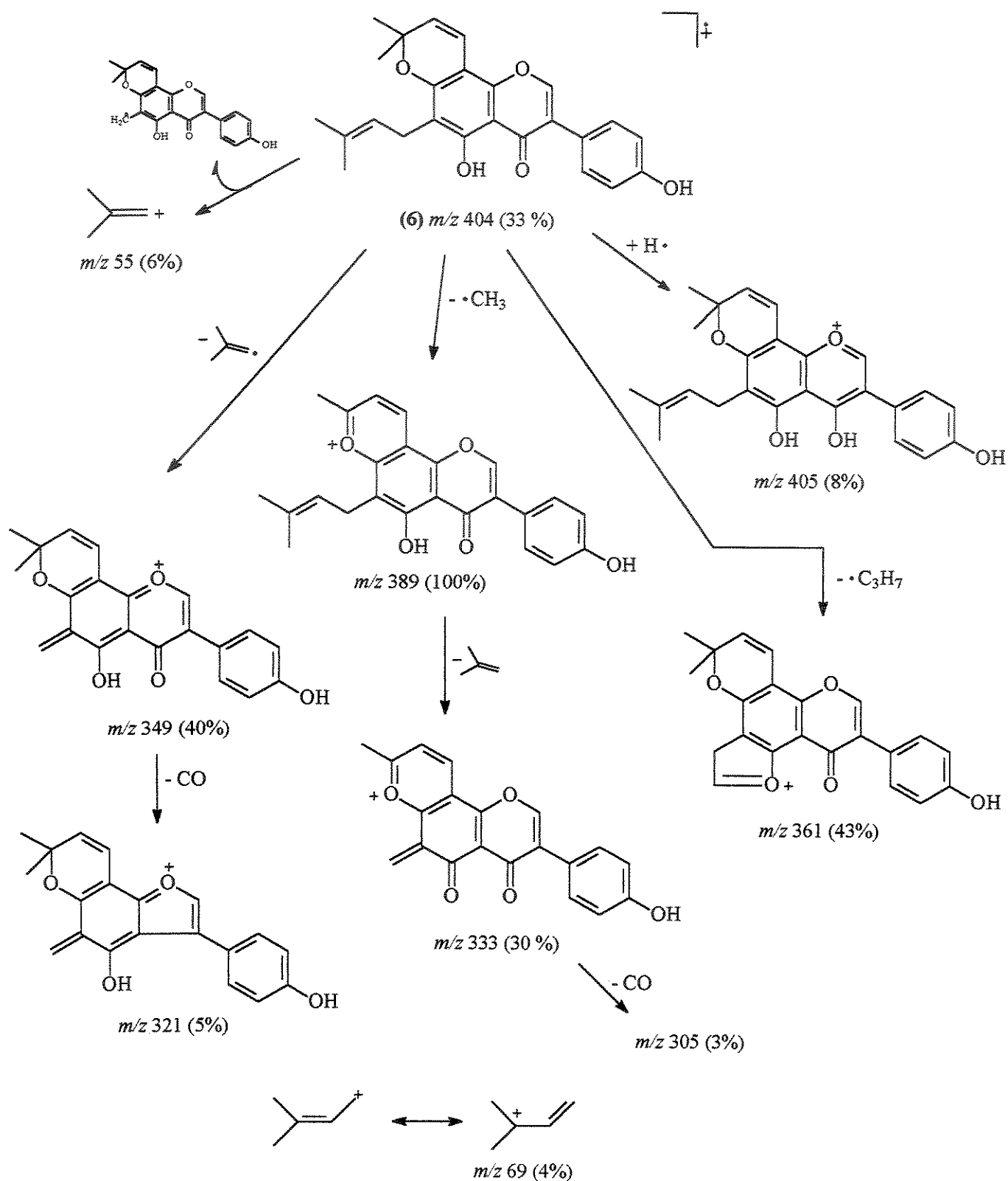
A reação produziu uma pequena quantidade de uma mistura do produto mono-acetilado e bi-acetilado, tornando inviável uma posterior purificação por cromatografia em placa preparativa para separar o produto bi-acetilado e comparar seus dados espectroscópicos de RMN ^1H com o produto isolado.

Desta forma, os dados espectroscópicos foram comparados com os relatados na literatura⁷⁶, os quais estão coerentes para a isoflavona osajina (6=6a).

O espectro de massas (Anexo A- E85) apresenta principalmente o pico do íon molecular M^+ de m/z 404 (33%) e o pico base de m/z 389 (100%) referente a perda de um grupo metila do anel 2,2-dimetilcromeno (Quadro 30). É interessante mencionar que os fragmentos provenientes da clivagem Retro-Diels Alder do anel C não são observados, conforme mencionado na literatura⁷⁷, principalmente para isoflavonas com quatro ou mais substituintes, onde normalmente estes fragmentos ocorrem com baixa intensidade.

⁷⁶ Delle Monache, G.; Scurria, R.; Vitali, A.; Botta, B.; Monacelli, B.; Pasqua, G.; Palocci, C. e Cernia, E. Two isoflavones and a flavone from the fruits of *Maclura pomifera*. *Phytochemistry*, 37 (3), p. 893-898, 1994.

⁷⁷ Mabry, T. J. e Markham, K. R. Mass spectrometry of flavonoids. In: Harbone, J. B.; Mabry, T. J. e Mabry, H. *The Flavonoids*, Academic Press, p. 97, 1975.



Quadro 30- Proposta de fragmentação da osajina (6) no espectrômetro de massas

O espectro no UV (Anexo A- E87) desta substância apresenta um perfil característico para isoflavonas, uma vez que mostra um máximo de absorção em 273 nm ($\log \epsilon = 4,61$) referente a Banda II (cromóforo benzoila) e outra de menor intensidade, apresentando-se como um ombro, em 357 nm ($\log \epsilon = 3,28$), referente a absorção $n-\pi^*$ da carbonila.

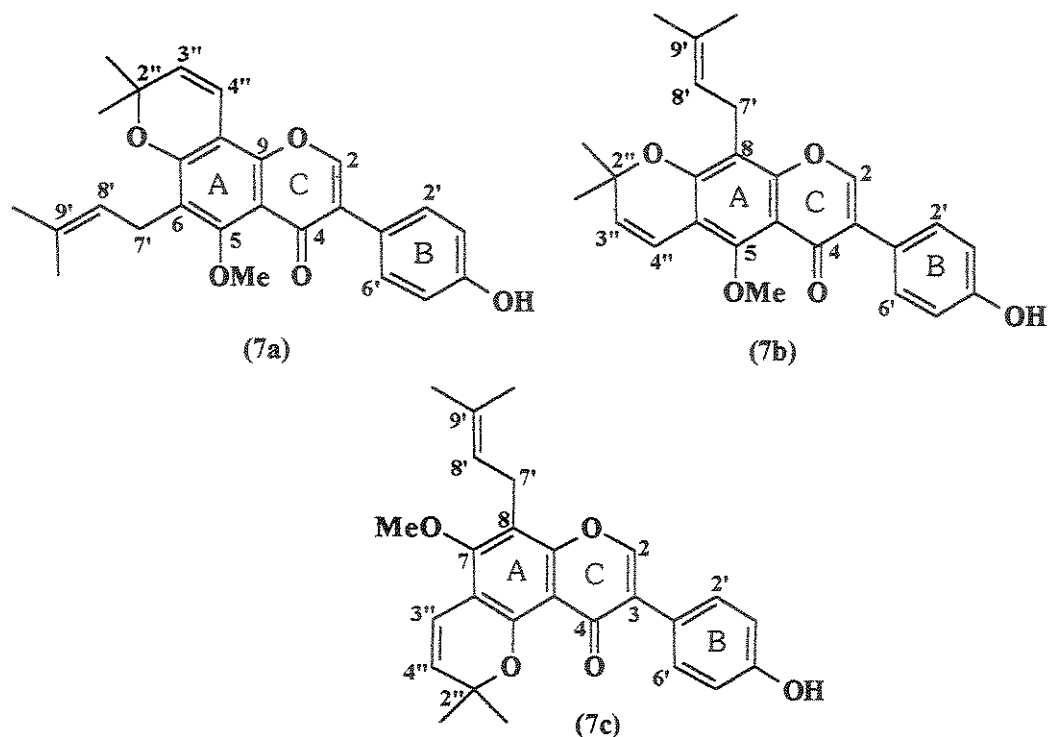
O espectro no IV (Anexo A- E86) apresenta principalmente as absorções referentes a hidroxila ($3373,6 \text{ cm}^{-1}$) e de uma carbonila quelada ($1645,9 \text{ cm}^{-1}$).

6.3b Escandinona (7)

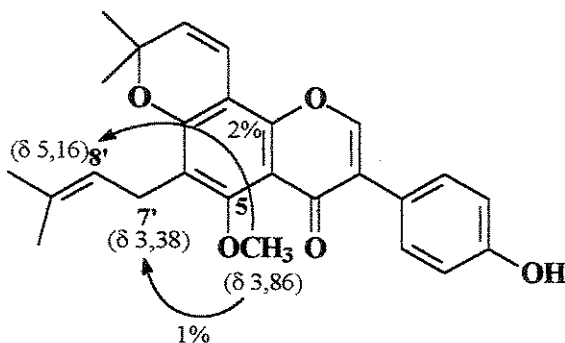
Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C (Anexo A- E88 e E89, Tabelas 27 e 28) desta substância são muito semelhantes aos da osajina (6), onde foi observado sinais característicos do hidrogênio H-2 de uma isoflavona [$\delta_{\text{H}} 7,82$ (1H, s)], dos carbonos C-2 ($\delta_{\text{C}} 150,2$), C-3 ($\delta_{\text{C}} 125,7$) e C-4 ($\delta_{\text{C}} 175,5$) de um anel C típico de isoflavonas, de um anel *para*- substituído, do anel 2,2- dimetilcromeno e do grupo 3, 3-dimetilalila.

Por outro lado, a ausência de um singleto acima de $\delta_{\text{H}} 10,0$ e a presença de um singleto em $\delta_{\text{H}} 3,86$ (3H, s) no espectro de RMN ^1H , indicam a substituição da hidroxila quelatogênica por uma metoxila no Anel A desta isoflavona. Do mesmo modo, o sinal em $\delta_{\text{C}} 62,4$ (CH_3) no espectro de RMN ^{13}C , também confirma a presença da metoxila aromática que, segundo a biossíntese dos flavonóides, poderá estar ligada no carbono C-5 ou no carbono C-7.

Desta forma, podemos ter três estruturas regioisoméricas possíveis para esta substância (7a, 7b e 7c):



Para decidir entre as três propostas acima, foi feito o experimento de diferença de NOE (Anexo A- E90), onde ao irradiar a metoxila (δ_H 3,86), observamos somente incremento nos sinais de H-7' (1%) e H-8' (2%), relativos ao grupo 3,3- dimetilalila, de acordo com o esperado para as estruturas **7a** e **7c**. A proposta estrutural **7c** pôde ser descartada, pois os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com os publicados na literatura⁷⁸ para Escandinona (7a=7).



Incrementos observados no experimento de diferença de NOE

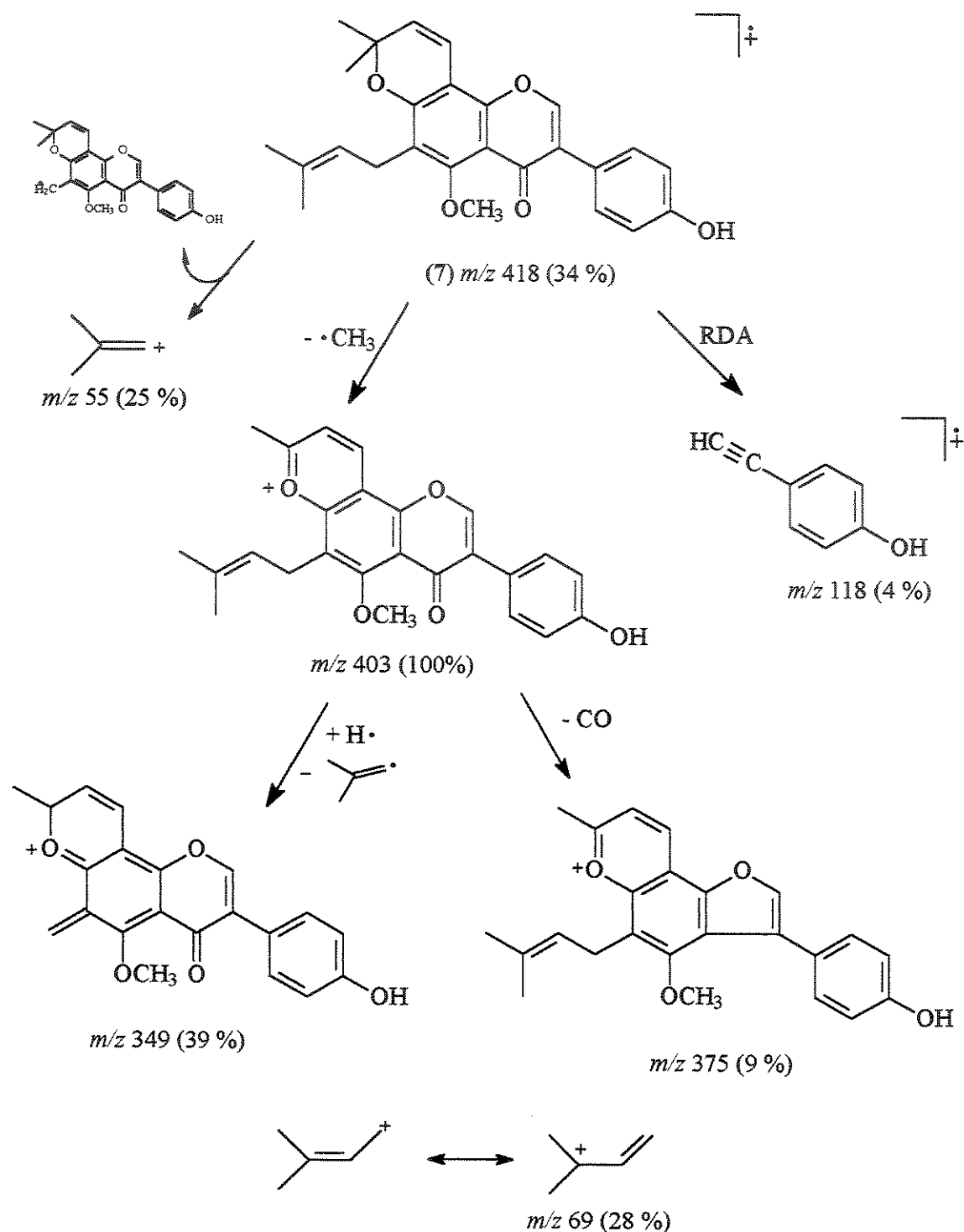
⁷⁸ Sekine, T.; Inagaki, M.; Ikegami, F.; Fujii, Y.; Ruangrunsi, N. Six diprenylisoflavones, derrisisoflavones A-F, from *Derris scandens*. *Phytochemistry*, 52 (1), p. 87-94, 1999.

O espectro de massas (Anexo A- E91) mostra principalmente o pico do íon molecular M^{+} . de m/z 418 (34%) compatível com a fórmula molecular $C_{26}H_{26}O_5$ e o pico base de m/z 403 (100%) referente a perda de um grupo metila característica do anel 2,2-dimetilcromeno (Quadro 31). Novamente não observamos os picos dos fragmentos provenientes da clivagem Retro Diels-Alder do anel C pois, tal como a osajina (6), esta isoflavona é bastante substituída⁷⁹.

O espectro no UV (Anexo A- E93) apresenta um perfil compatível para uma isoflavona, com um máximo de absorção em 266 nm ($\log \epsilon = 4,47$) e uma inflexão em 317 nm ($\log \epsilon = 3,60$) relativos, respectivamente, as Bandas II (cromóforo benzoíla) e a excitação $n-\pi^*$ dos elétrons do oxigênio da carbonila.

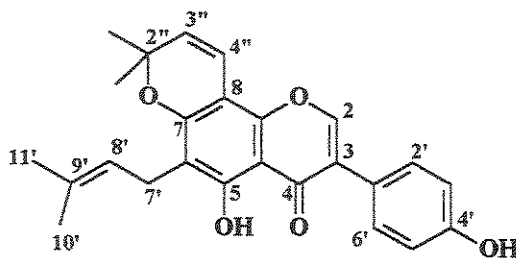
O espectro no IV (Anexo A- E92) mostra principalmente a absorção característica de uma carbonila ($1636,0\text{ cm}^{-1}$).

⁷⁹ Mabry, T. J. e Markham, K. R. Mass spectrometry of flavonoids. In: Harbone, J. B.; Mabry, T. J. e Mabry, H. *The Flavonoids*, Academic Press, p. 97, 1975.

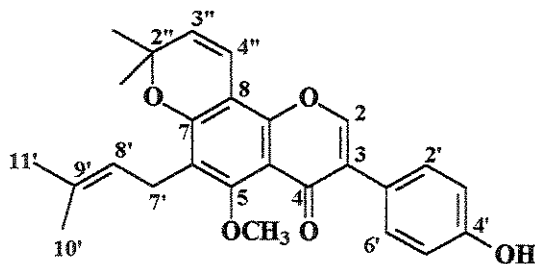


Quadro 31- Proposta de fragmentação da escandinona (7) no espectrômetro de massas

Para a escandinona a literatura não menciona dados espectrais de diferença de NOE.

Apêndice C- Tabelas das isoflavonas (6 e 7)Tabela 26- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para a isoflavona osajina (6).

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
2''-2CH ₃	1,48	6H, s
11'	1,68	3H, s
10'	1,81	3H, s
7'	3,35	2H, d, $J = 7,3$
4'-OH	5,12	1H, sl
8'	5,24	1H, tl, $J = 7,3$ e 1,5
3''	5,60	1H, d, $J = 10,0$
4''	6,70	1H, d, $J = 10,0$
3' e 5'	6,90	2H, d, $J = 8,6$
2' e 6'	7,40	2H, d, $J = 8,6$
2	7,87	1H, s
5-OH	13,13	1H, s

Tabela 27- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para a isoflavona escandinona (7).

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
2''-2CH ₃	1,48	6H, s
11'	1,67	3H, s
10'	1,81	3H, s
7'	3,38	2H, d, $J = 7,2$
5-OCH ₃	3,86	3H, s
8'	5,16	1H, tl, $J = 7,2$ e 1,4
3''	5,65	1H, d, $J = 10,0$
4''	6,76	1H, d, $J = 10,0$
3' e 5'	6,85	2H, d, $J = 8,6$
2' e 6'	7,34	2H, d, $J = 8,6$
2	7,82	1H, s

Tabela 28- Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para as isoflavonas (6 e 7).

C	6	7
2	152,2	150,2
3	123,4	125,7
4	180,9	175,5
5	159,3	158,0
6	112,8	121,7
7	155,8	155,8
8	100,7	105,8
9	150,5	152,1
10	105,6	112,7
1'	123,3	124,1
2'	130,4	130,5
3'	115,6	115,5
4'	157,2	155,8
5'	115,6	115,5
6'	130,4	130,5
7'	21,3	22,2
8'	121,9	122,5
9'	131,6	131,4
10'	17,9	17,9
11'	25,8	25,7
2''	77,8	77,8
3''	114,9	115,2
4''	127,2	128,8
2''-2CH ₃	28,1	28,1
5-OCH ₃	-	62,4

6.4 Derivados de desoxibenzoínas

A literatura menciona somente o isolamento da α -metil desoxibenzoína (-)-angolensina (27) e seus derivados (27a-d) do caule de espécies de *Pterocarpus* (*P. angolensis*, *P. indicus*, *P. erinaceus*) e espécies de *Pericopsis*^{80,81,82,83,84}; e da desoxibenzoína (28) apenas do extrato clorofórmico das raízes de *Glycyrrhiza* sp. (Leguminosae)⁸⁵, evidenciando a rara ocorrência natural deste tipo de esqueleto.

⁸⁰ King, F. E.; King, T. J. e Warwick, A. J. The chemistry of extractives from hardwoods. Part VII. Constituents of muninga, the heartwood of *Pterocarpus angolensis*. B: 2:4-dihydroxyphenyl 1-*p*-methoxyphenylethyl ketone (Angolensin). *J. Chem. Soc.*, 96, p. 1920-1924, 1952.

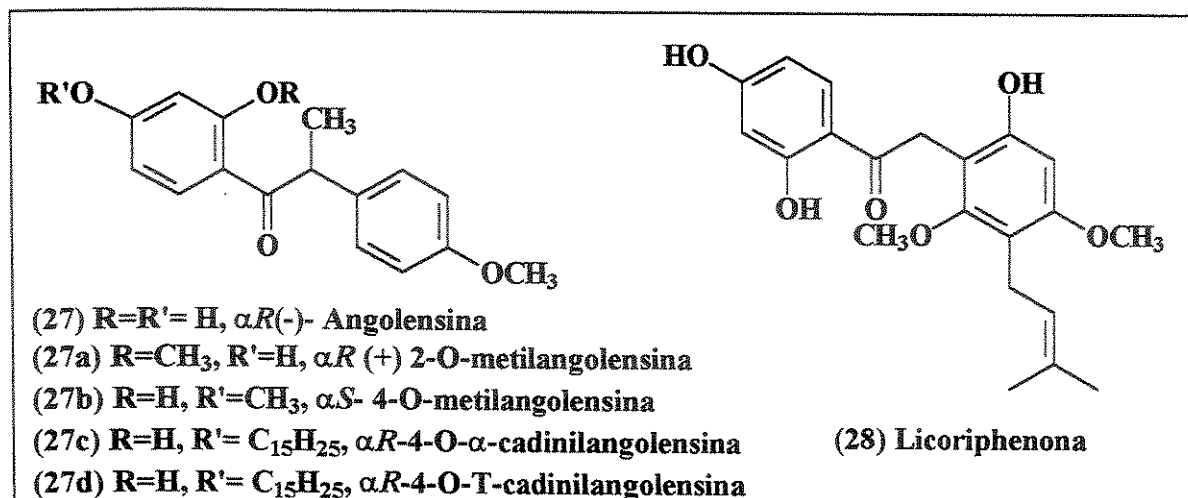
⁸¹ Bezuidenhout, B. C. B.; Brandt, E. V.; Roux, D. G. e Van Rooyen, P. H. Novel α -methyldeoxybenzoins from the heartwood of *Pterocarpus angolensis* D. C.: Absolute configuration and conformation of the first sesquiterpenylangolensin, and X-ray crystal structure of 4-O- α -cadinyl-angolensin. *J. C. S. Perkin Trans I*, p. 2179-2183, 1980.

⁸² Bezuidenhout, B. C. B.; Brandt, E. V. e Roux, D. G. A novel α -hydroxydihydrochalcone from the heartwood of *Pterocarpus angolensis* D. C.: Absolute configuration, synthesis, photochemical transformations, and conversion into α -methyldeoxybenzoins. *J. C. S. Perkin Trans I*, p. 263-269, 1981.

⁸³ Wong, E. *The isoflavonoids*. In: Harbone, J. B.; Mabry, T. J. e Mabry, H. *The Flavonoids*, Academic Press, p. 787, 1975.

⁸⁴ Jain, A. C. e Paliwal, P. A facile synthesis of α -methyldeoxybenzoins including racemates of natural angolensin, 2-O-methylangolensin & 4-O-methylangolensin. *Indian J. Chem.*, vol. 27B, p. 985-988, 1988.

⁸⁵ Kiuchi, F.; Chen, X. e Tsuda, Y. Four new phenolic constituents from Licorice (root of *Glycyrrhiza* sp.). *Heterocycles*, 31 (4), p. 629-636, 1990.



A co-ocorrência de α -metildesoxibenzoínas e alguns derivados de isoflavonóides sugeriram tratar-se de formas reduzidas do esqueleto isoflavonoídico, embora ainda faltem evidências experimentais⁸⁶.

6.4a Desoxibenzoína (9)

No espectro de RMN 1H (Anexo A- E94, Tabela 30) observamos os sinais típicos do grupo 3,3- dimetilalila; do anel 2,2- dimetilcromeno; de uma metoxila aromática e de um anel aromático *para*- substituído.

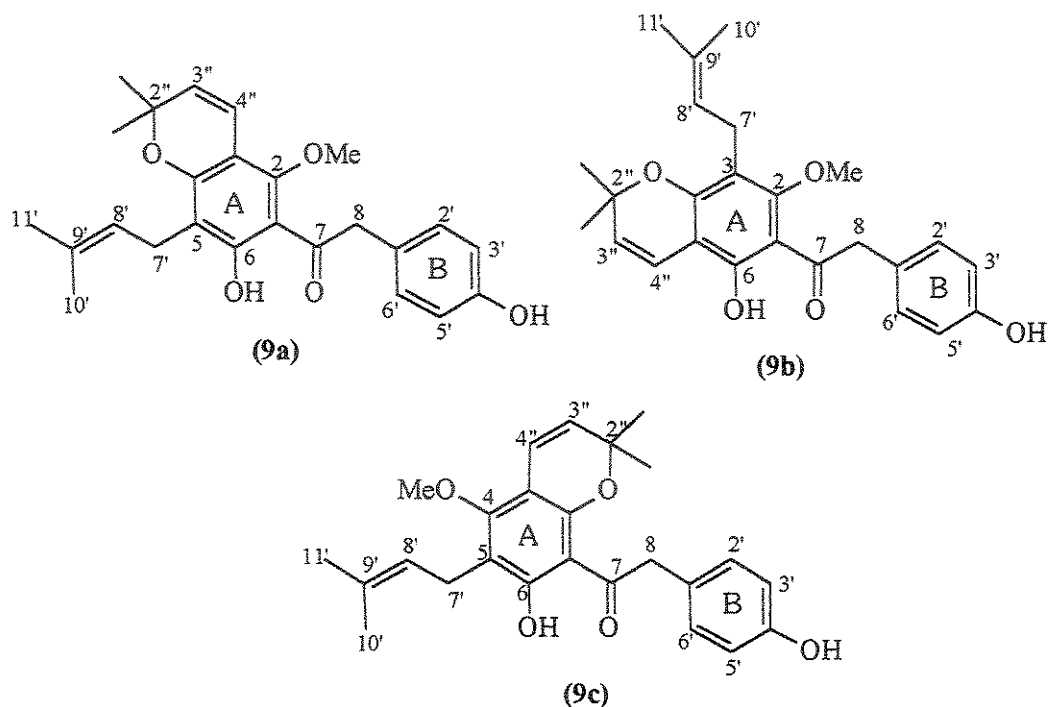
Além disso, dois singletos em δ_H 13,20 (1H) e 4,32 (2H) correspondem às absorções de um hidrogênio de uma hidroxila quelatogênica e de hidrogênios α - metilênicos de um derivado de uma desoxibenzoína⁸⁷.

O espectro de RMN ^{13}C , juntamente com o experimento DEPT (90° e 135°) (Anexo A- E95, Tabela 32) mostra a presença de 5 CH_3 , 2 CH_2 , 7 CH e 11 C_o , dos quais os sinais em δ 203,6 e 47,6 correspondem ao carbono de uma carbonila (C-7) e de um carbono metilênico (C-8) respectivamente. Os demais sinais estão de acordo com a presença dos grupos já identificados no espectro de RMN 1H

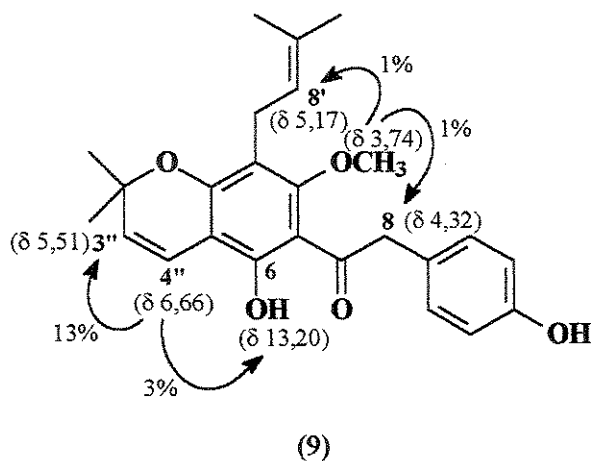
⁸⁶ Dewick, P. M. *Isoflavonoids*. In: Harbone, J. B. *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, p. 195, 1993.

⁸⁷ Kiuchi, F.; Chen, X. e Tsuda, Y. Four new phenolic constituents from Licorice (root of *Glycyrrhiza* sp.). *Heterocycles*, 31 (4), p. 629-636, 1990.

(Tabela 30). Após a análise destes dados, foi possível propor três regioisômeros para este derivado de desoxibenzoína (9a, 9b e 9c):

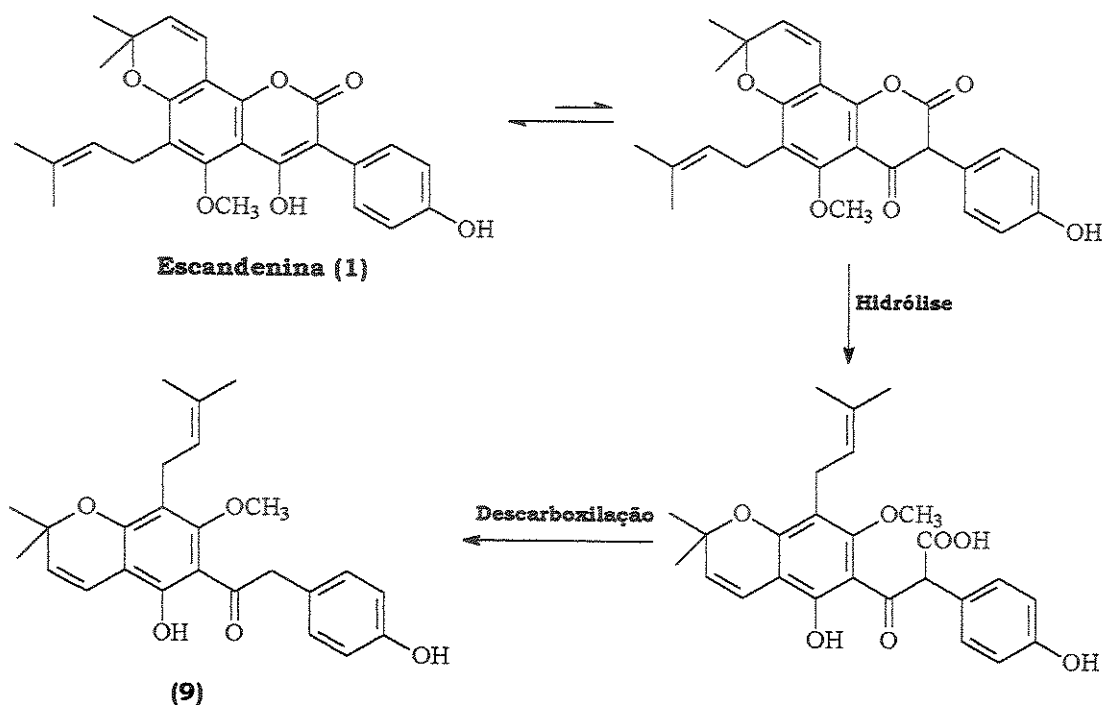


Através do experimento de diferença de NOE (Anexo A- E96 e E97) descartamos as possibilidades estruturais 9a e 9c, pois ao irradiar a metoxila observamos um incremento nos sinais dos hidrogênios H-8' do grupo 3,3-dimetilalila e dos hidrogênios H-8. Aliado a este resultado, observamos que ao irradiar o hidrogênio H-4'' do anel 2,2-dimetilcromeno, temos um incremento nos sinais do hidrogênio da hidroxila quelatogênica em C-6 e do hidrogênio H-3''.



Incrementos observados pelo experimento de NOE

Com base nestes dados, uma possível proposta biogenética para esta substância seria:

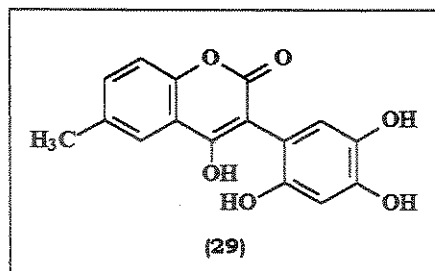


Quadro 32- Proposta biogenética para a desoxibenzoína (9)

O espectro de massas (Anexo A- E98) mostra o pico do íon molecular M^+ , de m/z 408 (3%), sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_5$. O pico base de m/z 69 (100%) corresponde ao cátion isoprenila, enquanto os picos de m/z 301 (32 %) e m/z 107 (15%) correspondem aos fragmentos originados da clivagem da ligação $\text{C}_7\text{-C}_8$, como mostrado no caminho de fragmentação do Quadro 33.

Com o objetivo de auxiliar, através da comparação dos dados espectroscópicos, na comprovação da estrutura proposta para o derivado (9) isolado do extrato diclorometânico; e sabendo que a desoxibenzoína (9) pode ser formada à partir da hidrólise alcalina seguida de descarboxilação da escandenina (1) (Quadro 32), submetemos a escandenina à uma reação com KOH alcoólico (2%) à $95\text{-}100^\circ\text{C}$ por 4 horas, como fizeram Uma Rani e Darbarwar⁸⁸ para o derivado de uma 4-OH-3-fenilcumarina (29).

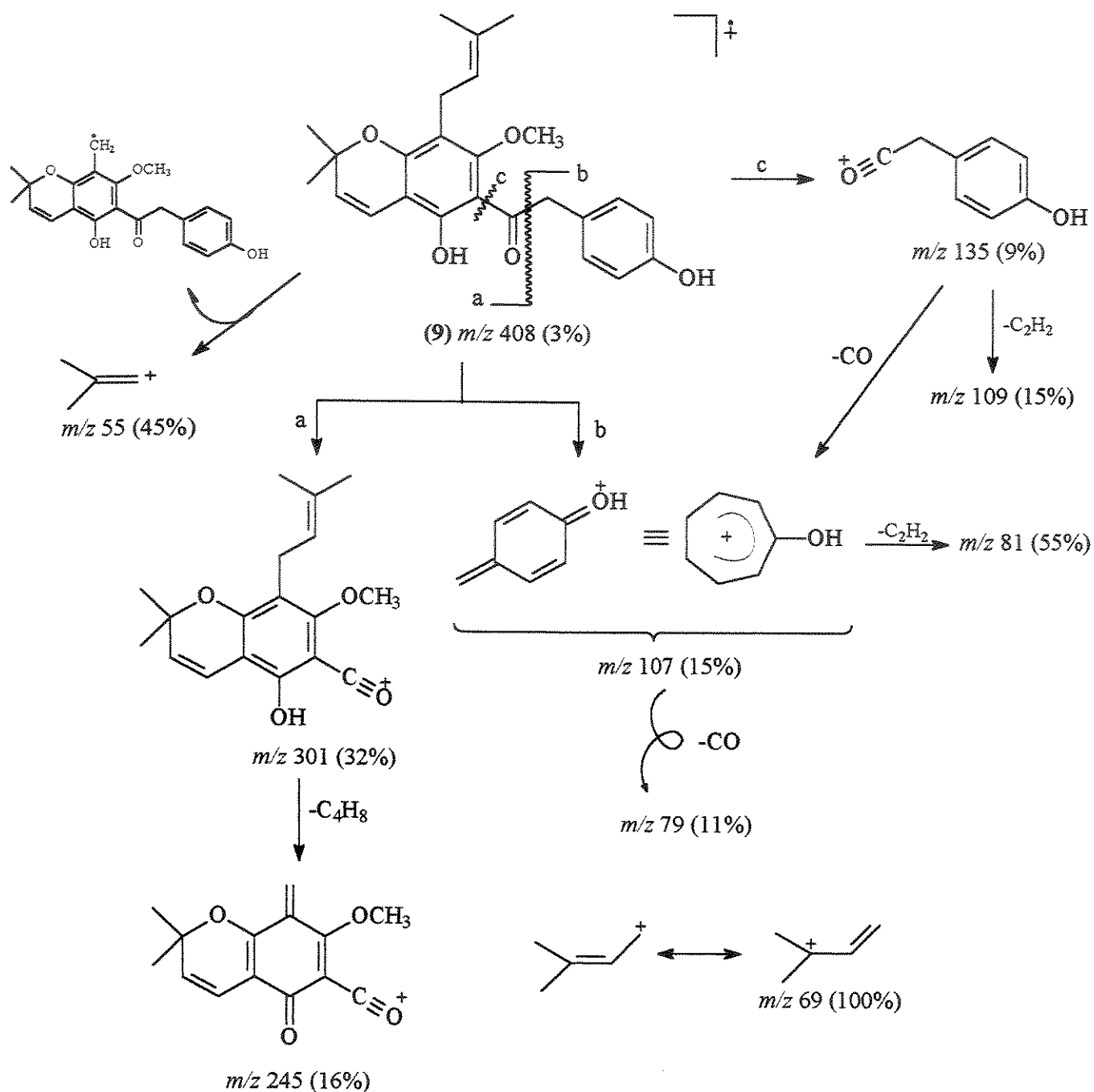
⁸⁸ Uma Rani, B. S. e Darbarwar, M. Synthesis of oxygenated deoxybenzoins and isoflavones. *J. Indian Chem. Soc.*, 64, p. 555-558, 1987.



A análise, por CCDA, do produto da reação não mostrou a formação do derivado da desoxibenzoína (9).

Ao repetir a reação com uma solução de KOH alcoólico (4%), também não foi observado a formação do derivado (9) desejado.

Por se tratar de um derivado pouco comum, foi levantada a hipótese de que esta substância pudesse ser um artefato produzido à partir de uma hidrólise seguida de descarboxilação da escandenina **1**, durante o processo de isolamento. A detecção desta substância no extrato diclorometânico, após análise qualitativa por CLAE (Capítulo II), afastou esta hipótese, nos levando a sugerir que a escandenina (1) é o precursor biogenético do composto **9** (Quadro 32).



Quadro 33- Proposta de fragmentação da desoxibenzoína (9) no espectrômetro de massas

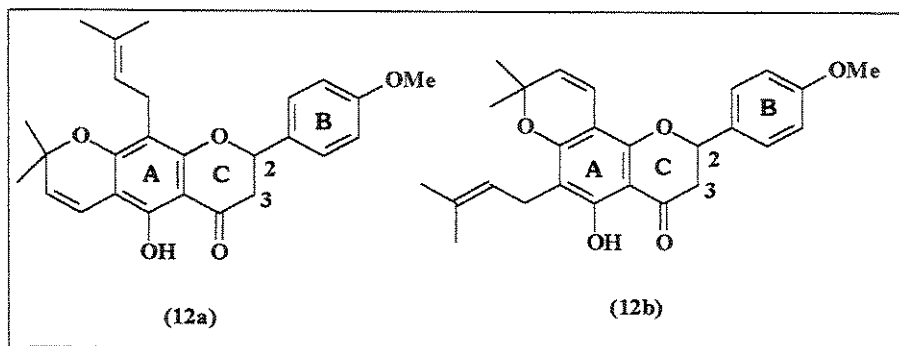
O espectro no UV (Anexo A- E100) apresenta um máximo de absorção em 266 nm ($\log \epsilon = 4,14$) referente ao cromóforo benzoíla e uma banda em 316,5 nm ($\log \epsilon = 3,72$), que apresenta-se como um ombro, referente a excitação $n-\pi^*$ dos elétrons do oxigênio da carbonila.

O espectro no IV (Anexo A- E99) apresenta principalmente as bandas de absorções relativas às ligações O-H (ν 3388,1 cm^{-1}) e C=O (ν 1700,1 cm^{-1}).

6.4b Desoxibenzoína substituída no carbono C-8 (12)

O espectro de RMN ^1H (Anexo A- E101, Tabela 31) mostrou sinais característicos para: anel 2,2- dimetilcromeno, grupo 3,3-dimetilalila, metoxila aromática, anel aromático *para*- substituído e uma hidroxila quelatogênica.

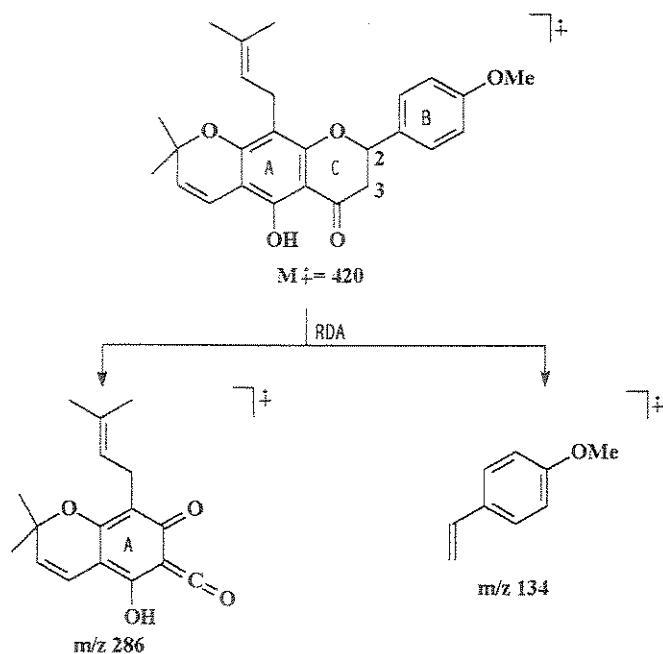
A presença de três duplos dubletos em δ 5,41 (1H; *dd*; J = 10,7 e 4,0 Hz); 3,58 (1H; *dd*; J =17,8 e 10,7 Hz) e 2,65 (J =17,8 e 4,0 Hz), nos levaram primeiramente a pensar que a substância isolada seria uma flavanona do tipo 12a ou 12b. Nos chama a atenção, entretanto, é a presença de um singlete em δ 2,20 (3H), que pode ser atribuído a uma metila de uma metilcetona ou de um acetato.



Paralelamente a isto, o espectro de massas (Anexo A- E104) mostra o pico do íon molecular M^+ . de m/z 464 (16%) e o pico base de m/z 301 (100%).

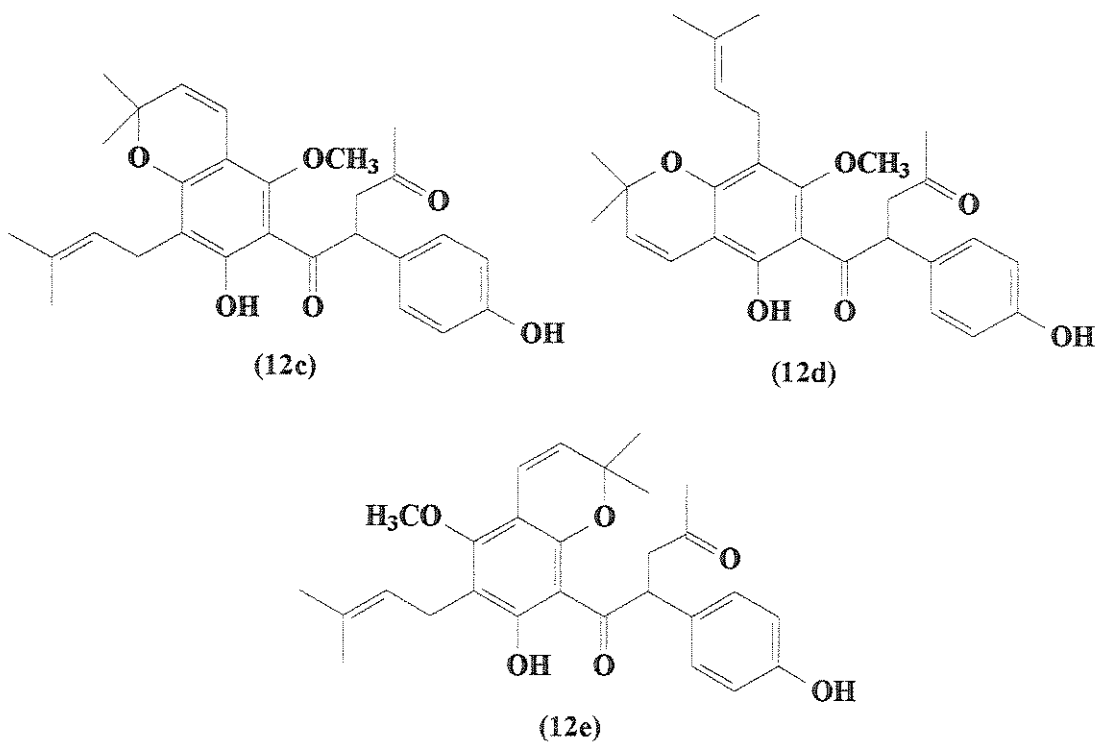
No espectro de RMN ^{13}C (Anexo A- E102, Tabela 32) observamos a presença de dois sinais típicos de carbonilas, uma em δ 207,6 e outra em δ 204,4, além do sinal em δ 30,0 característico de uma metila de uma metilcetona ou de um acetato.

Com estes dados, podemos concluir que a substância isolada não é uma flavanona (12a ou 12b), que possuiria apenas uma carbonila e o seu espectro de massas deveria apresentar os picos referentes a clivagem Retro Diels-Alder do anel C (m/z 286 e m/z 134) e do íon molecular de m/z 420, como mostra a Quadro 34.

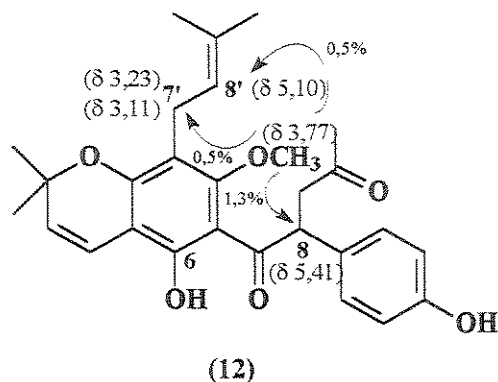


Quadro 34- Fragmentação esperada para a flavanona (12a) no espectrômetro de massas

Assim, a estrutura proposta para a substância isolada foi a de uma desoxibenzoína alquilada no carbono C-8, com três possíveis estruturas regioisoméricas:

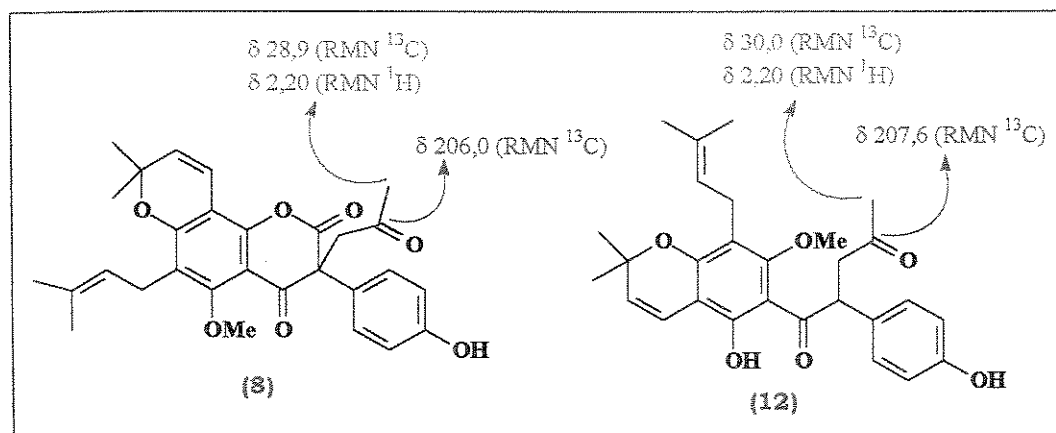


Os dados obtidos pelo experimento de diferença de NOE (Anexo A- E103) auxiliam na confirmação da estrutura proposta (12d=12), como podemos ver pelos incrementos mostrados abaixo:



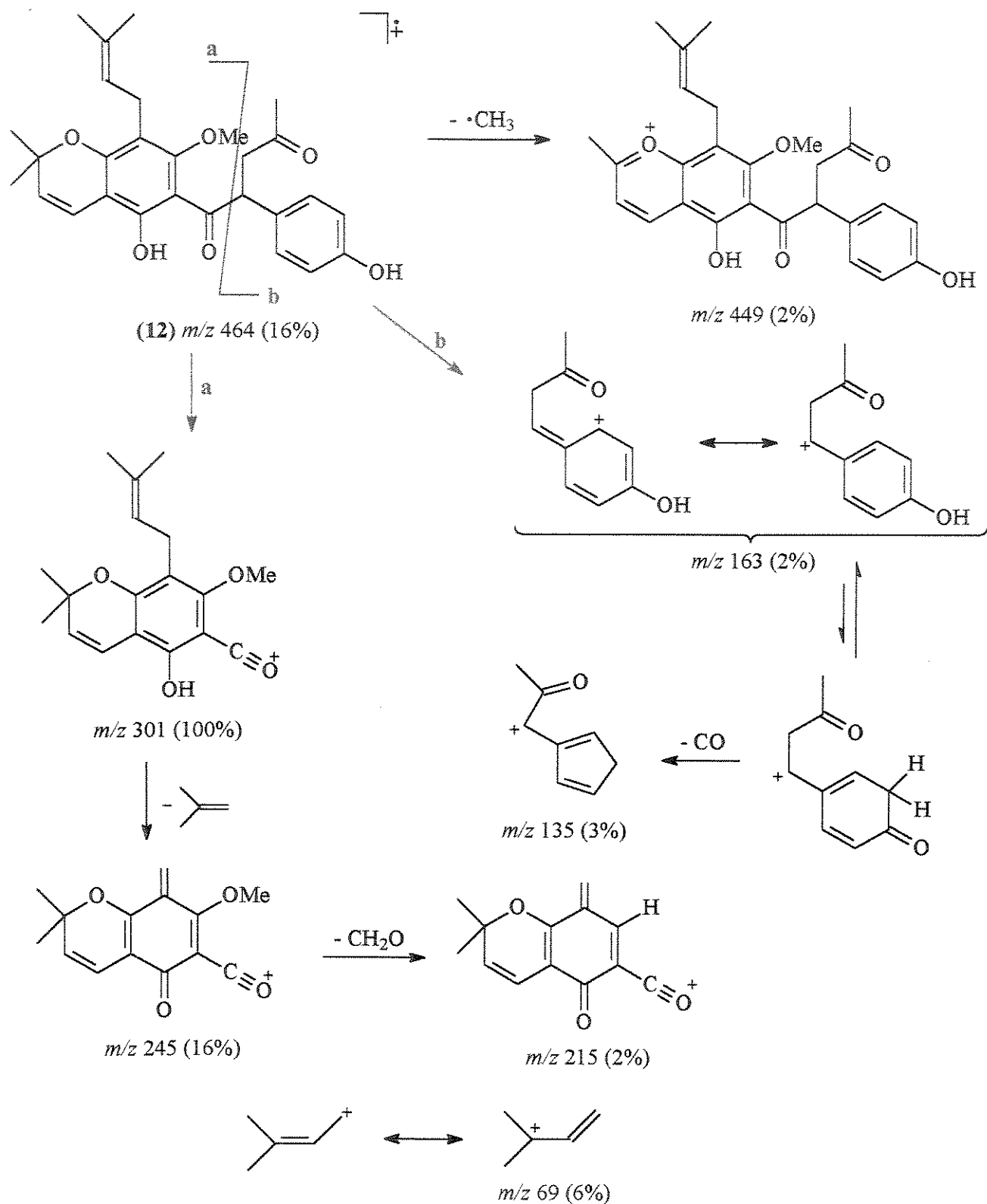
Incrementos observados pelo experimento de diferença de NOE

Como já havíamos isolado um novo derivado de uma 4-OH-3-fenil cumarina alquilada no carbono C-3 (8) por um grupo idêntico ao da substância 12, os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram comparados (Quadro 35).



Quadro 35- Comparação dos dados de RMN ^{13}C do substituinte na substância (8) e (12)

A proposta de fragmentação (Quadro 36) está compatível, merecendo destaque o pico base de m/z 301 (100%) e o íon molecular M^+ de m/z 464 (16%).



Quadro 36- Proposta de fragmentação da desoxibenzoína (12) no espectrômetro de massas

Achamos interessante também observar a revelação das flavanonas (4 e 5) e da desoxibenzoína (12) em CCDA, após nebulização com solução ácida de anisaldeído, uma vez que as flavanonas apresentam R_f e coloração distintas (Figura 23).

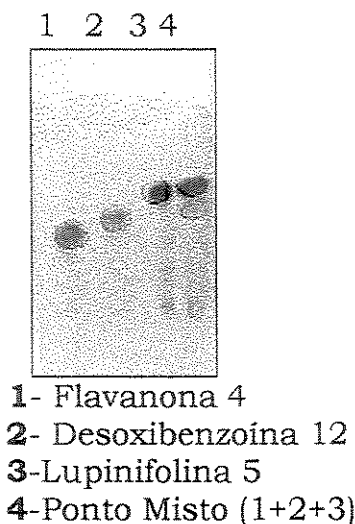
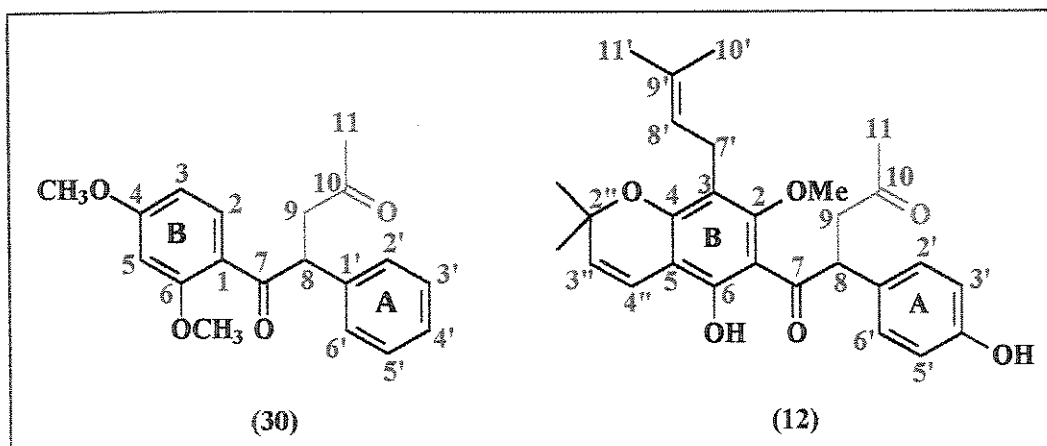


Figura 23- Placa de CCDA das flavanonas 4 e 5 e da desoxibenzoína 12

Com o objetivo de auxiliar a determinação estrutural deste novo derivado de desoxibenzoína, o ex-aluno de Iniciação Científica Giordano Trazzi, sintetizou em nosso laboratório uma desoxibenzoína modelo contendo o mesmo grupo ligado ao carbono C-8 (30) do derivado isolado (12) (Quadro 37).



Quadro 37- Estruturas das desoxibenzoínas 12 (isolada) e 30 (modelo)

Através da análise dos dados espectrais de RMN ^1H (500 MHz), RMN ^{13}C (125 MHz), DEPT, Espectro de Massas e técnicas bidimensionais de correlações homonucleares (gCOSY) e heteronucleares (HSQC e gHMBC), foi possível

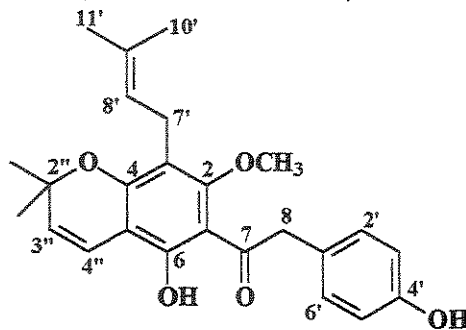
observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos e multiplicidades, principalmente aqueles referentes às absorções do C_o em C-7, ao CH em C-8, ao CH₂ em C-9 e ao CH₃ em C-11 (Tabela 29).

Tabela 29- Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C dos compostos 12 e 30.

H	(30) (δ _H)*	(12) (δ _H)#	(30) (δ _C)*	(12) (δ _C)#
7	-	-	196,4	204,4
8	5,06 (dd, J= 9,6 e 4,5 Hz)	5,41 (dd, J= 10,7 e 4,0 Hz)	52,2	49,7
9	3,36 (dd, J= 17,4 e 9,6 Hz) 2,47 (dd, J= 17,4 e 4,6 Hz)	3,58 (dd, J= 17,8 e 10,7 Hz) 2,65 (dd, J= 17,8 e 4,0 Hz)	47,8	47,7
10	-	-	203,9	207,6
11	2,08 (s)	2,20 (s)	29,7	30,0

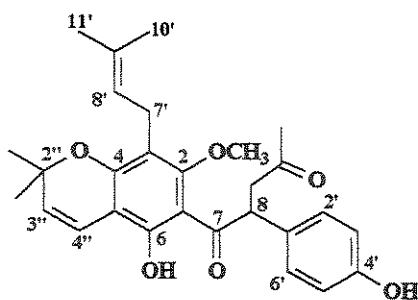
* RMN ¹H (500 MHz, CCl₄/TMS) e RMN ¹³C (125 MHz, CCl₄/TMS)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS) e RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS)

Apêndice D- Tabelas das desoxibenzoínas (9 e 12)Tabela 30- Dados RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da desoxibenzoína (9).

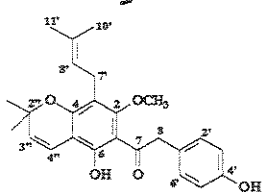
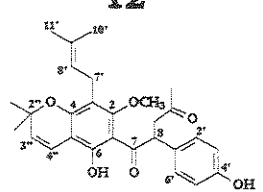
H	δ	multiplicidade e J (Hz)
6-OH	13,20	1H, s
2' e 6'	7,12	2H, d, $J = 8,5$
3' e 5'	6,80	2H, d, $J = 8,5$
4''	6,66	1H, d, $J = 10,0$
3''	5,51	1H, d, $J = 10,0$
8'	5,17	1H, tl, $J = 6,9$
4'-OH	4,80	1H, sl
8	4,32	2H, s
2-OCH ₃	3,74	3H, s
7'	3,25	2H, d, $J = 6,9$
10'	1,79	3H, s
11'	1,70	3H, s
2'' -2CH ₃	1,44	6H, s

Tabela 31- Dados RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da desoxibenzoína (12).



H	δ	multiplicidade e J (Hz)
6-OH	12,96	1H, s
2' e 6'	7,12	2H, d, $J = 8,9$
3' e 5'	6,68	2H, d, $J = 8,9$
4"	6,60	1H, d, $J = 10,3$
3"	5,45	1H, d, $J = 10,3$
8	5,41	1H, dd, $J = 10,7$ e $4,0$
8'	5,10	1H, m
2-OCH ₃	3,77	3H, s
CH ₂ COCH ₃	3,58	1H, dd, $J = 17,8$ e $10,7$
	2,65	1H, dd, $J = 17,8$ e $4,0$
7'	3,23	1H, dd, $J = 15,4$ e $7,0$
	3,11	1H, dd, $J = 15,4$ e $7,0$
CH ₂ COCH ₃	2,20	3H, s
10'	1,74	3H, s
11'	1,66	3H, s
2"-CH ₃	1,41	3H, s
2"-CH ₃	1,36	3H, s

Tabela 32- Dados de RMN ^{13}C (75* e 125# MHz, CDCl_3) das desoxibenzoínas (9 e 12).

C	9*	12#
		
1	131,2	131,1
2	160,6	160,4
3	108,5	108,0
4	154,4	154,7
5	115,0	115,1
6	158,8	158,6
7	203,6	204,4
8	47,6	49,7
CH_2COCH_3	-	47,7
CH_2COCH_3	-	207,6
CH_2COCH_3	-	30,0
1'	106,0	105,8
2'	130,9	129,3
3'	115,3	115,5
4'	158,5	158,2
5'	115,3	115,5
6'	130,9	129,3
7'	22,3	22,3
8'	123,1	123,2
9'	127,5	130,9
10'	17,9	17,9
11'	25,7	25,7
2''	77,9	77,7
3''	116,0	116,0
4''	126,7	126,4
2''- 2 CH_3	28,3	28,3
2-O CH_3	63,0	63,4

6.5 Estilbenos

Os dois estilbenos isolados (10) e (11), apresentam-se como produtos naturais inéditos.

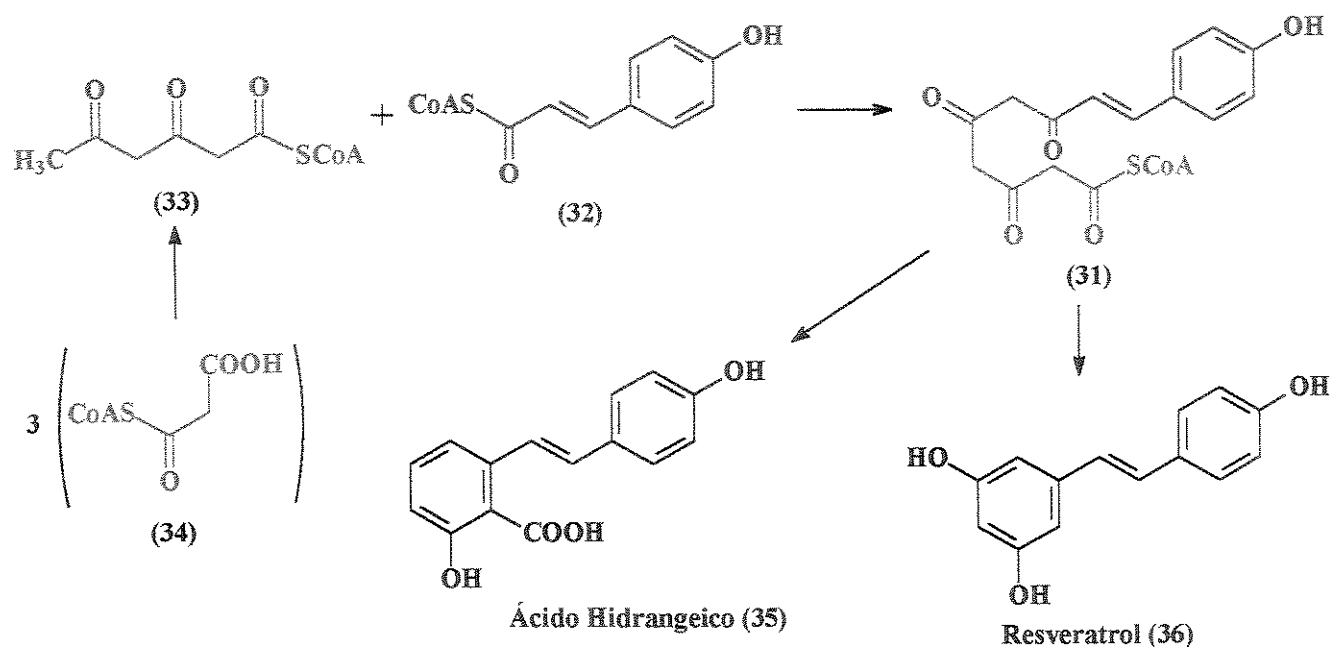
Apesar de pequena⁸⁹, a classe de estilbenos é um importante grupo de produtos naturais encontrados na madeira, casca e folhas de gimnospermas e angiospermas.

Os estilbenos são amplamente distribuídos entre as plantas e, muitas vezes, ocorrem junto com os flavonóides, aos quais se relacionam quanto aos precursores biogenéticos⁹⁰.

É importante ressaltar que a biossíntese dos estilbenos de plantas madeiras não foi verificada por experimentos com biomarcadores “in vivo”, mas o padrão de oxigenação dos compostos é uma forte indicação de que eles se originam de um precursor (31), resultante da condensação do éster CoA do ácido cinâmico (32), com um éster CoA da acetogenina (33), formada pela condensação de 3 moléculas do éster CoA do ácido malônico (34) (Quadro 38)⁸⁹.

⁸⁹ Rowe, J. W. *Natural Products of Woody Plants I*, Springer- Verlag Berlin Heideberg, p. 512-517, 1989.

⁹⁰ Kaouadji, M.; Agban, A.; Mariotte, A-M. e Tissut, M. Lonchocarpene, a stilbene, and lonchocarpusone, an isoflavone: two new pyranopolyphenols from *Lonchocarpus nicou* roots. *J. Nat. Prod.*, 49 (2), p. 281-285, 1986.



Quadro 38- Proposta de biossíntese para os estilbenos

O isômero *trans*-estilbeno é geralmente o único isolado, embora haja na literatura relatos do isolamento de pequenas quantidades do isômero *cis*. Muitas vezes estes isômeros *cis* são formados pela interconversão *trans-cis* durante o processo de isolamento, principalmente se os extratos forem expostos ao calor e luz. Desta forma, os isômeros *cis*- devem ser considerados artefatos^{91,92}.

6.5a Estilbeno (10)

O espectro de RMN ¹H (Anexo A- E105, Tabela 33) desta substância mostra sinais típicos de um *trans*-estilbeno com dois dubletos, integrando para 1H, em δ_H 7,15 e δ_H 6,84 ($J=16,6$ Hz) característico da cadeia *trans*-etilênica; dois pares de dubletos em δ_H 7,32 (2H, H-2' e 6') e 6,75 (2H, H-3' e 5') com constantes de acoplamento *orto* $J= 8,6$ Hz atribuído à um anel aromático *para*- substituído por uma hidroxila [δ_H 5,00 (1H, *m*, 4'-OH)].

⁹¹ Schultz, T. P.; Boldin, W. D.; Fisher, T. H.; Nicholas, D. D.; McMurtrey, K. D. e Pobanz, K. Structure-fungicidal properties of some 3- and 4-hydroxylated stilbenes and bibenzyl analogues. *Phytochemistry*, 31 (11), p. 3801-3806, 1992.

⁹² Hart, J. H. Role of phytoestilbenes in decay and disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19, p. 437-458, 1981.

Adicionalmente, apresenta sinais característicos para o anel 2,2-dimetilcromeno [δ_H 6,60 (1H; *d*; $J=9,8$ Hz; H-4''); 5,50 (1H; *d*; $J=9,8$ Hz; H-3'') e 1,34 (6H, *s*, 2CH₃-2'')]; grupo 3,3-dimetilalila [δ_H 3,34 (2H; *d*; $J=6,8$ Hz; H-7'); 5,06 (1H, *m*, H-8'); 1,75 (3H, *s*, CH₃-10') e 1,61 (3H, *s*, CH₃-11')]; uma metoxila aromática [δ_H 3,79 (3H, *s*, 3-OCH₃)] e um hidrogênio aromático [δ_H 6,59 (1H, *s*, H-2)].

Levando em conta a rota biossintética (Quadro 38) e as estruturas dos estilbenos relatados na literatura^{93,94,95,96,97,98}, podemos ter 4 possíveis regioisômeros para a substância isolada.

⁹³ Christensen, L.P. e Lam, J. Excelsaocetaphenol, a stilbene dimer from *Chlorophora excelsa*. *Phytochemistry*, 28 (3), p. 917-918, 1989.

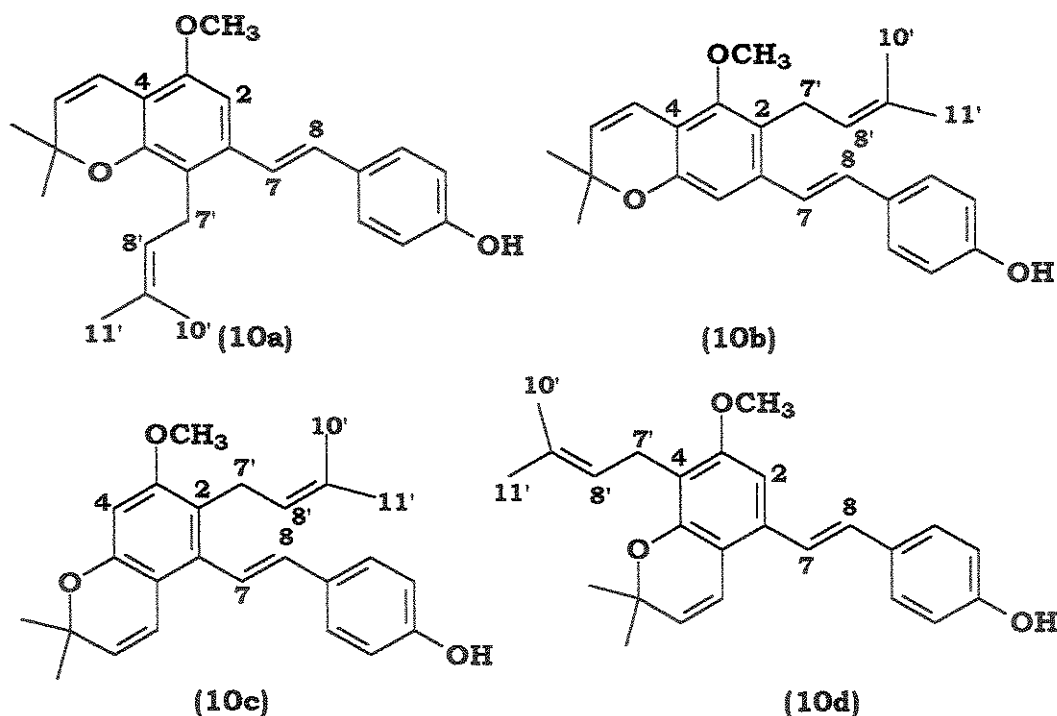
⁹⁴ Kaouadji, M.; Agban, A.; Mariotte, A-M. e Tissut, M. Lonchocarpene, a stilbene, and lonchocarpusone, an isoflavone: two new pyranopolyphenols from *Lonchocarpus nicou* roots. *J. Nat. Prod.*, 49 (2), p. 281-285, 1986.

⁹⁵ Rowe, J. W. *Natural Products of Woody Plants I*, Springer- Verlag Berlin Heideeborg, p. 512-517, 1989.

⁹⁶ Tsuruga, T.; Chun, Y-T; Ebizuka, Y. e Sankawa, U. Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: Inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chem. Pharm. Bull.* 39 (12), p. 3276-3278, 1991.

⁹⁷ Talvitie, A.; Mannila, E. e Kolehmainen, E. Syntheses of some biologically active compounds from stilbenes isolated from bark of *Picea abies*. *Liebigs Ann. Chem.*, p. 399-401, 1992.

⁹⁸ Fang, N. e Casida, J. E. New bioactive flavonoids and stilbenes in cubé resin insecticide. *J. Nat. Prod.* 62 (2), p. 205-210, 1999.



A proposta **10d** foi descartada pelo experimento de diferença de NOE (Anexo A- E107 e E108), uma vez que ao irradiar os hidrogênios H-7' (δ_H 3,34) observamos incrementos nos sinais referentes aos hidrogênios H-8' (3,4%), H-10' (5,1%) e do H-7 (7,9%).

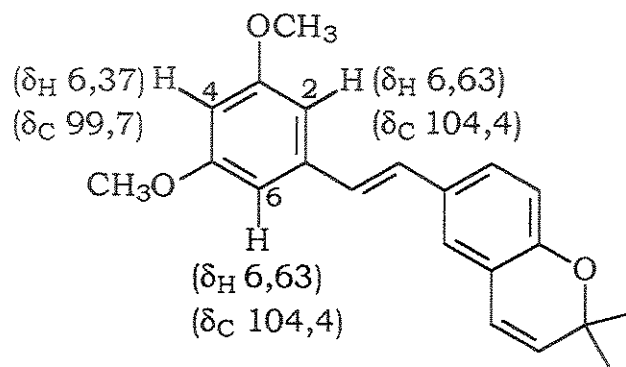
Uma irradiação dos hidrogênios da metoxila (δ_H 3,79) foi pouco informativo, uma vez que forneceu incremento no sinal em δ_H 6,60 (6,3%), relativo aos hidrogênios H-4' (δ_H 6,60) e H-2 (δ_H 6,59) que, como vemos absorveram na mesma região.

No espectro de RMN ^{13}C (Anexo A- E106, Tabela 35) observamos um sinal em δ_C 55,6 (CH₃) referente a uma metoxila aromática.

Sabendo que, quando uma metoxila aromática tem suas duas posições *orto* substituídas seu sinal no espectro de RMN ^{13}C aparece aproximadamente em δ_C 60,0; a proposta estrutural **10b** é também descartada⁹⁹.

⁹⁹ Agrawal, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier, 1989.

Comparando os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-2 e H-4 do estilbeno Lonchocarpene (37)^{100,101} com o sinal de um único hidrogênio aromático no anel A em δ_H 6,59 (1H, s), podemos descartar a proposta **10c**, pois o H-4 absorve em uma região mais protegida no espectro.



Lonchocarpene (37)

Assim, a proposta estrutural **10a** (4'-hidroxi-3-metoxi-6-(3,3-dimetilalila)-2'',2''-dimetilcromeno (5'',6'': 4,5) estilbeno) é a correta para o estilbeno isolado.

Os sinais obtidos pelo espectro de RMN ¹³C (DEPT) (Anexo A- E106) confirmaram a presença do anel 2,2-dimetilcromeno [δ_C 117,1 (CH, C-4''); 128,6 (CH, C-3''); 77,2 (C_o, C-2''); 27,5 (CH₃, 2CH₃-2'')]; do grupo 3,3-dimetilalila [δ_C 24,3 (CH₂, C-7'); 123,5 (CH, C-8'); 130,7 (C_o, C-9'); 25,7 (CH₃, C-11'); 18,0 (CH₃, C-10')]; da metoxila aromática [δ_C 55,6 (CH₃, 3-OCH₃)] e de um CH aromático [δ_C 99,6 (CH, C-2)].

Os espectros de RMN bidimensionais de COSY e HETCOR (Anexo A- E109 e E110, Tabelas 36 e 37) auxiliaram na completa atribuição dos hidrogênios e carbonos da molécula. É importante mencionar a correlação observada do H-2 (δ_H 6,59) com C-2 (δ_C 99,6); de H-7 (δ_H 6,84) com C-7 (δ_C 124,9) e de H-8 (δ_H 7,15) com C-8 (δ_C 129,0) (Tabela 37).

¹⁰⁰ Kaouadji, M.; Agban, A.; Mariotte, A-M. e Tissut, M. Lonchocarpene, a stilbene, and lonchocarpusone, an isoflavone: two new pyranopolyphenols from *Lonchocarpus nicou* roots. *J. Nat. Prod.*, 49 (2), p. 281-285, 1986.

¹⁰¹ Kaouadji, M. Two new C-prenylated derivatives of 2,4-dihydroxy benzoic acid from *Lonchocarpus nicou* roots. *J. Nat. Prod.* 51 (2), p. 376-378, 1988.

O espectro de massas de alta resolução (Anexo A- E112) desta substância mostra o íon molecular M^+ de m/z 376,2039, coerente com a fórmula molecular $C_{25}H_{28}O_3$ (376,2038).

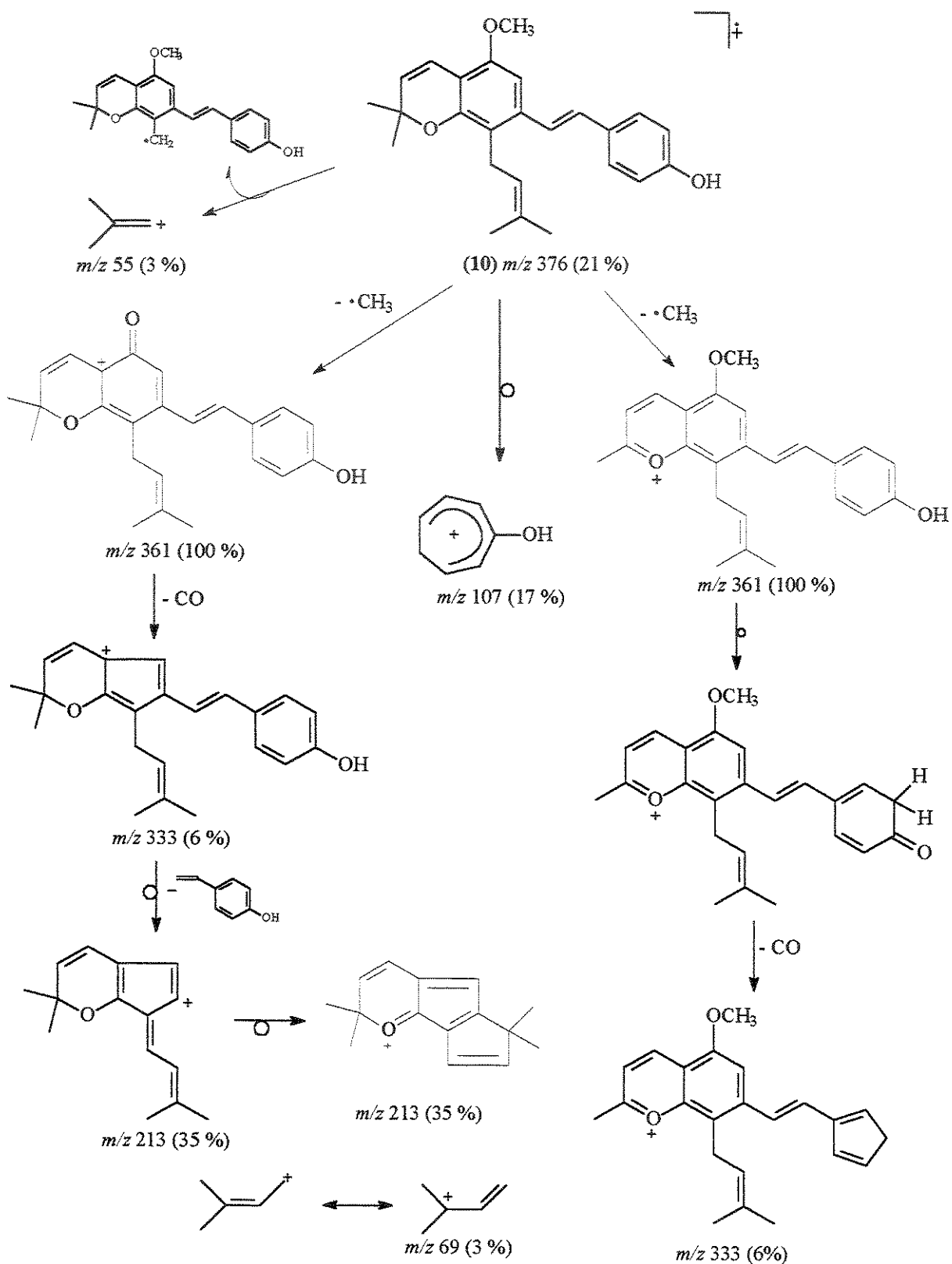
Os principais picos observados no espectro de massas (Anexo A- E111) representam o íon molecular M^+ de m/z 376 (21%) e o pico base de m/z 361 (100%), formado pela perda de um radical metila do anel 2,2-dimetilcromeno, juntamente com outros fragmentos característicos da classe de estilbenos, mostrados no Quadro 39 (39a e 39b).

O espectro no UV (Anexo A- E114) apresenta um perfil típico de estilbenos, onde se observa um máximo de absorção em 330 nm ($\log \epsilon = 4,23$) e uma inflexão em 273 nm ($\log \epsilon = 3,96$)¹⁰².

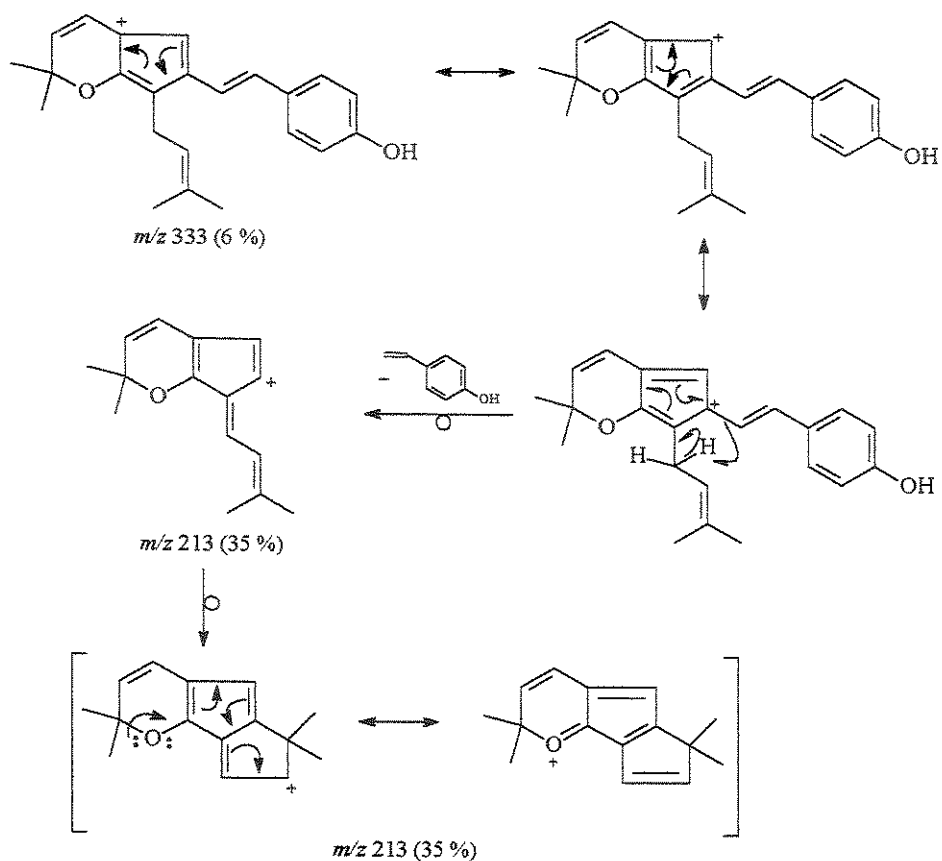
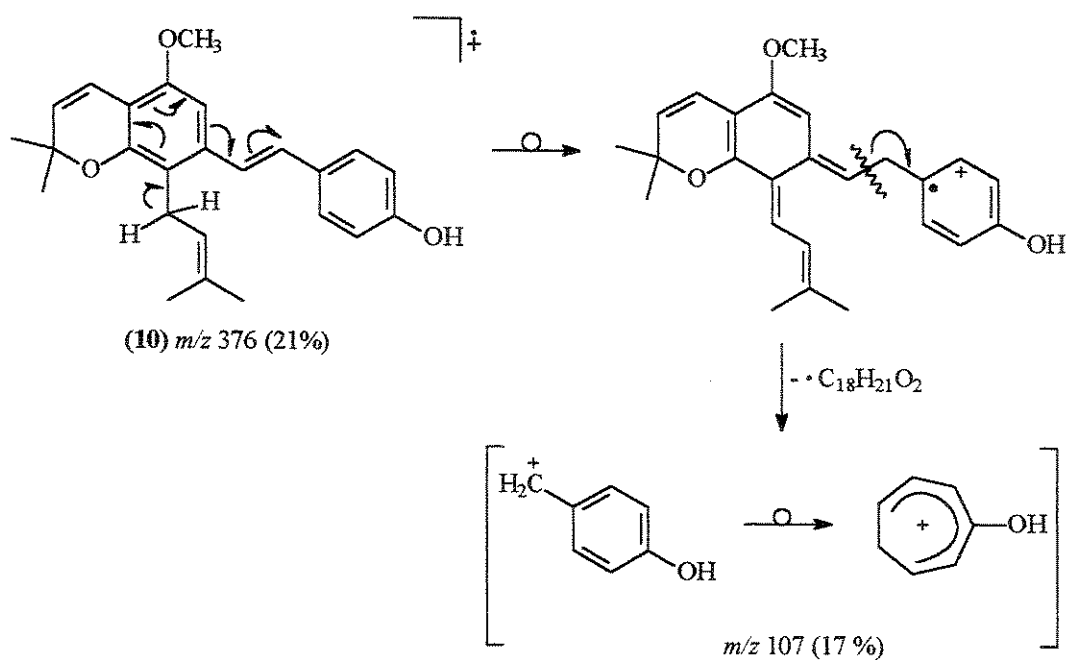
No espectro no IV (Anexo A- E113) destacam-se principalmente as bandas correspondentes a uma hidroxila ν 3403,9 cm^{-1} e dupla *trans* ν 959,6 cm^{-1} ¹⁰³.

¹⁰² Ashok, D. e Sarma, P. N. Roxburghin- a new stilbene from the wood of *Cassia roxburghii*. *J. Indian Chem. Soc.* 64, p. 559-561, 1987.

¹⁰³ Schultz, T. P.; Boldin, W. D.; Fisher, T. H.; Nicholas, D. D.; McMurtrey, K. D. e Pobanz, K. Structure-fungicidal properties of some 3- and 4-hydroxylated stilbenes and bibenzyl analogues. *Phytochemistry*, 31 (11), p. 3801-3806, 1992.



Quadro 39- Proposta de fragmentação do estilbeno (10) no espectrômetro de massas

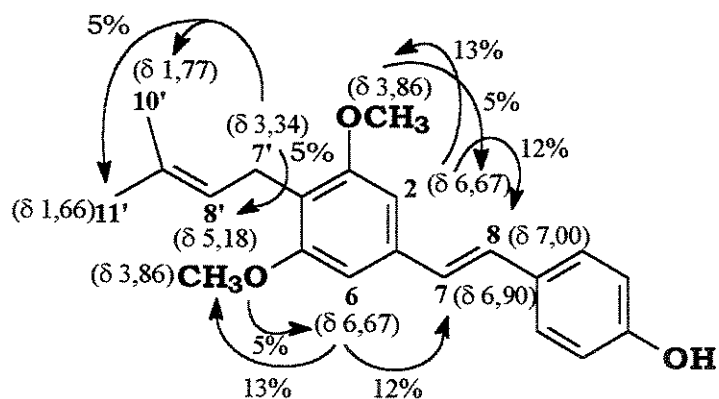
Quadro 39a- Proposta de formação do íon de m/z 213 a partir do íon de m/z 333Quadro 39b- Proposta de formação do íon de m/z 107 a partir do íon molecular de m/z 376

6.5b Estilbeno (11)

No espectro de RMN ^1H (Anexo A- E115, Tabela 34) observamos, tal como em 10, os sinais característicos da cadeia *trans*-etilênica de um *trans*-estilbeno [δ_{H} 7,00 (1H; *d*; $J=16,3$ Hz; H-8); 6,90 (1H; *d*; $J=16,3$ Hz; H-7)]; de um anel aromático *para*-substituído [δ_{H} 7,40 (2H; *d*; $J=8,6$ Hz; H-2' e 6') e 6,83 (2H; *d*; $J=8,6$ Hz; H-3' e 5')] e do grupo 3,3-dimetilalila [δ_{H} 3,34 (2H; *d*; $J=7,0$ Hz; H-7'); 5,18 (1H; *tl*; $J=7,0$ e 1,3 Hz; H-8'); 1,77 (3H, *s*, CH_3 -10') e 1,66 (3H, *s*, CH_3 -11')].

O que nos chama a atenção neste espectro é a presença de dois singletos; um em δ_{H} 3,86 (6H) e outro em δ_{H} 6,67 (2H), atribuídos respectivamente a duas metoxilas e a dois hidrogênios aromáticos equivalentes.

A proposta estrutural 11 é comprovada pelo experimento de diferença de NOE (Anexo A- E117 a E119), que mostrou um incremento nos sinais dos hidrogênios H-7, H-8 e das metoxilas quando irradiamos os hidrogênios equivalentes H-2 e H-6.



(11)

Incrementos observados pelo experimento de diferença de NOE

O espectro de RMN ^{13}C (DEPT) (Anexo A- E116, Tabela 35) está compatível com a estrutura proposta, pois mostra a presença de 4 CH_3 , 1 CH_2 , 9 CH e 7 C_o , além dos sinais típicos do grupo 3,3-dimetilalila [δ_{C} 22,3 (CH_2 , C-7'); 122,7 (CH , C-8'); 25,8 (CH_3 , C-11') e 17,7 (CH_3 , C-10')]; do anel aromático *para*-substituído [δ_{C} 130,3 (C_o , C-1'); 127,8 (2 CH , C-2' e 6'); 115,6 (2 CH , C-3' e 5') e 155,1 (C_o , C-

4⁷]; dos carbonos C-2 e C-6 equivalentes [δ_c 102,1 (2CH)]; C-7 e C-8 [δ_c 127,4 (CH) e 127,2 (CH)] e das metoxilas aromáticas também equivalentes [δ_c 55,8 (CH₃)].

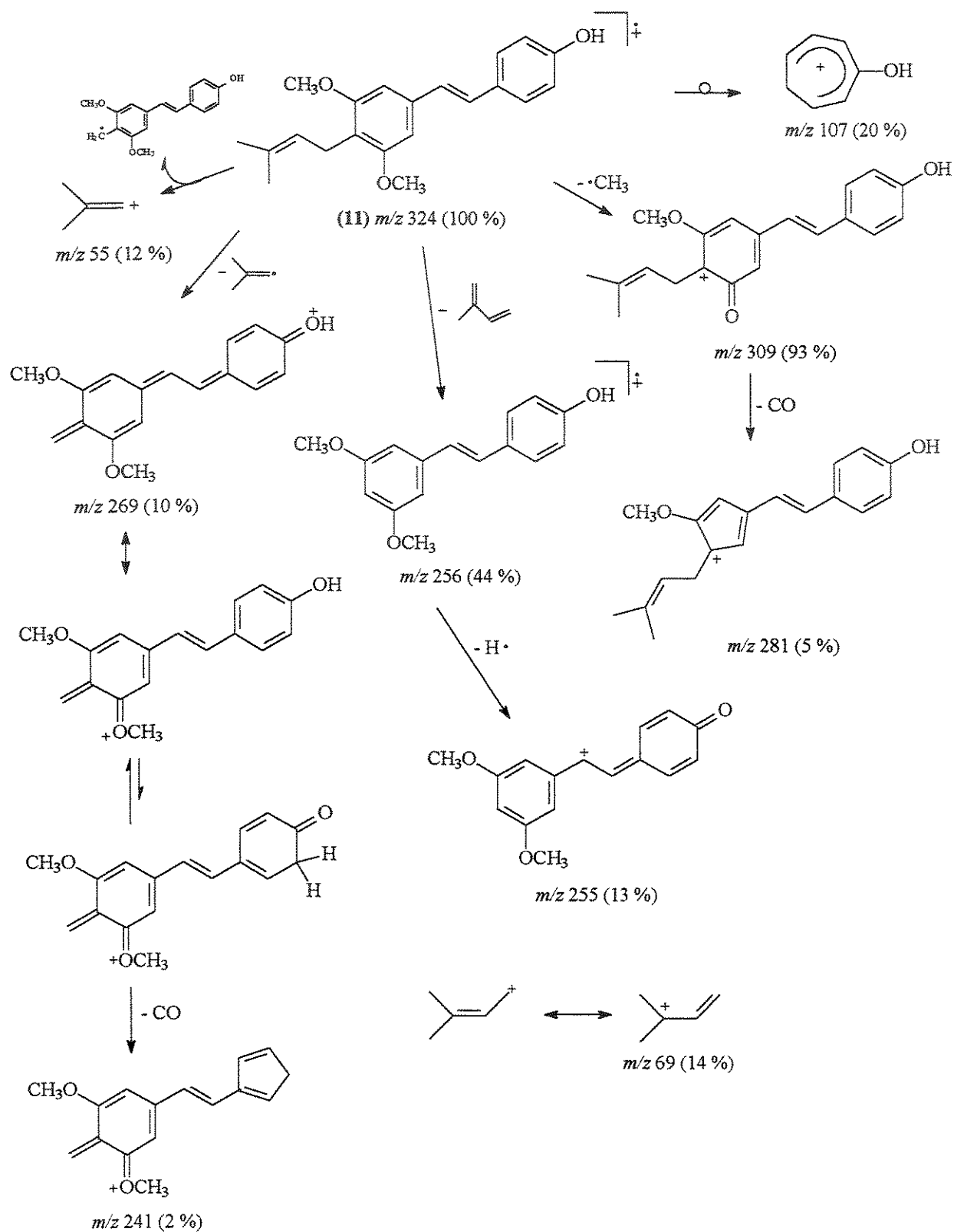
No espectro de massas de alta resolução (Anexo A- E121) observamos o pico do íon molecular M⁺. de m/z 324,1725 compatível com a fórmula molecular C₂₁H₂₄O₃ (324,1725).

Os principais picos observados no espectro de massas (Anexo A- E120) representam o íon molecular M⁺. de m/z 324 (100%) e o pico de m/z 309 (93%) formado pela perda de um radical metila, juntamente com outros fragmentos característicos da classe de estilbenos, mostrados no Quadro 40.

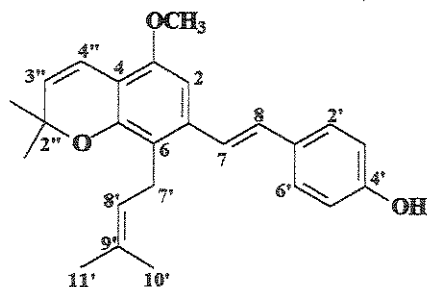
O espectro no UV (Anexo A- E123) apresenta um máximo de absorção em 325 nm (log ϵ = 4,21) típico de *trans*-estilbenos¹⁰⁴. O espectro no IV (Anexo A- E122) apresenta bandas relativas a hidroxila ν 3407,5 cm⁻¹ e dupla *trans* ν 958,4 cm⁻¹ ¹⁰⁵.

¹⁰⁴ Ashok, D. e Sarma, P. N. Roxburghin- a new stilbene from the wood of *Cassia roxburghii*. *J. Indian Chem. Soc.* 64, p. 559-561, 1987.

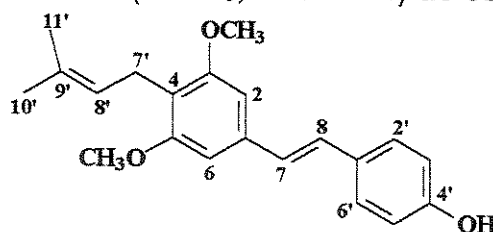
¹⁰⁵ Schultz, T. P.; Boldin, W. D.; Fisher, T. H.; Nicholas, D. D.; McMurtrey, K. D. e Pobanz, K. Structure-fungicidal properties of some 3- and 4-hydroxylated stilbenes and bibenzyl analogues. *Phytochemistry*, 31 (11), p. 3801-3806, 1992.



Quadro 40- Proposta de fragmentação do estilbeno (11) no espectrômetro de massas

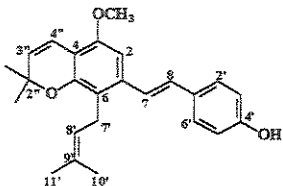
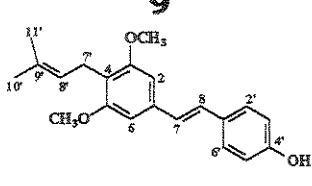
Apêndice E- Tabelas dos estilbenos (10 e 11)Tabela 33- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do estilbeno (10).

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
2' e 6'	7,32	2H, <i>d</i> , $J = 8,6$
8	7,15	1H, <i>d</i> , $J = 16,6$
7	6,84	1H, <i>d</i> , $J = 16,6$
3' e 5'	6,75	2H, <i>d</i> , $J = 8,6$
4''	6,60	1H, <i>d</i> , $J = 9,8$
2	6,59	1H, <i>s</i>
3''	5,50	1H, <i>d</i> , $J = 9,8$
8'	5,06	1H, <i>m</i>
4'-OH	5,00	1H, <i>sl</i>
3-OCH ₃	3,79	3H, <i>s</i>
7'	3,34	2H, <i>d</i> , $J = 6,8$
10'	1,75	3H, <i>s</i>
11'	1,61	3H, <i>s</i>
2''-2CH ₃	1,34	6H, <i>s</i>

Tabela 34- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do estilbeno (11).

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
2' e 6'	7,40	2H, <i>d</i> , $J = 8,6$
8	7,00	1H, <i>d</i> , $J = 16,3$
7	6,90	1H, <i>d</i> , $J = 16,3$
3' e 5'	6,83	2H, <i>d</i> , $J = 8,6$
2	6,67	1H, <i>s</i>
6	6,67	1H, <i>s</i>
8'	5,18	1H, <i>tl</i> , $J = 7,0$ e $1,3$
4'-OH	4,98	1H, <i>sl</i>
3,5-OCH ₃	3,86	6H, <i>s</i>
7'	3,34	2H, <i>d</i> , $J = 7,0$
10'	1,77	3H, <i>s</i>
11'	1,66	3H, <i>s</i>

Tabela 35- Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) dos estilbenos (10 e 11).

C	8  9 	
	8	9
1	136,7	136,4
2	99,6	102,1
3	155,1	158,1
4	120,6	117,9
5	153,2	158,1
6	110,2	102,1
7	124,9	127,4 *
8	129,0	127,2 *
1'	130,4	130,3
2'	127,8	127,8
3'	115,6	115,6
4'	151,2	155,1
5'	115,6	115,6
6'	127,8	127,8
7'	24,3	22,3
8'	123,5	122,7
9'	130,7	131,1
10'	18,0	17,7
11'	25,7	25,8
2''	77,2	-
3''	128,6	-
4''	117,1	-
2''- 2CH ₃	27,5	-
3-OCH ₃	55,6	55,8
5-OCH ₃	-	55,8

* Valores intercambiáveis

Tabela 36- Correlações observadas no espectro de HETCOR (CDCl_3 , 7 Tesla) para o estilbeno (10).

H (δ)	C (δ , 1J)
8 (7,15)	8 (129,0)
3" (5,50)	3" (128,6)
2' e 6' (7,32)	2' e 6' (127,8)
7 (6,84)	7 (124,9)
8' (5,06)	8' (123,5)
4" (6,60)	4" (117,1)
3' e 5' (6,75)	3' e 5' (115,6)
2 (6,59)	2 (99,6)
3-OCH ₃ (3,79)	3-OCH ₃ (55,6)
2"-2CH ₃ (1,34)	2"-2CH ₃ (27,5)
11' (1,61)	11' (25,7)
7' (3,34)	7' (24,3)
10' (1,75)	10' (18,0)

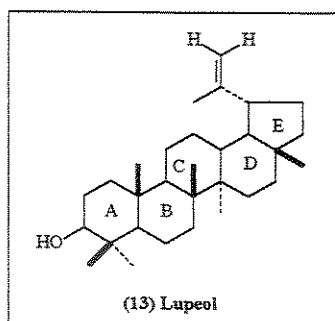
Tabela 37- Correlações observadas no espectro COSY (H-H) do estilbeno (10).

H (δ)	H (δ , 2J)
2' e 6' (7,32)	3' e 5' (6,75)
7 (6,84)	8 (7,15)
4" (6,60)	3" (5,50)
8' (5,06)	7' (3,34); 10' (1,75); 11' (1,61)
7' (3,34)	10' (1,75); 11' (1,61); 8' (5,06)
10' (1,75)	7' (3,34); 8' (5,06)
11' (1,61)	7' (3,34); 8' (5,06)

6.6 Triterpenos

6.6a Lupeol

Concluído o estudo do extrato diclorometânico, iniciamos o estudo do extrato éter de petróleo, permitindo o isolamento do triterpeno Lupeol (13), além das flavanonas 4 e 5 (Quadro 5) e dos estilbenos 10 e 11 (Quadro 6) já isolados do extrato diclorometânico.



Quadro 41- Triterpeno Lupeol isolado do extrato éter de petróleo

O Lupeol (13), foi identificado através dos dados espectrais obtidos de RMN ^1H , RMN ^{13}C , Espectro de Massas e por comparação com dados espectrais da literatura^{106,107,108,109,110,111,112}. É um triterpeno pertencente à classe dos Lupanos

¹⁰⁶ Lindgren, B. O e Svahn, C. M. Lupan-3 β ,20-diol and Lupan-3 β ,20,28-triol in bark from Birch, *Betula verrucosa* Erh. *Acta Chem. Scand.* 20 (6), p. 1720-1721, 1966.

¹⁰⁷ Itoh, T.; Tamura, T. e Matsumoto, T. Triterpene alcohols in the seeds of Solanaceae. *Phytochemistry*, 16, p. 1723-1726, 1977.

¹⁰⁸ Rahman, U-A, Khan, M. A. e Khan, N. H. Loranthol: a new pentacyclic triterpenoid from *Loranthus grewinkii*. *Phytochemistry*, 12, p. 3004- 3006, 1973.

¹⁰⁹ Lehn, J-M. e Ourisson, G. Résonance magnétique nucléaire de produits naturels. I.- Introduction générale. Triterpènes de la série du lupane: les groupes méthyles. *Mémoires Présentés a la Société Chimique*, 5^a série, p. 1137-1142, 1962.

¹¹⁰ Shannon, J. S. Studies in mass spectrometry. *Aust. J. Chem.*, 16, p. 683-689, 1963.

¹¹¹ Budzikiewicz, H.; Wilson, J. M. e Djerassi, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (20), p. 3688-3699, 1963.

¹¹² Muccino, R. R. e Djerassi, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CCXXXIX. Elucidation of the ring D cleavage in lanostane. *J. Amer. Chem. Soc.*, 96 (2), p. 556-570, 1974.

e já foi isolado de várias fontes, tais como *Derris laxiflora*¹¹³, *Betula verrucosa* Erh.¹¹⁴, *Capsicum annuum*¹¹⁵, *Plumeria obtusifolia*¹¹⁶, *Alibertia macrophylla*¹¹⁷, *Arbutus unedo*¹¹⁸, *Achillea magnifica*¹¹⁹, *Cnidoscylus urens*¹²⁰ e *Carphephorus odoratissimus*¹²¹.

Vale a pena mencionar que é a primeira vez que se relata o isolamento de Lupeol de espécies do gênero *Deguelia*.

Os dados de RMN ¹H e de RMN ¹³C (DEPT 90° e 135°) (Anexo A- E124 e E125) obtidos experimentalmente, comparados com os da literatura^{115,122,123} são mostrados na Tabela 38.

¹¹³ Lin, Y-L, Chen, Y-L e Kuo, Y-H. 3 new flavonoids, 3'-methoxylupinifolin, laxifolin, and isolaxifolin from the roots of *Derris laxiflora* Benth. *Chem. Pharm. Bull.* 39 (12), p. 3132-3135, 1991.

¹¹⁴ Lindgren, B. O e Svahn, C. M. Lupan-3 β ,20-diol and Lupan-3 β ,20,28-triol in bark from Birch, *Betula verrucosa* Erh. *Acta Chem. Scand.* 20 (6), p. 1720-1721, 1966.

¹¹⁵ Itoh, T.; Tamura, T. e Matsumoto, T. Triterpene alcohols in the seeds of Solanaceae. *Phytochemistry*, 16, p. 1723-1726, 1977.

¹¹⁶ Schmidt, J.; Lien, N. T.; Khoi, N. H. e Adam, G. Lupeol long-chain fatty acid esters and other triterpenoid constituents from *Plumeria obtusifolia*. *Phytochemistry*, 22 (4), p. 1032-1033, 1983.

¹¹⁷ Bolzani, V. da S.; Trevisan, L. M. V. e Young, M. C. M. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. *Phytochemistry*, 30 (6), p. 2089-2091, 1991.

¹¹⁸ Karikas, G. A.; Euerby, M. R. e Waigh, R. D. Constituents of the stems of *Arbutus unedo*. *Planta Medica* 2, p. 223-224, 1987

¹¹⁹ Ulubelen, A.; Öksüz, S. e Tuzlaci, E. A new triterpene and other compounds from *Achillea magnifica*. *Planta Medica*, 55 (4), p. 395-395, 1989.

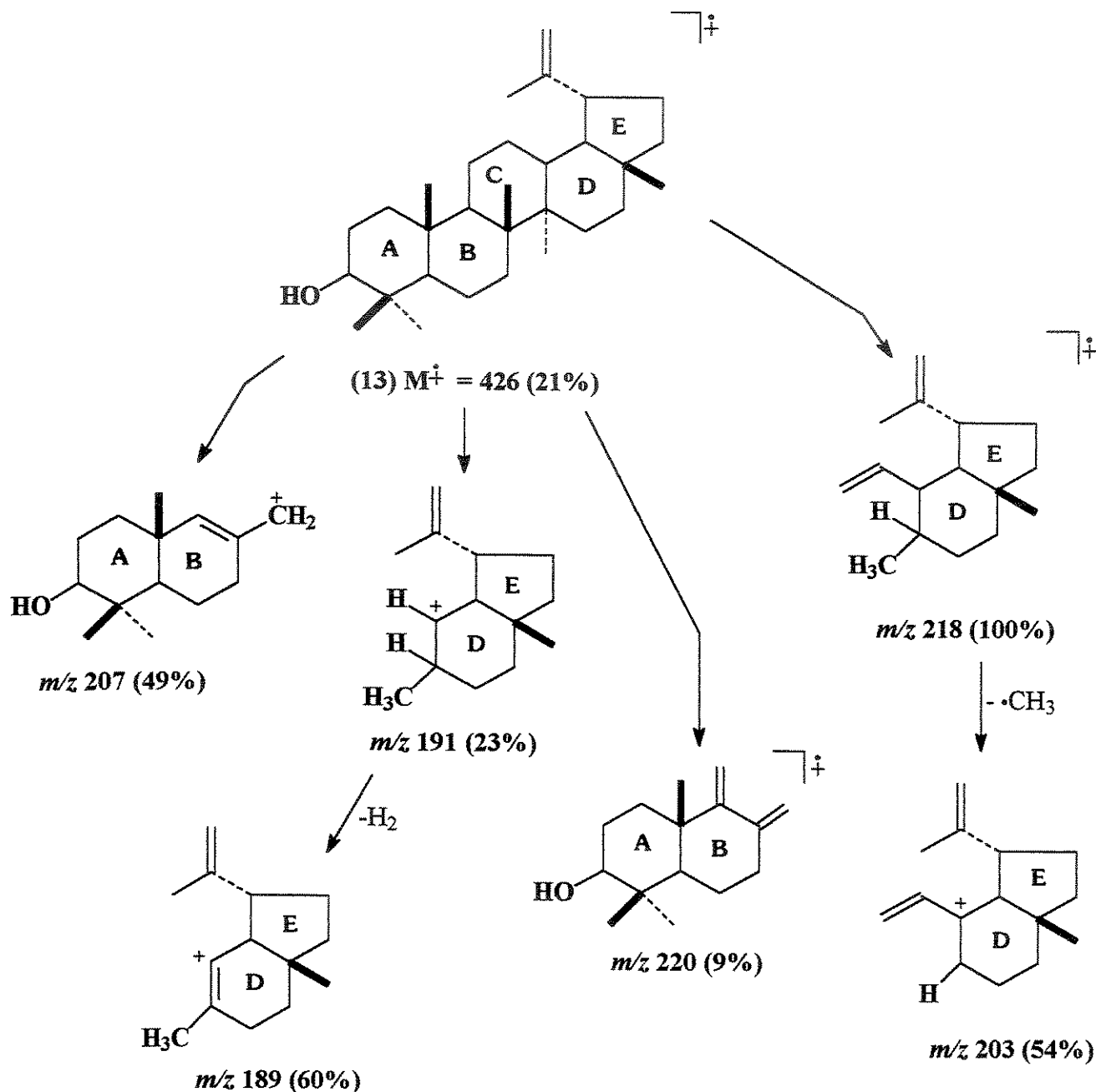
¹²⁰ Bhattacharyya, J. e Barros, C. B. Triterpenoids of *Cnidoscylus urens*. *Phytochemistry*, 25 (1), p. 274-276, 1986.

¹²¹ Appleton, R. A. e Enzell, C. R. Triterpenoids and aromatic components of deertongue leaf. *Phytochemistry*, 10, p. 447-449, 1971.

¹²² Rahman, U-A, Khan, M. A. e Khan, N. H. Loranthal: a new pentacyclic triterpenoid from *Loranthus grewinkii*. *Phytochemistry*, 12, p. 3004- 3006, 1973.

¹²³ Lehn, J-M. e Ourisson, G. Résonance magnétique nucléaire de produits naturels. I.- Introduction générale. Triterpènes de la série du lupane: les groupes méthyles. *Mémoires Présentés a la Société Chimique*, 5^a série, p. 1137-1142, 1962.

O espectro de massas (Anexo A- E126) mostra o íon molecular de m/z 426 (21%), além dos picos de m/z 207 (49%), m/z 191 (23%), m/z 218 (100%), m/z 220 (9%), m/z 189 (60%) e m/z 203 (54%), que são bastante característicos para triterpenos pentacíclicos saturados, como mostra o Quadro 42.



Quadro 42- Proposta de fragmentação do Lupeol (13) no espectrômetro de massas

Apêndice F- Tabela do Lupeol (13)

Tabela 38- Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para o Lupeol (13).

Carbono	δ_{C} (ppm)	DEPT	δ_{H} (ppm) *, 1
1	38,7	CH_2	--
2	27,4	CH_2	--
3	79,0	CH	3,20 (<i>dd</i> ; 10 e 5)
4	38,8	C_o	--
5	55,3	CH	--
6	18,3	CH_2	--
7	34,3	CH_2	--
8	40,8	C_o	--
9	50,4	CH	--
10	37,1	C_o	--
11	20,9	CH_2	--
12	25,1	CH_2	--
13	38,0	CH	--
14	42,8	C_o	--
15	27,4	CH_2	--
16	35,6	CH_2	--
17	43,0	C_o	--
18	48,3	CH	--
19	47,9	CH	--
20	150,9	C_o	--
21	29,8	CH_2	--
22	40,0	CH_2	--
23	28,0	CH_3	0,76
24	15,4	CH_3	0,84
25	16,1	CH_3	0,97
26	15,9	CH_3	1,04
27	14,5	CH_3	0,95
28	18,0	CH_3	0,79
29a	109,3	CH_2	4,57 (<i>dd</i> ; 2,0 e 1,0)
29b	109,3	CH_2	4,69 (<i>d</i> ; 2,0)
30	19,3	CH_3	1,69

¹ Os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

*Os espaços em branco correspondem aos sinais que não puderam ser identificados no espectro, por apresentarem deslocamentos químicos de hidrogênio muito próximos.

Capítulo II
Análise por CLAE

1. INTRODUÇÃO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação analítica que vem sendo atualmente muito empregada em laboratórios de pesquisa e indústrias, principalmente nos estudos de quimiotaxonomia, composição dos alimentos e monitoramento de drogas terapêuticas¹²⁴.

Sabendo que os flavonóides possuem importantes aplicações farmacológicas, fisiológicas e taxonômicas, e que muitas vezes são encontrados na natureza em sistemas altamente complexos e a baixas concentrações^{125,126}, torna-se importante o desenvolvimento de técnicas analíticas de separação mais eficazes. A técnica de CLAE possui algumas vantagens, pois oferece uma alta sensibilidade e na maioria dos casos é mais eficiente em comparação a cromatografia em camada delgada (CCD), além disso, possibilita a análise destes compostos sem a derivatização necessária nas análises por CG.

A literatura menciona que, para analisar flavonóides por CLAE o método mais apropriado é de fase reversa, usando como fase móvel as misturas de Metanol/ Água ou Acetonitrila/ Água ^{125,127}.

¹²⁴ Pryde, A. & Gilbert, M. T. *apud* Soriano, M. del P. C. Estudos de *Lonchocarpus dipteroneurus* Pittier e *Lonchocarpus montanus* A. M. G. Azevedo- Isolamento, Determinação estrutural e Atividade Biológica, Campinas, 1999, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP.

¹²⁵ Conde, E.; Cadahía, E. e Garcia-Vallejo, M. C. HPLC analysis of flavonoids and phenolic acids and aldehydes in *Eucalyptus* spp. *Chromatographia*, 41 (11/12), p. 657-660, 1995.

¹²⁶ De Simón, B. F.; Pérez-Ilzarbe, J.; Hernández, T.; Gómez-Cordovés, C. e Estrella, I. HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatographia*, 30 (1/2), p. 35-37, 1990.

¹²⁷ Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F.; Blázquez, M. A., García-Viguera, C. e Tomás-Lorente, F. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *J. Chromatogr.* 634, p. 41-46, 1993.

A eluição em gradiente é a mais recomendada para a separação de misturas de flavonóides e uma grande diversidade de gradientes pode ser encontrado na literatura^{128,129,130}.

A detecção foi feita por UV e arranjo de diodos, que também são muito empregadas, principalmente o arranjo de diodos que facilita a identificação e avalia a pureza dos picos nos cromatogramas^{131,132}.

Neste capítulo encontramos os resultados obtidos pelas análises qualitativas e quantitativas por CLAE dos extratos diclorometânico e éter de petróleo das raízes de *D. hatschbachii*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises qualitativa e quantitativa, foram realizadas em um aparelho de cromatografia Líquida de Alta Eficiência HP 1090 série II/M, utilizando:

Detector: espectrofotométrico UV/VIS arranjo de diodos.

Coluna: HP Nova-Pack, 3 µm

Fase Móvel Gradiente: 80: 20 (H₂O: CH₃CN)- 100 (CH₃CN) em 45 minutos de análise.

¹²⁸ Sendra, J. M.; Navarro, J. L. e Izquierdo, L. C₁₈ Solid-Phase isolation and High-Performance Liquid Chromatography/ Ultraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in citrus juices. *J. Chromatogr. Sci.*, 26, p. 443- 448, 1988.

¹²⁹ Hasler, A.; Sticher, O. e Meier, B. High-Performance Liquid Chromatographic determination of five widespread flavonoid aglycones. *J. Chromatogr.*, 508, p. 236-240, 1990.

¹³⁰ Patron, N. H.; Smith, P. e Mabry, T. J. Identification of flavonoid compounds in HPLC separation of sugar cane colorants. *Int. Sugar Journal*, 87 (1043), p. 213-215, 1985.

¹³¹ Schaufelberger, D. e Hostettmann, K. High-Performance Liquid Chromatographic analysis of secoiridoid and flavone glycosides in closely related *Gentiana* species. *J. Chromatogr.*, 389, p. 450-455, 1987.

¹³² Conde, E.; Cadahía, E. e Garcia-Vallejo, M. C. HPLC analysis of flavonoids and phenolic acids and aldehydes in *Eucalyptus* spp. *Chromatographia*, 41 (11/12), p. 657-660, 1995.

Fluxo: 0,8 mL/min.

Volume de Injeção: 10,0 µL

Detector: 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340 e 360 nm.

Temperatura: Ambiente

As purificações dos flavonóides, usados como padrões para análise quantitativa, foram feitas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência semi-preparativo Waters 600E, utilizando:

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

Coluna: preparativa Octadecyl Spherisorb S50DS Hi-Chrom Preparative HPLC Collumn (5 µm, 25 cm x 10 mm, ID)

Fase Móvel: Gradiente Linear 80: 20 (H₂O: CH₃CN)- 100 (CH₃CN) em 45 minutos de análise.

Fluxo: 2mL/min.

Volume de Injeção: 100 µL

Detector: 270 nm

Os solventes foram filtrados e desgaseificados antes de cada análise, sendo a água destilada e deionizada a uma concentração de 18,2 mΩ. Todas as amostras foram dissolvidas em solvente grau HPLC e filtradas em filtro tipo Millex®.

2.1 Análise Qualitativa

As análises qualitativas dos extratos diclorometânico e éter de petróleo das raízes de *Deguelia hatschbachii* foram realizadas com objetivo de verificar o perfil cromatográfico de cada extrato.

Para o extrato diclorometânico esta análise se baseou na co-injeção de oito das doze substâncias isoladas deste extrato, enquanto que para o extrato éter de petróleo co-injetamos apenas duas das quatro substâncias isoladas. A

identificação dos picos nos cromatogramas foi feita comparando o tempo de retenção e o espectro no UV correspondente a cada substância pura. A pureza de cada pico foi checada pela varredura dos correspondentes espectros no UV realizada pelo próprio equipamento.

2.1.1 Seleção da fase móvel

Usando a coluna ODS Hypersil 5 μ m, 100x4,6 mm, foram testadas várias fases móveis, tais como: condições isocráticas de acetonitrila 100% e CH₃CN:H₂O 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60%, gradientes de CH₃CN:H₂O (20:80) até 100% de CH₃CN em 30 minutos e em 45 minutos, de CH₃CN:H₂O (10:90) até 100% de CH₃CN em 30 minutos e em 45 minutos. Gradientes de MeOH:H₂O também foram testadas na proporções de MeOH:H₂O (60:40) até 100% de MeOH em 30 minutos, MeOH:H₂O (50:50) até 100% de MeOH em 30 minutos, MeOH:H₂O (40:60) até 100% de MeOH em 30 minutos, MeOH:H₂O (30:70) até 100% de MeOH em 30 minutos. Trocando a coluna para HP Nova-Pack, 3 μ m, foram testados os gradientes de CH₃CN:H₂O (20:80) até 100% de CH₃CN em 30 minutos e em 45 minutos; de CH₃CN:H₂O (30:70) até 100% de CH₃CN em 30 minutos e em 45 minutos; CH₃CN:H₂O (40:60) até 100% de CH₃CN em 30 minutos e em 45 minutos.

Após todas estas tentativas, a fase móvel que proporcionou melhor separação dos picos correspondentes as substâncias foi a gradiente partindo da mistura CH₃CN:H₂O (20:80) aumentando a proporção de CH₃CN até 100% em 45 minutos.

2.1.2 Seleção do comprimento de onda

A escolha do comprimento de onda se baseou no comportamento dos flavonóides, que apresentam duas principais bandas de absorção no UV, uma referente ao sistema benzoíla (Banda II, 240-285 nm) e outra ao sistema cinamoíla (Banda I, 300-400 nm). Desta forma, foram selecionados 8 comprimentos de onda (λ = 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340 e 360 nm) com o

objetivo de determinar em qual deles a absorção de cada substância é máxima. Este dado foi de grande importância para a análise quantitativa dos extratos.

2.2 Análise Quantitativa

O método utilizado para a quantificação de cinco dos flavonóides isolados foi o de calibração externa, produzindo curvas analíticas com coeficiente de correlação de no mínimo 0,999. As condições de análise foram as mesmas usadas na análise qualitativa das substâncias nos extratos. Vale a pena mencionar que o detector foi selecionado no comprimento de onda de absorção máxima característica de cada amostra, que foi determinado pela análise qualitativa.

2.2.1 Preparação das soluções padrões:

As curvas analíticas foram feitas com os padrões diluídos em balões volumétricos.

2.2.2 Construção das curvas analíticas:

As curvas analíticas foram construídas seguindo a equação:

$$y = a + bx$$

onde:

y= área absoluta dos picos no cromatograma (fornecida pelo integrador do aparelho);

x= concentração do padrão ($\mu\text{g}/2\mu\text{L}$ solvente)

a e **b** foram obtidos através do cálculo de regressão linear com auxílio do programa Microcal Origin versão 5.0.

Os valores de concentração (**x**), áreas dos picos obtidos em cada diluição (**y**) e a área do pico de cada amostra no extrato diclorometânico e éter de petróleo, são mostrados nas Tabelas 39 e 40:

Tabela 39- Valores utilizados para a construção das curvas analíticas dos cinco flavonóides isolados do extrato diclorometânico das raízes de *Deguelia hatschbachii*.

Padrão	Concentração ($\mu\text{g}/2\mu\text{L}$) (x)	Área do Pico (y)	Área do Pico no ED
Escandenina (1)	2,072	2303	1095
	1,036	1069	
	0,518	494,09	
	0,259	237,06	
	0,129	97,01	
	0,064	65,61	
Ácido Robústico (2)	2,08	3031	213,87
	1,04	1448	
	0,52	723,80	
	0,26	345,64	
	0,13	170,47	
	0,065	83,67	
Flavanona (4)	2,4	3428	1147
	1,2	1692	
	0,6	841,23	
	0,3	412,31	
	0,15	203,63	
	0,075	99,95	
Lupinifolina (5)	2,2	2730	572,83
	1,1	1202	
	0,55	550,68	
	0,275	250,99	
	0,1375	102,75	
	0,06875	43,41	
Escandinona (7)	0,84	2322	353,06
	0,42	1142	
	0,21	577,91	
	0,105	273,51	
	0,0525	139,32	
	0,02625	69,76	

Tabela 40- Valores utilizados para a construção das curvas analíticas das duas flavanonas isoladas do extrato éter de petróleo das raízes de *Deguelia hatschbachii*.

Padrão	Concentração ($\mu\text{g}/2\mu\text{L}$) (x)	Área do Pico (y)	Área do Pico no ED
Flavanona (4)	2,4	3428	
	1,2	1692	
	0,6	841,23	712,41
	0,3	412,31	
	0,15	203,63	
	0,075	99,95	
Lupinifolina (5)	2,2	2455	
	1,1	1201	
	0,55	573,79	1101
	0,275	278,37	
	0,1375	137,90	
	0,06875	68,83	

As Tabelas 41 e 42 mostram as equações da reta para os flavonóides quantificados nos extratos éter de petróleo e diclorometânico de *D. hatschbachii*.

Tabela 41- Equações da reta para os sete flavonóides quantificados no extrato diclorometânico de *D. hatschbachii*

Padrão	Equação da Reta $y=a+bx$	Coefficiente de correlação
1	$y = -122,41 + 1167,21456x$	0,99986
2	$y = -3,915 + 1344,01099x$	1
3	$y = 96,43499 + 698,67583x$	0,99981
4	$y = -10,94 + 1419,08x$	1
5	$y = -74,67 + 1157,23636x$	0,99980
7	$y = -9,11771 + 2768,98338x$	0,99996
8	$y = -59,78 + 1715,29279x$	0,99998

Tabela 42- Equações da reta para as duas flavanonas quantificadas no extrato éter de petróleo de *D. hatschbachii*

Padrão	Equação da Reta $y=a+bx$	Coefficiente de correlação
4	$y= -10,94 + 1419,08x$	1
5	$y= -53,21+ 1140,10909x$	1

As figuras 24 e 25 mostram os gráficos de regressão linear (curvas analíticas) dos flavonóides quantificados nos extratos éter de petróleo e diclorometânico.

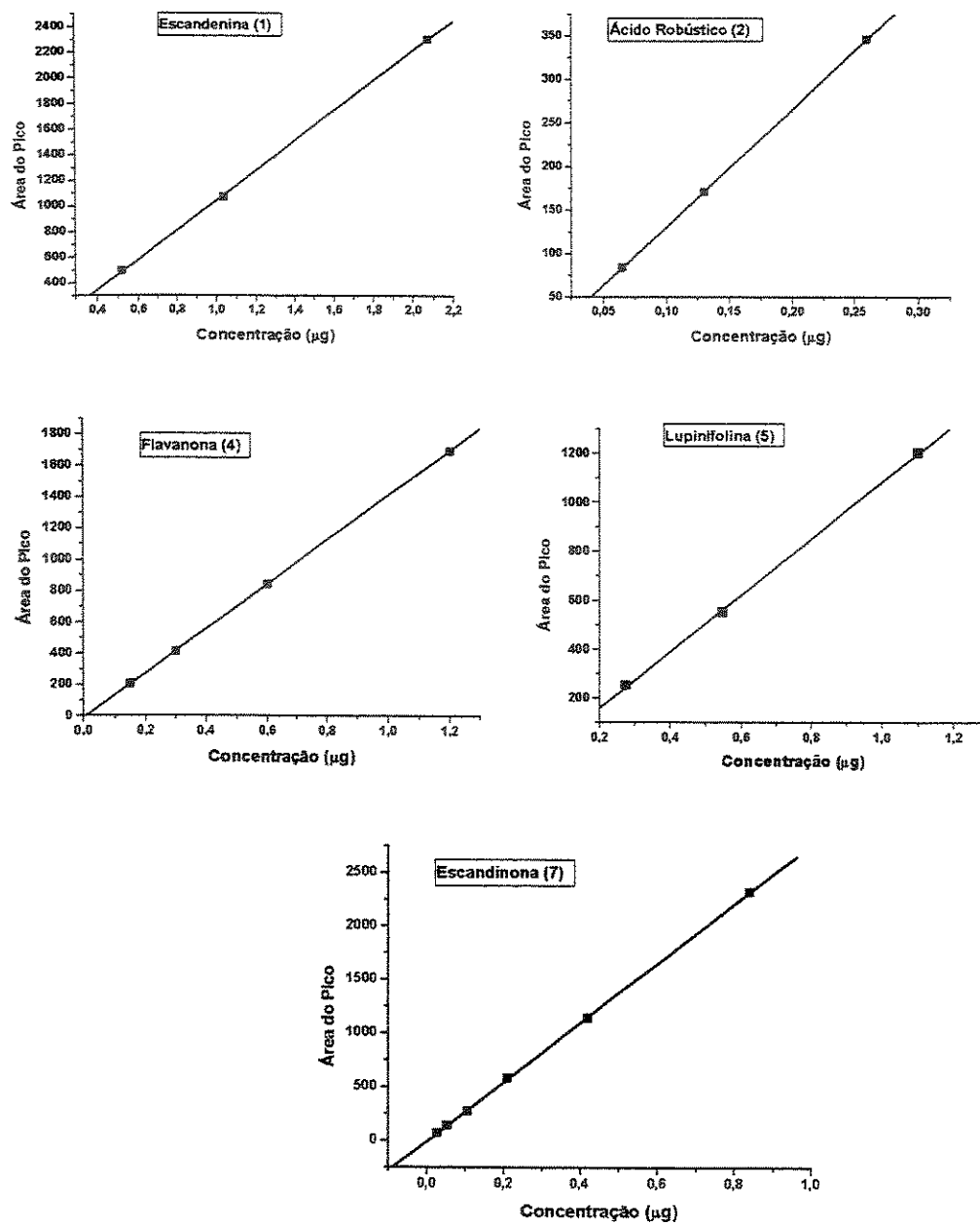


Figura 24- Curvas de calibração pelo método de regressão linear dos flavonóides 1, 2, 4, 5 e 7 para o extrato diclorometânico

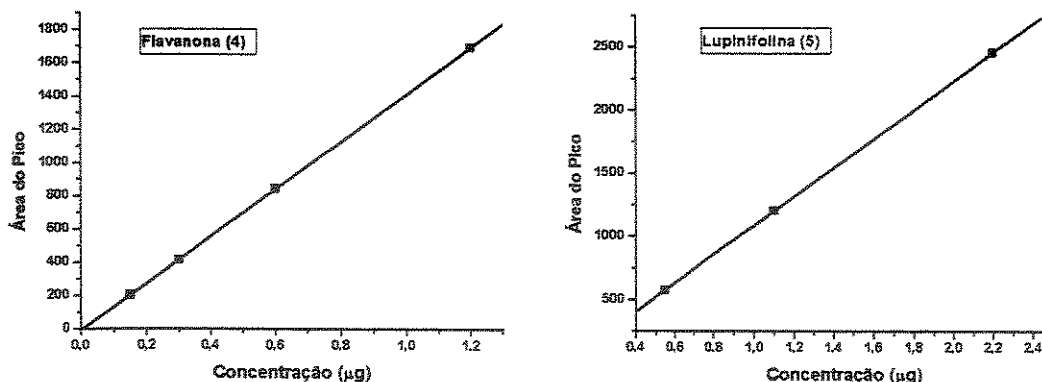


Figura 25- Curvas de calibração pelo método de regressão linear das flavanonas 4 e 5 para o extrato éter de petróleo

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise Qualitativa

Dos 12 flavonóides isolados do extrato diclorometânico, só não foi possível identificar a osajina (6), os estilbenos (10 e 11) e a desoxibenzoína (12).

O cromatograma da Figura 26, mostra a identificação de 8 substâncias no extrato diclorometânico obtidos pela injeção de 10,0 µL de uma solução de concentração 1,25 mg/mL deste extrato em acetonitrila, selecionando o detector no $\lambda = 260$ nm.

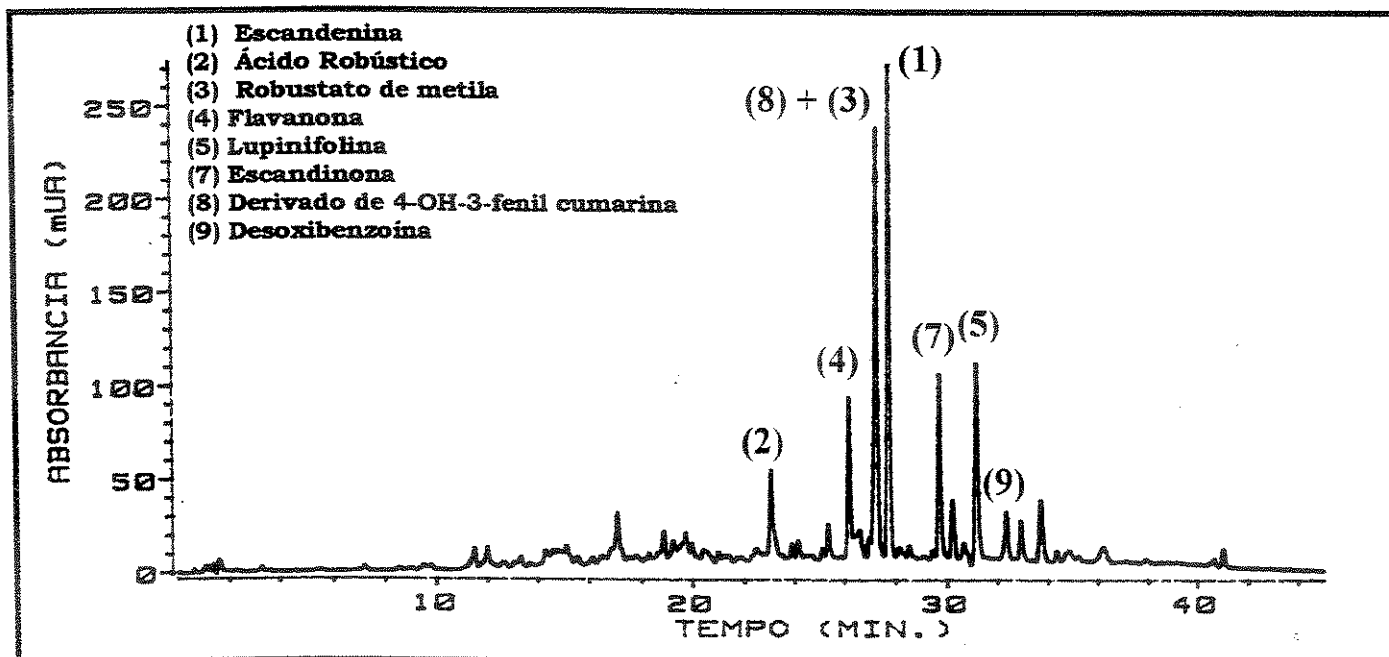


Figura 26- Cromatograma do extrato diclorometânico das raízes de *D. hatschbachii*. 1: Escandenina, 2: Ácido Robústico, 3: Robustato de metila, 4: Flavanona, 5: Lupinifolina, 7: Escandinona, 8: Derivado de 4-OH-3-fenil cumarina, 9: Desoxibenzoína. Condições utilizadas: Coluna HP Nova-Pack, 3 μ m, fase móvel: gradiente 80: 20 (H_2O : CH_3CN)- 100 (CH_3CN) em 45 min., fluxo: 0,8 mL/min.

A identificação dos flavonóides, no cromatograma do extrato, foi feita pela co-injeção dos respectivos padrões puros isolados, comparando os valores de tempo de retenção e espectros no UV.

A Figura 27 mostra o cromatograma obtido da injeção de 1,0 μ L de uma solução de concentração de 1,45 mg/mL da flavanona (4) em acetonitrila, selecionando o detector no comprimento de onda onde sua absorção é máxima ($\lambda = 230$ nm). Observamos também que o espectro no UV fornecido pelo aparelho está compatível com o obtido experimentalmente para o produto isolado (Anexo A- E74).

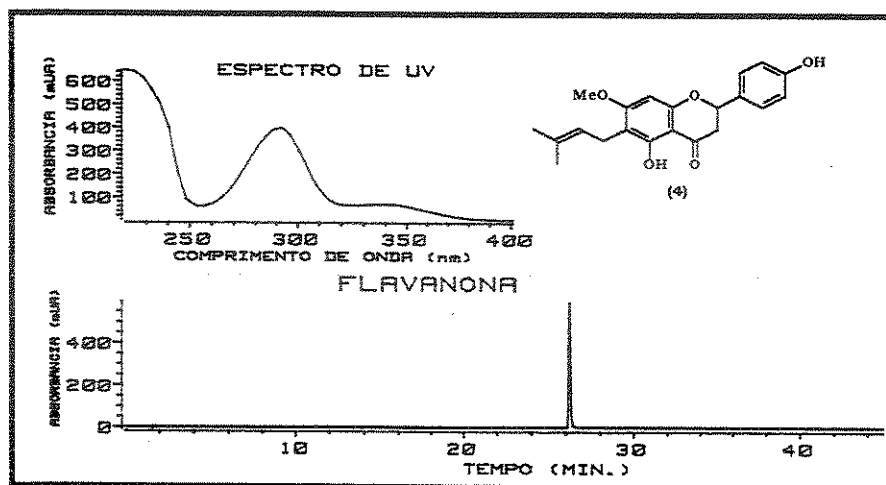


Figura 27- Cromatograma da flavanona ($\lambda = 230$ nm) e seu respectivo espectro no UV. Condições utilizadas: Coluna HP Nova-Pack, 3 μ m, fase móvel: gradiente 80: 20 (H_2O : CH_3CN)- 100 (CH_3CN) em 45 min., fluxo: 0,8 mL/min.

As substâncias puras (1), (2), (3), (5), (7), (8) e (9), também foram injetadas no aparelho tal como a flavanona (4) e, desta forma pudemos determinar seus respectivos tempos de retenções, sempre comparando seus espectros no UV com os obtidos experimentalmente.

Na Figura 28 observamos a intensificação do pico referente a flavanona (4) (Cromatograma B), quando co-injetada com o extrato diclorometânico.

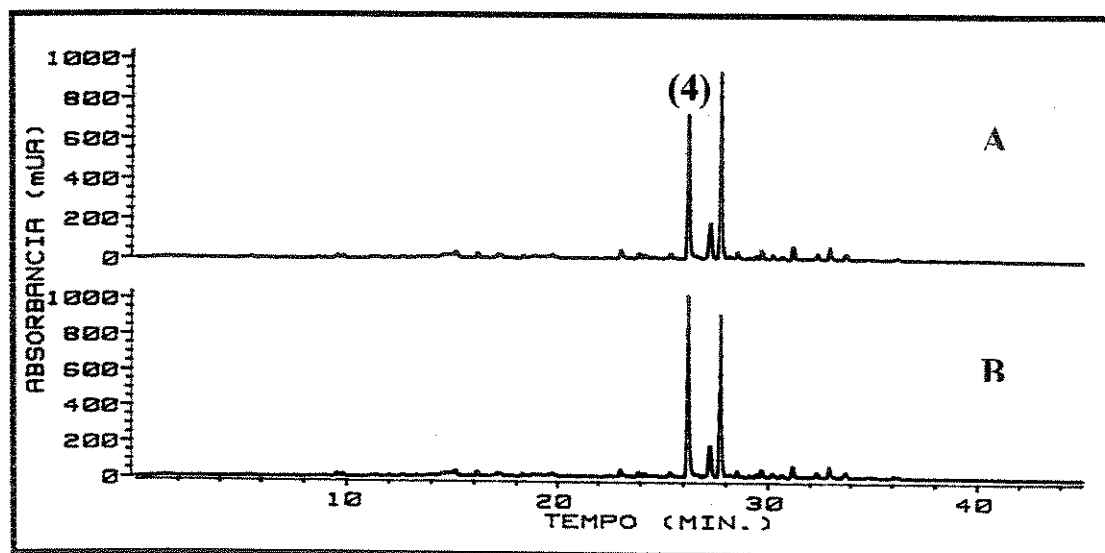


Figura 28- A: Cromatograma do extrato diclorometânico ($\lambda = 230$ nm), B: Cromatograma da co-injeção da flavanona (4) no extrato diclorometânico ($\lambda = 230$ nm). Condições utilizadas: Coluna HP Nova-Pack, 3 μ m, fase móvel: gradiente 80: 20 (H_2O : CH_3CN)- 100 (CH_3CN) em 45 min., fluxo: 0,8 mL/min.

O extrato éter de petróleo foi injetado nas mesmas condições de análise do extrato diclorometânico (Figura 29).

O que mais nos chama atenção nestes cromatogramas é a ausência da escandenina (1) e do derivado da desoxibenzoína (9) no extrato éter de petróleo e a presença das duas flavanonas (4 e 5) nos dois extratos.

Vale a pena mencionar que há mais três substâncias presentes em ambos os extratos, a substância com $t_R = 27,526$; $t_R = 33,094$ e $t_R = 33,947$. A substância de $t_R = 27,526$ corresponde ao novo derivado de uma 4-OH-3-fenil cumarina (8), que deve estar em concentração muito baixa no extrato éter de petróleo, pois não foi possível seu isolamento.

As substâncias de $t_R = 33,094$ (**a**) e $33,947$ (**b**); provavelmente devem ser os estilbenos (10 e 11, ou vice-versa) isolados de ambos os extratos, que não estão mais disponíveis para serem analisados por CLAE, pois sofreram polimerização.

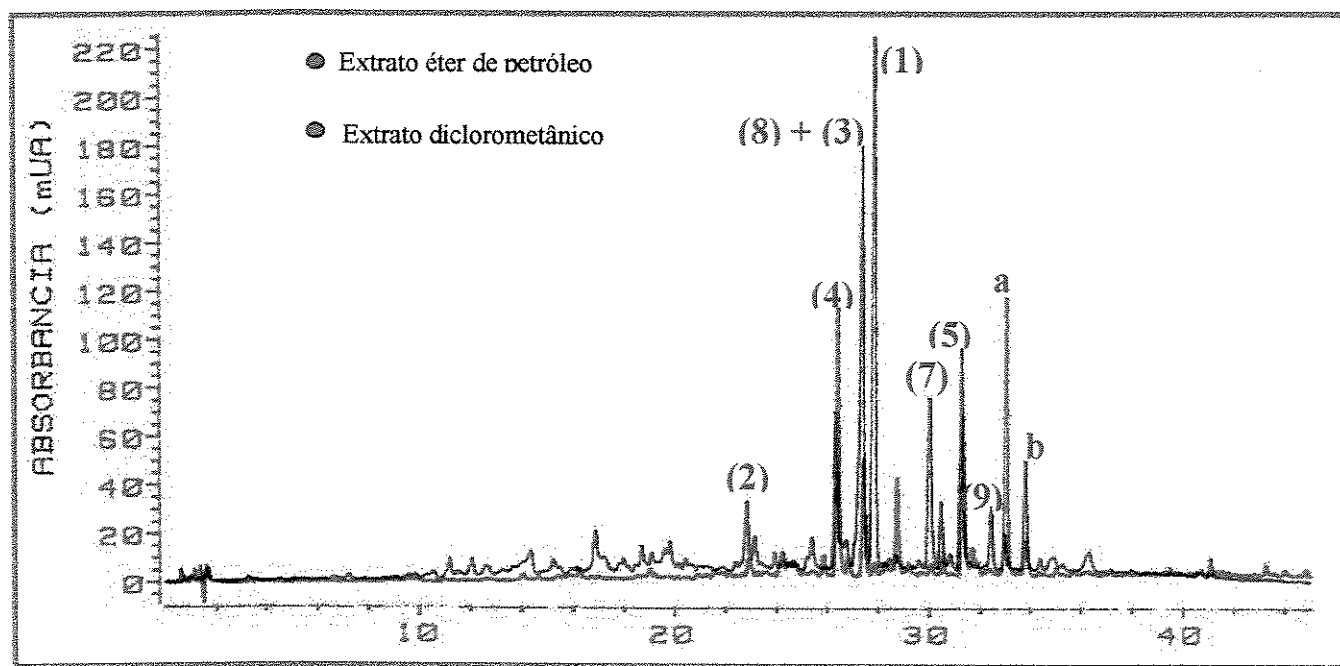


Figura 29- Cromatogramas dos extratos diclorometânico ($\lambda = 260$ nm) e éter de petróleo ($\lambda = 230$ nm). Condições utilizadas: Coluna HP Nova-Pack, 3 μ m, fase móvel: gradiente 80: 20 (H_2O : CH_3CN)- 100 (CH_3CN) em 45 min., fluxo: 0,8 mL/min.

Além de termos identificado 8 dos flavonóides isolados, no cromatograma do extrato diclorometânico, também pudemos confirmar a presença das substâncias inéditas (8) e (9) neste extrato, concluindo com isso, que se tratam de substâncias naturais e não artefatos.

Estas análises auxiliaram na determinação das condições experimentais para a análise quantitativa das substâncias nos extratos.

3.2 Análise Quantitativa

Embora oito flavonóides tenham sido identificados por CLAE no extrato diclorometânico, apenas cinco deles puderam ser quantificados, porque (3) e (8) coeluíram (Figura 26) dando um único pico e o composto (9) se decompôs. Para o extrato éter de petróleo, foi possível apenas a quantificação das flavanonas (4) e (5).

As Tabelas 43 e 44 mostram as quantidades obtidas de cada substância por grama de raiz nos extratos diclorometânico e éter de petróleo de *D. hatschbachii*.

Tabela 43- Quantidade determinada das cinco substâncias no extrato diclorometânico.

<i>Padrão</i>	<i>mg/g de raiz</i>
1	12,37
2	0,57
4	2,90
5	12,03
7	0,46

Tabela 44- Quantidade determinada das duas flavanonas no extrato éter de petróleo.

<i>Padrão</i>	<i>mg/g de raiz</i>
4	0,64
5	1,27

A decorative banner with a wavy, torn-edge border. On the left, there is a botanical illustration of a plant with large, dark, rounded leaves and a smaller, lighter-colored plant with thin, spiky leaves. In the center, there is a circular logo with a globe-like design and some text around it. The text "Capítulo III" is written in a large, bold, serif font, and "Testes Biológicos" is written below it in a slightly smaller, bold, serif font. On the right, there is a single, dark, elongated leaf or seed pod.

Capítulo III
Testes Biológicos

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, vem sendo observado um grande número de trabalhos na literatura mostrando o interesse no isolamento de compostos bioativos de plantas, principalmente por grupos envolvidos em programas visando a descoberta de novas drogas^{133,134,135,136,137,138,139,140}. A metodologia empregada tanto pode ser de isolamento dos compostos e subsequente testes biológicos, como de isolamento biomonitorado seguido ou não da aplicação de testes de atividade biológica das substâncias puras já isoladas e identificadas.

Os flavonóides¹⁴¹ devem ocorrer na natureza por mais de um bilhão de anos interagindo com organismos desenvolvidos ao longo das eras geológicas. Nitidamente os flavonóides desempenham algum papel importante na natureza,

¹³³ Abegaz, B. M.; Ngadjui, B. T.; Bezabih, M. e Mdee, L. K. Novel natural products from marketed plants of eastern and southern Africa. *Pure Appl. Chem.* 71 (6), p. 919-926, 1999.

¹³⁴ Takasaki, M.; Tokuda, H.; Nishino, H. e Konoshima, T. Cancer chemopreventive agents (Antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*. *J. Nat. Prod.* 62 (7), p. 972-975, 1999.

¹³⁵ Stevens, J. F.; Ivancic, M.; Deinzer, M. L. e Wollenweber, E. A novel 2-hydroxyflavanone from *Collinsonia canadensis*. *J. Nat. Prod.* 62 (2), p. 392-394, 1999.

¹³⁶ Kuroyanagi, M.; Arakawa, T.; Hirayama, Y. e Hayashi, T. Antibacterial and Antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* 62 (12), p. 1595-1599, 1999.

¹³⁷ Hosny, M. e Rosazza, J. P. N. Microbial hydroxylation and methylation of genistein by *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.* 62 (12), p. 1609-1612, 1999.

¹³⁸ Zahir, A.; Jossang, A.; Bodo, B.; Provost, J.; Cosson, J-P. e Sévenet, T. Five new flavone 5-O-glycosides from *Lethedon tannaensis*: lethedosides and lethediosides. *J. Nat. Prod.* 62 (2), p. 241-243, 1999.

¹³⁹ Máñez, S.; Recio, M. del C.; Gil, I.; Gómez, C.; Giner, R-M.; Waterman, P. G. e Ríos, J-L. A glycosyl analogue of diacylglycerol and other antiinflammatory constituents from *Inula viscosa*. *J. Nat. Prod.* 62 (4), p. 601-604, 1999.

¹⁴⁰ Le Bail, J. C.; Champavier, Y.; Chulia, A. J. e Habrioux, G. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3-beta and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life sciences*, 66 (14), p. 1281-1291, 2000.

¹⁴¹ Middleton Jr., E. e 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*, 1th. Edition. Chapman & Hall, chapter 15, p. 619-652, 1993.

tendo sobrevivido em plantas vasculares durante toda a evolução. A grande associação dos flavonóides de plantas com várias espécies de animais e outros organismos durante toda a evolução pode explicar a extraordinária extensão de atividades bioquímicas e farmacológicas destes metabólitos em mamíferos e outros seres vivos.

Taverniera abyssinica A. Rich (Leguminosae)¹⁴² é uma planta pertencente a um pequeno gênero de 15 táxons, que ocorre no nordeste da África e sudoeste da Ásia. Ela é vendida em mercados da Etiópia como um analgésico para todas as dores. O nome dado pela Etiópia a esta planta é: **Dingetegna**, que significa: “Cura para doenças súbitas”. Um pequeno maço das raízes de *Taverniera abyssinica* é mastigado e o suco é engolido para o alívio imediato da febre, desconforto e dor. As raízes desta planta tem fornecido 4 derivados de isoflavonóides e um novo pterocarpano: 3,4- dihidroxi-9-metoxipterocarpano. Pelo menos algumas das propriedades analgésicas das raízes tem sido atribuído aos isoflavonóides. Este exemplo, de uma planta amplamente usada pela população, reforça a importância de um controle de qualidade na produção de fitofármacos e no estudo das dosagens efetivas e/ou tóxicas.

Atualmente o câncer continua sendo uma doença muito séria e é uma das maiores causas de morte no mundo, apesar de muitos avanços que tem sido feitos na quimioterapia. Contudo, um agente anticâncer ideal e efetivo, livre dos efeitos colaterais, ainda não foi encontrado. Entretanto, a quimioprevenção do câncer tem se tornado bastante importante nos últimos anos¹⁴³.

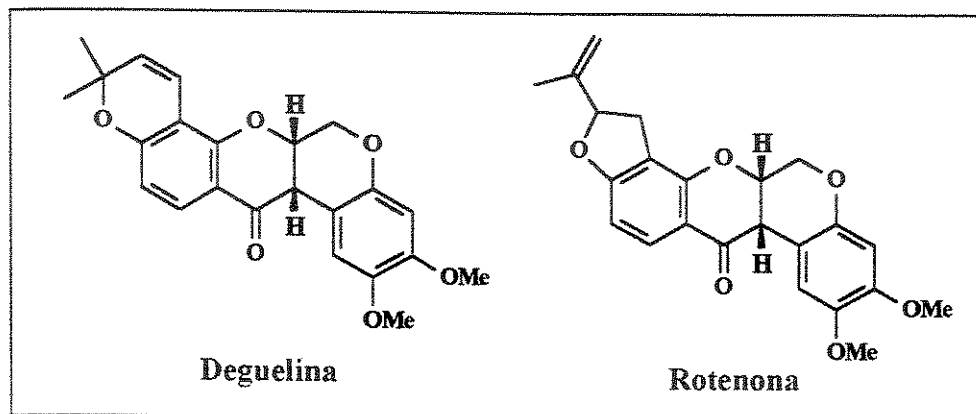
Em um trabalho recente, Fang e Casida¹⁴⁴ relataram o efeito inibitório de Rotenona e Deguelina (Quadro 43), já conhecidas por suas atividades inseticidas, frente a NADH:ubiquinona oxidoreductase, a primeira enzima alvo no ciclo de

¹⁴² Abegaz, B. M.; Ngadjui, B. T.; Bezabih, M. e Mdee, L. K. Novel natural products from marketed plants of eastern and southern Africa. *Pure Appl. Chem.* Vol. 71 (6), p. 919-926, 1999.

¹⁴³ Takasaki, M.; Tokuda, H.; Nishino, H. e Konoshima, T. Cancer chemopreventive agents (Antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*. *J. Nat. Prod.* 62 (7), p. 972-975, 1999.

¹⁴⁴ Fang, N. e Casida, J. E. New bioactive flavonoids and stilbenes in cubé resin insecticide. *J. Nat. Prod.* 62 (2), p. 205-210, 1999.

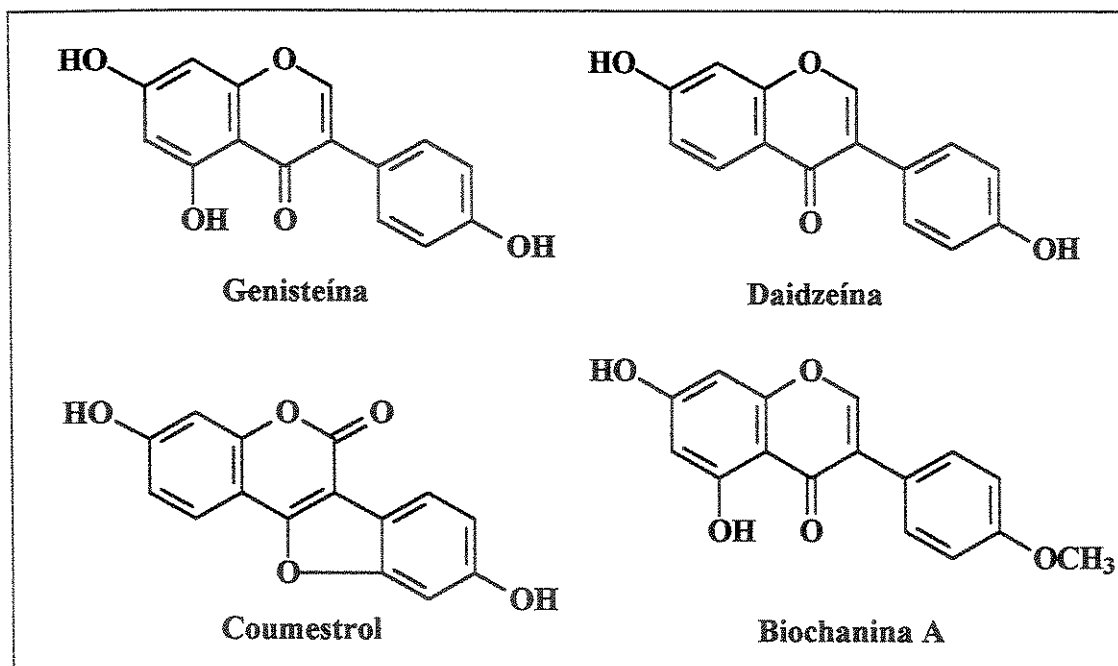
desenvolvimento das células tumorais; e da ornitina descaboxilase forbol ester-induzida (ODC), indicando o efeito antiproliferativo, tornando-as candidatas para o uso quimiopreventivo do câncer.



Quadro 43- Estruturas dos rotenóides Deguelina de Rotenona

Sabendo que os estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de alimentos ricos em fitoestrógenos devem proteger contra o câncer de mama, e que fitoestrógenos, tais como a genisteína, tem sido relatados tanto inibindo quanto estimulando o crescimento de algumas células do câncer de mama humano, Dixon-Shanies et al.¹⁴⁵ testaram os fitoestrógenos genisteína, daidzeína, biochanina A e coumestrol (Quadro 44) observando que estes inibiram o crescimento soro-estimulado das células de câncer de mama das linhagens T-47D e MCF-7 nas concentrações de 10-100 μ M. Da mesma forma testaram extratos de várias ervas estrogênicas, incluindo lúpulo, e estas também inibiram o crescimento das células T-47D. Estes resultados in vitro sugerem que tanto as ervas como os fitoestrógenos podem ser promissores na prevenção do câncer de mama.

¹⁴⁵ Dixon- Shanies, D. e Shaikh, N. Growth inhibition of human breast cancer cells by herbs and phytoestrogens. *Oncology reports* 6 (6), p. 1383-1387, 1999.



Quadro 44- Estruturas da genisteína, daidzeína, coumestrol e biochanina A.

Sabendo que muitos derivados dos flavonóides são responsáveis por várias atividades biológicas, tais como proteção contra os raios UV, anti-oxidante, anti-hipertensivo, anti-viral, antitumoral, fungicida, bactericida entre outras^{146,147,148}, nos tornamos muito interessados em realizar testes de Bioautografia, para avaliar a atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana) e; teste de letalidade com *Artemia salina* para avaliar a potencial atividade antitumoral e/ou inseticida dos três extratos de *Deguelia hatschbachii* e de algumas das substâncias isoladas.

¹⁴⁶ Mc Clure, J. W.; In: Harbone, J. B.; Mabry, T. J. e Mabry, H.; *The Flavonoids*. Academic Press, p. 1011-1038, 1975.

¹⁴⁷ Evans, W. C. *apud* Nogueira, M. A. Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae- Isolamento, Determinação estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal. Tese de Doutorado, Instituto de Química- UNICAMP, 1998.

¹⁴⁸ Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M. E. J. e McDonald, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 761, p. 315-321, 1997.

Os testes acima mencionados foram implantados em nosso laboratório de pesquisa com a valiosa colaboração da Dra. Marisa Alves Nogueira¹⁴⁹ ex-aluna de doutorado do nosso grupo de pesquisa. Estes testes permitiram avaliar possíveis atividades biológicas dos extratos obtidos da planta estudada, bem como das substâncias puras isoladas, de uma forma rápida e simples.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioensaio de Letalidade com *Artemia salina* (“Brine Shrimp Letality Test”)

O ensaio foi desenvolvido de acordo com a técnica proposta por Mc Laughlin¹⁵⁰, sendo que o resultado positivo indica toxicidade.

Ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em solução de sal marinho (38 g/L), num pequeno recipiente coberto parcialmente, pois as larvas possuem fototropismo positivo (são atraídas pela luz). Este sistema foi deixado durante dois dias (48 hs) para que os ovos se convertessem em larvas tipo nauplii.

Os extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico e os compostos escandenina (1), flavanona (4) e flavanona lupinifolina (5), foram pesados e diluídos em solventes apropriados conforme mostrado no Fluxograma 17.

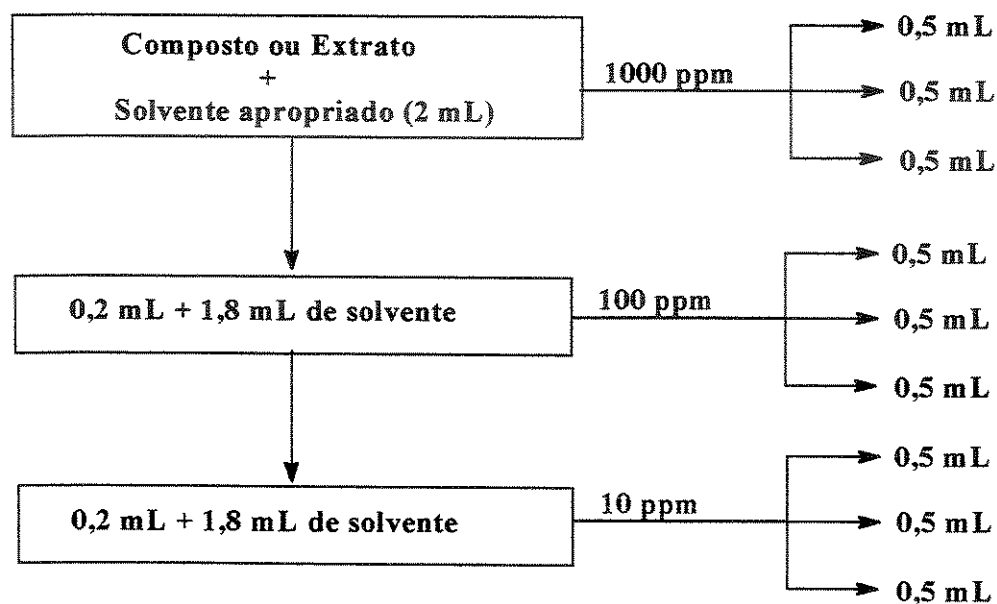
Por questões de quantidade disponível das substâncias e de tratamento dos dados através do programa fornecido, o extrato diclorometânico, por ser muito ativo, foi testado em concentrações de 100, 10 e 1 ppm, enquanto que os dois últimos compostos foram testados em concentrações de 250, 25 e 2,5 ppm.

¹⁴⁹ Nogueira, M. A. Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae- Isolamento, Determinação estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal. Tese de Doutorado, Instituto de Química- UNICAMP, 1998.

¹⁵⁰ Mc Laughlin, J. L.; Colman-Saizarbitoria, T.; Anderson, J. E. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Quimica* 18 (4), p. 13-18, 1995.

Após a evaporação total do solvente, cada um dos nove frascos recebeu uma gota de dimetilsulfóxido (DMSO), cerca de 3 mL de solução de sal marinho (38 g/L), 10 larvas de *Artemia salina* e, o volume ajustado para 5 mL. Os frascos foram deixados em repouso e descobertos e, após 24 horas procedeu-se a contagem do número de camarões sobreviventes.

Os dados obtidos foram analisados em programa Finney, o qual foi obtido pelo Dr. McLaughlin, para análise estatística e assim determinar os valores de ED₅₀.



Fluxograma 17- Procedimento para diluição da amostra no teste com *Artemia salina*

2.2 Teste para atividade bactericida e fungicida (Bioautografia)

Este teste foi implantado em nosso laboratório, com algumas modificações introduzidas no protocolo descrito por Saxena¹⁵¹.

Foram realizados ensaios bioautográficos, à fim de avaliar as atividades antimicrobianas dos extratos e de algumas substâncias isoladas do extrato diclorometânico.

¹⁵¹ Saxena, G.; Farner, S.; Towers, G. H. N. e Hancock, R. E. W. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant-extracts using a thin-layer chromatography agar overlay technique. *Phytochem. Anal.*, 6 (3), p. 125-129, 1995.

Quantidades conhecidas dos três extratos e das substâncias puras, são primeiramente dissolvidas em solventes próprios, atingindo concentrações que variam de 0,56 mg/mL à 4,18 mg/mL dependendo da amostra. São aplicados nas placas de CCD (Merk Sílica Gel GF₂₅₄ 6x6 cm) os volumes de 20 µL ou 50 µL de amostra, enquanto que os volumes de antibiótico (cloranfenicol para as bactérias e ciclopírox olamina para os fungos) são de 2 µL ou 1 µL, também dependendo do teste.

Para cada teste são feitas duas placas, pois uma delas é posteriormente revelada com anisaldeído para servir de **placa controle**.

As placas são desenvolvidas em solventes pré-determinados e, em seguida colocadas dentro de uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro, que para serem esterilizadas são mantidas durante 30 minutos dentro de uma câmara de madeira revestida de fórmica, sob luz ultra-violeta. Posteriormente, é adicionado à estas placas 20 mL do meio de cultura característico para cada microorganismo, deixando sob luz UV por mais 30 minutos, até que o meio esfrie e solidifique.

Após a solidificação do meio, são inoculados, com o auxílio de uma alça de Digralski, cerca de 100 µL ou 200 µL de suspensão do microorganismo contendo aproximadamente 10⁶ células/mL.

Em todos os testes é feito uma placa de Petri contendo apenas o meio de cultura (branco) inoculado com a suspensão do microorganismo, a fim de avaliar o crescimento microbiano.

Após todo este procedimento, as placas são envolvidas com filme de PVC transparente e incubadas, durante 24 horas para bactérias e 7 dias para fungos, em uma estufa apropriada, com temperatura controlada e específica para cada microorganismo (cerca de 37°C para bactérias e 25°C para fungos).

Passada as horas ou os dias de incubação, são observados os halos de inibição para o crescimento do microorganismo e, comparados com a **placa controle**.

Os meios de cultura utilizados foram: **NA** (Ágar Nutriente) para **bactérias**, constituído de peptona (5,0 g) + extrato de carne (3,0 g) + ágar (15,0 g) + água destilada 1000 mL; **MA** (Ágar Malte) para **fungos filamentosos**, constituído de extrato de malte (20,0 g) + ágar (20,0 g) e **YMA** para **fungos não filamentosos**, constituído de extrato de levedura (3,0 g), extrato de malte (3,0 g), peptona (5,0 g), dextrose (10,0 g) e ágar (20,0 g).

Foram testados os seguintes microorganismos:

🌐 **Bactérias:**

Bacillus subtilis (gram +) CCT 0089

Staphylococcus aureus (gram +) CCT 4295

Escherichia coli (gram -) CCT 5050

Salmonella typhimurium (gram -) CCT 0528

Micrococcus luteus (gram +) CCT 2720

Rodococcus equi (gram +) CCT 0541

🌐 **Fungos filamentosos:**

Aspergillus niger CCT 1435

Penicillium funiculosum CCT 0490

Fusarium oxysporum CCT 3244

Alternaria alternata CCT 1250

Rhizopus oryzae CCT 4964

Aspergillus fumigatus CCT 01277

Cladosporium cladosporioides CCT 5039

Penicillium oxalicum CCT 4815

🌐 **Fungo não filamentoso (Levedura):**

Candida albicans CCT 0776

Os meios de cultura, bem como as suspensões dos microorganismos utilizados nestes bioensaios, foram fornecidos pela Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” de Campinas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Bioensaio de Letalidade com *Artemia salina* (“Brine Shrimp Letality Test”)

O resultado positivo deste bioensaio é um indicador de toxicidade tanto para “screening” de substâncias com atividade antitumoral^{152,153}, 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 valores de DL_{50} para citotoxicidade são geralmente próximos a décima parte dos valores DL_{50} encontrados nos bioensaios com *Artemia salina*¹⁵⁴.

Após análise estatísticas dos dados, podemos observar que os extratos diclorometânico e éter de petróleo são mais ativos do que o metanólico (Tabela 45), dentro da faixa de interesse (≤ 1000 ppm). Das substâncias puras testadas, a flavanona (4) é a mais ativa, seguida pela flavanona lupinifolina (5) e por último pela escandenina (1), todas mostrando-se bastante ativas (Tabela 45).

Tabela 45- Valores obtidos de doses letais médias efetivas (DL_{50}) dos extratos e dos compostos (1, 4 e 5) para o teste com *Artemia salina*

Amostra	DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Resultado
Extrato éter de petróleo	3,60	Ativo
Extrato diclorometânico	1,28 e 0,83	Ativo
Extrato metanólico	79,98	Ativo
Flavanona (4)	0,0004	Ativo
Lupinifolina (5)	13,01	Ativo
Escandenina (1)	4,31	Ativo

¹⁵² Hoop, D. C.; Alali, F. Q.; Gu, Z-M. e McLaughlin, J. L. Mono-THF ring annonaceous acetogenins from *Annona squamosa*. *Phytochemistry* 47 (5), p. 803-809, 1998.

¹⁵³ Ratnayake, S.; Gu, Z-M.; Miesbauer, L. R.; Smith, D. L.; Wood, K. V.; Evert, D. R. e McLaughlin, J. L. Parvifloracin and parviflorin: cytotoxic bistetrahydrofuran acetogenins with 35 carbons from *Asimina parviflora* (annonaceae). *Can. J. Chem.* 72 (2), p. 287-293, 1994.

¹⁵⁴ Mc Laughlin, J. L.; Colman-Saizarbitoria, T.; Anderson, J. E. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Quimica* 18 (4), p. 13-18, 1995.

3.2 Teste para atividade bactericida e fungicida (Bioautografia)

A escandenina (1), o estilbeno (11), a flavanona (4) e a flavanona lupinifolina (5) apresentaram atividade positiva contra *Bacillus subtilis*, enquanto somente a escandenina apresentou-se ativa contra *Staphylococcus aureus*.

Dos fungos testados, apenas o extrato metanólico apresentou-se ativo contra *Cladosporium cladosporioides*.

Os compostos **2**, **3**, **7**, **10** e **11** foram também testados contra *Bacillus subtilis*, mas apenas o composto **11** mostrou resultado positivo.

Os compostos **10** e **11** também foram testados contra *Candida albicans* e *Cladosporium cladosporioides*, mas mostraram resultados negativos.

Na Figura 30, observamos os halos de inibição, um referente à substância isolada Escandenina (1) e outra ao antibiótico aplicado, para o crescimento do microorganismo *Bacillus subtilis*, exemplificando o resultado positivo observado através do Teste de Bioautografia.

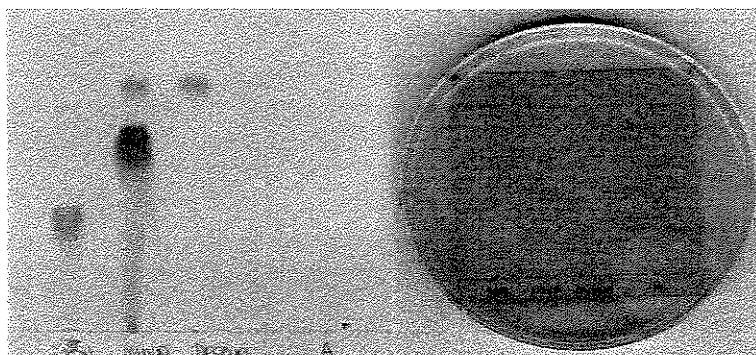


Figura 30- Placas, testemunha e do resultado do teste para *Bacillus subtilis*, contendo as substâncias escandenina (1), (8), a desoxibenzoína (9) e o antibiótico (A).

Na Figura 31, observamos os halos de inibição, um referente ao extrato metanólico e outra ao antibiótico aplicado, para o crescimento do microorganismo *Cladosporium cladosporioides*, exemplificando outro resultado positivo do Teste de Bioautografia.

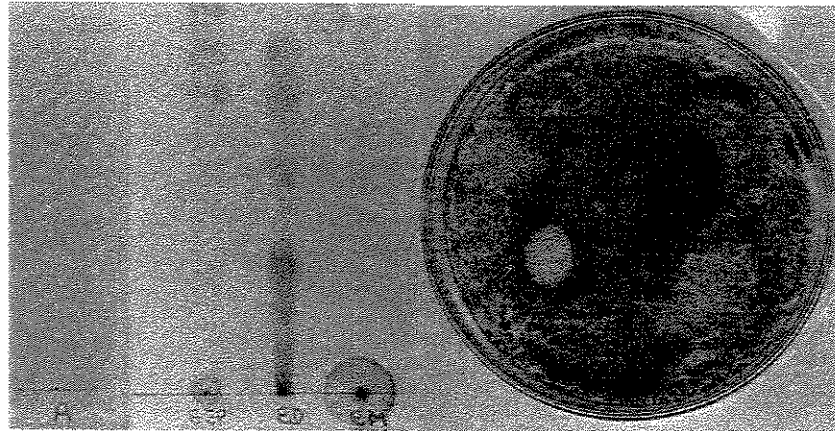


Figura 31- Placas, testemunha e do resultado do teste para *Cladosporium cladosporioides*, contendo o antibiótico (A) e os extratos éter de petróleo (EEP), diclorometânico (ED) e metanólico (EMe).

A Tabela 46 fornece todos os dados obtidos dos Testes de Bioautografia, bem como as concentrações utilizadas.

Tabela 46- Resultados dos testes de bioautografia dos extratos e alguns compostos isolados das raízes de *D. hatschbachii*.

Microorganismos testados	EEP	ED	EMe	1	8	9	4	5
Bactérias								
* <i>Staphylococcus aureus</i> CCT* 4295	-	+	-	+	-	-	-	-
** <i>Escherichia coli</i> CCT 5050	-	-	-	-	-	-	-	-
** <i>Rodococcus equi</i> CCT 0541	-	-	-	-	-	-	-	-
*** <i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089	-	+	-	+	-	-	+	+
** <i>Salmonella typhimurium</i> CCT 0528	-	-	-	-	-	-	-	-
** <i>Micrococcus luteus</i> CCT 2720	-	-	-	-	-	-	-	-
Fungos								
** <i>Candida albicans</i> CCT 0776	-	-	-	-	-	-	-	-
° <i>Cladosporium cladosporioides</i> CCT 5039	-	-	+	-	-	-	-	-
°° <i>Aspergillus niger</i> CCT 1435	-	-	-	-	-	-	-	-
°° <i>Penicillium funiculosum</i> CCT 0490	-	-	-	-	-	-	-	-
°° <i>Fusarium oxysporium</i> CCT 3244	-	-	-	-	-	-	-	-
°°° <i>Alternaria alternata</i> CCT 1250	-	-	-	-	-	-	-	-
°°° <i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964	-	-	-	-	-	-	-	-
°°° <i>Aspergillus fumigatus</i> CCT 01277	-	-	-	-	-	-	-	-
°°°° <i>Penicillium oxalicum</i> CCT 4815	-	-	-	-	-	-	-	-

* **CCT:** Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" de Campinas.

+ : resultado positivo

- : resultado negativo

As quantidades das amostras aplicadas na placas de CCDA contra os microorganismos, foram respectivamente (da esquerda para a direita):

(*) 24,0; 34,8; 66,4; 32,8; 83,6; 11,2; 20,0 e 20,0 µg

(**) 40,0; 39,2; 39,7; 20,0; 19,5; 20,0; 20,3 e 20,4 µg

(***) 40,0; 39,2; 39,7; 112,5 (e 32,8); 13,5 (e 83,6); 14,0 (e 11,2); 20,3; 20,4 µg

(°) 30,0; 87,0; 166; 20,0; 19,5; 20,0; 20,3 e 20,4 µg

(°°) 12,0; 34,8; 66,4; 32,8; 83,6; 11,2; 20,0 e 20,0 µg

(°°°) 30,0; 87,0; 166; 82,0; 209; 28,0; 20,0 e 20,0 µg

(°°°°) 30,0; 87,0; 166; 82,0; 19,5; 20,0; 20,0 e 20,0 µg

Obs: Os compostos 2, 3, 7, 10 e 11 (Quadro 5 e 6) respectivamente 97,5; 71,3; 66,6; 56,6 e 24,0 µg foram também testados contra *Bacillus subtilis*, mas apenas 11 apresentou atividade positiva, enquanto os compostos 10 e 11 respectivamente 34,0 e 48,0 µg foram também testados contra *Candida albicans* e *Cladosporium cladosporioides*, mas não apresentaram atividade.

Capítulo IV
Considerações Finais

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo, uma nova espécie nativa, é inédito na literatura e permitiu o isolamento de treze substâncias, das quais cinco são inéditas (8-12), destacando-se as desoxibenzoínas (9 e 12), o derivado da 4-hidroxi-3-fenilcumarina (8), por pertencerem a classe de metabólitos raramente encontradas na natureza.

Em relação as substâncias isoladas, após um levantamento bibliográfico, detectamos a ocorrência natural de apenas seis derivados de desoxibenzoínas (27, 27a-d e 28)^{155,156,157,158,159,160} (Quadro 45) e quatorze derivados de 4-hidroxi-3-fenilcumarinas (32-45)^{160,161,162} (Quadro 46).

¹⁵⁵ King, F. E.; King, T. J. e Warwick, A. J. The chemistry of extractives from hardwoods. Part VII. Constituents of muninga, the heartwood of *Pterocarpus angolensis*. B: 2:4-dihydroxyphenyl 1-*p*-methoxyphenylethyl ketone (Angolensin). *J. Chem. Soc.*, 96, p. 1920-1924, 1952.

¹⁵⁶ Bezuidenhoudt, B. C. B.; Brandt, E. V.; Roux, D. G. e Van Rooyen, P. H. Novel α -methyldeoxybenzoins from the heartwood of *Pterocarpus angolensis* D. C.: Absolute configuration and conformation of the first sesquiterpenylangolensin, and X-ray crystal structure of 4-*O*- α -cadinyl-angolensin. *J. C. S. Perkin Trans I*, p. 2179-2183, 1980.

¹⁵⁷ Bezuidenhoudt, B. C. B.; Brandt, E. V. e Roux, D. G. A novel α -hydroxydihydrochalcone from the heartwood of *Pterocarpus angolensis* D. C.: Absolute configuration, synthesis, photochemical transformations, and conversion into α -methyldeoxybenzoins. *J. C. S. Perkin Trans I*, p. 263-269, 1981.

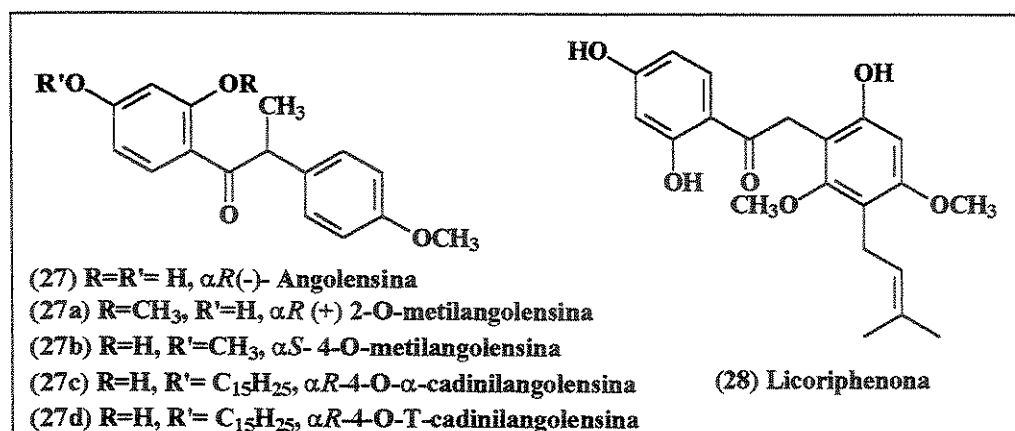
¹⁵⁸ Jain, A. C. e Paliwal, P. A facile synthesis of α -methyldeoxybenzoins including racemates of natural angolensin, 2-*O*-methylangolensin & 4-*O*-methylangolensin. *Indian Journal of Chemistry*, vol. 27B, p. 985-988, 1988.

¹⁵⁹ Kiuchi, F.; Chen, X. e Tsuda, Y. Four new phenolic constituents from Licorice (root of *Glycyrrhiza* sp.). *Heterocycles*, 31 (4), p. 629-636, 1990.

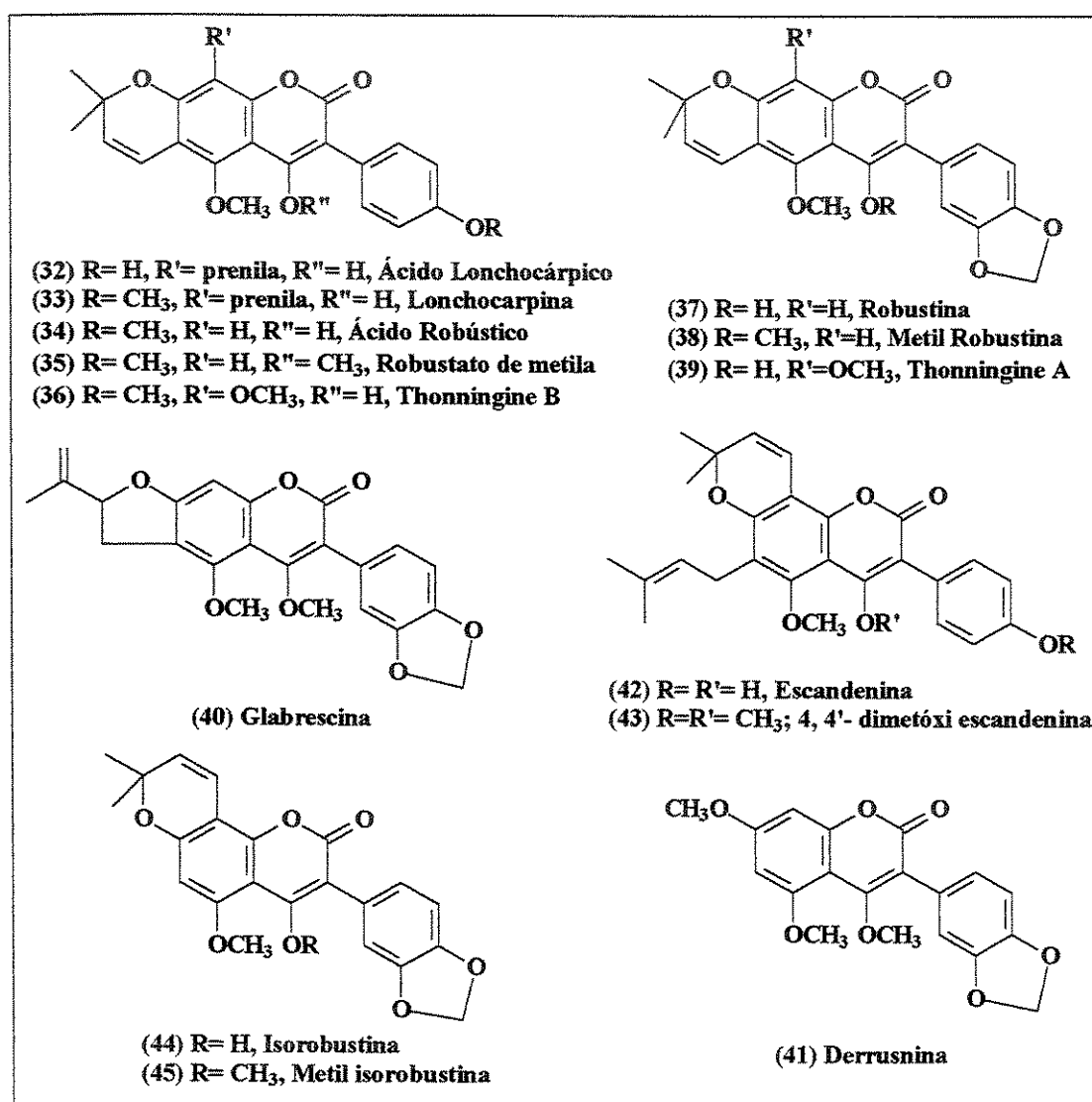
¹⁶⁰ Wong, E. The isoflavonoids. In: Harbone, J.B.; Mabry, T.J. e Mabry, H.; *The Flavonoids*; Academic Press; p. 743-800, 1975.

¹⁶¹ Dewick, P. M. *Isoflavonoids*. In: Harbone, J. B. *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, p. 120, 1993.

¹⁶² Boland, G. M. e Donnelly, D. M. X. Isoflavonoids and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 15 (3), p. 241-260, 1998.



Quadro 45- Derivados de desoxibenzoínas encontrados na literatura



Quadro 46- Derivados de 4-hidroxi-3-fenilcumarinas encontrados na literatura

Levando em consideração suas características morfológicas de inflorescência *Deguelia hatschbachii* foi alocada, por A. M. G. Azevedo, na seção *Multiovulis*.

Quando comparamos as substâncias isoladas das espécies de *Deguelia* pertencentes às seções *Multiovulis* e *Deguelia* (Tabelas 2 e 3; Quadros 1 e 2) com as isoladas de *Deguelia hatschbachii* (Quadros 5 e 6) vemos que a presença de fenilcumarinas e isoflavonas predomina nas espécies da seção *Multiovulis*, o que corrobora com a inclusão de *D. hatschbachii* nesta seção.

Segundo a proposta apresentada pela botânica Dra. Ana Maria G. A. Tozzi, as espécies do gênero *Deguelia* apresentavam características morfológicas mais evoluídas do que as espécies de *Lonchocarpus*^{163,164,165,166,167,168}, o que se confirma pelo estudo fitoquímico de *Deguelia hatschbachii*, pois a maioria dos flavonóides isolados pertencem à classe dos isoflavonóides (1-3, 6-9 e 12) (Quadro 5 e 6). Para sintetizar substâncias dessa classe é preciso que a planta tenha um complexo enzimático mais desenvolvido, pois envolve um maior número de etapas dentro da rota biossintética (Quadro 3- Capítulo I).

¹⁶³ Nogueira, M. A. Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae- Isolamento, Determinação estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal. Tese de Doutorado, Instituto de Química- UNICAMP, 1998.

¹⁶⁴ Blanco, I. S. Flavonóides de *Lonchocarpus muehlbergianus* e Síntese de flavanas 4-oxigenadas. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Química- UNICAMP, 1995.

¹⁶⁵ Magalhães, A.F.; Tozzi, A.M.G. de A.; Sales, B.H.L.N. e Magalhães, E.G. Twenty-three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucens*. *Phytochemistry*, 42 (5), p. 1459-1471, 1996.

¹⁶⁶ Magalhães, A. F.; Ruiz, A. L. T. G.; Tozzi, A. M. G. A. e Magalhães, E. G. Dihydroflavonols and flavanones from *Lonchocarpus atropurpureus* roots. *Phytochemistry*, 52 (8), p. 1681-1685, 1999.

¹⁶⁷ Firmino, C. A. Estudo fitoquímico das raízes de *Lonchocarpus campestris*- Tozzi. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química- UNICAMP, 1998.

¹⁶⁸ Soriano, M. del P. C. Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus dipteroneurus* Pittier e *Lonchocarpus montanus* A. M. G. Azevedo- Isolamento, Determinação estrutural e Atividade biológica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química- UNICAMP, 1999.

A ocorrência natural das novas desoxibenzoínas 9 e 12, ao lado de escandenina (1) e de seu novo derivado 8, sugere que a hidrólise seguida de descarboxilação, anteriormente observada “in vitro” com várias 4-OH-3-fenilcumarinas, também pode ocorrer na natureza.

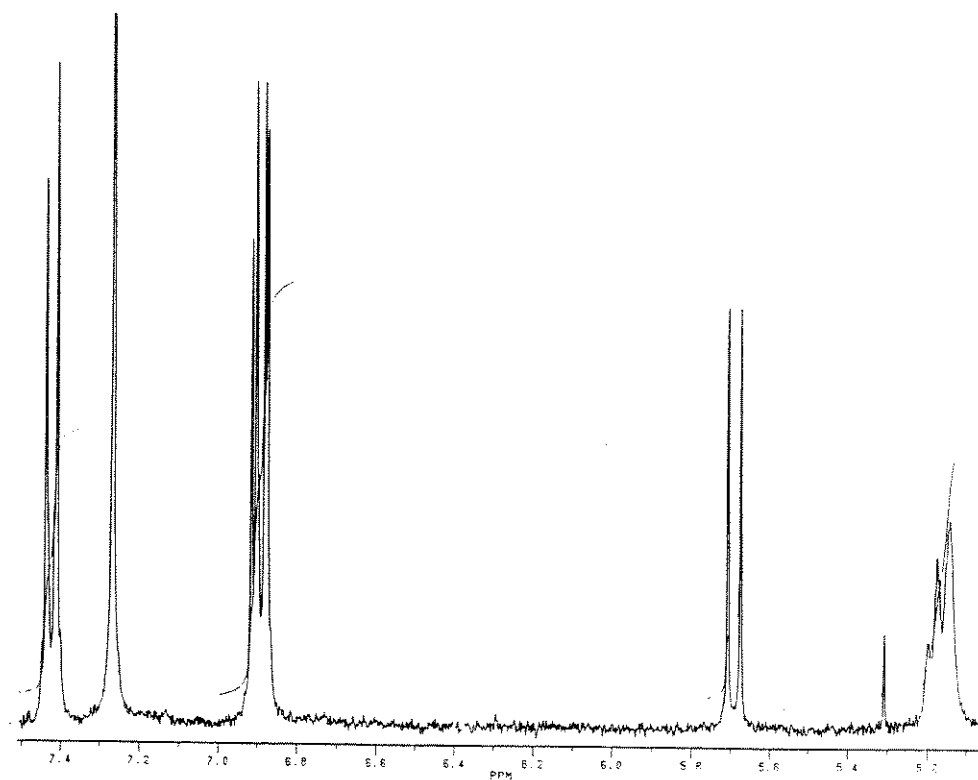
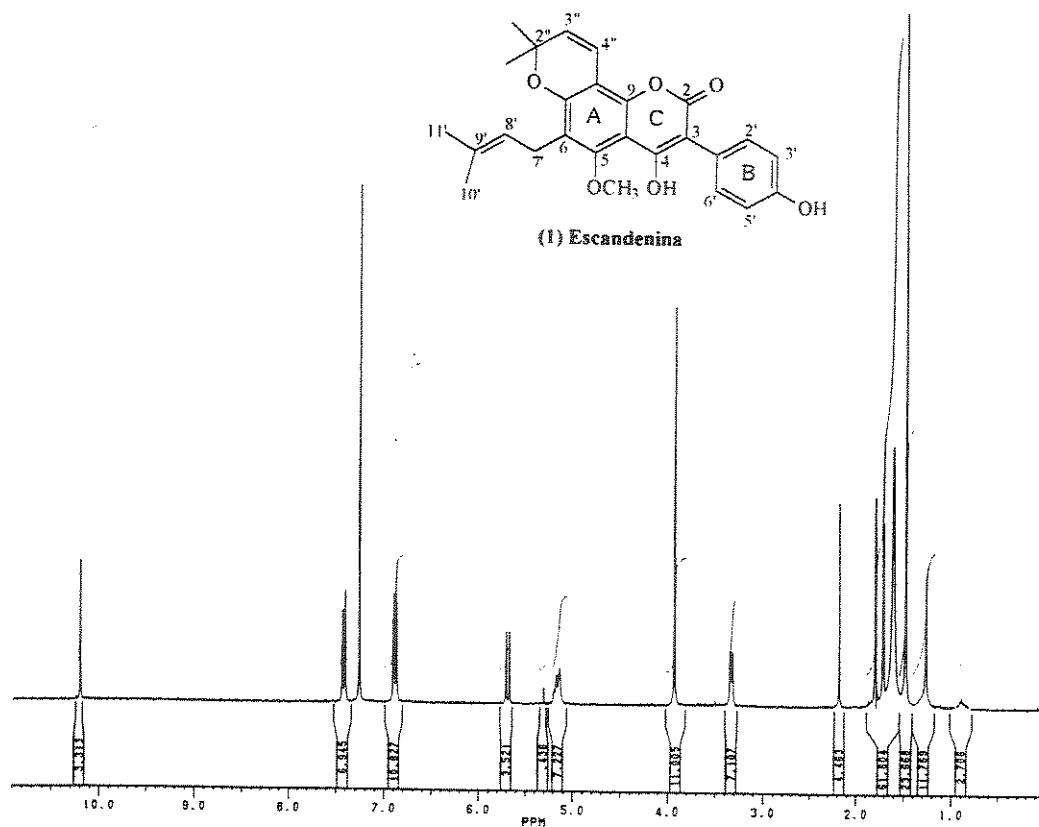
É importante ressaltar que os testes de bioautografia e de Letalidade com *Artemia salina* ainda não haviam sido aplicados a nenhum extrato de espécies de *Deguelia*, nem à maioria das substâncias conhecidas que foram isoladas de *D. hatschbachii*. A literatura menciona apenas a atividade fungicida de lupinifolina (5) contra os fungos *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans*¹⁶⁹.

¹⁶⁹ Ma, W. G.; Fuzzati, N.; Lu, S. L.; Gu, D. S. e Hostettmann, K. Further chromones from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry*, 43 (6), p. 1339-1343, 1996.

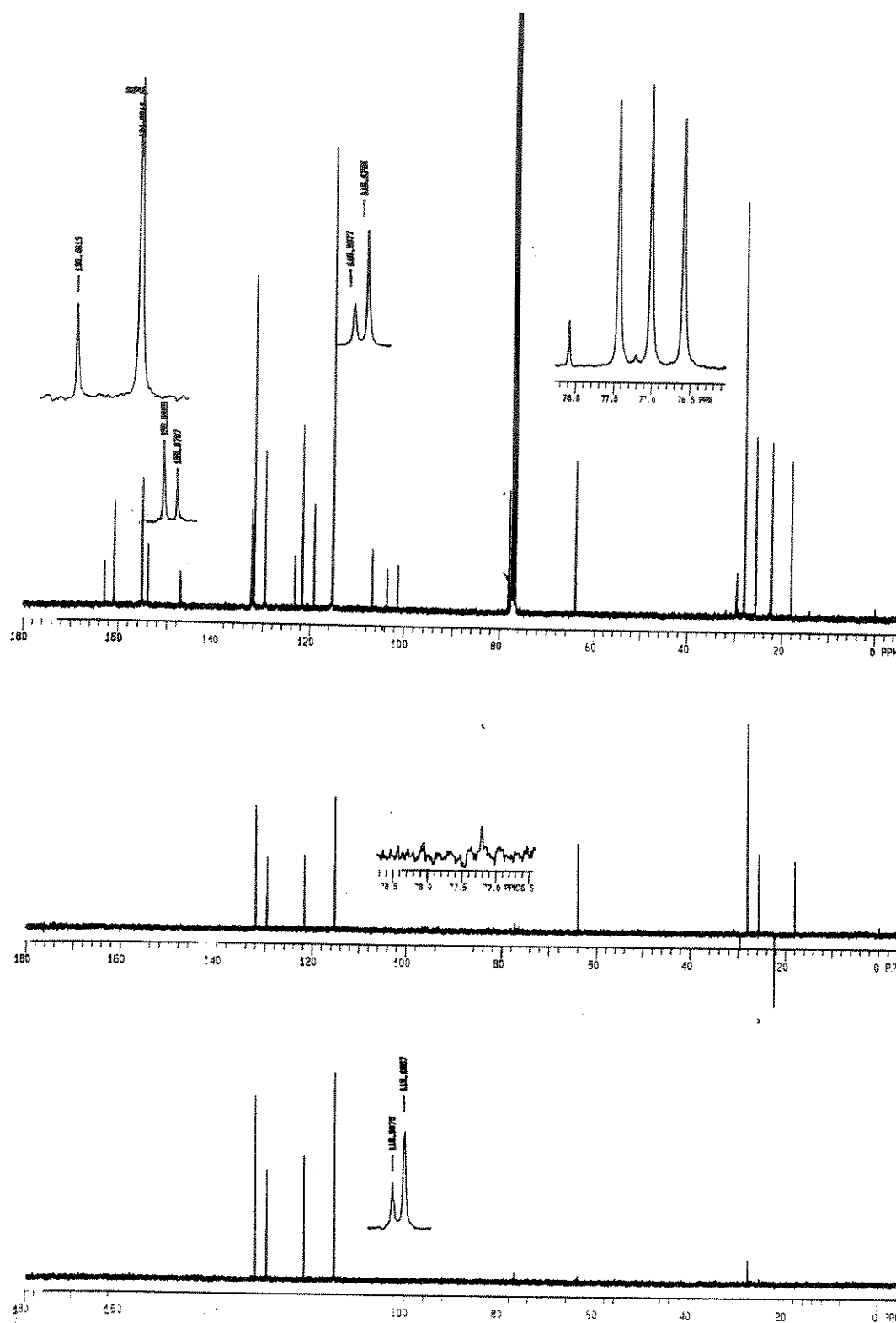


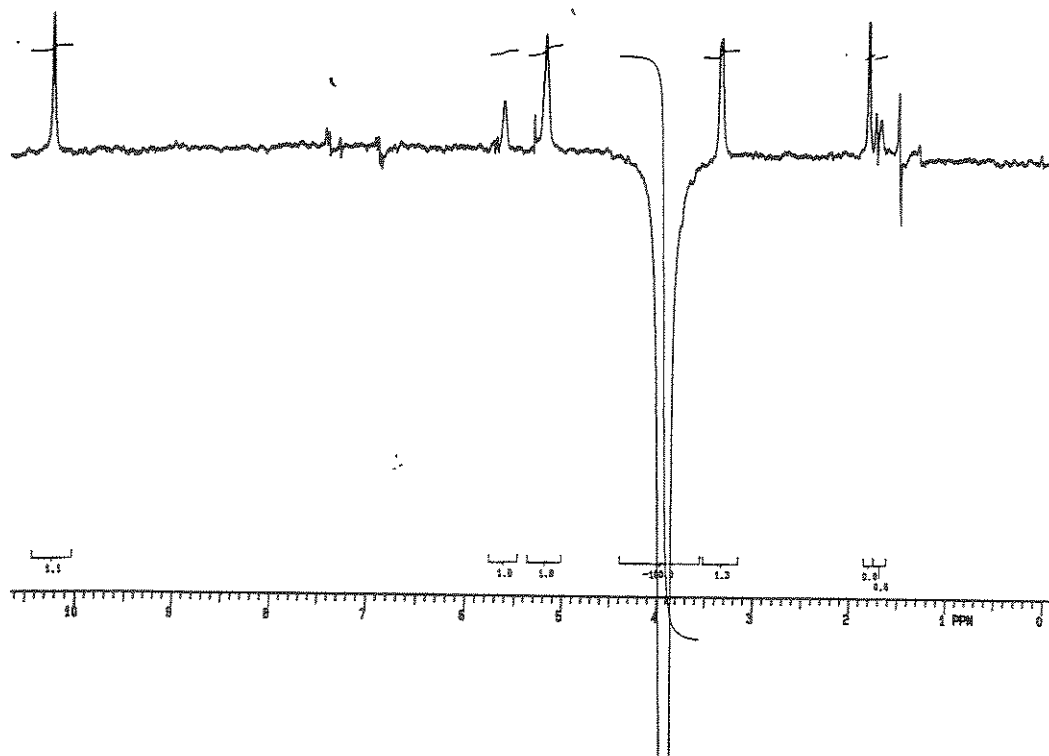
Anexo A

Espectros

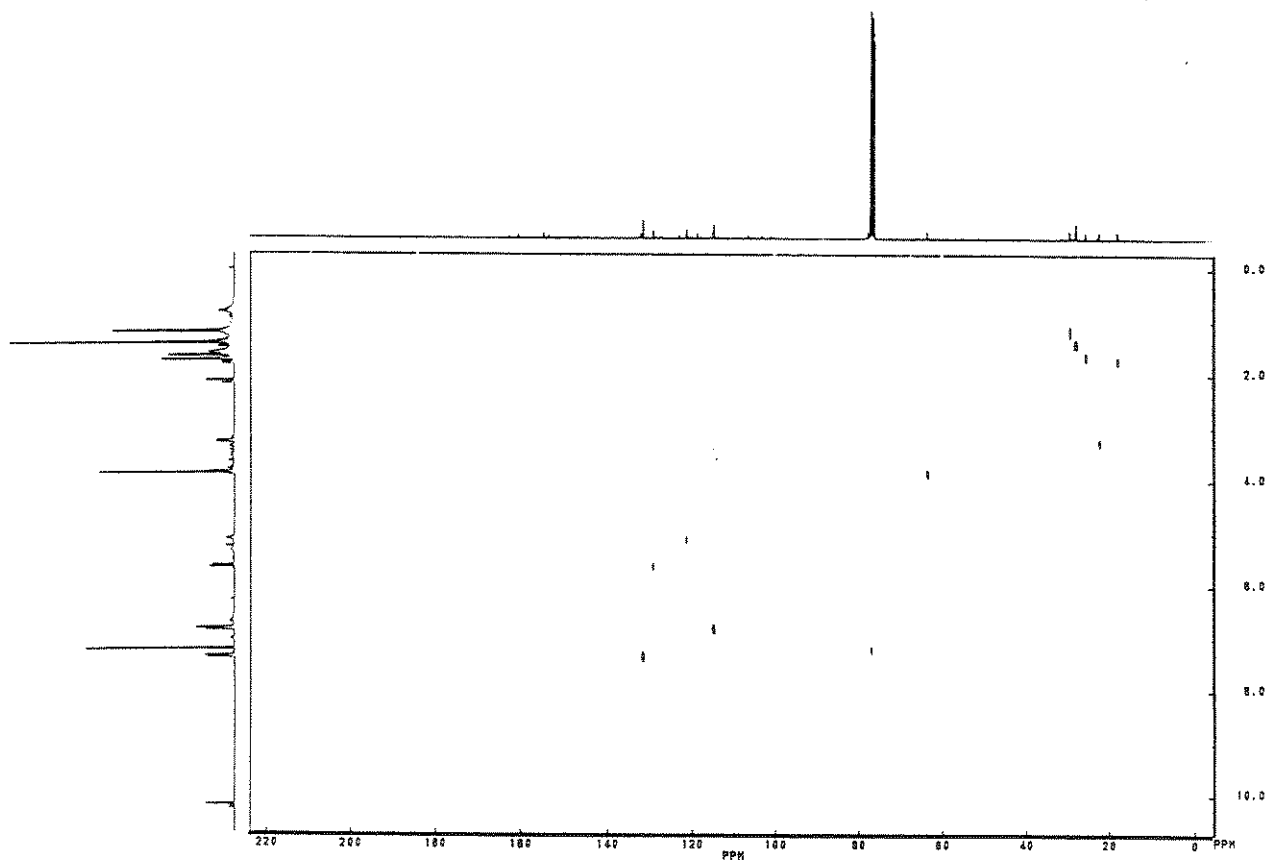


E1-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da escandenina (1)

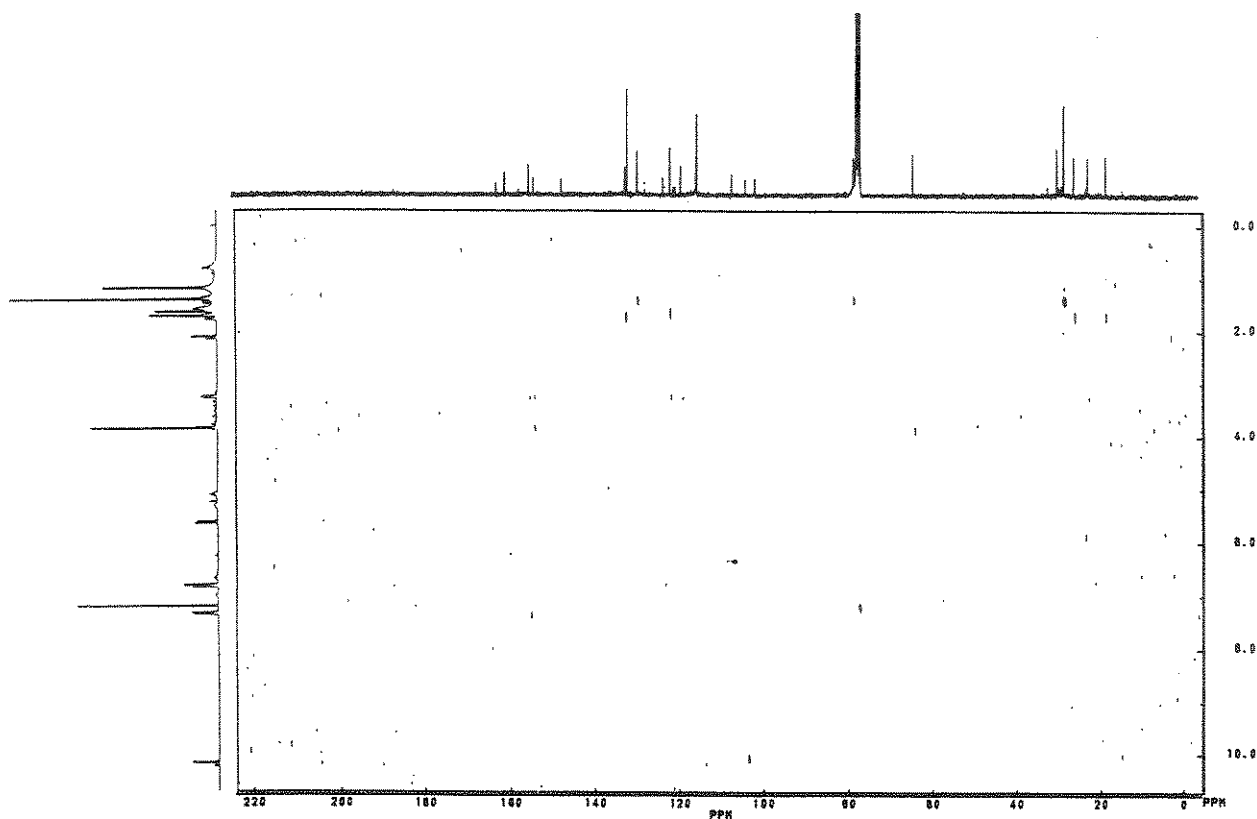
E2-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) da escandenina (1)



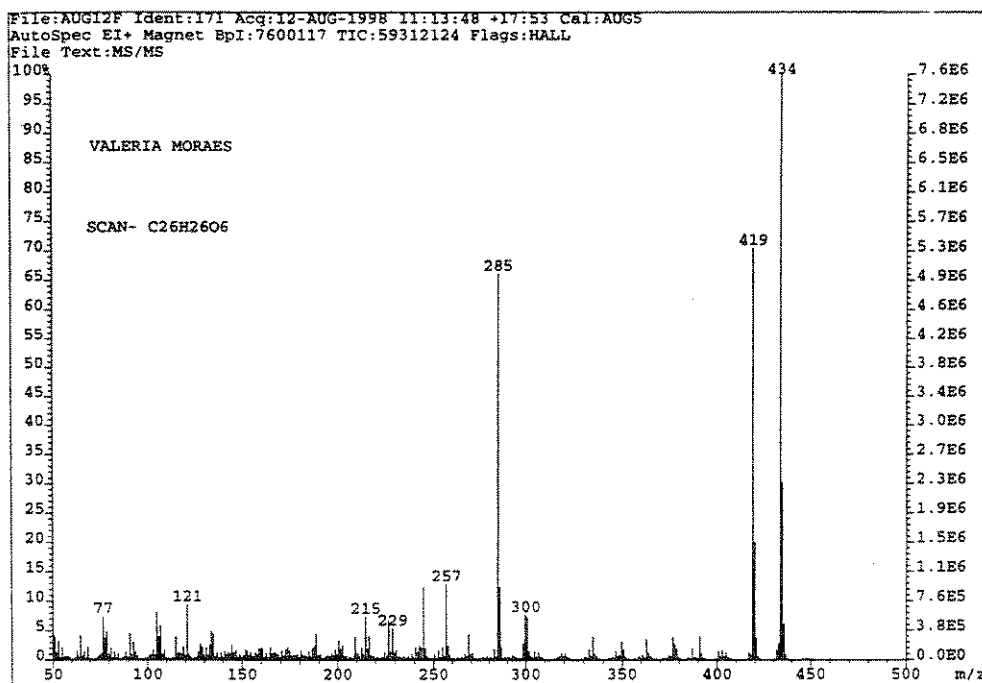
E3-Espectro de diferença de NOE (δ 3,93) da escandénina (1)



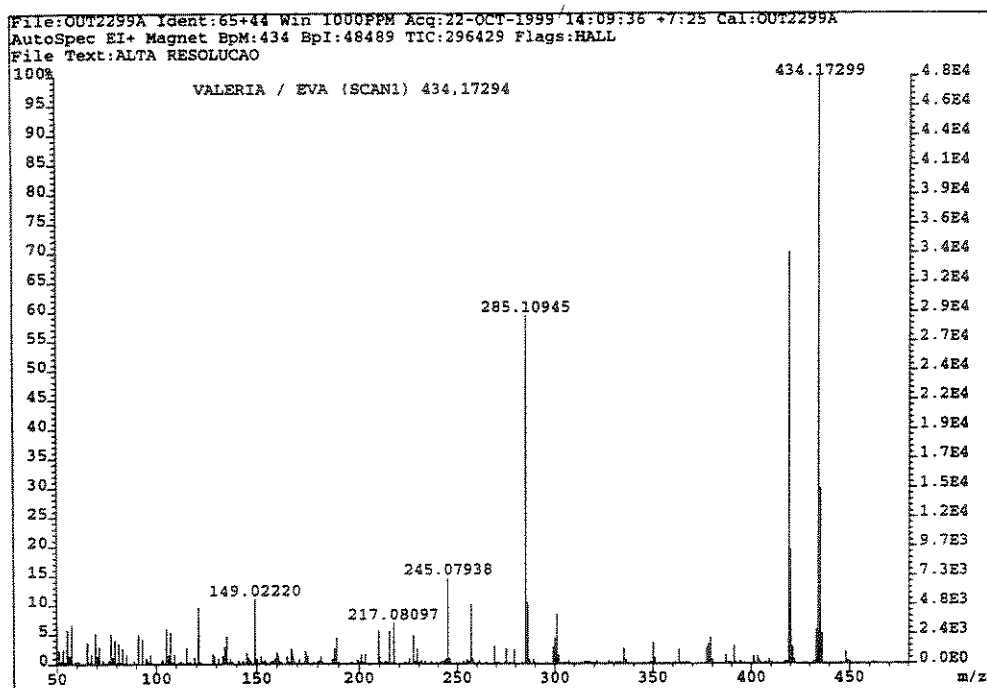
E4-RMN-2D a uma ligação (^1H , ^{13}C -HETCOR) da escandénina (1)



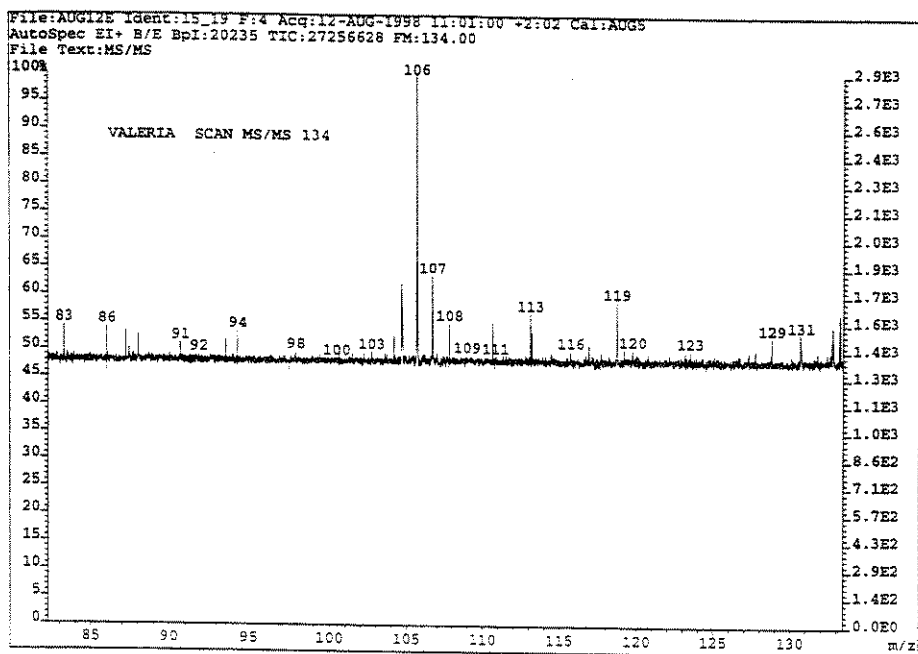
E5- RMN-2D a várias ligações (^1H , ^{13}C -COLOC) da escandenina (1)

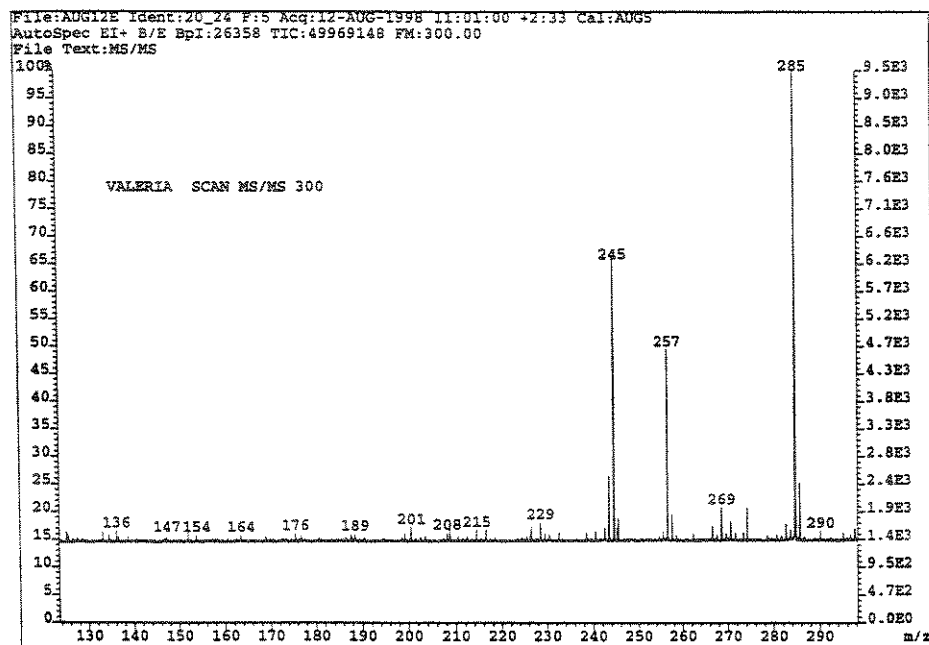


E6-Espectro de massas (IE, 70 eV) da escandenina (1)

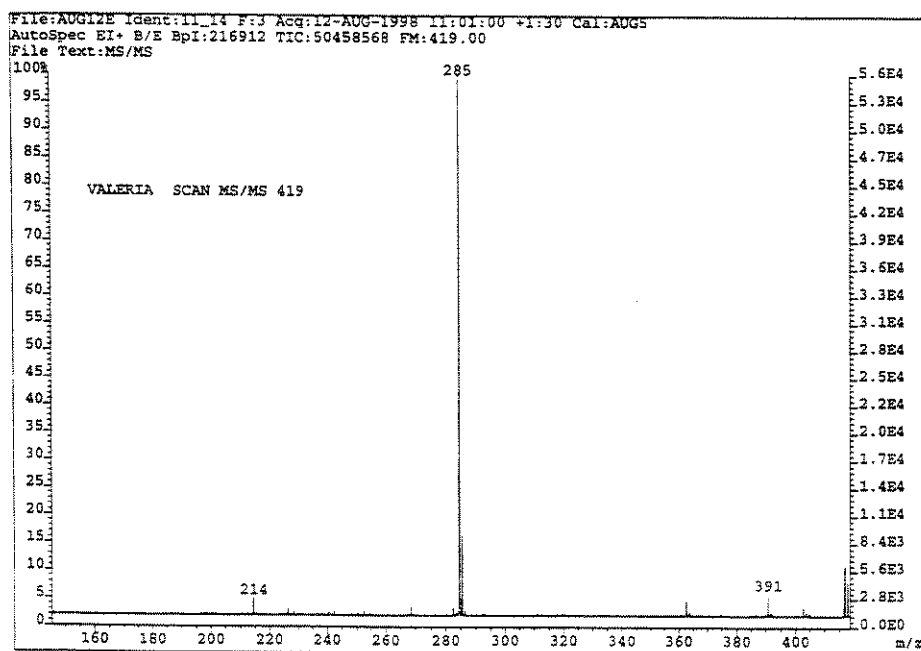


E7-Espectro de massas de alta resolução (IE, 70 eV) da escandénina (1)

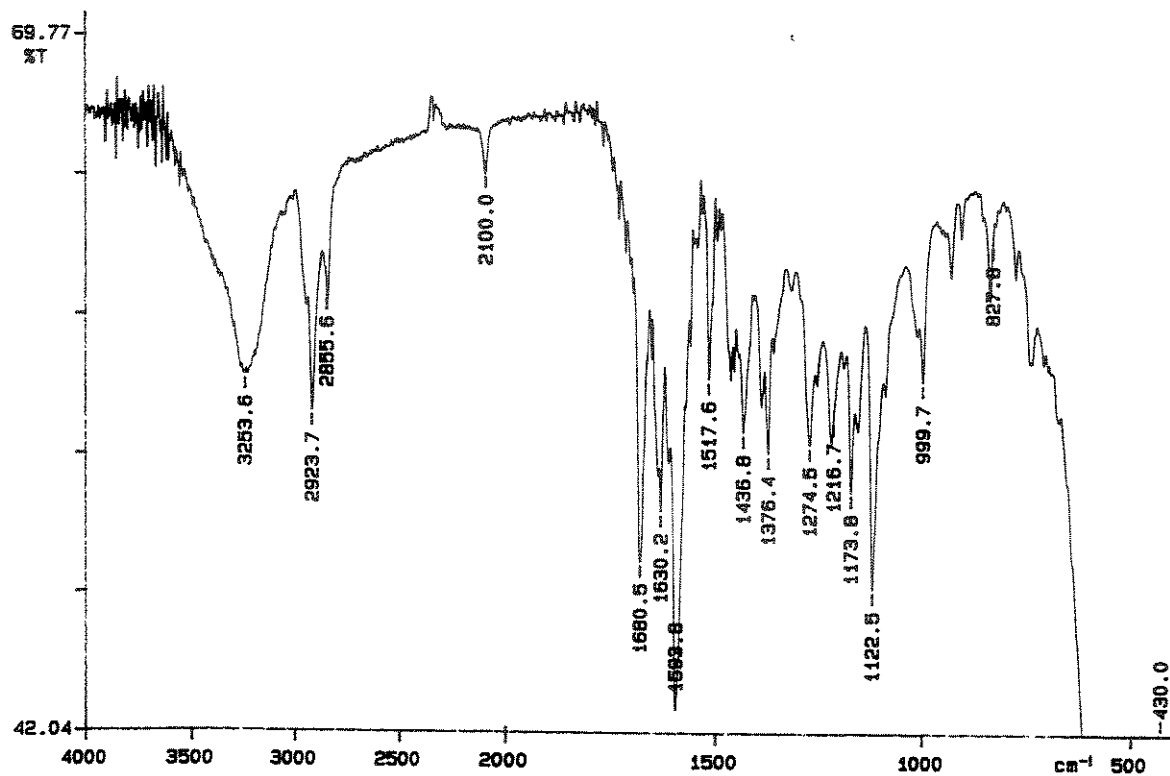
E8-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da escandénina (1)
selecionando o íon de m/z 134

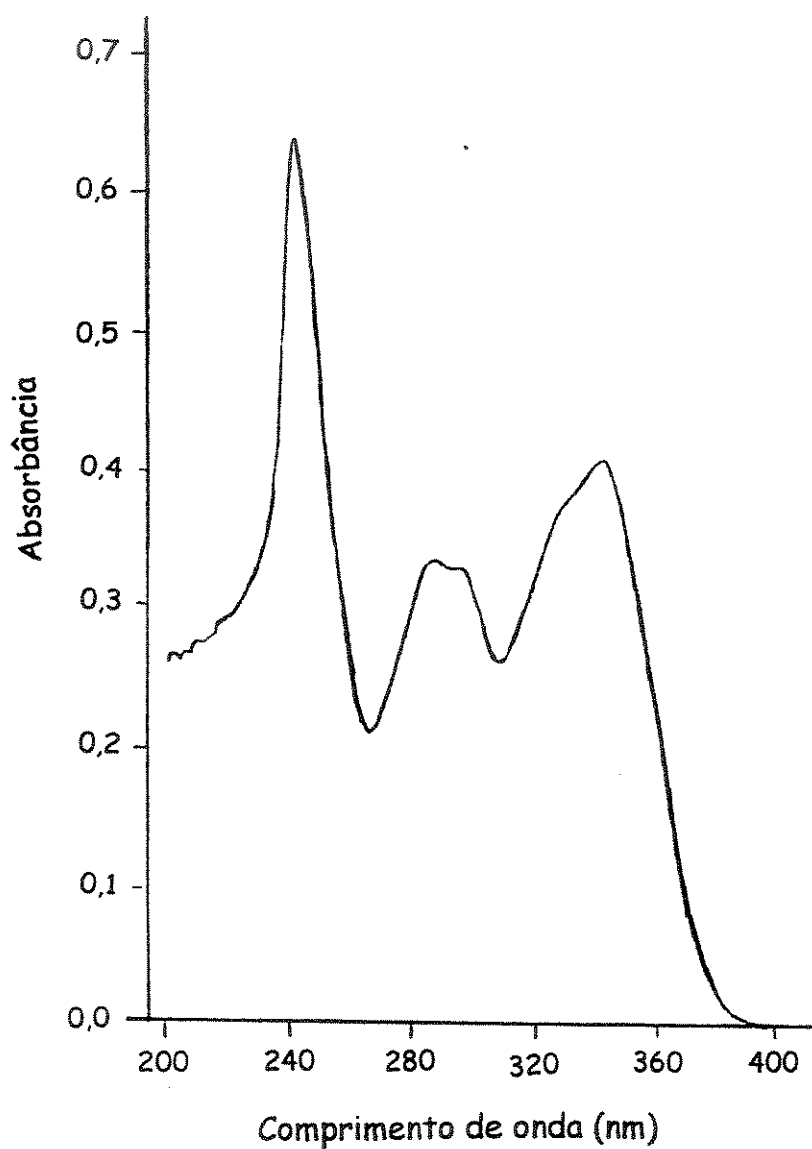


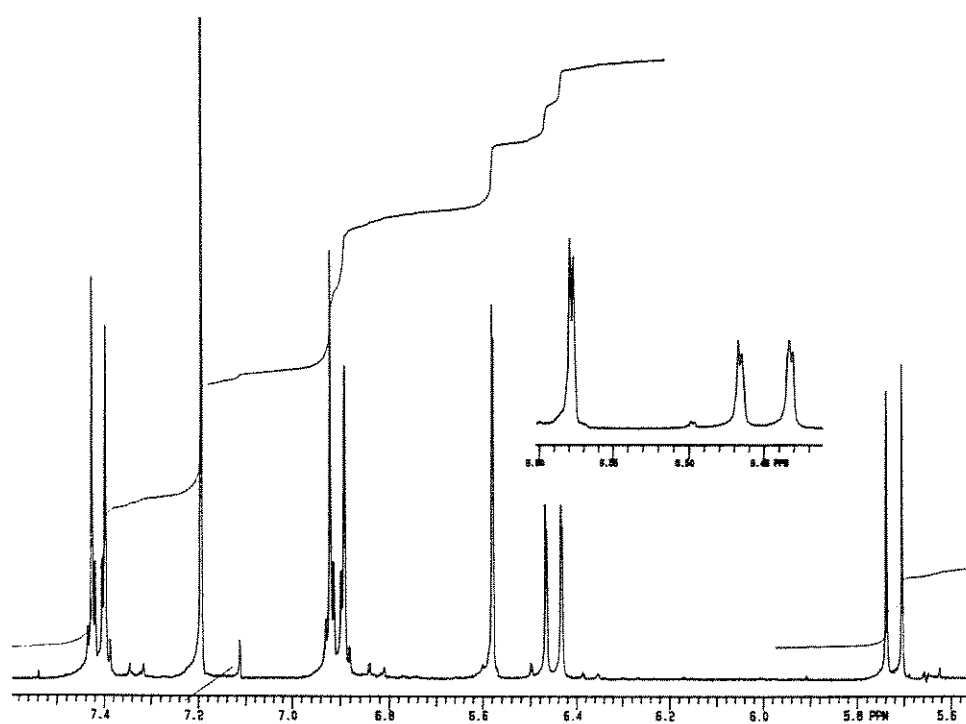
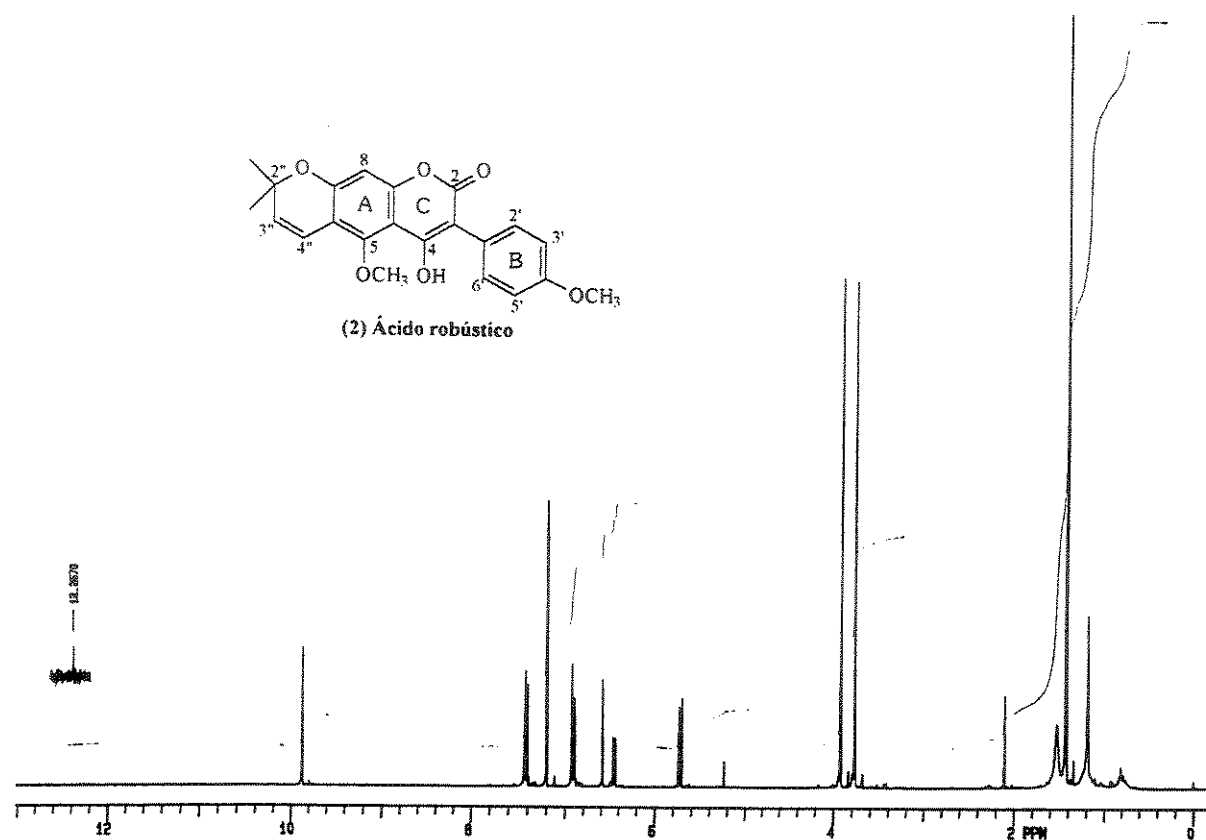
E9-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da escandénina (1)
 selecionando o íon de m/z 300

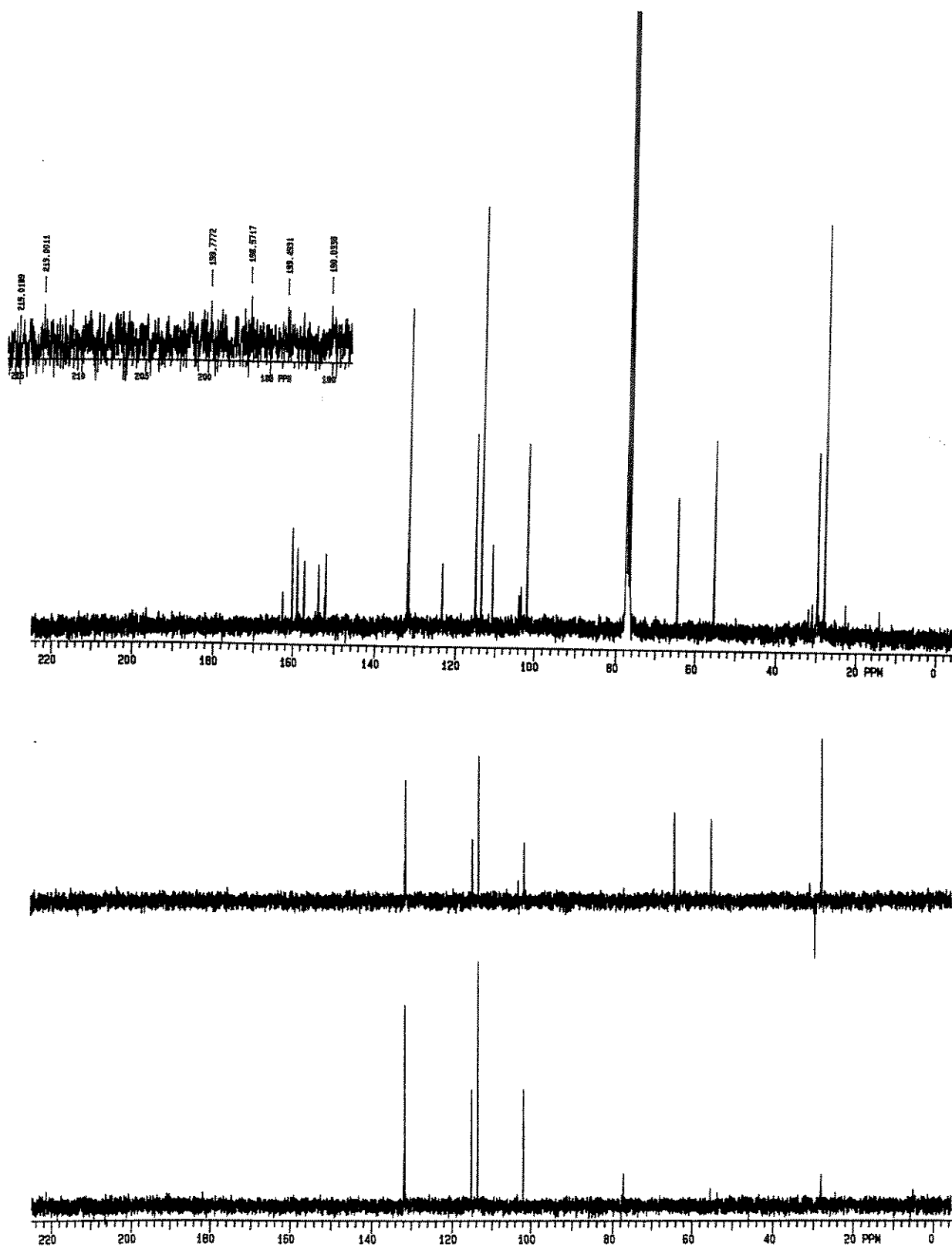


E10-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da escandénina (1)
 selecionando o íon de m/z 419

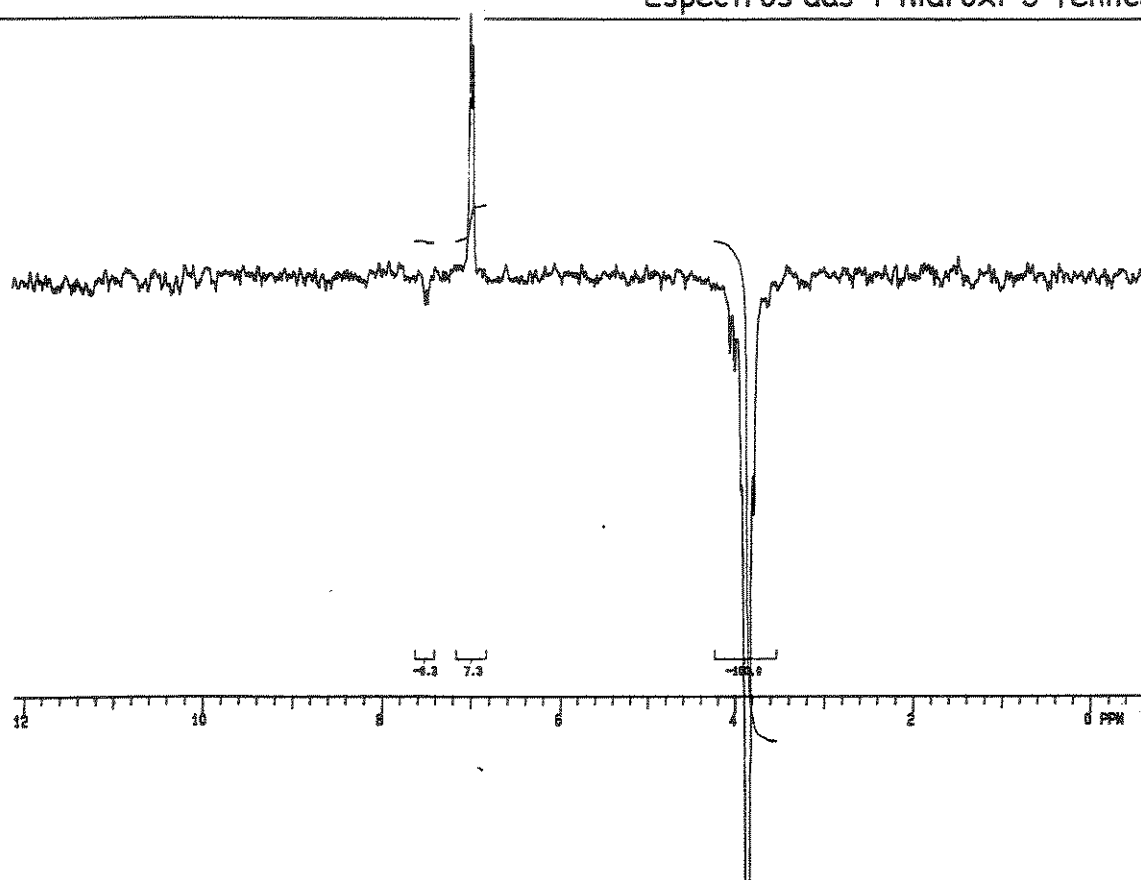
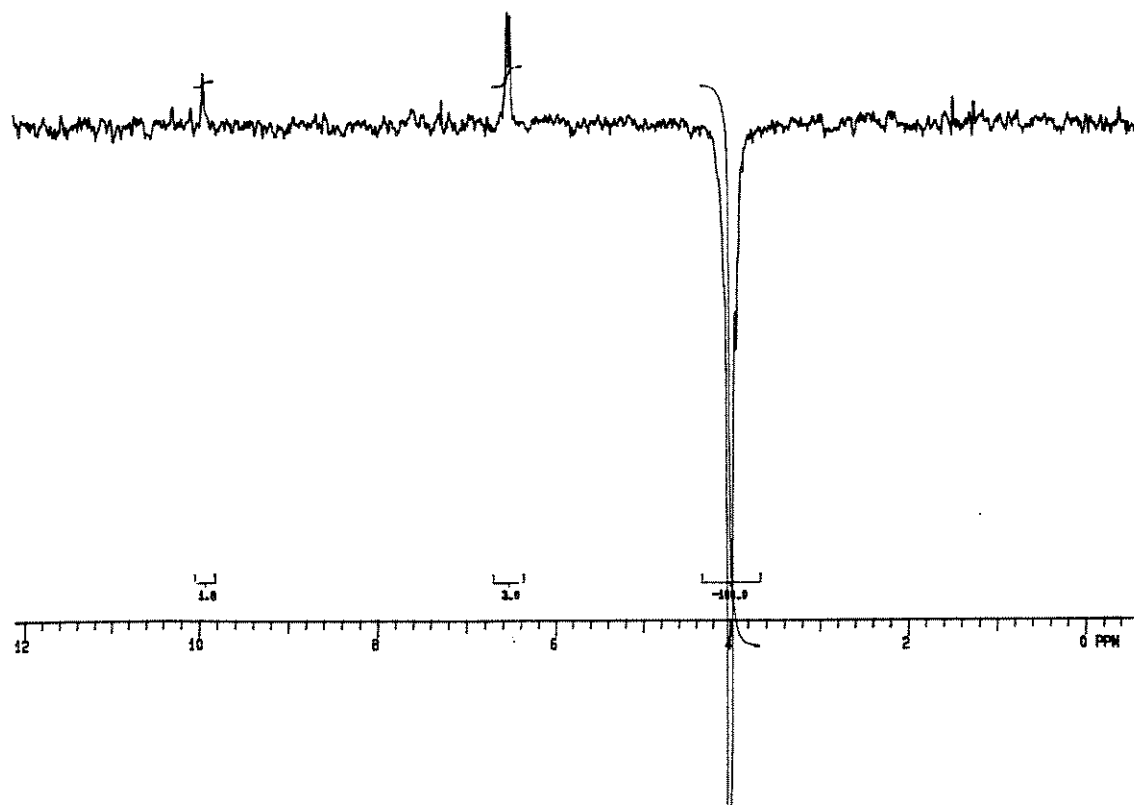
E11-Espectro no IV (filme CH₂Cl₂) da escandenina (1)

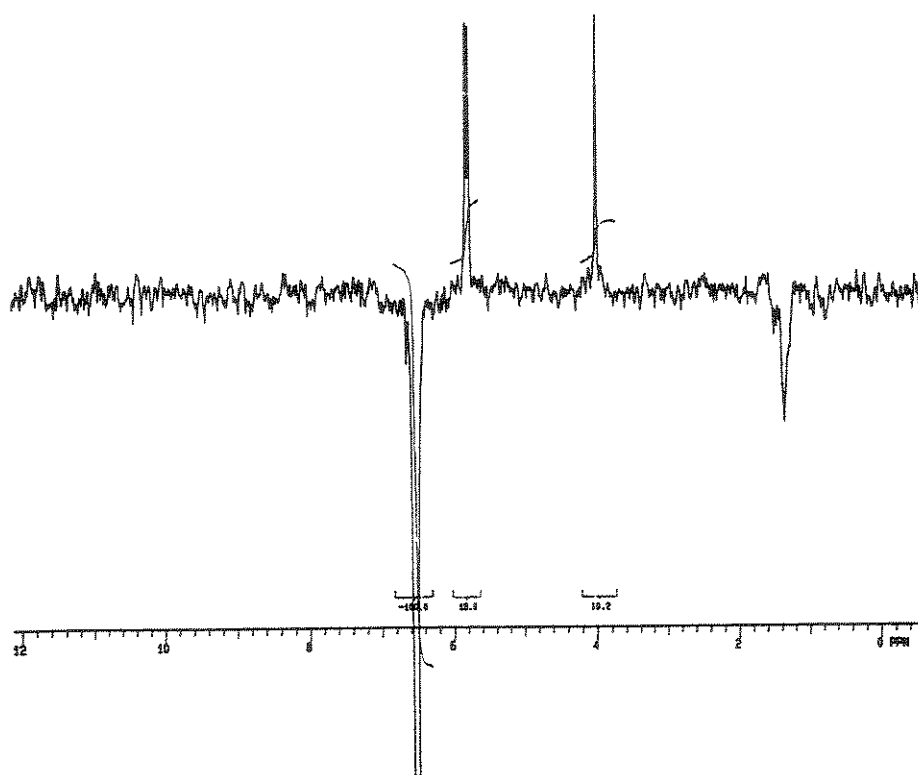
E12-Espectro no UV (CHCl_3) da escandenina (1)

E13-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do ácido robústico (2)

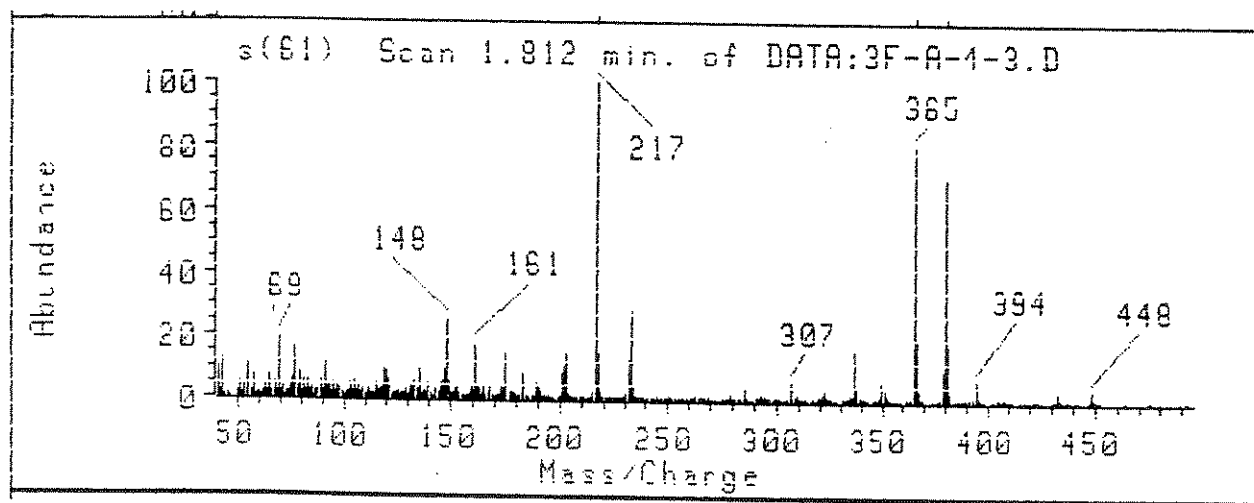


E14-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) do ácido robústico (2)

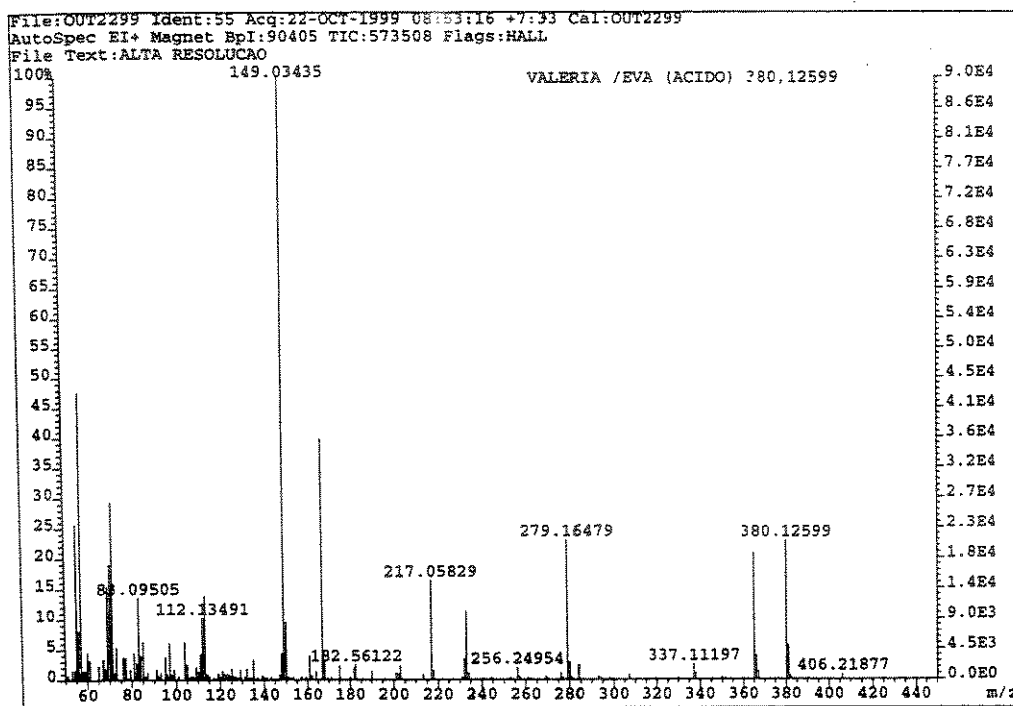
E15- Espectro de diferença de NOE (δ 3,76) do ácido robústico (2)E16-Espectro de diferença de NOE (δ 3,92) do ácido robústico (2)



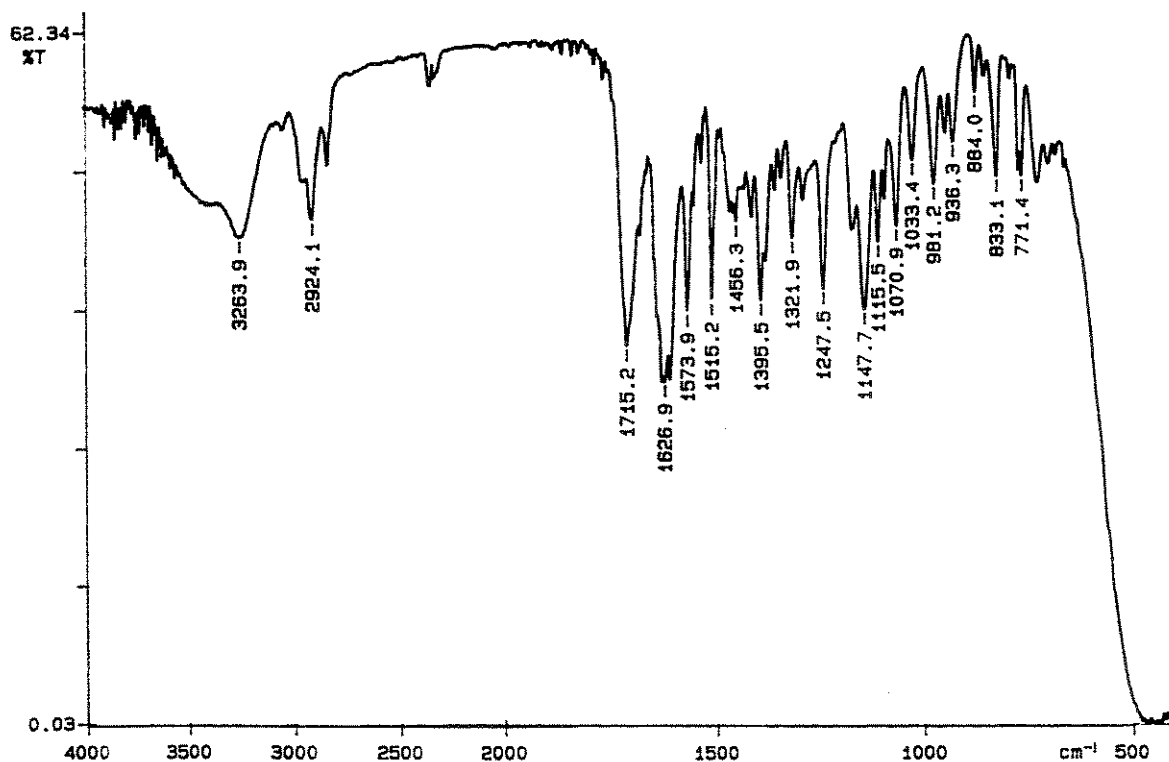
E17-Espectro de diferença de NOE (δ 6,45) do ácido robústico (2)



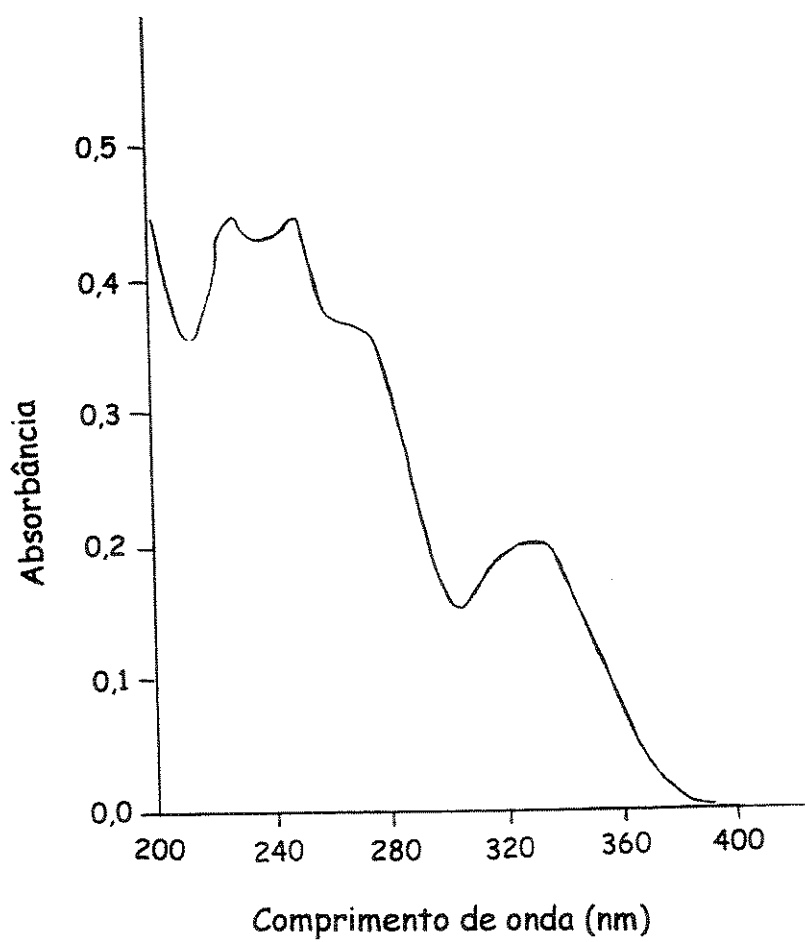
E18-Espectro de massas (IE, 70 eV) do ácido robústico (2)



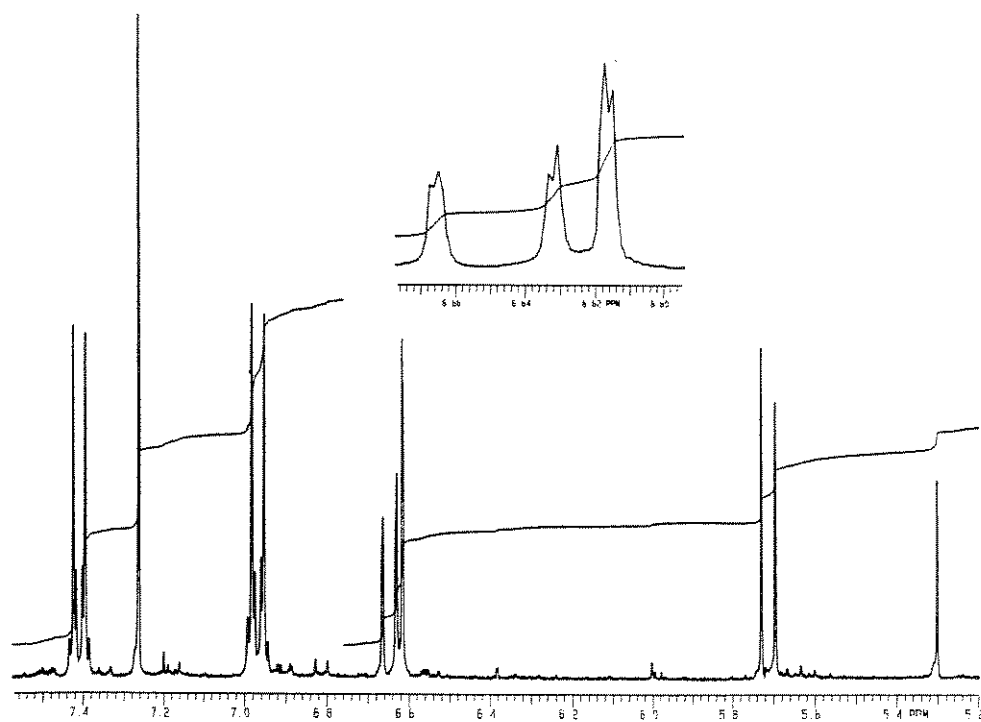
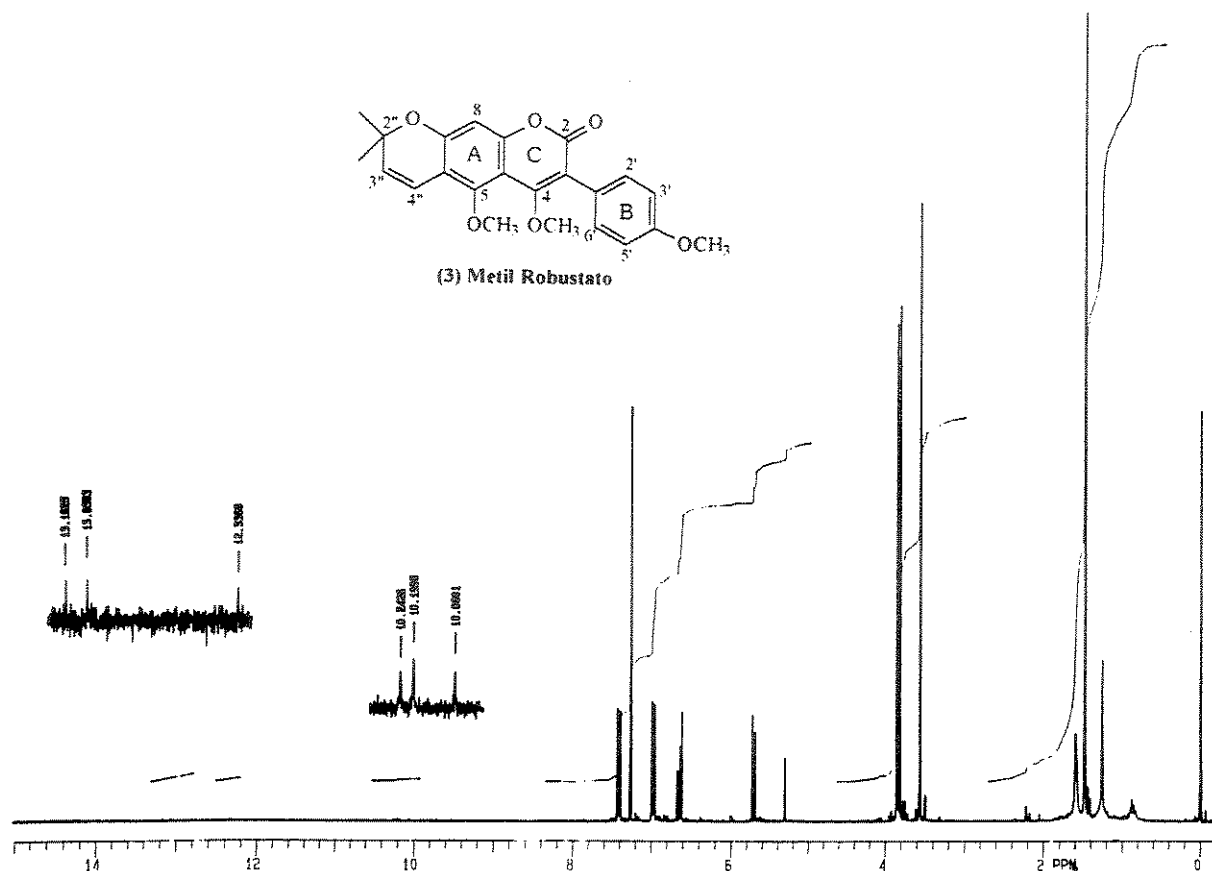
E19-Espectro de massas de alta resolução (IE, 70 eV) do ácido robústico (2)

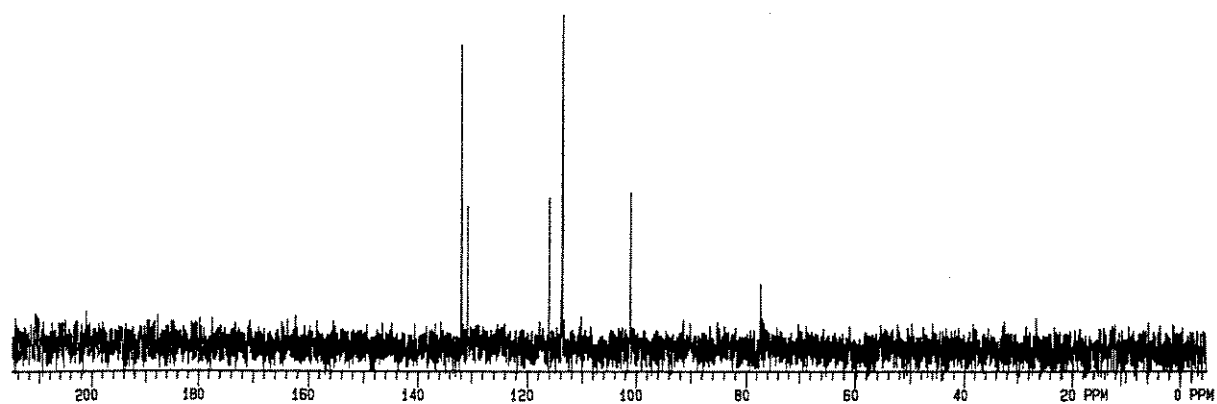
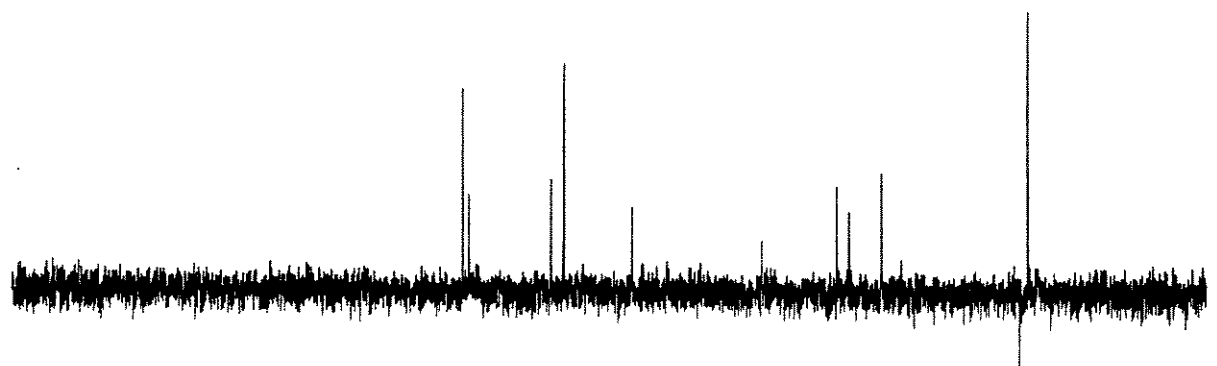
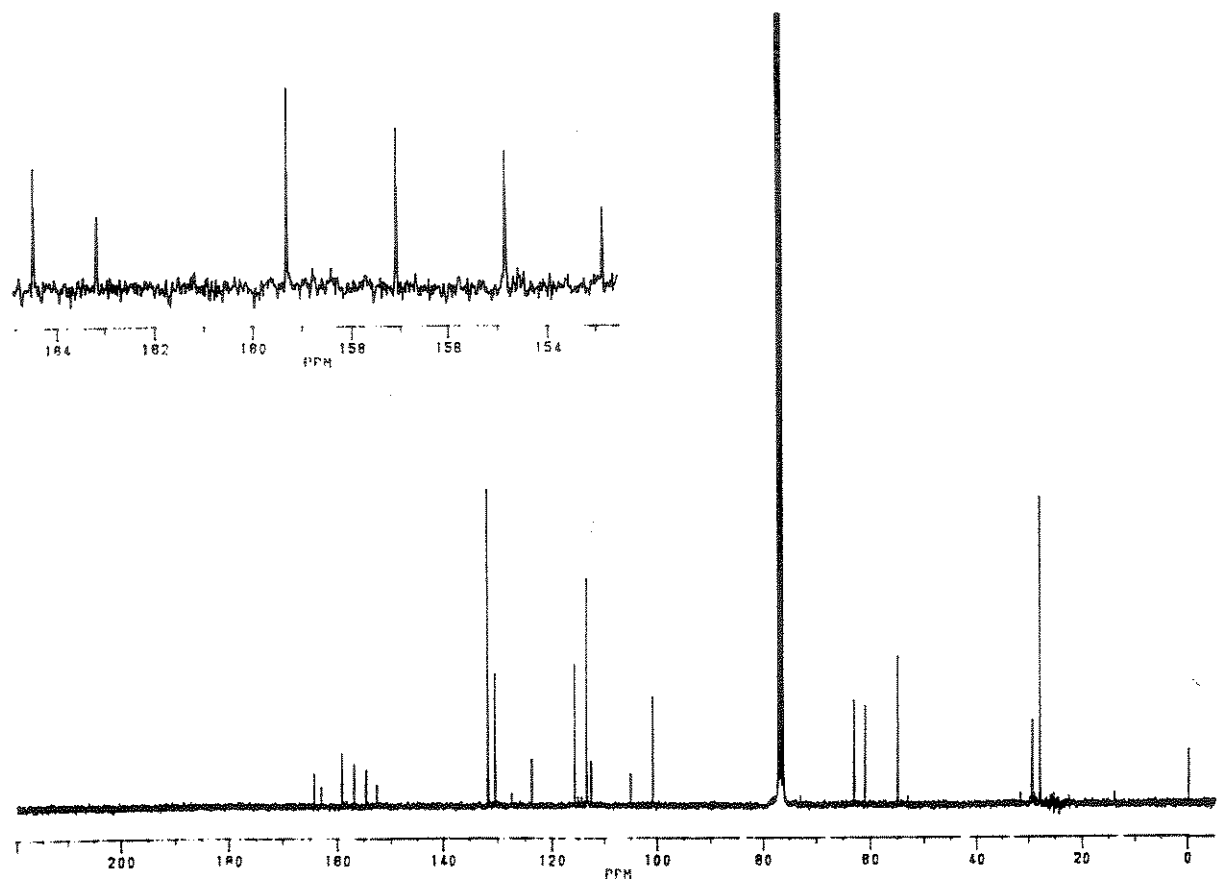


E20-Espectro no IV (cela NaCl) do ácido robústico (2)

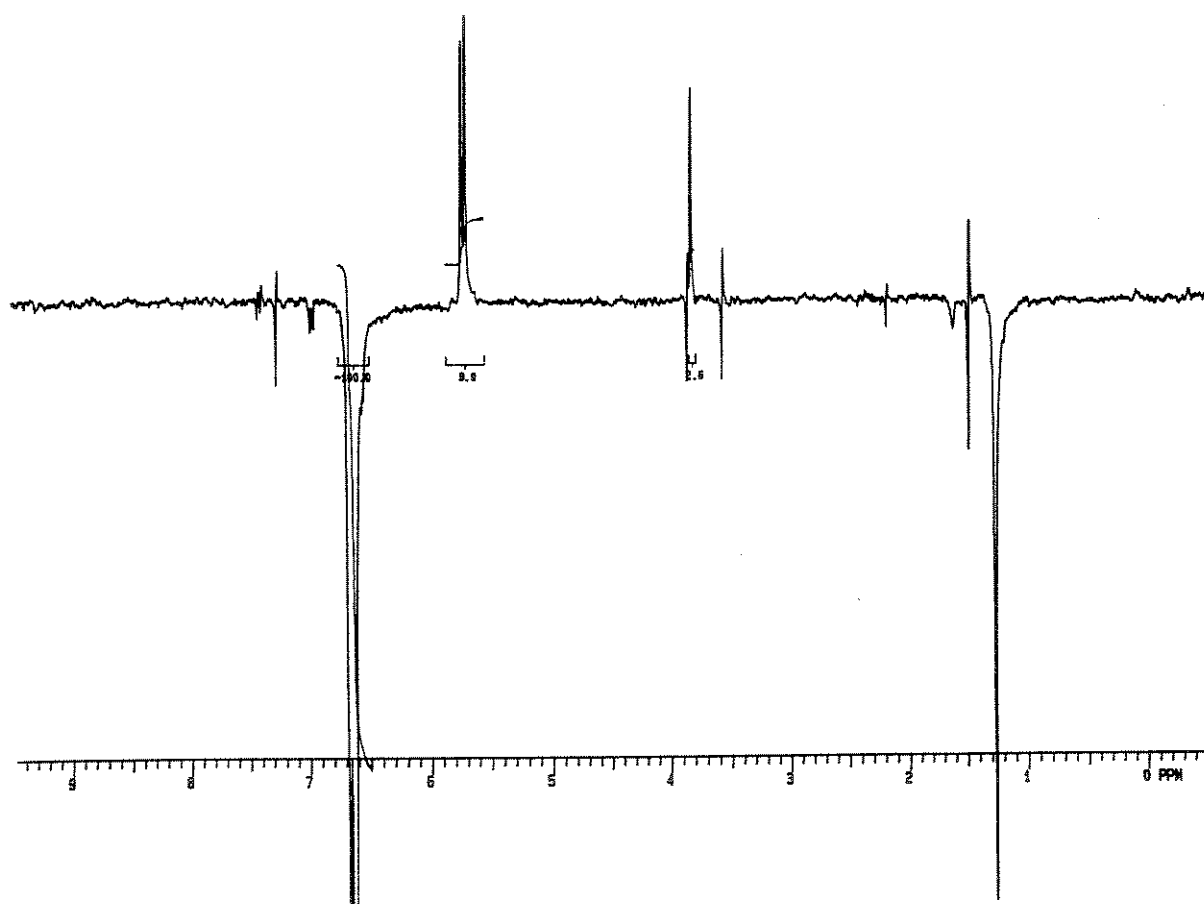


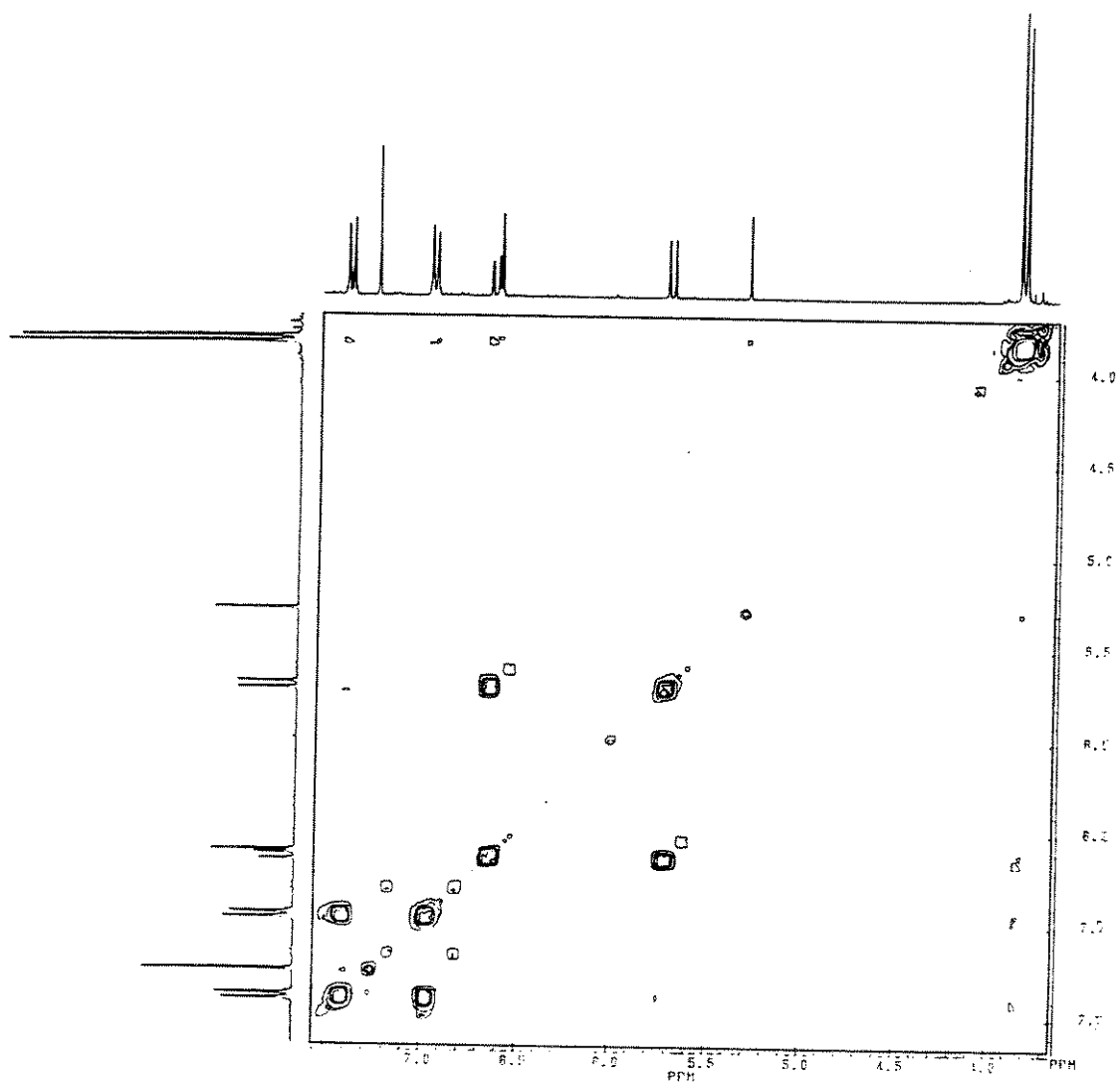
E21-Espectro no UV (MeOH) do ácido robústico (2)

E22-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do robustato de metila (3)

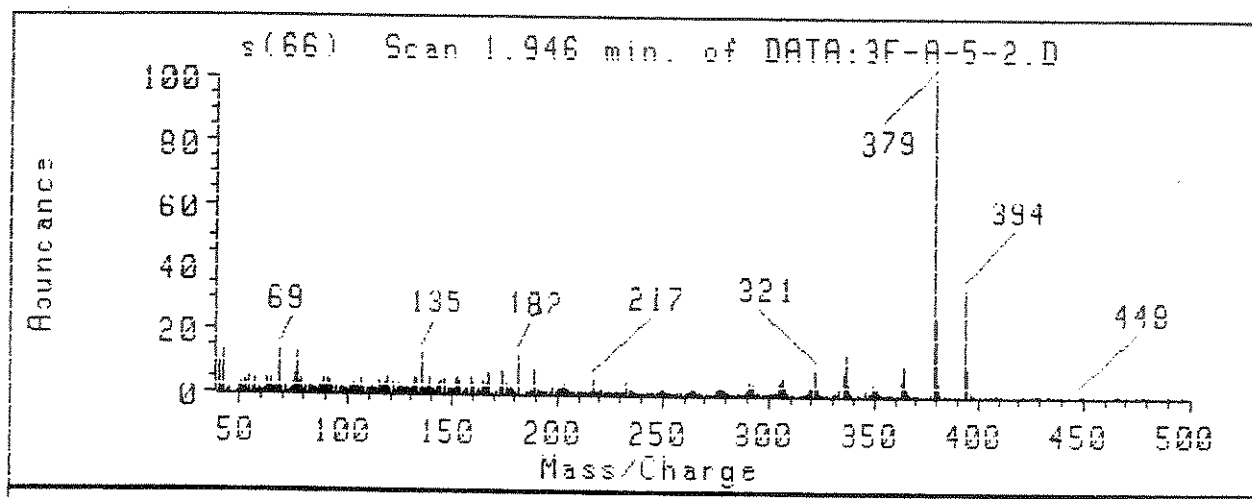


E23-RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS) e DEPT (90° e 135°) do robustato de metila (3)

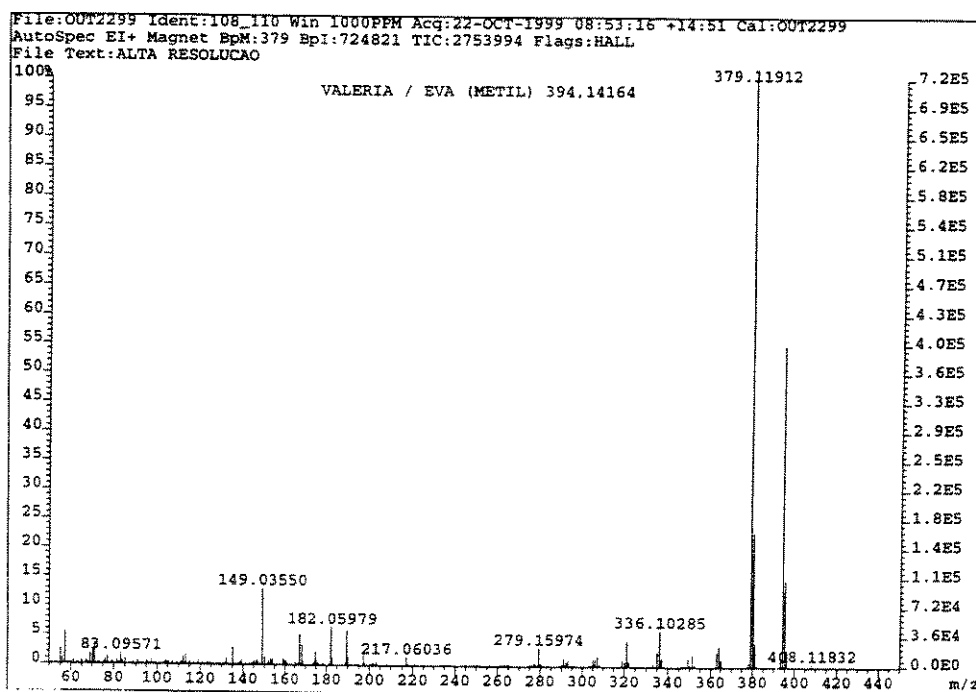
E24-Espectro de diferença de NOE (δ 6,65) do robustato de metila (3)



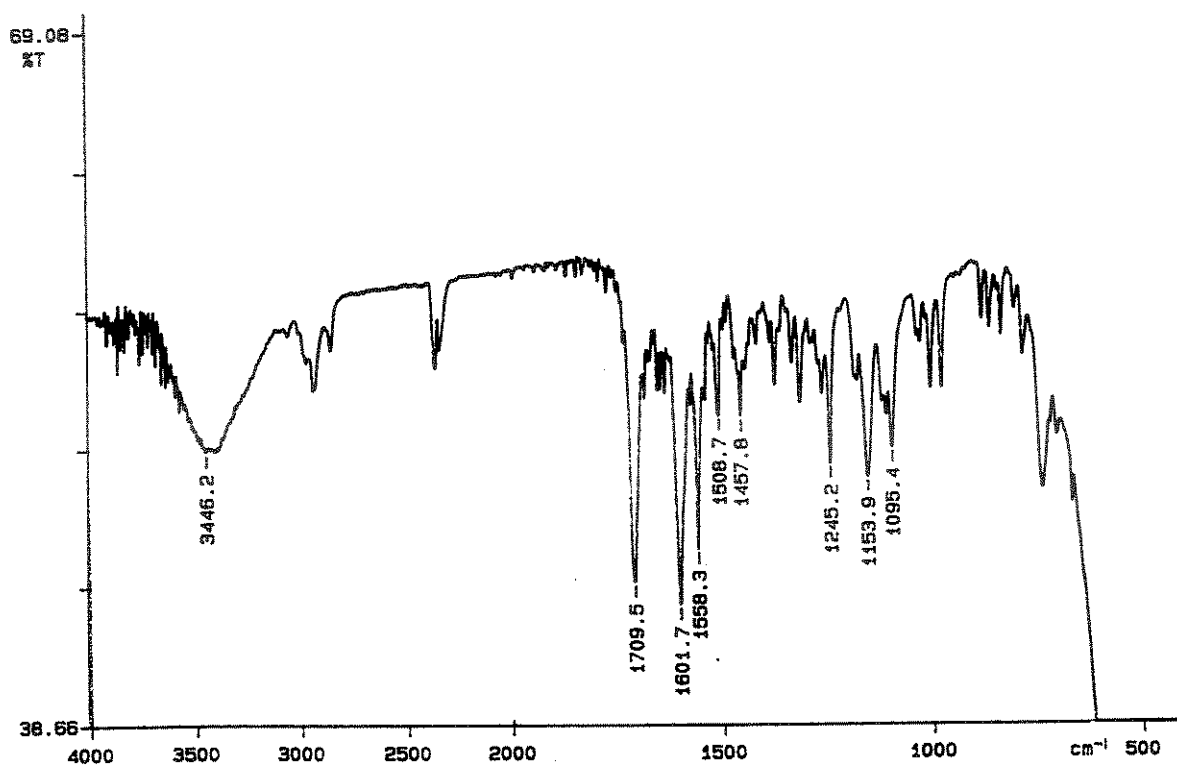
E25-RMN-2D (^1H , ^1H -COSY) do robustato de metila (3)



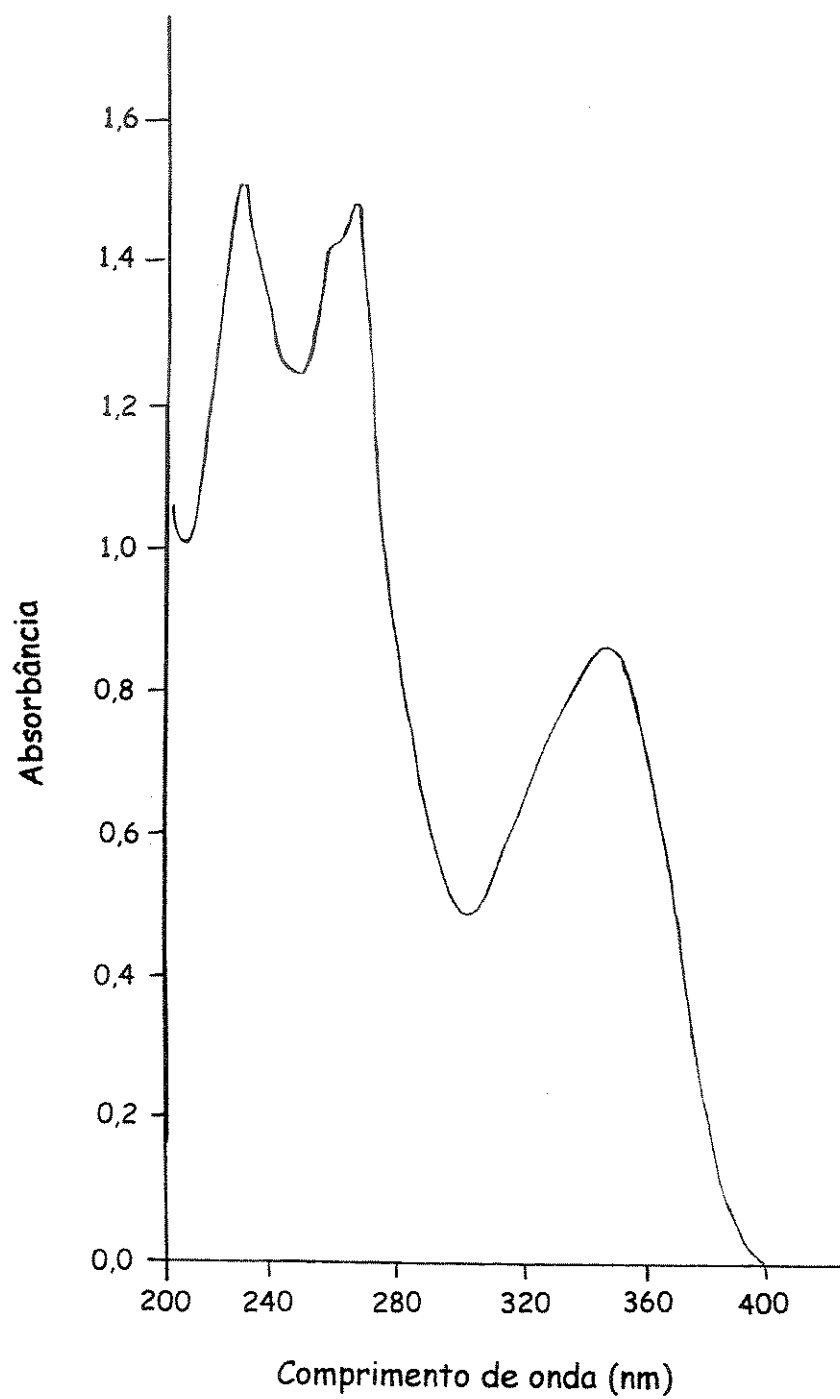
E26-Espectro de massas (IE, 70 eV) do robustato de metila (3)



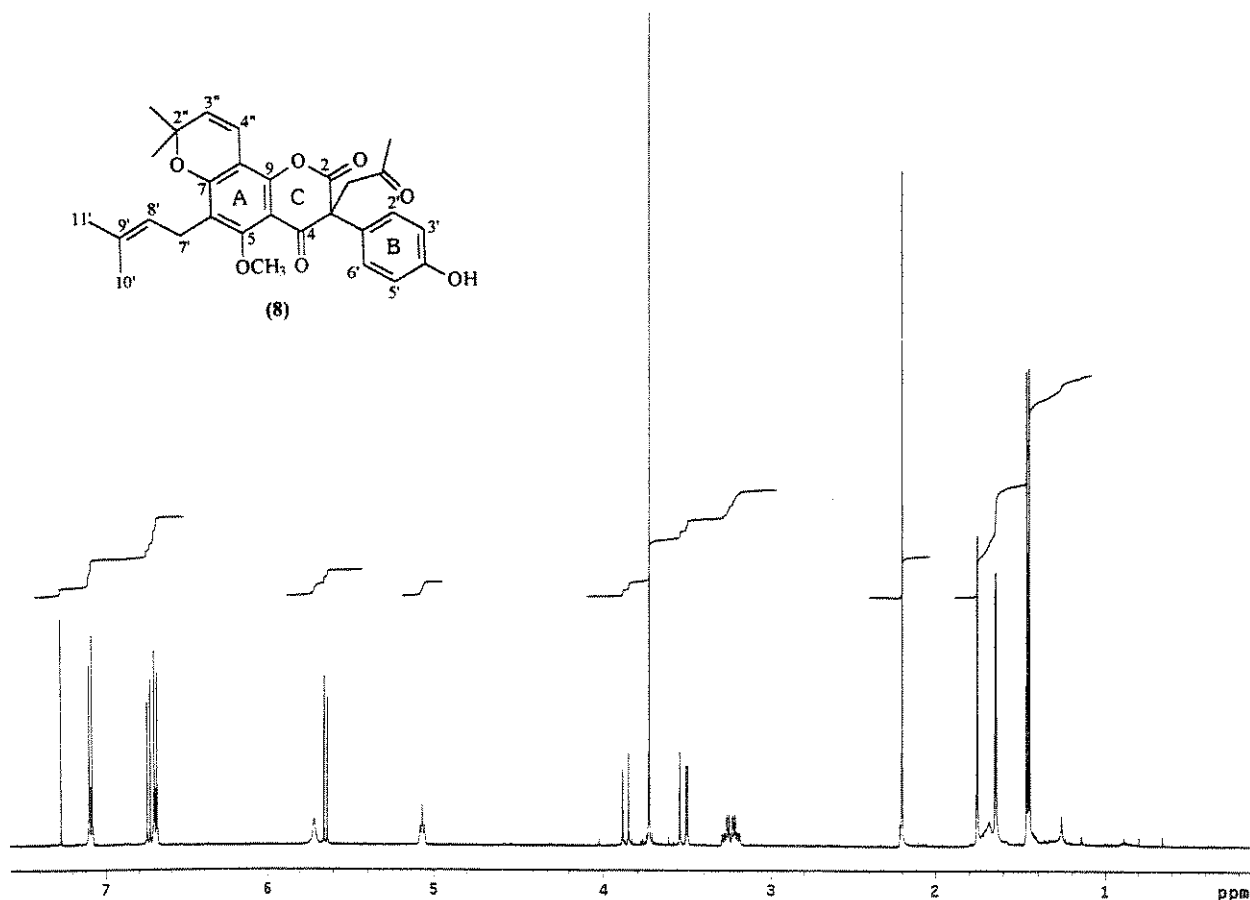
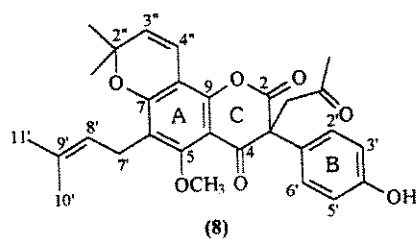
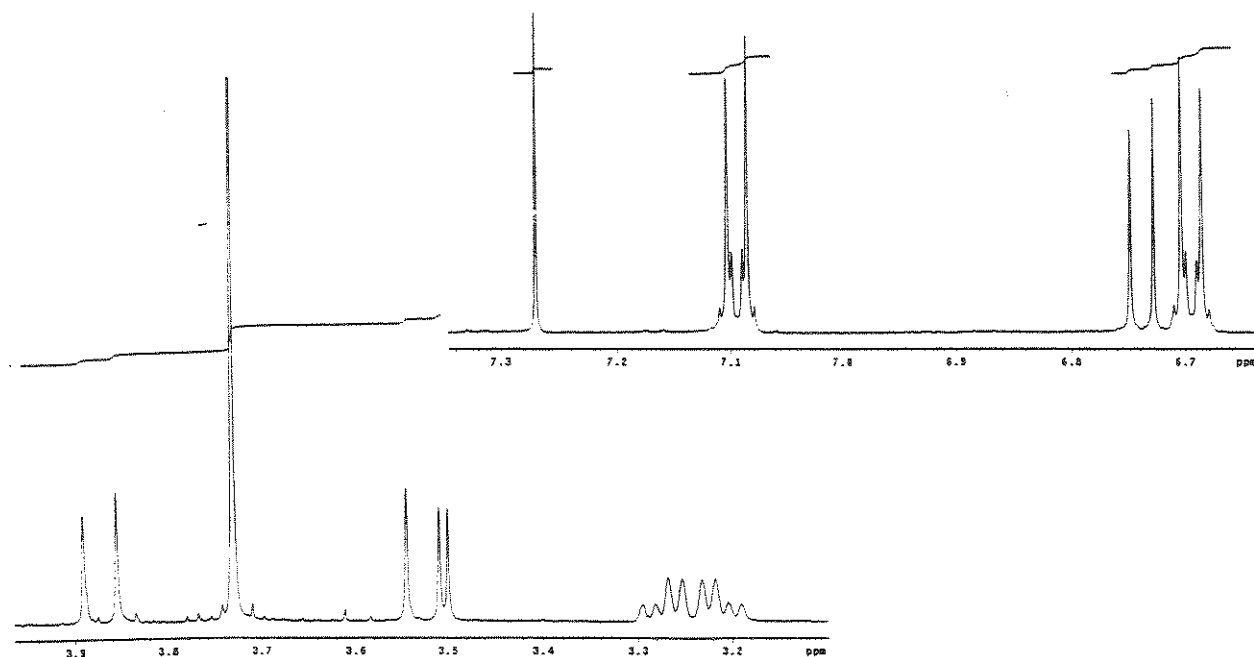
E27-Espectro de massas de alta resolução (IE, 70 eV) do robustato de metila (3)



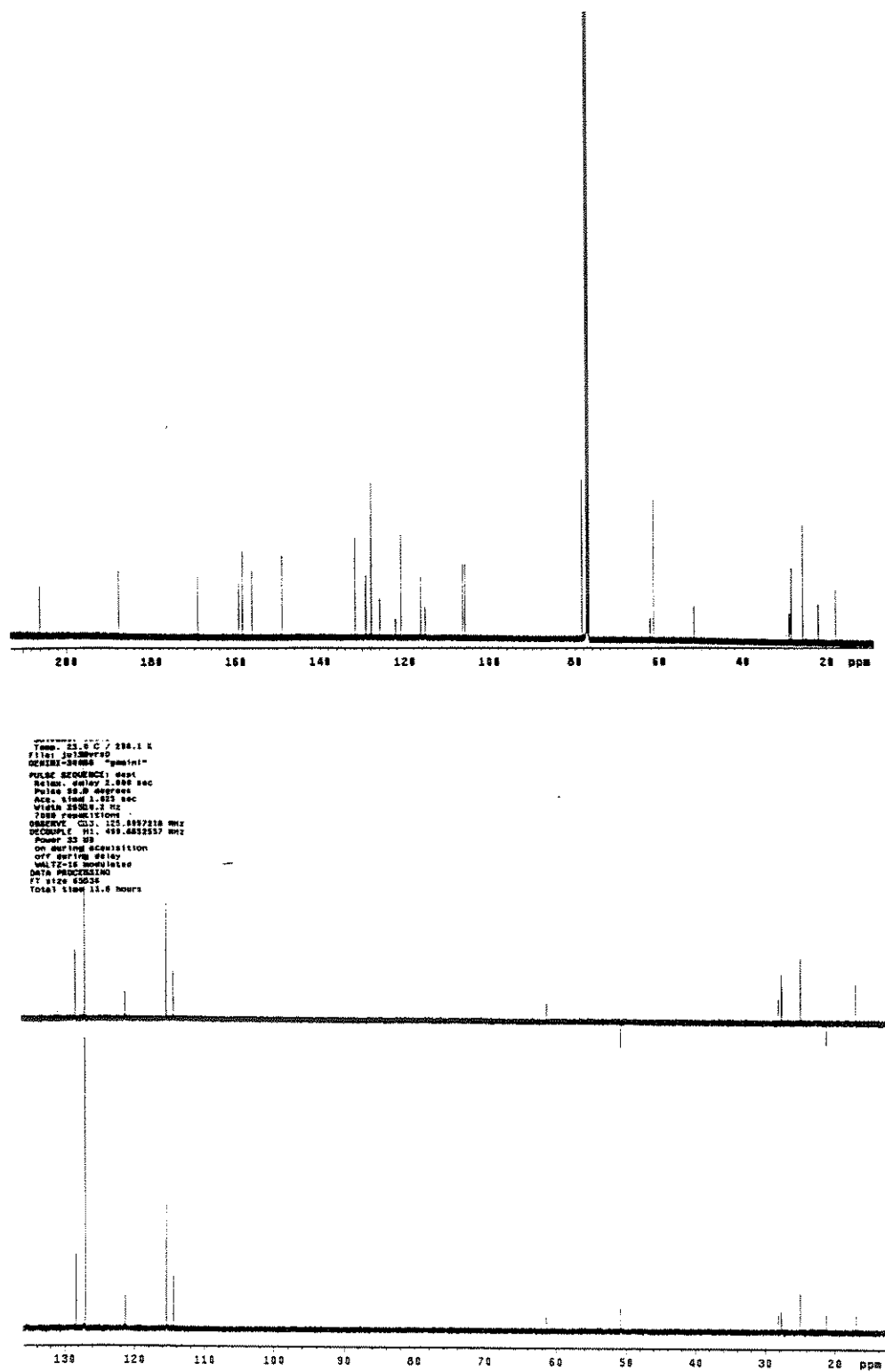
E28-Espectro no IV (cela NaCl) do robustato de metila (3)

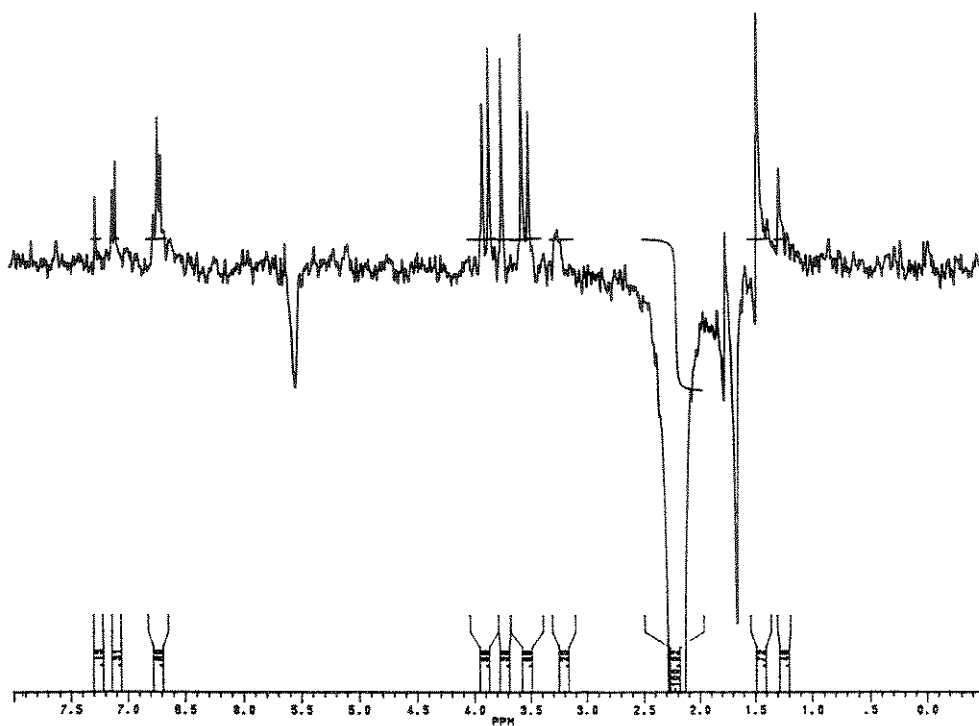
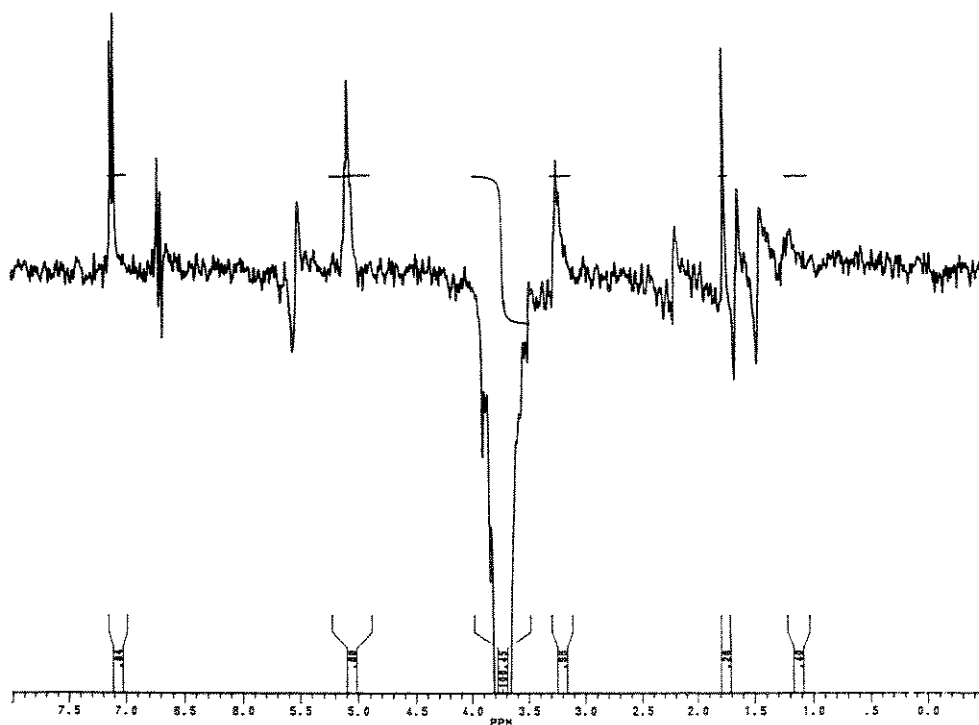


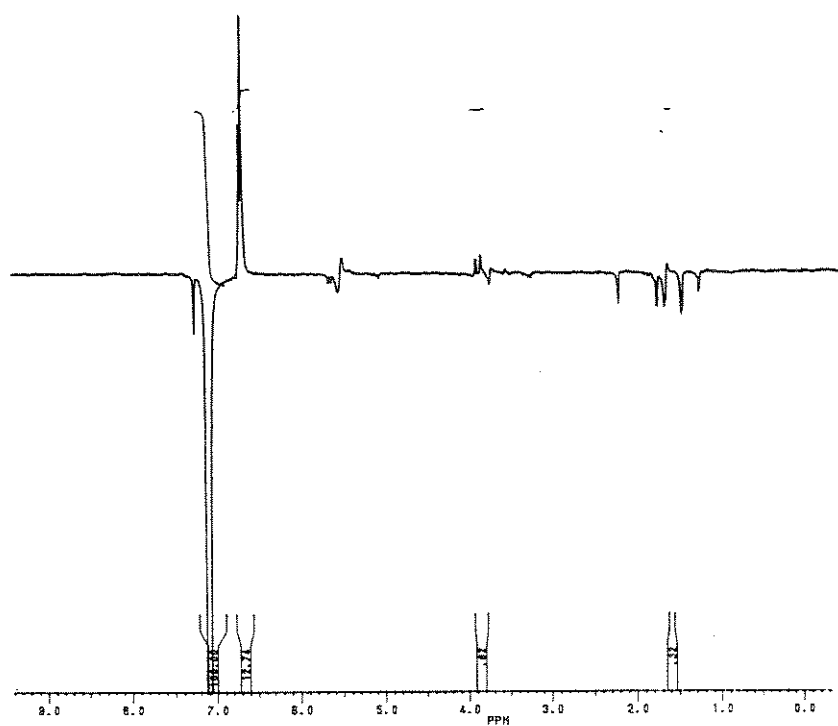
E29-Espectro no UV (MeOH) do robustato de metila (3)

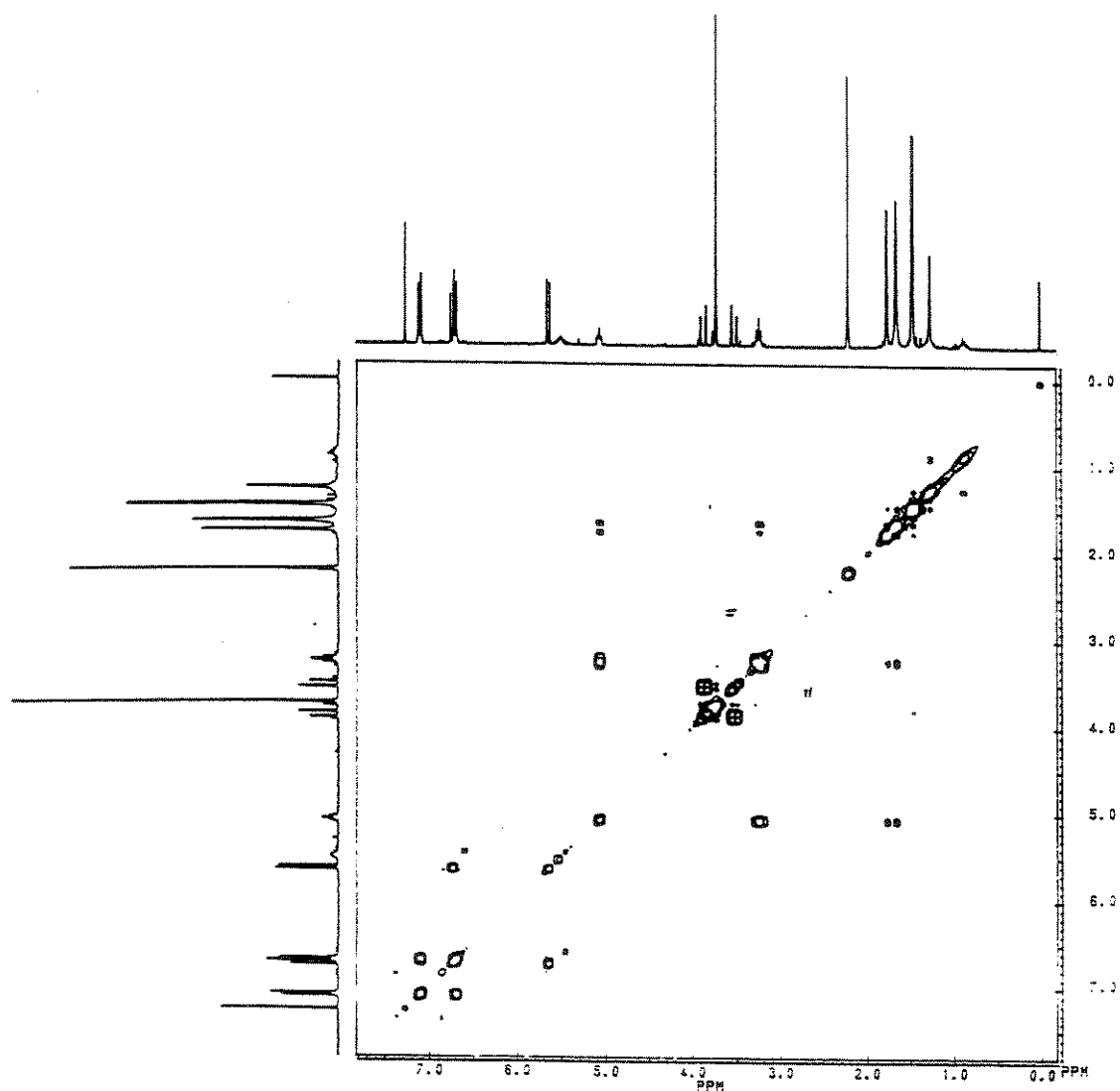


E30-RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3/TMS) da substância (8)

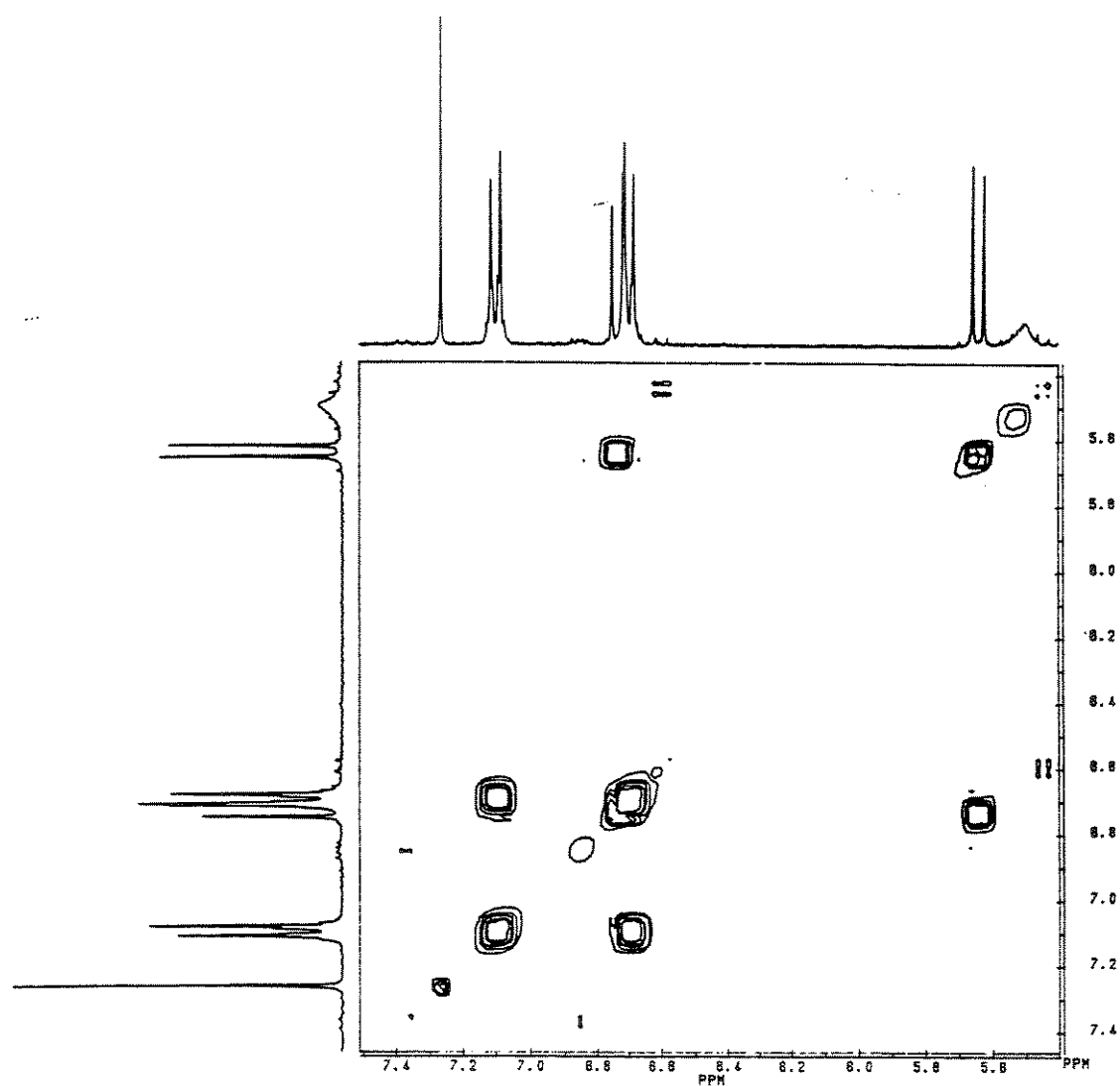
E31-RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS) e DEPT (90° e 135°) da substância (8)

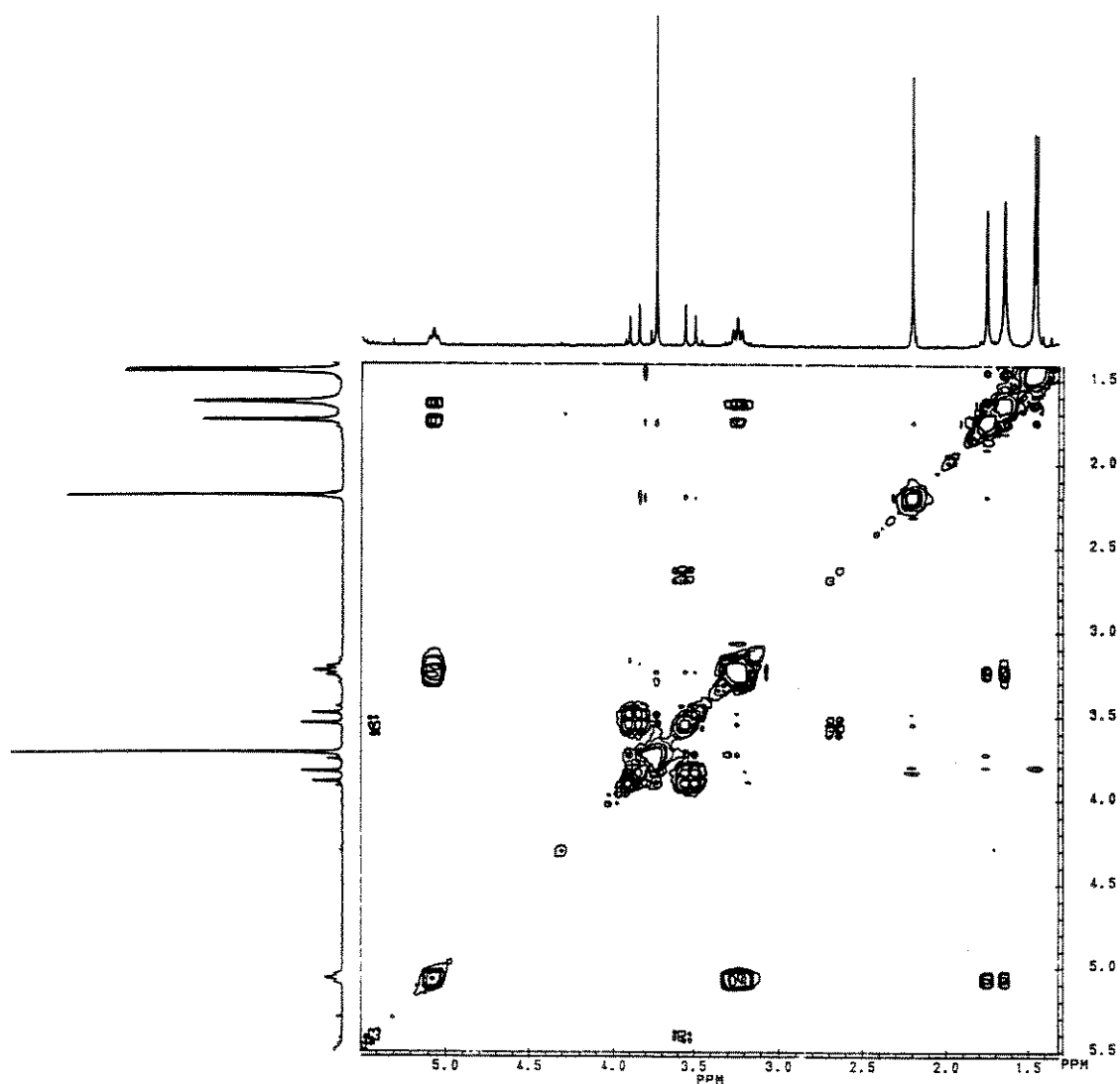
E32- Espectro de diferença de NOE (δ 2,20) da substância (8)E33- Espectro de diferença de NOE (δ 3,73) da substância (8)

E34- Espectro de diferença de NOE (δ 7,10) da substância (8)

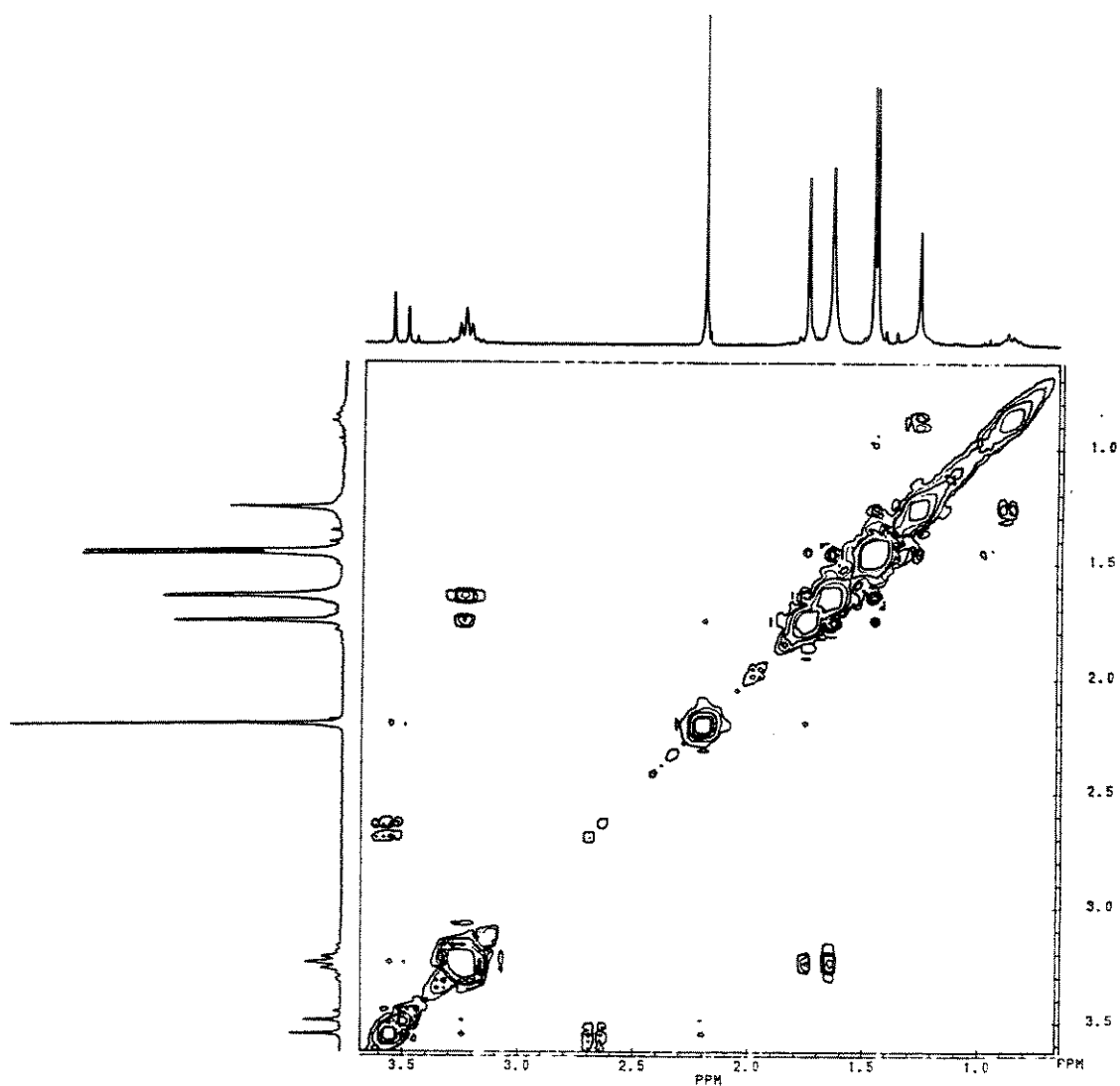


E35-RMN-2D (^1H , ^1H -COSY) da substância (8)

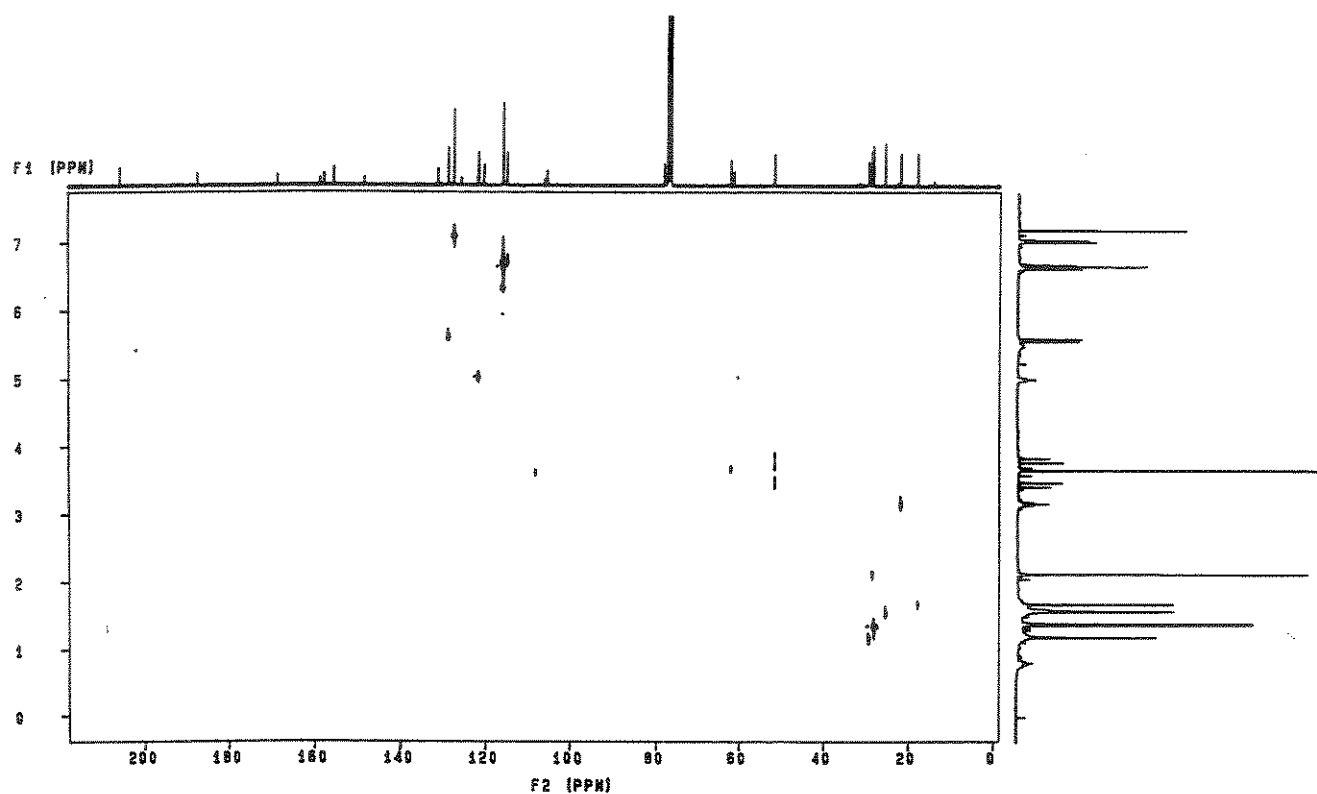
E36- RMN-2D (¹H, ¹H-COSY) da substância (8) (Ampliação)



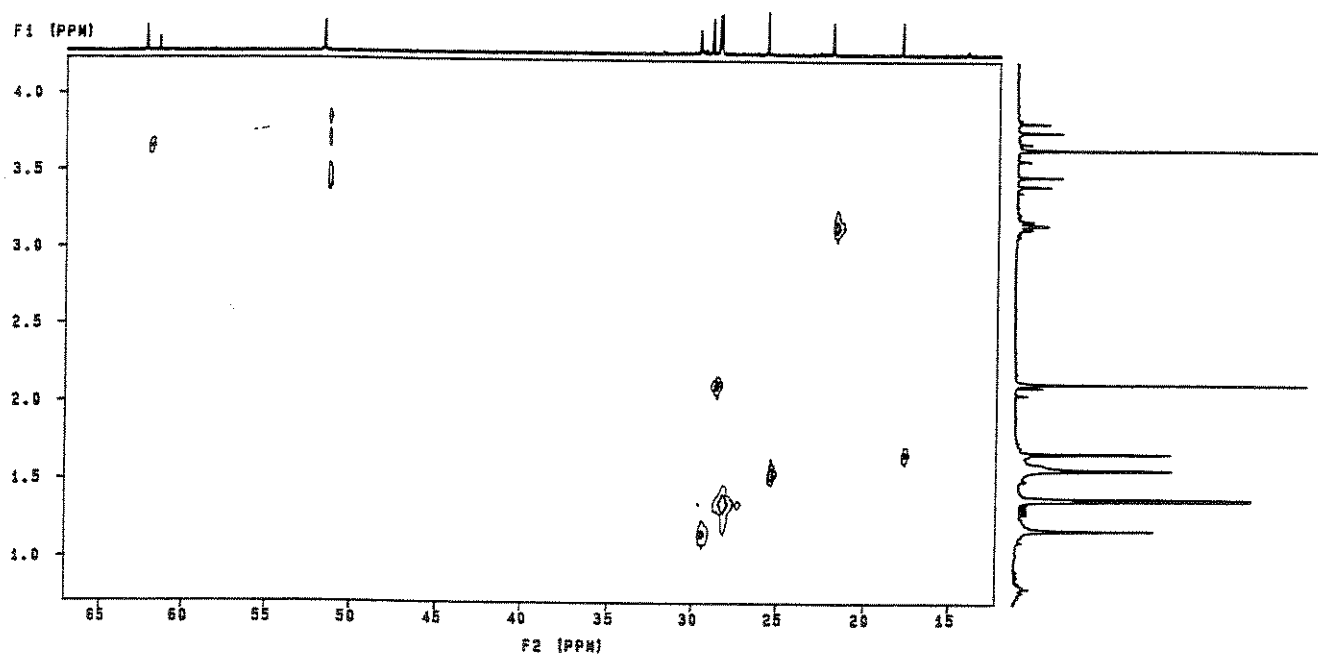
E37- RMN-2D (^1H , ^1H -COSY) da substância (8) (Ampliação)



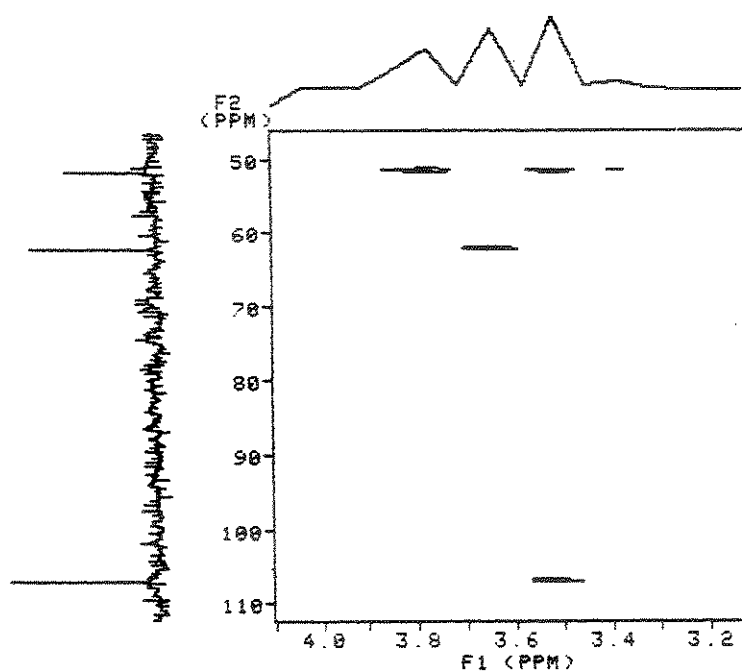
E38- RMN-2D (^1H , ^1H -COSY) da substância (8) (Ampliação)



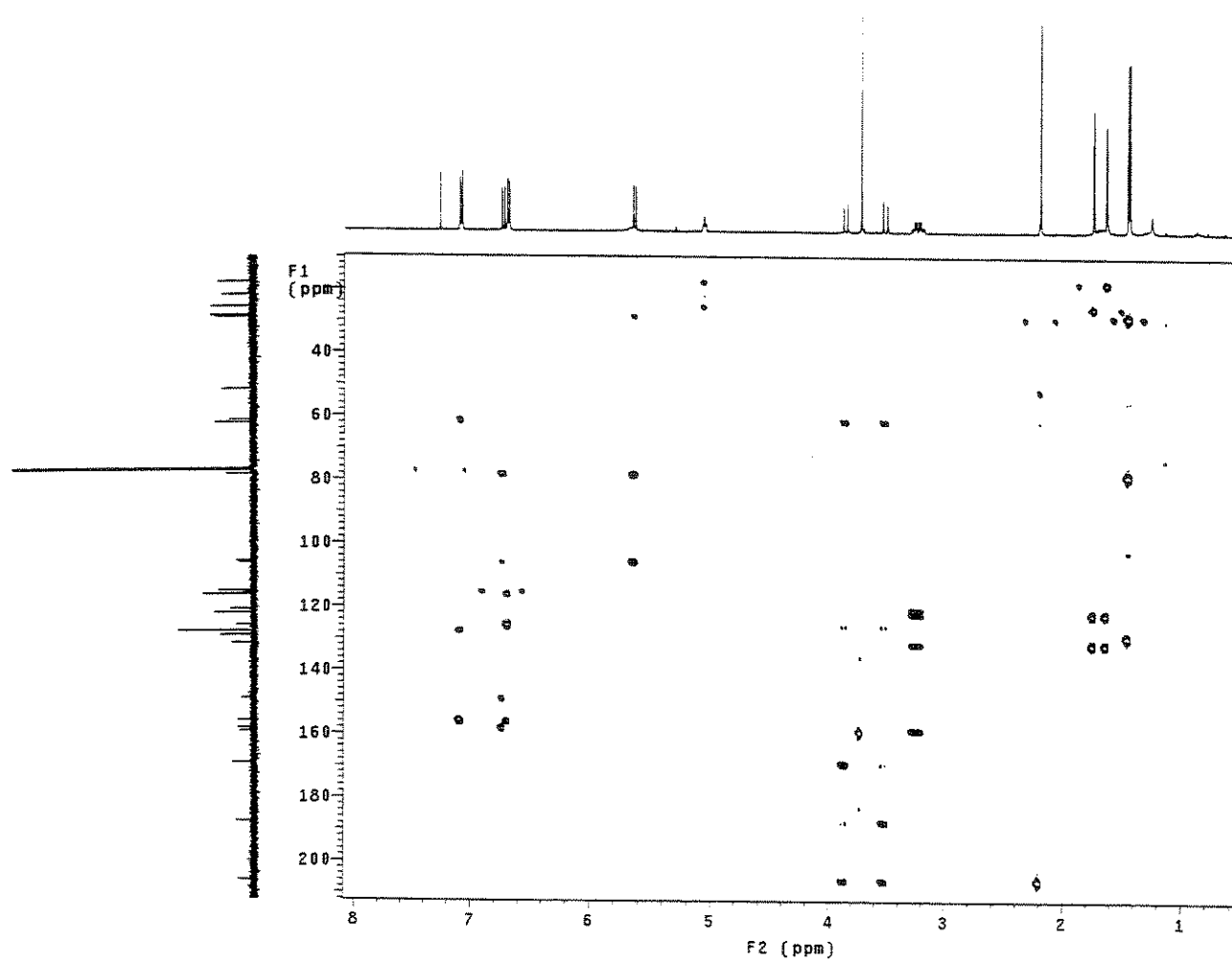
E39- RMN-2D a uma ligação (^1H , ^{13}C -HETCOR) da substância (8)



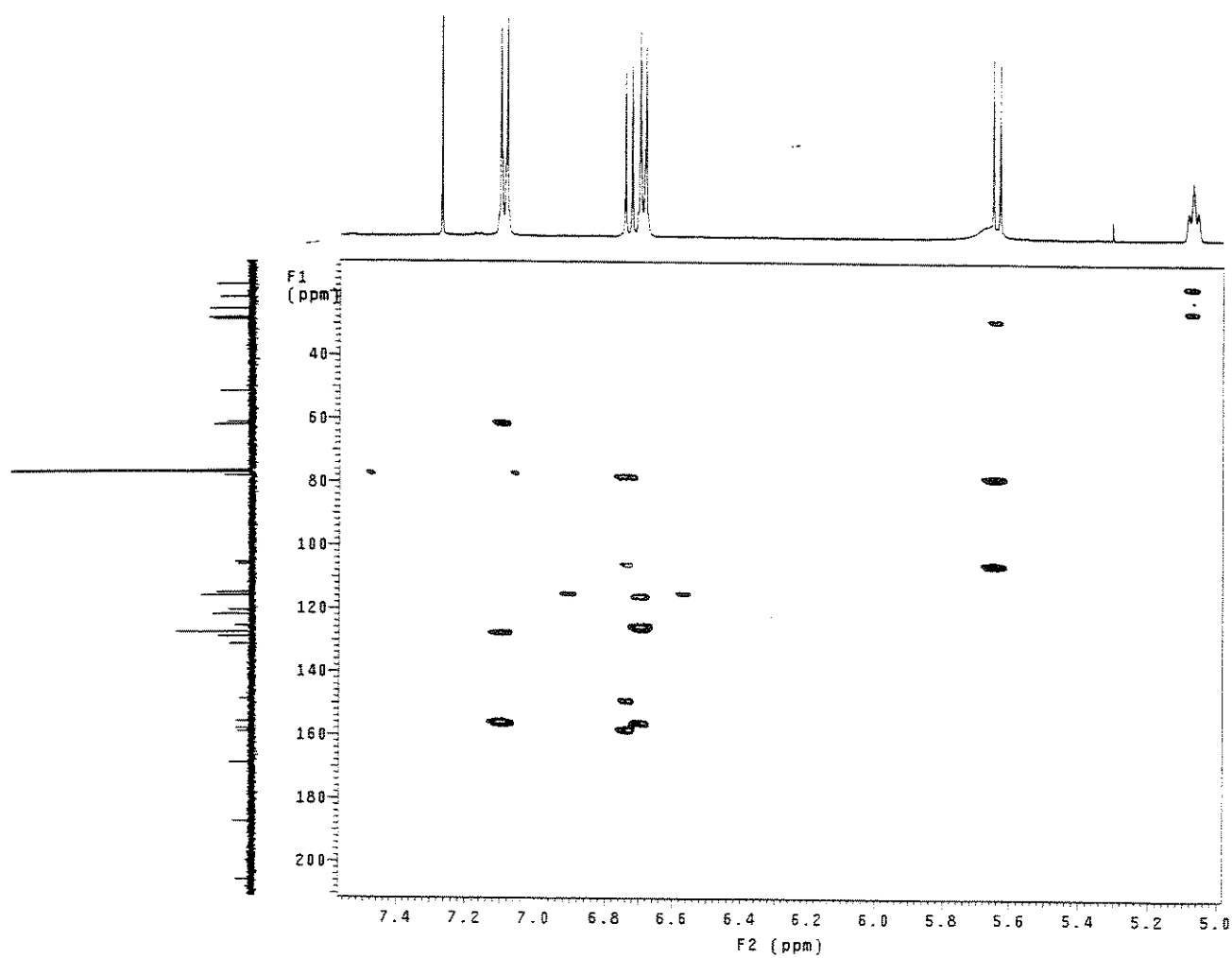
E40- RMN-2D a uma ligação (^1H , ^{13}C -HETCOR) da substância (8) (Ampliação)

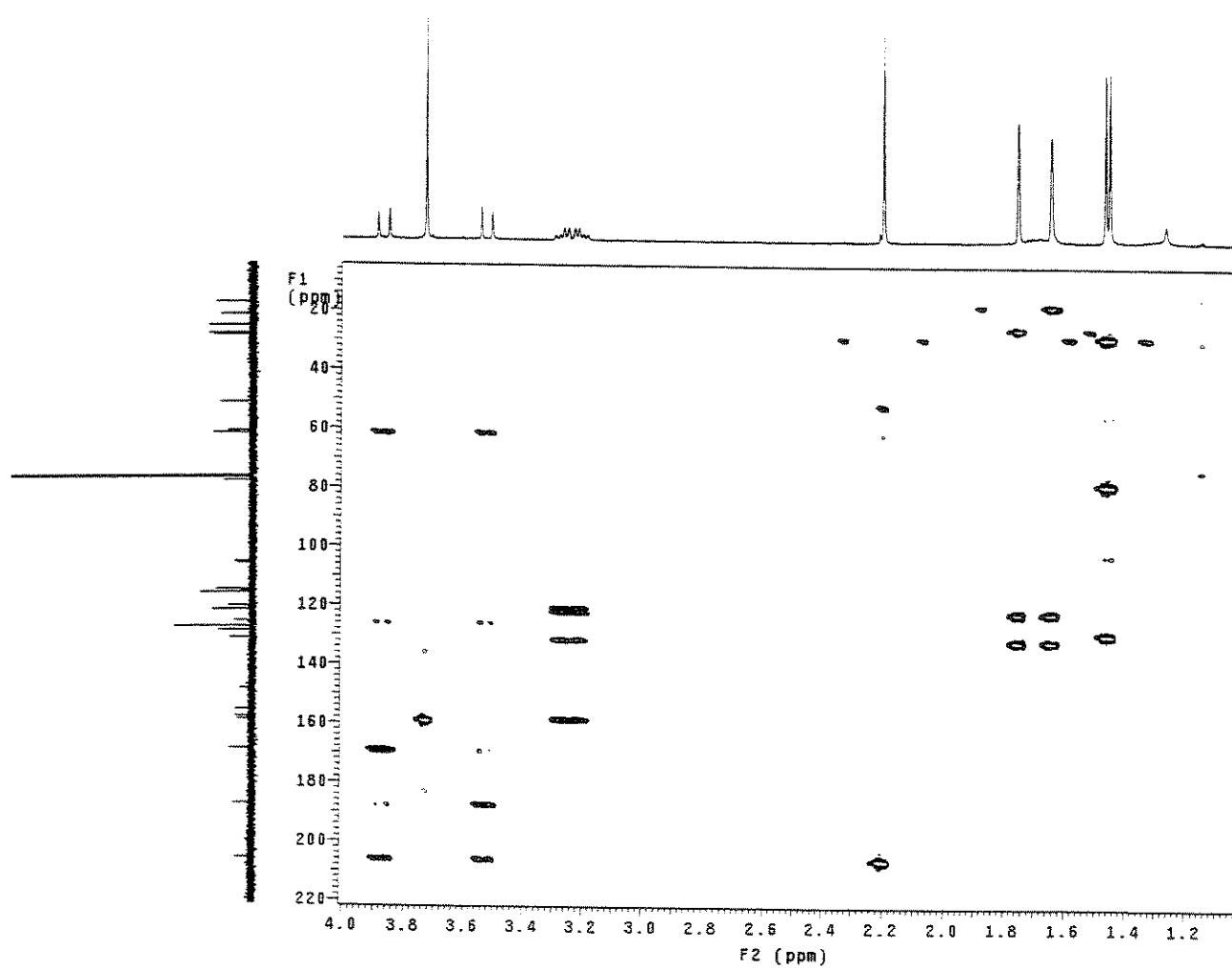


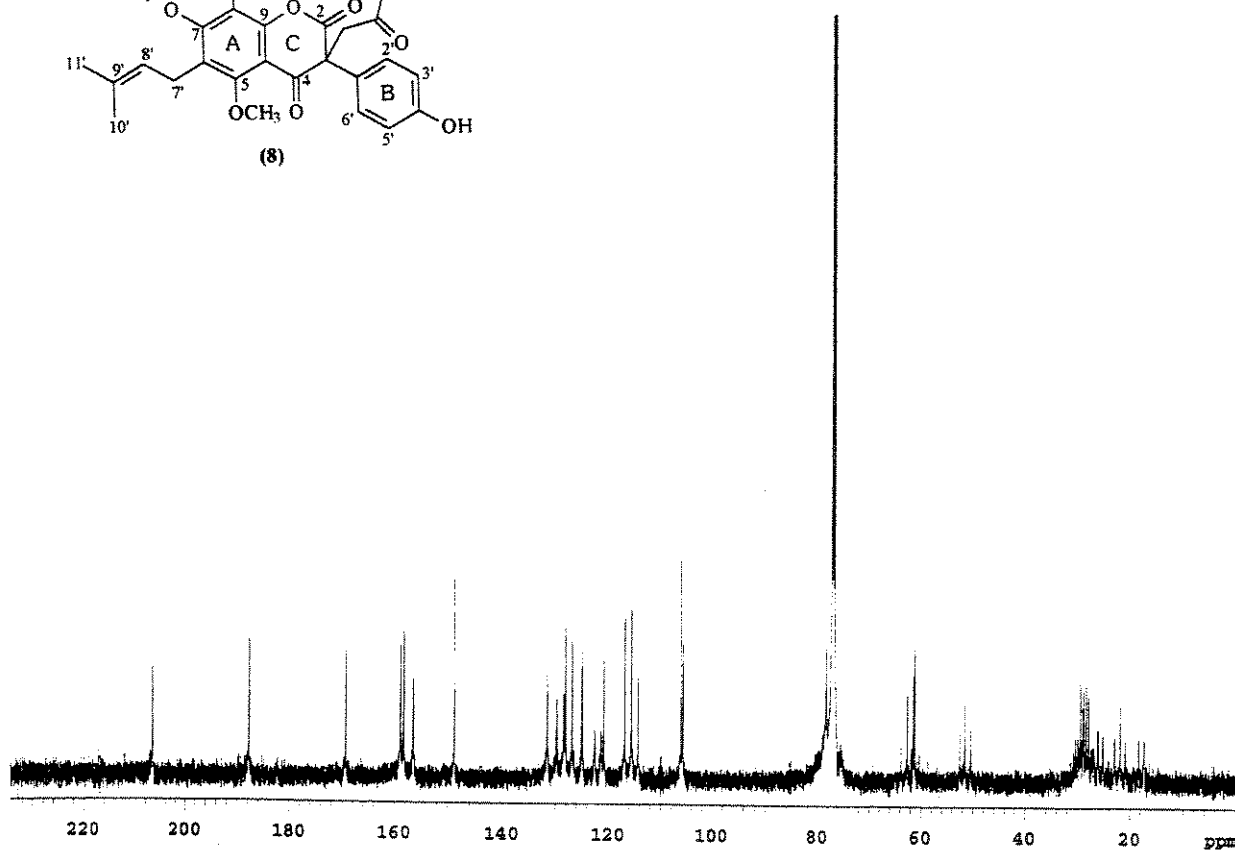
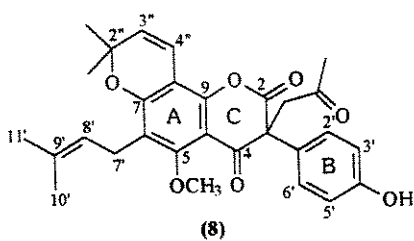
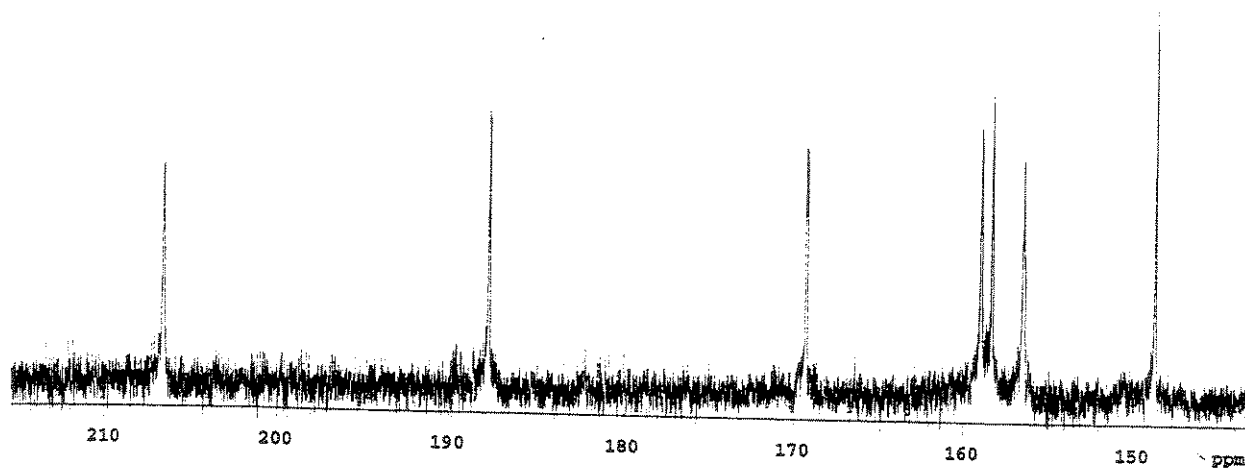
E41- RMN-2D a uma ligação (^1H , ^{13}C -HETCOR) da substância (8) (Ampliação)



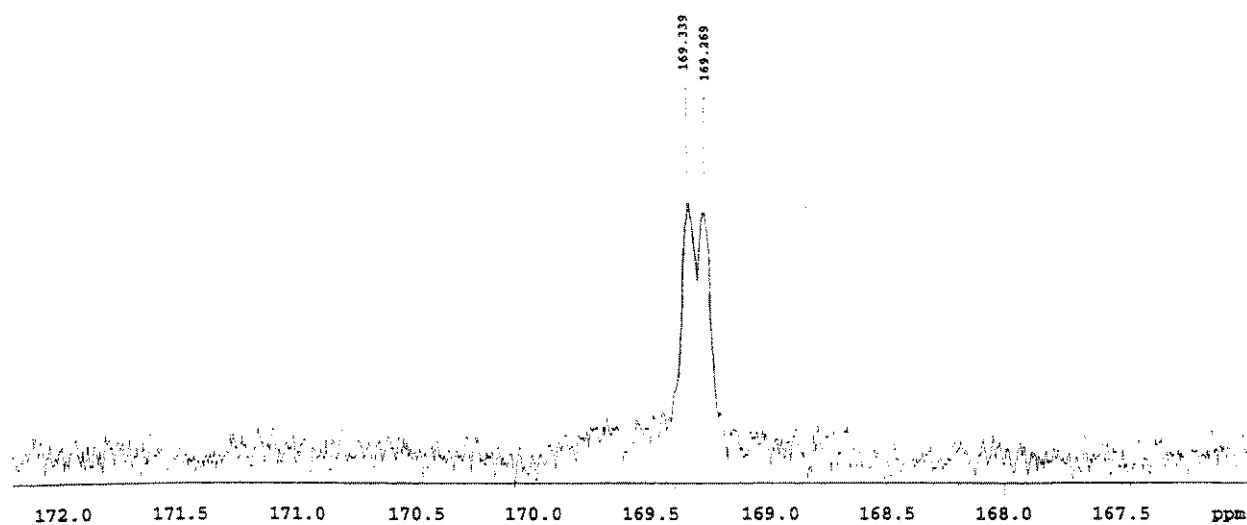
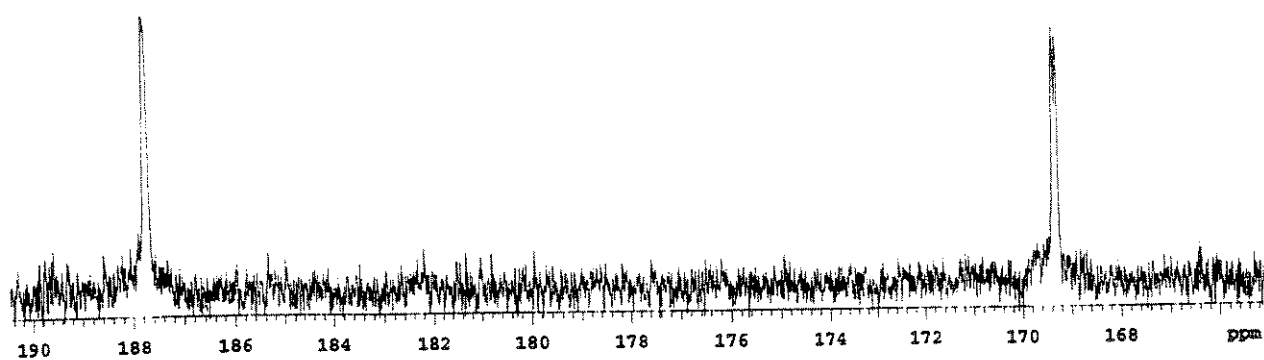
E42- RMN-2D a várias ligações (^1H , ^{13}C -gHMBC) da substância (8)

E43- RMN-2D a várias ligações (^1H , ^{13}C -gHMBC) da substância (8) (Ampliação)

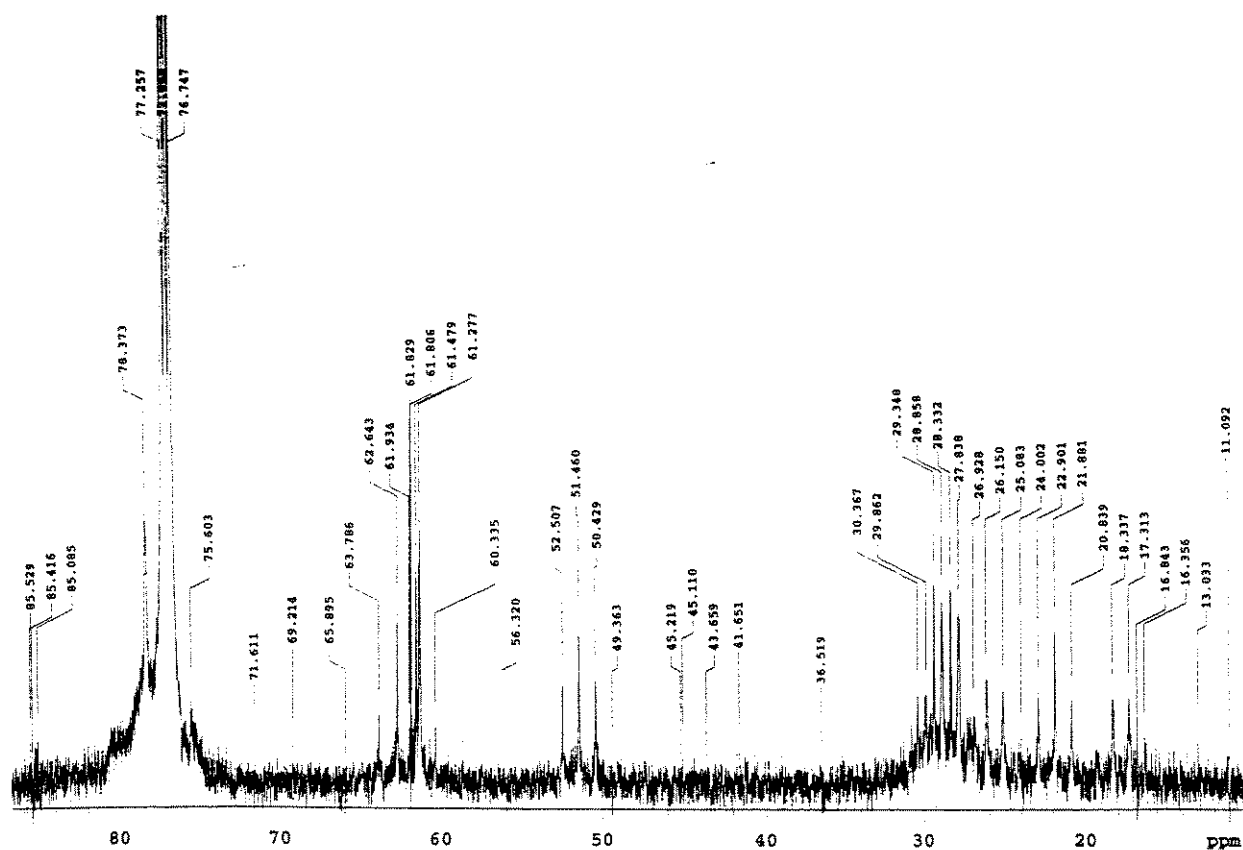
E44- RMN-2D a várias ligações (^1H , ^{13}C -gHMBC) da substância (8) (Ampliação)



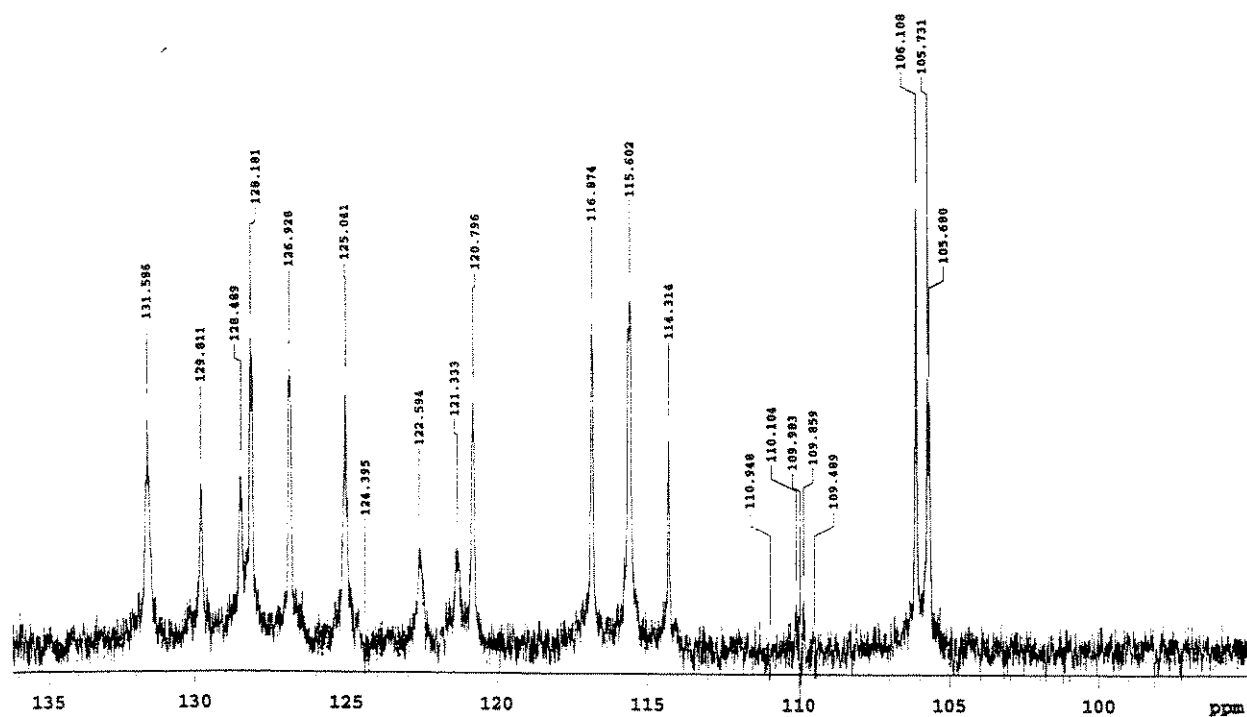
E45-RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3/TMS) totalmente acoplado da substância (8)



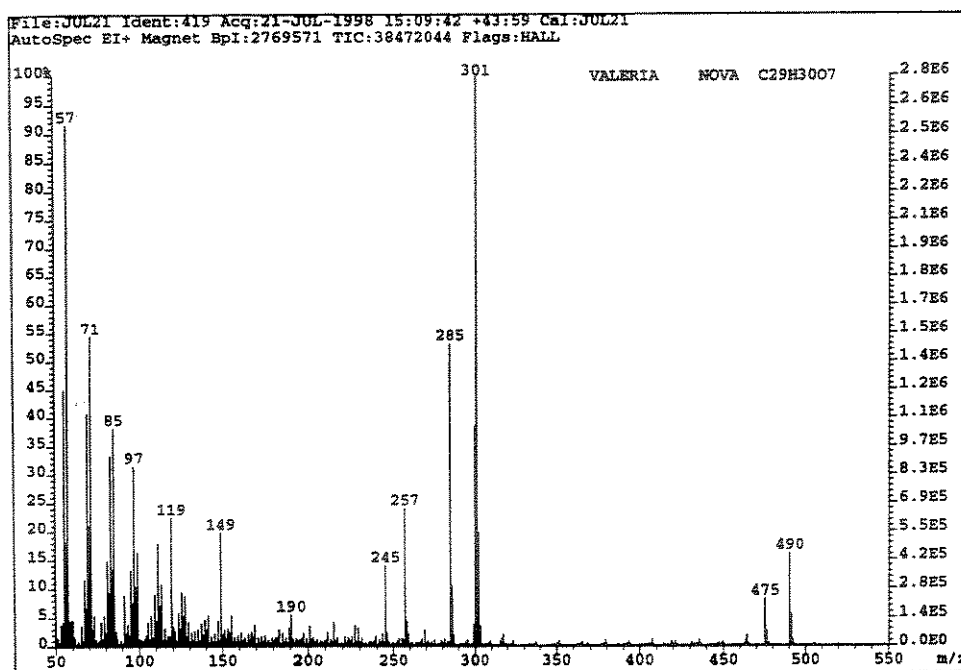
E45a- RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) totalmente acoplado da substância (8) (Ampliações



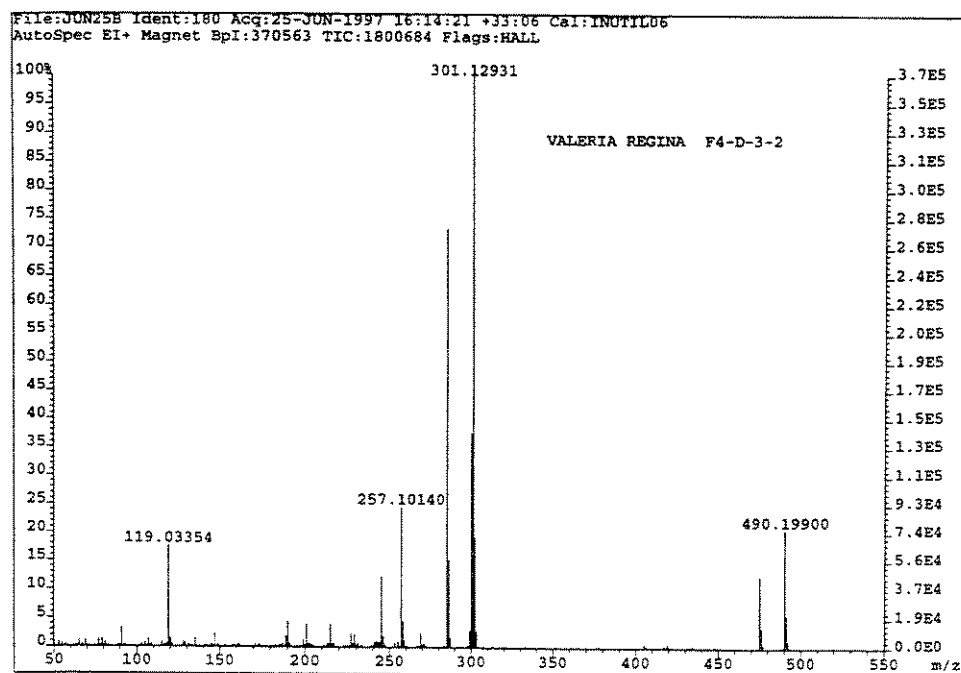
E45b- RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) totalmente acoplado da substância (8) (Ampliações)



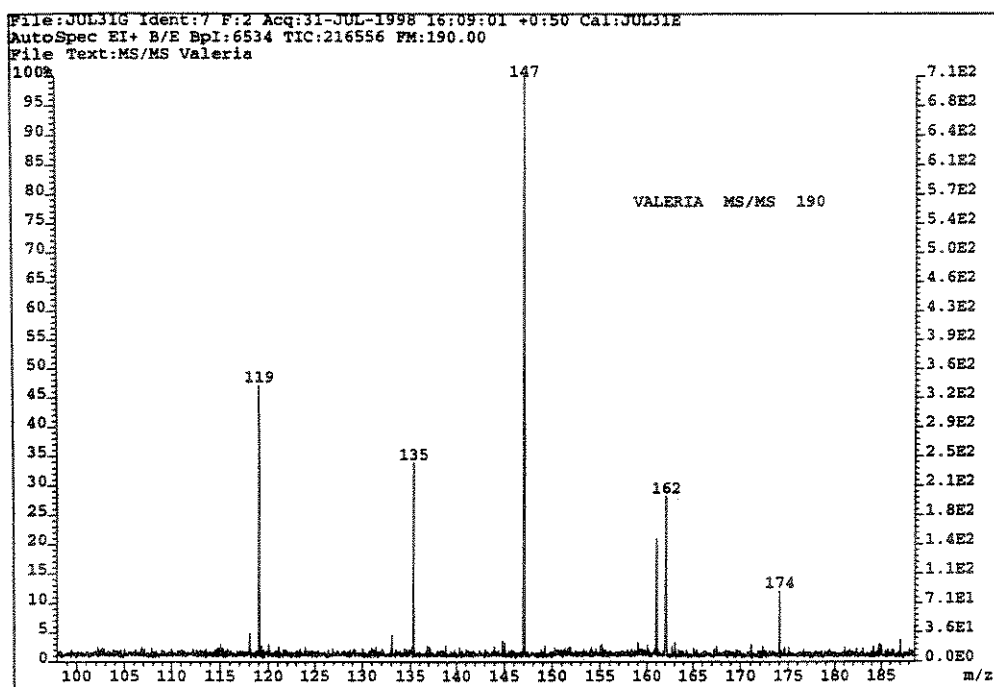
E45c- RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) totalmente acoplado da substância (8) (Ampliações)



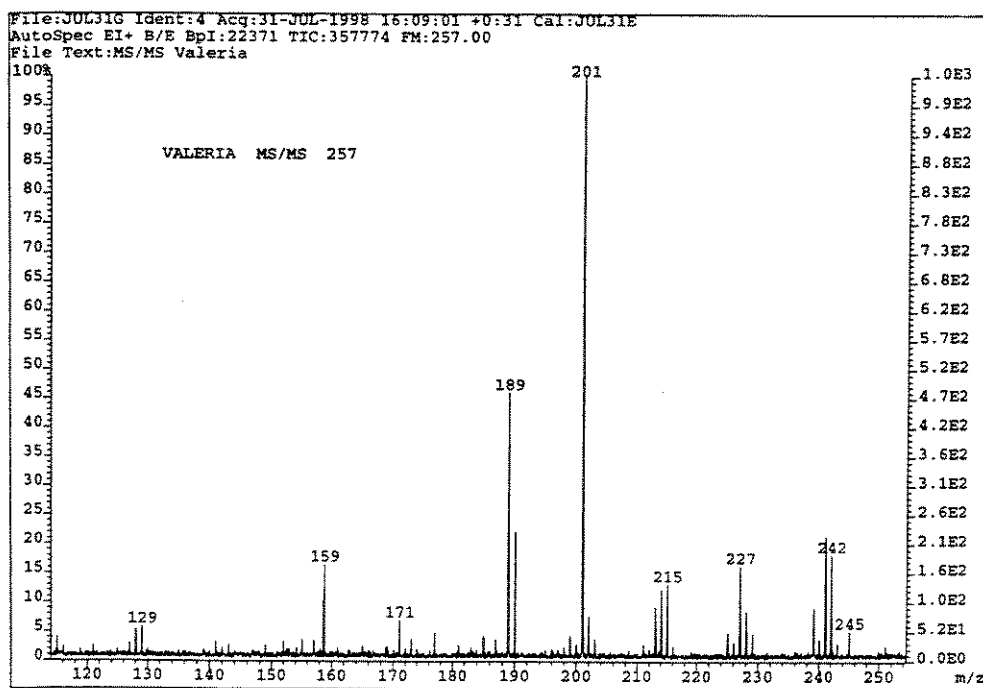
E46-Espectro de massas (IE, 70 eV) da substância (8)



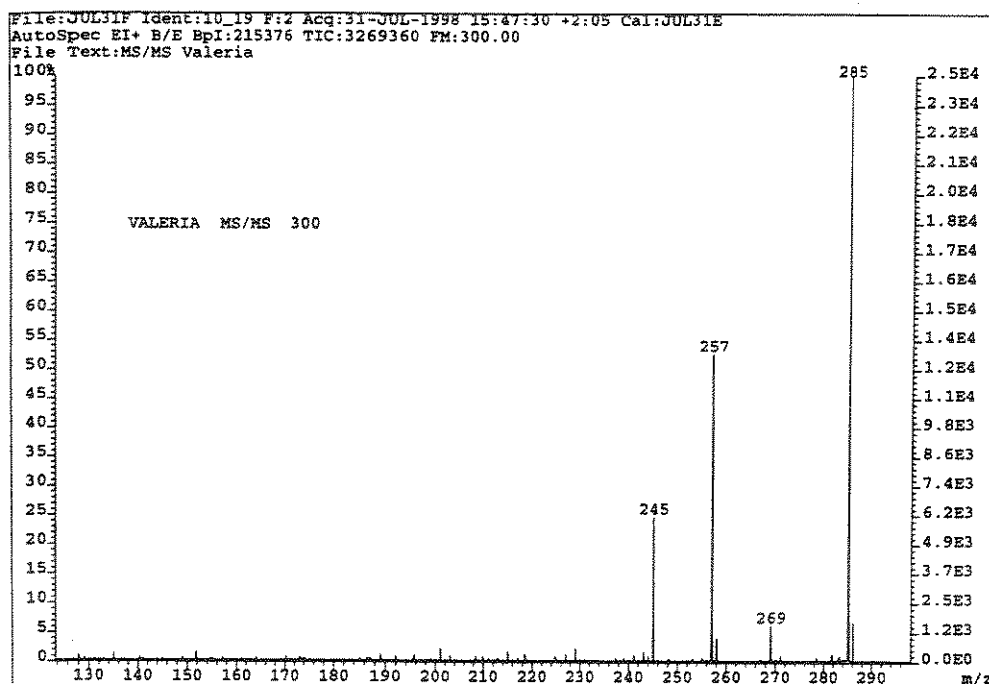
E47-Espectro de massas de alta resolução (IE, 70 eV) da substância (8)



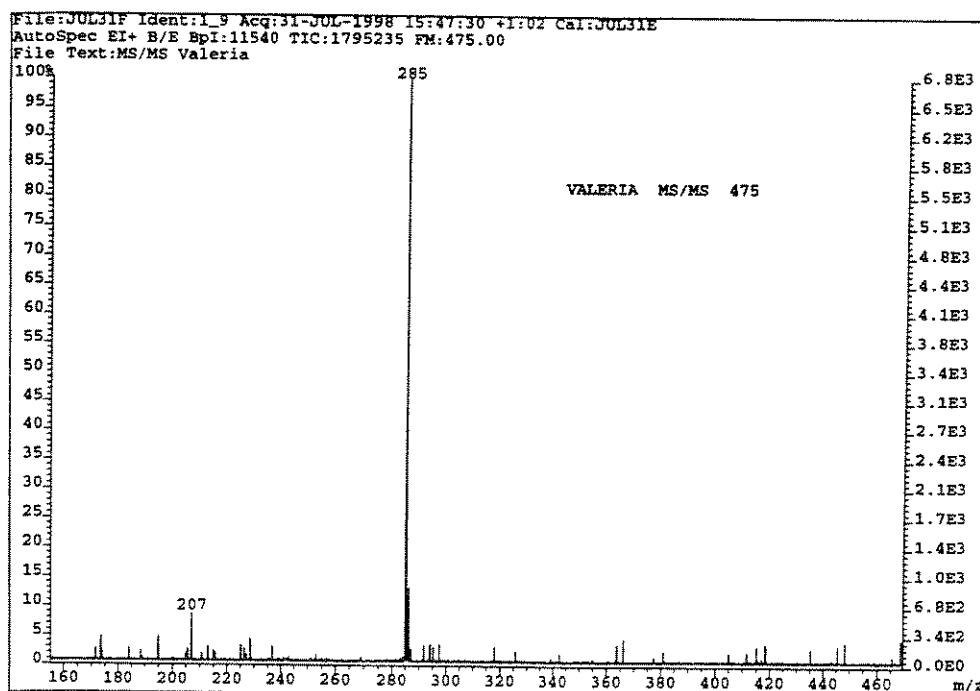
E48-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da substância (8) selecionando o íon de m/z 190



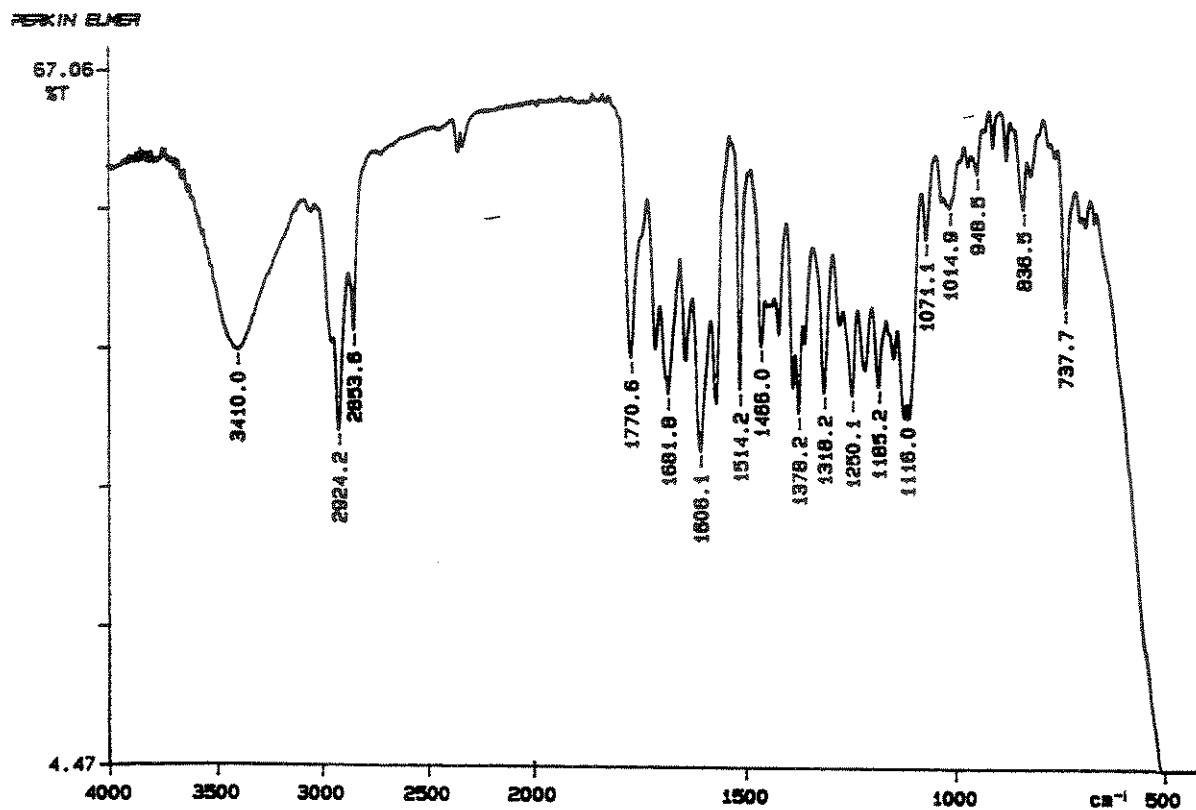
E49-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da substância (8) selecionando o íon de m/z 257



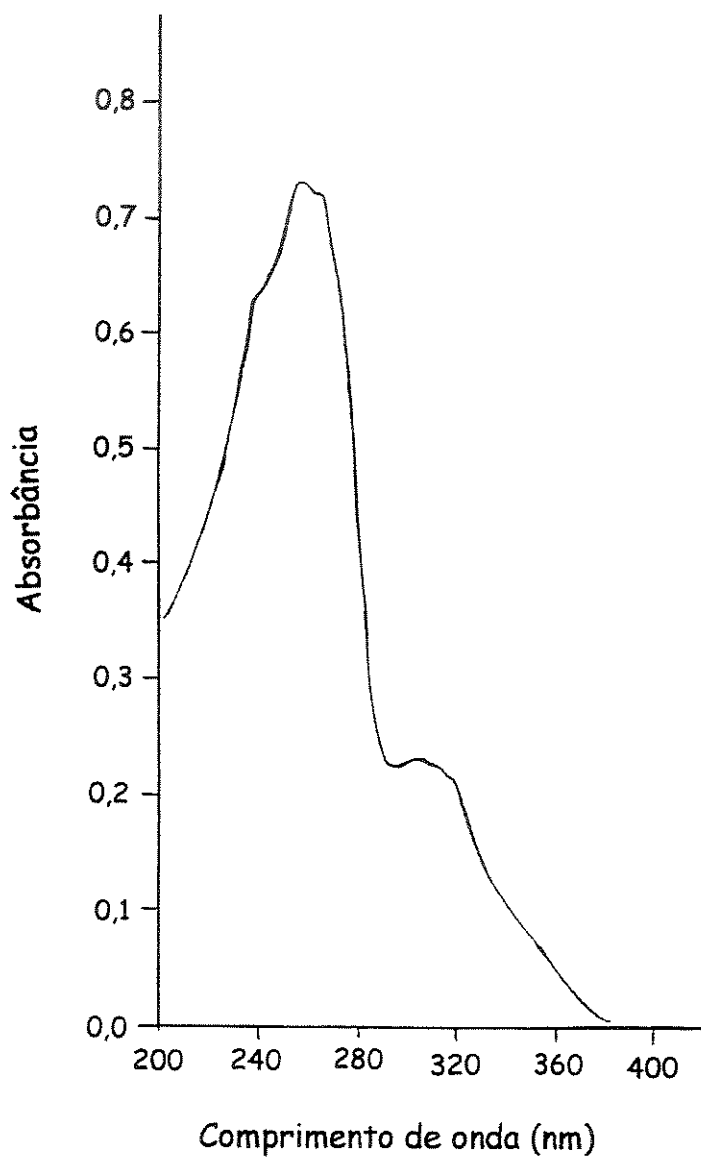
E50-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da substância (8) selecionando o íon de m/z 300

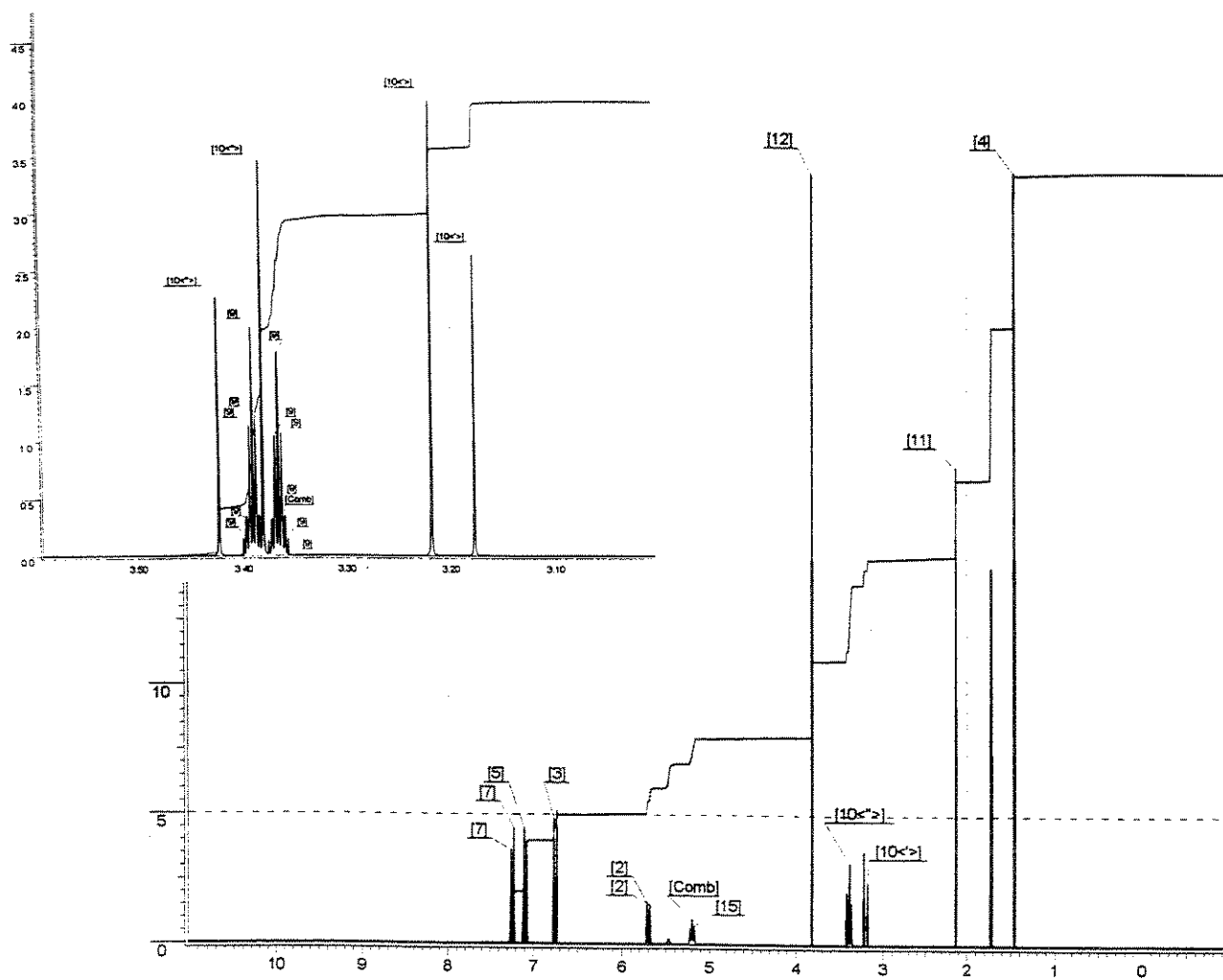
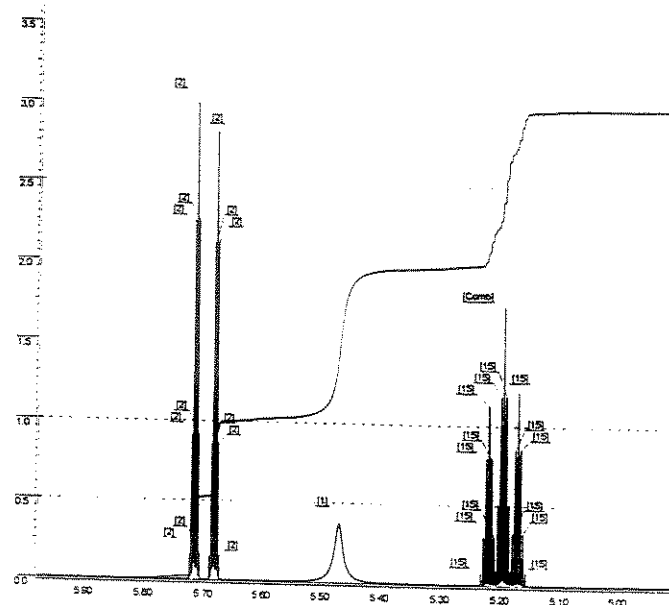


E51-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da substância (8) selecionando o íon de m/z 457

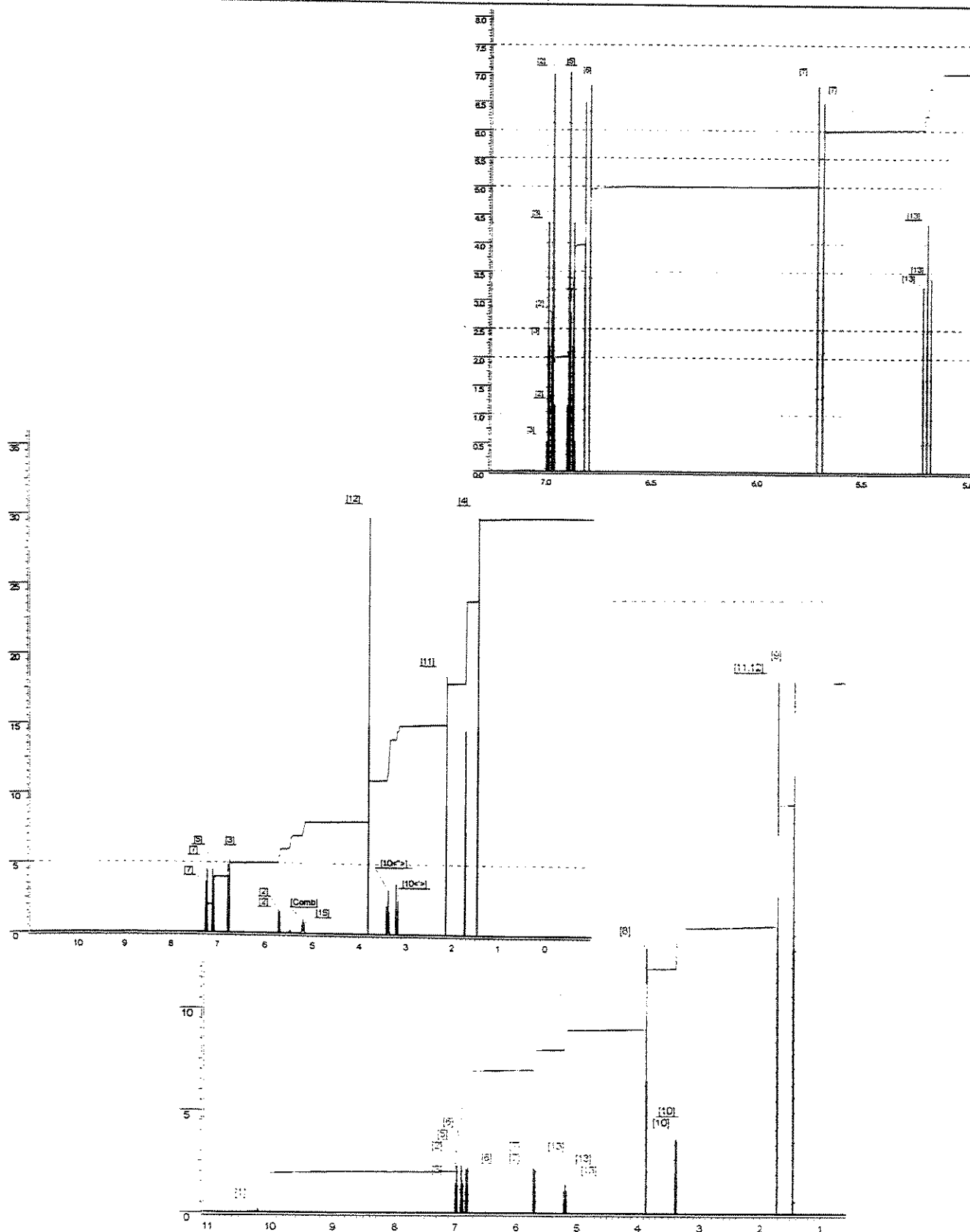


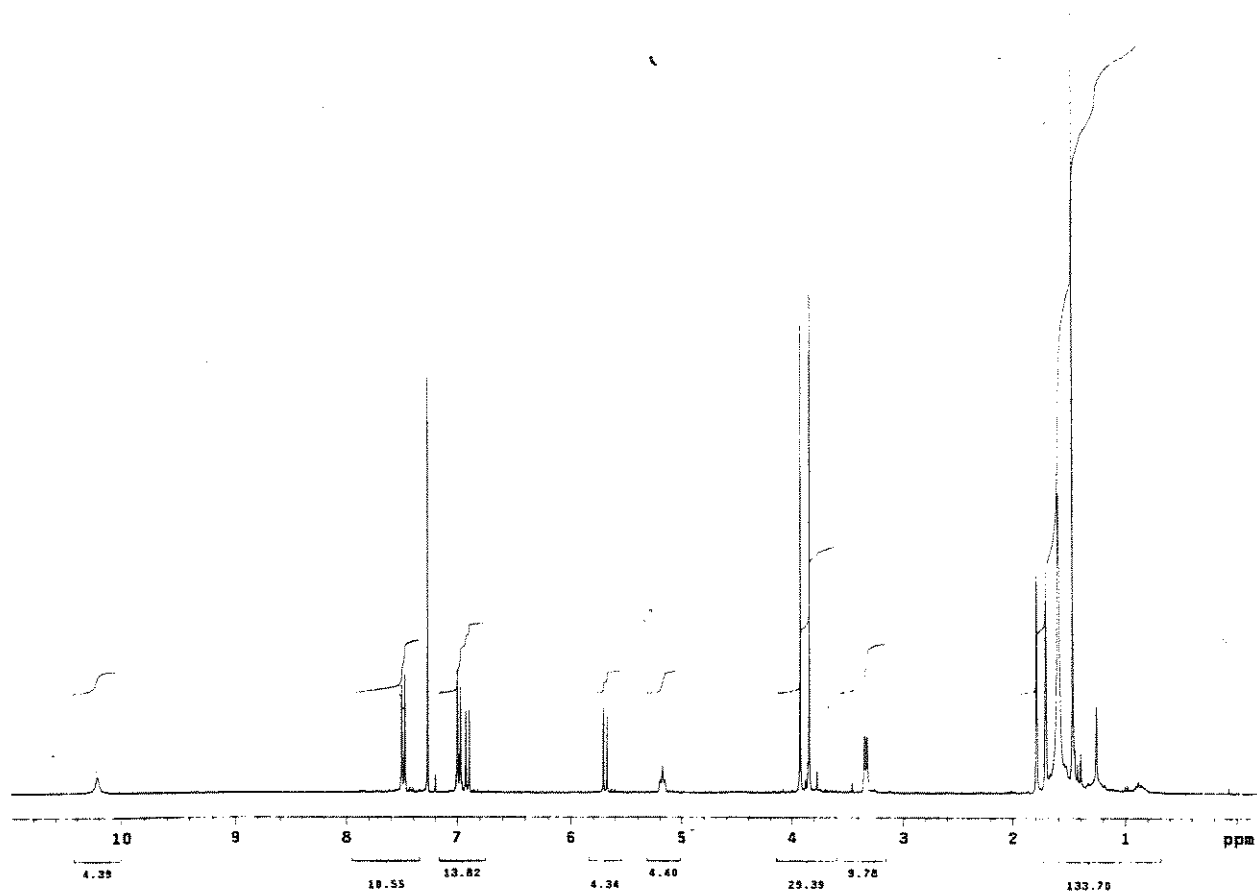
E52-Espectro no IV (cela KBr) da substância (8)

E53-Espectro no UV (CHCl_3) da substância (8)

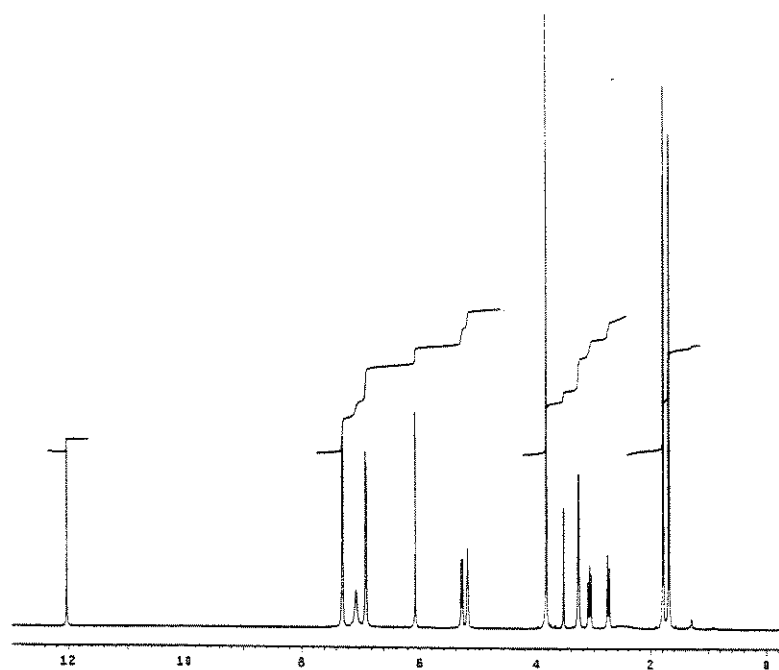
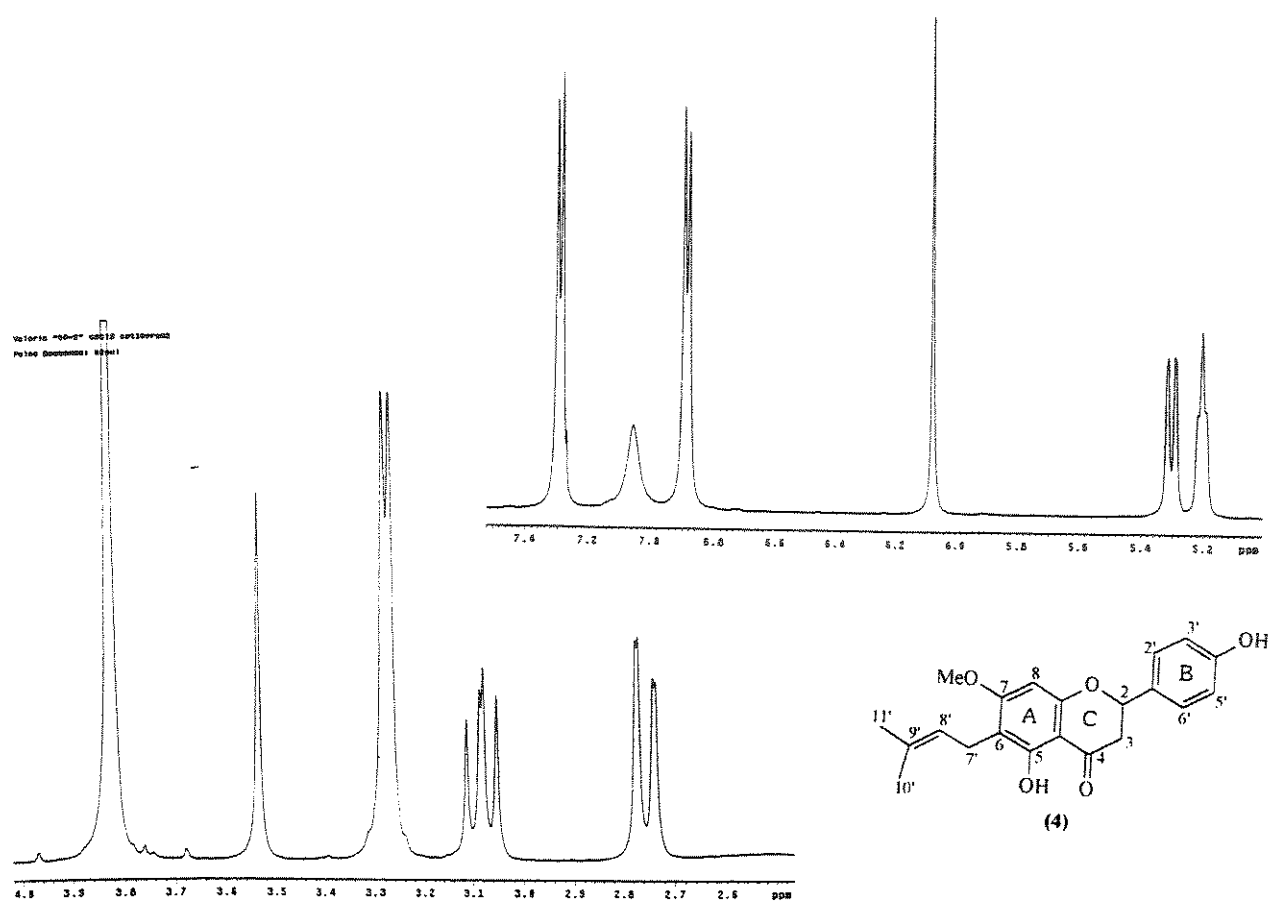


E54-Simulação do Espectro de RMN ^1H da substância (8)

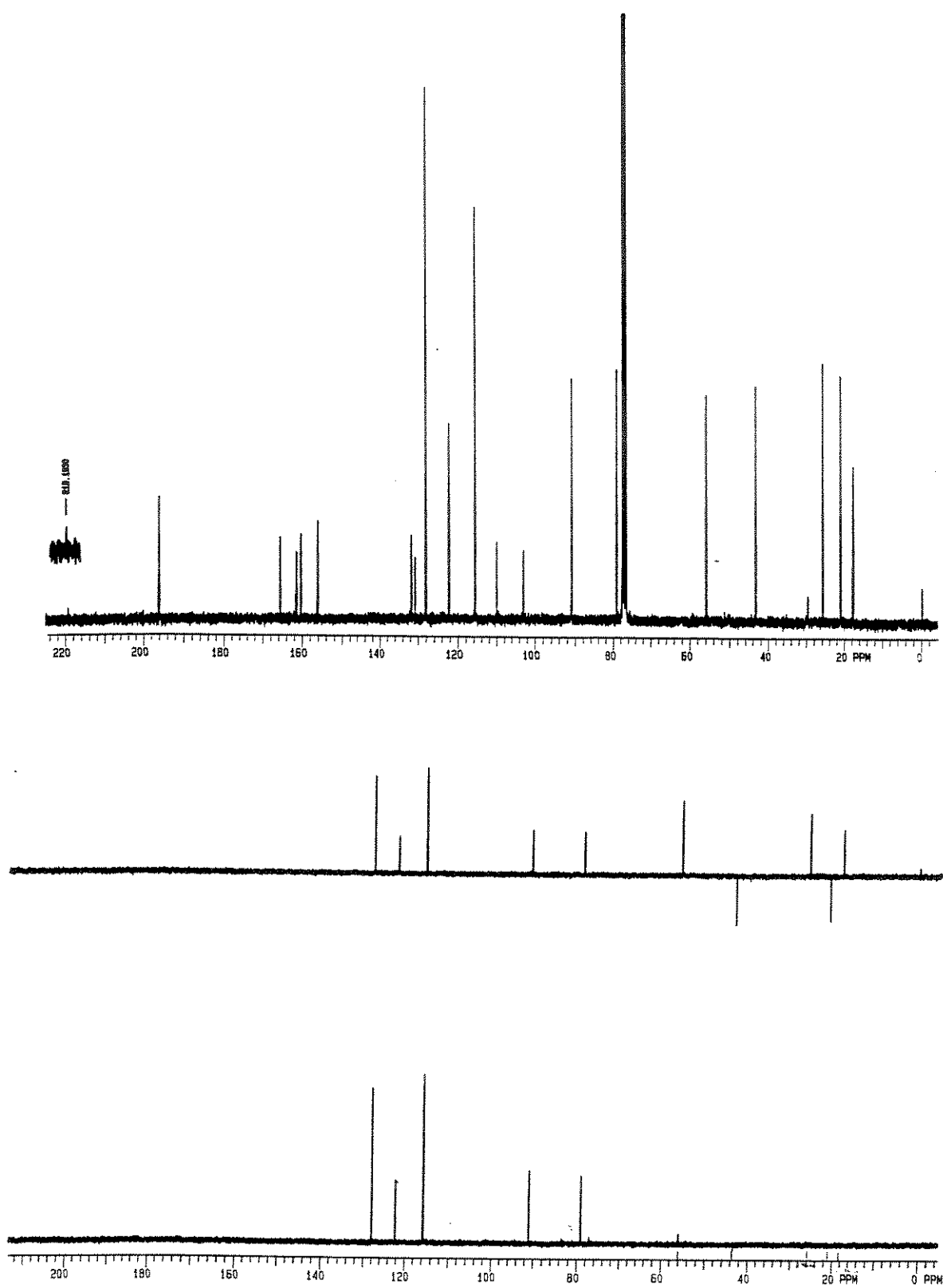
E54a-Simulação do Espectro de RMN ^1H da escandenina (1)



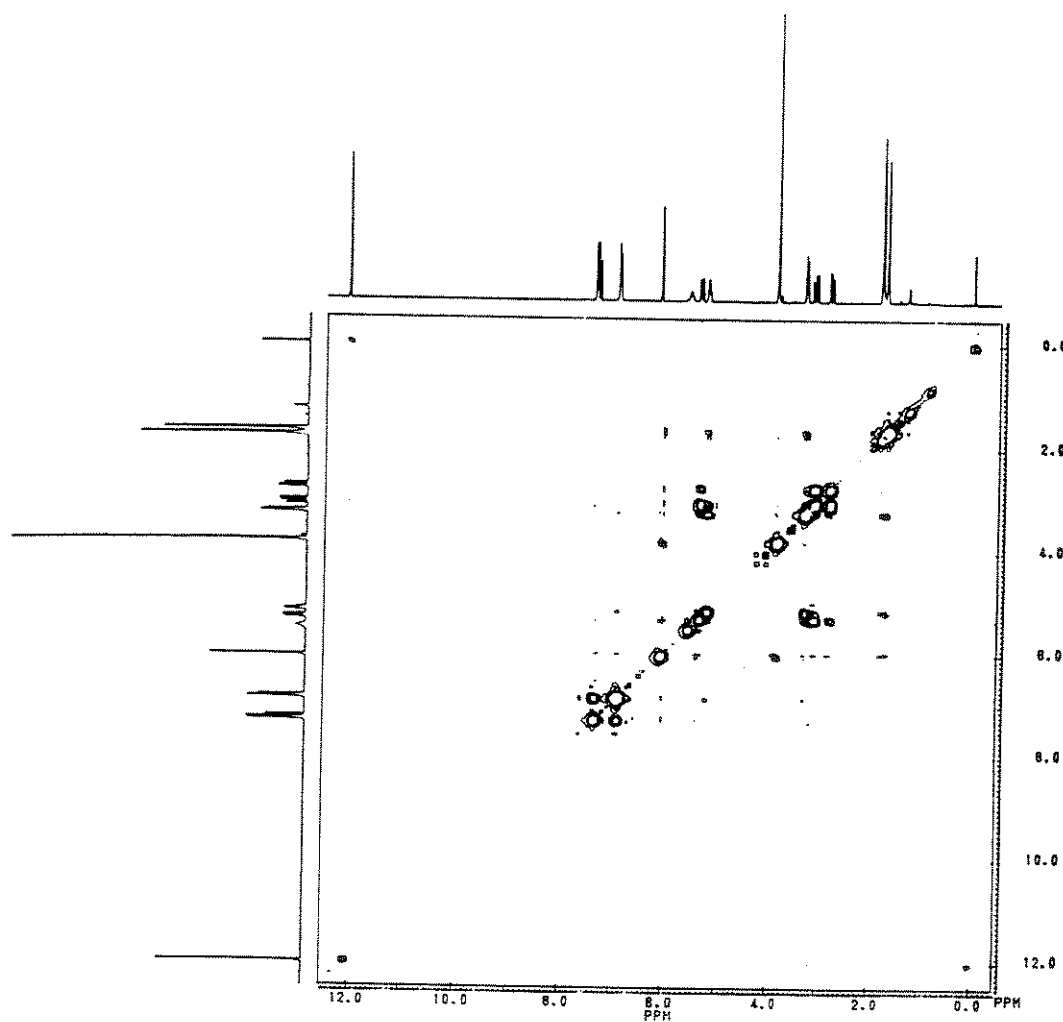
E55- RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da 4'-metoxi escandena (20)

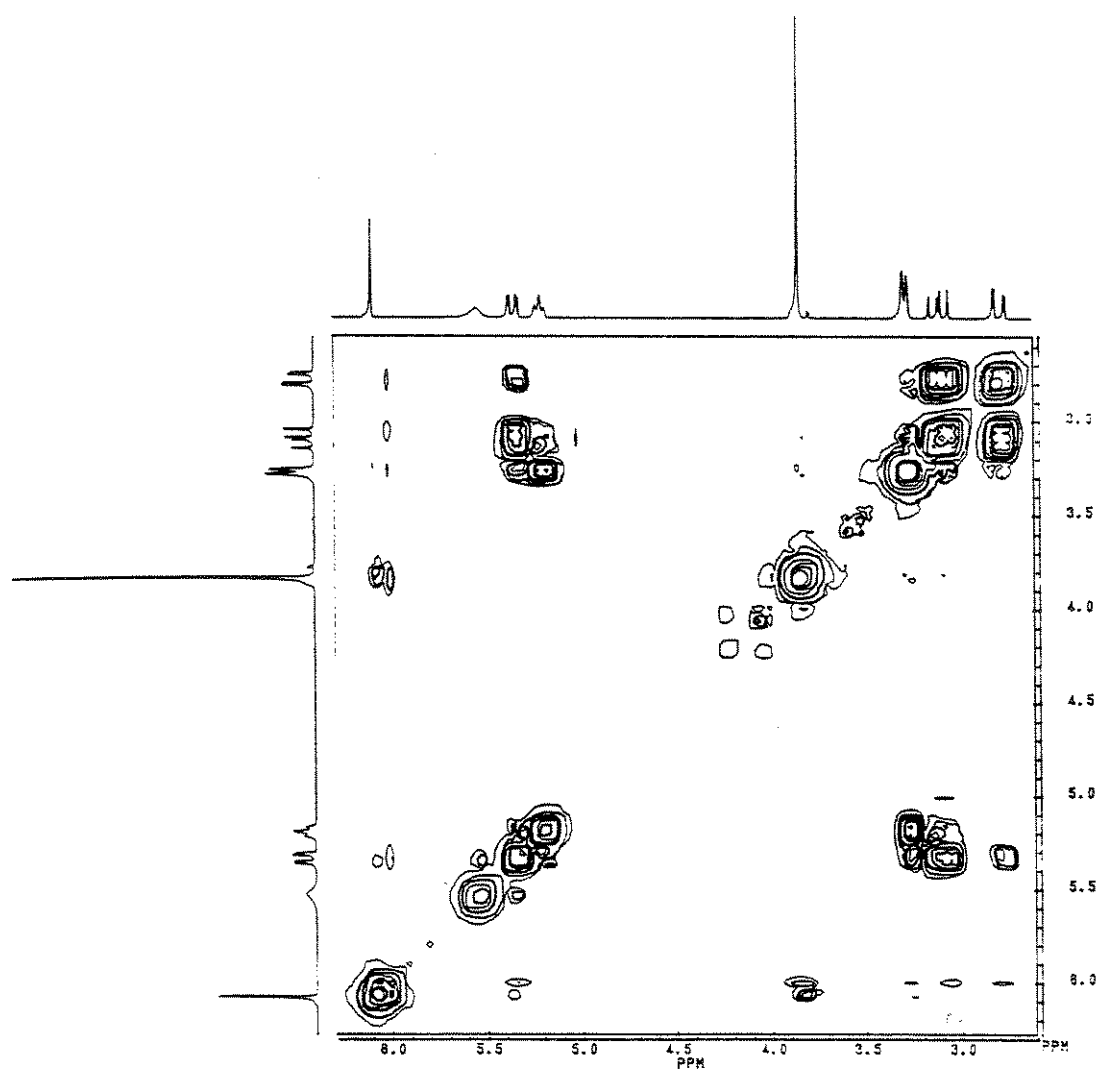


E56-RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS) da flavanona (4)

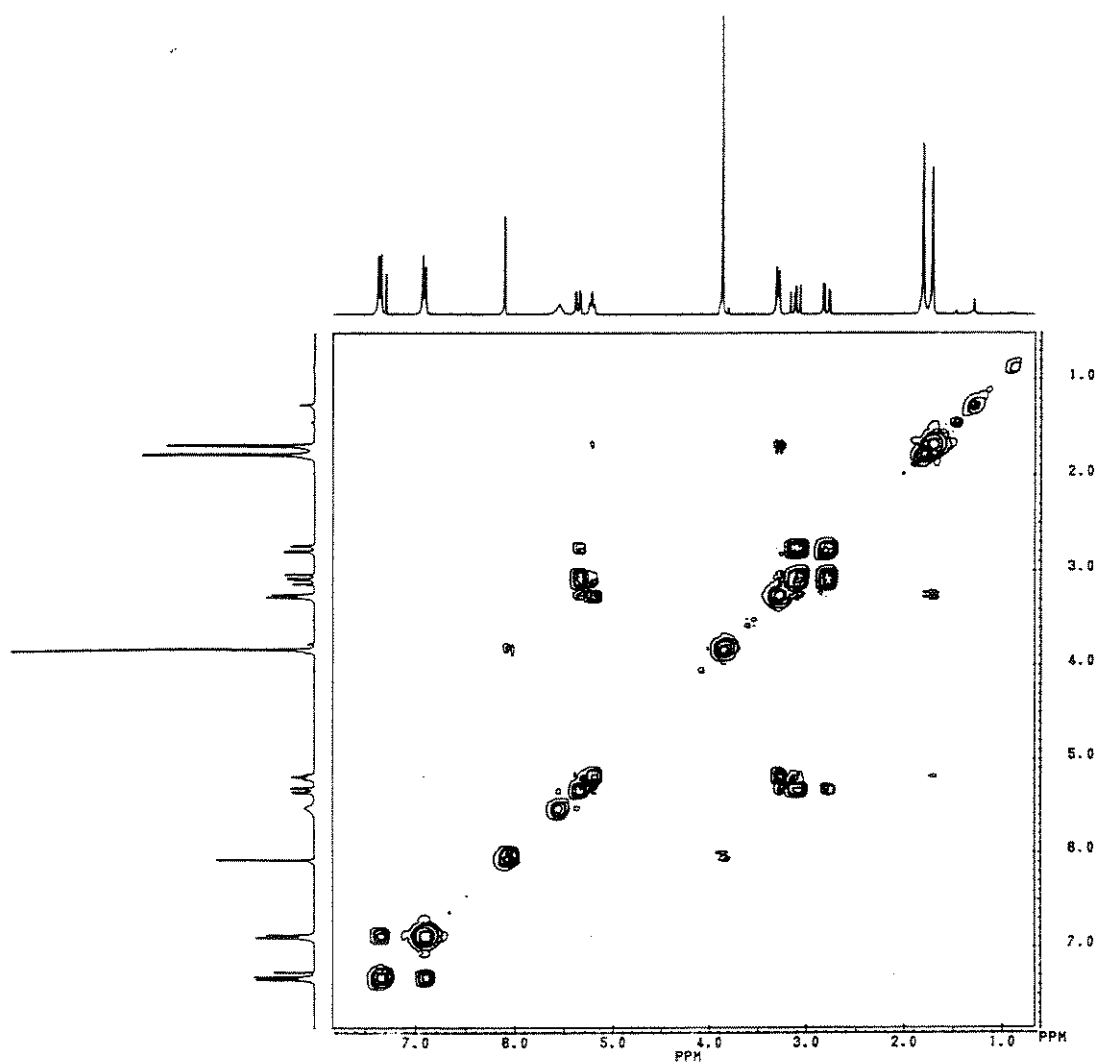


E57-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) da flavanona (4)

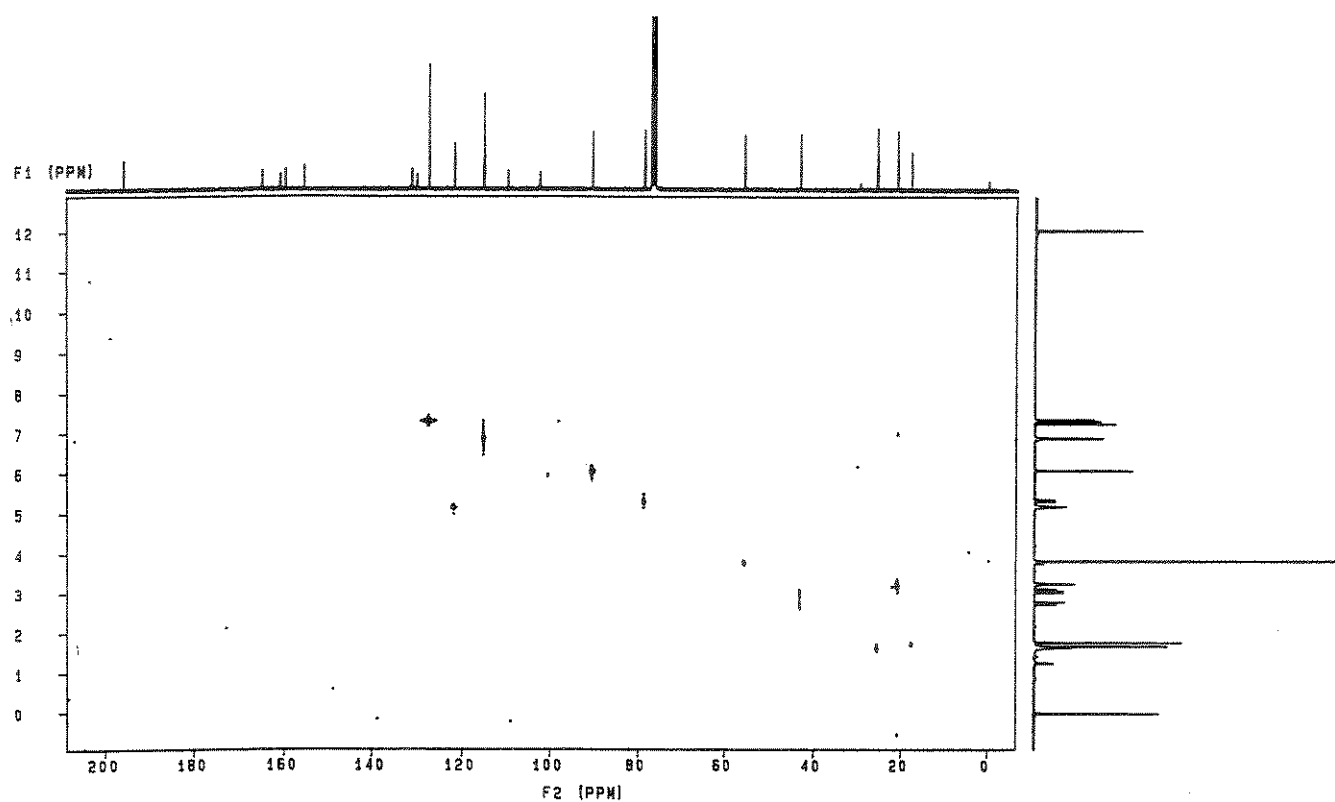
E58- RMN-2D (¹H, ¹H- COSY) da flavanona (4)



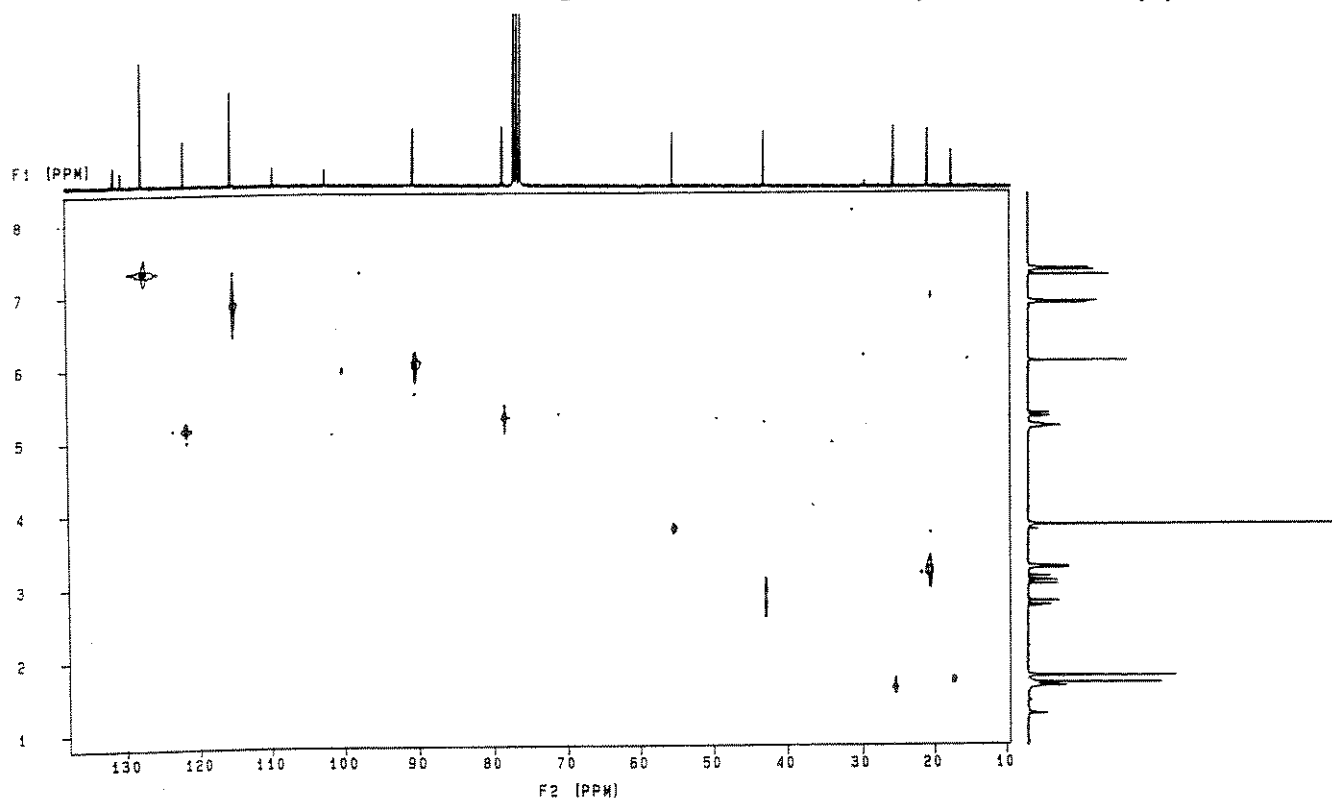
E59- RMN-2D (¹H, ¹H- COSY) da flavanona (4) (Ampliação)



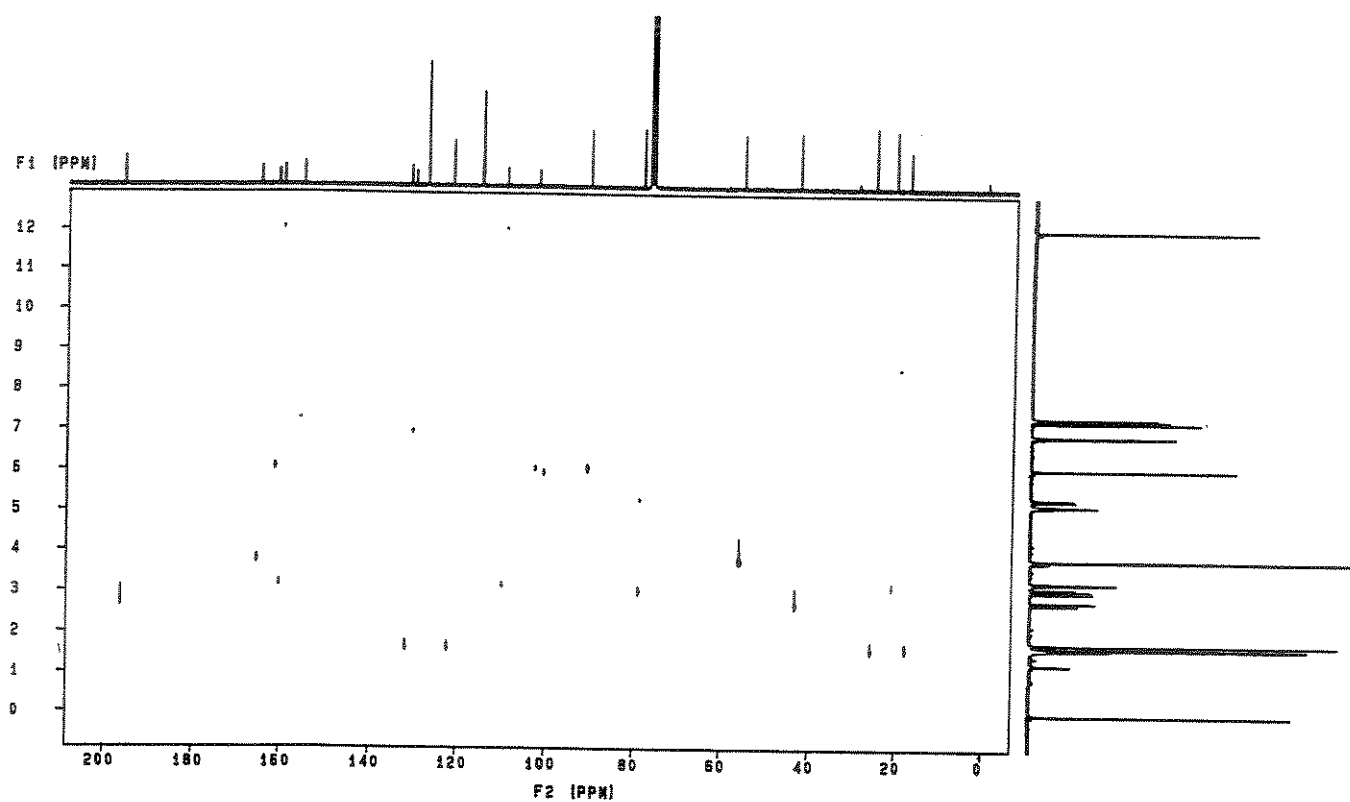
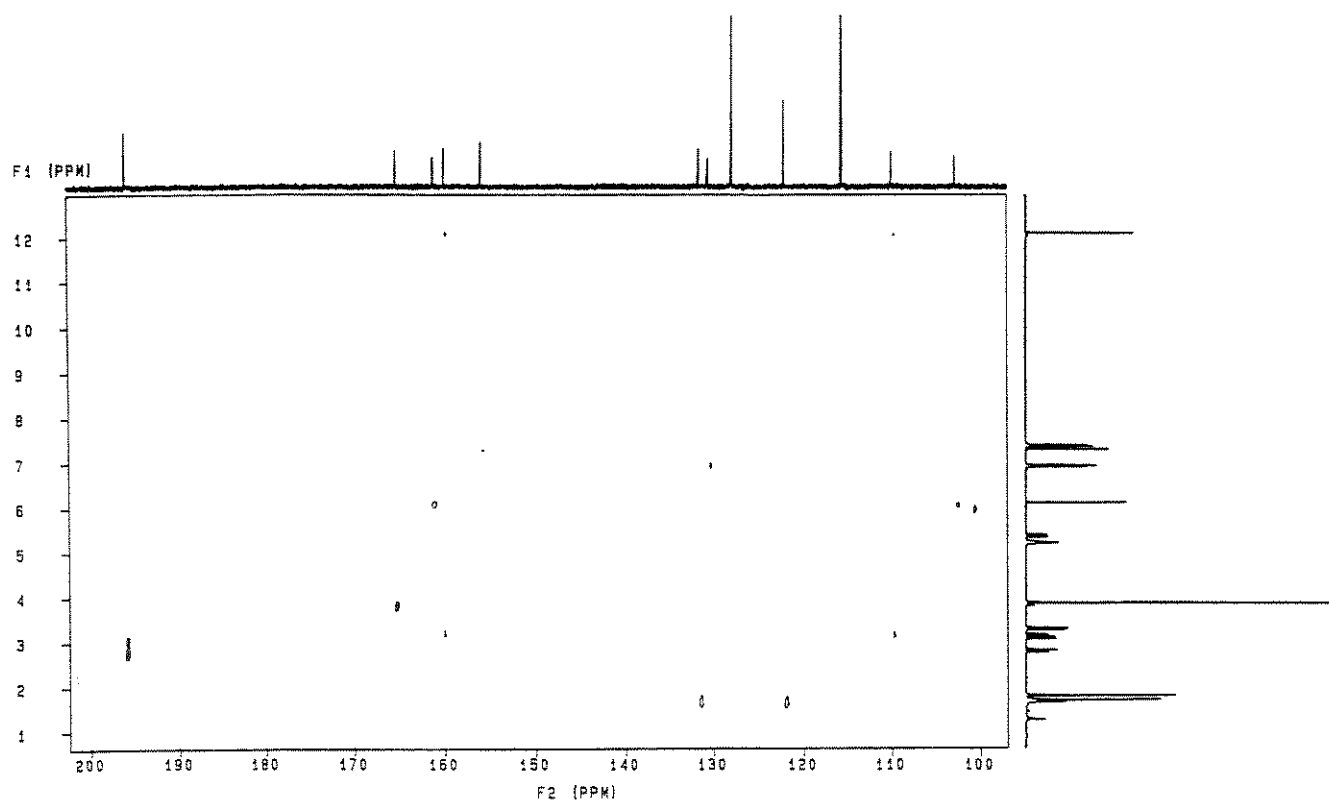
E60- RMN-2D (¹H, ¹H- COSY) da flavanona (4) (Ampliação)

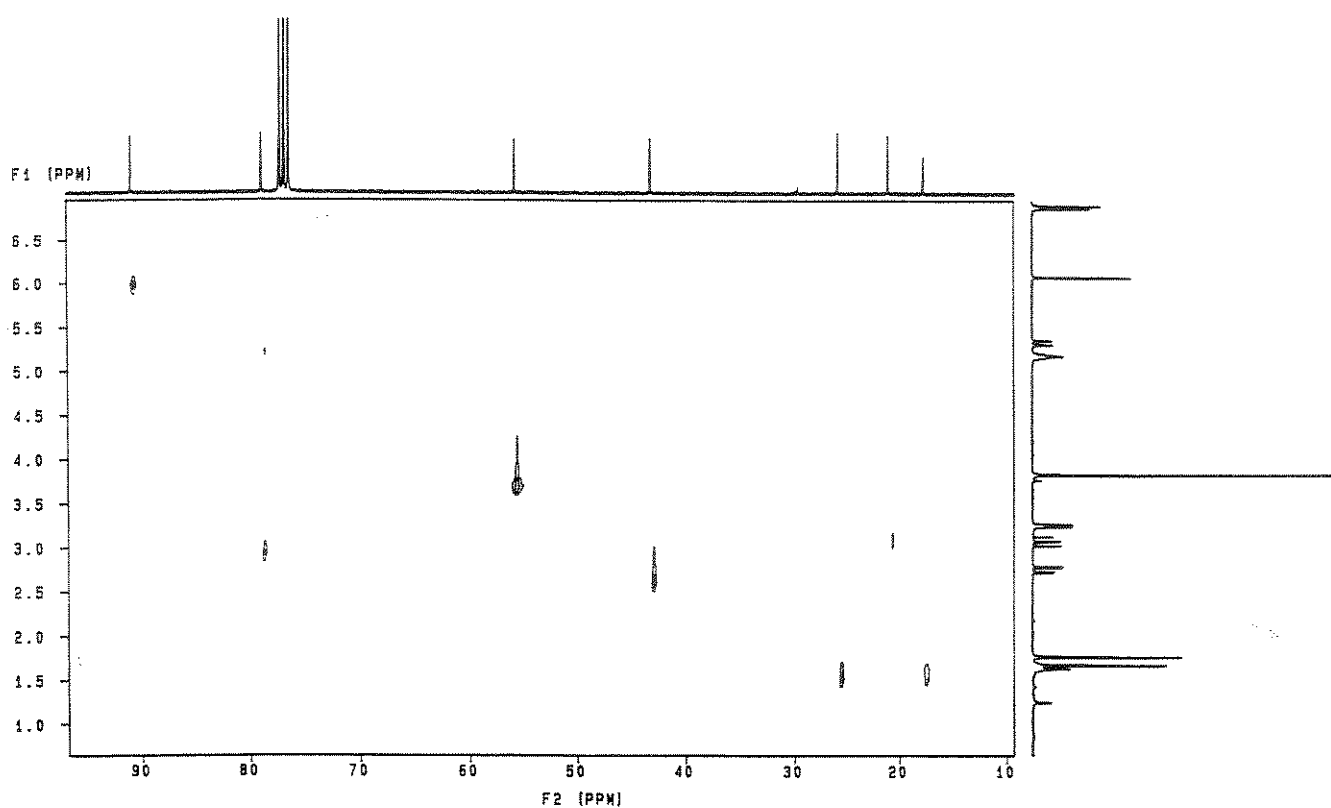


E61- RMN-2D a uma ligação (^1H , ^{13}C - HETCOR) da flavanona (4)

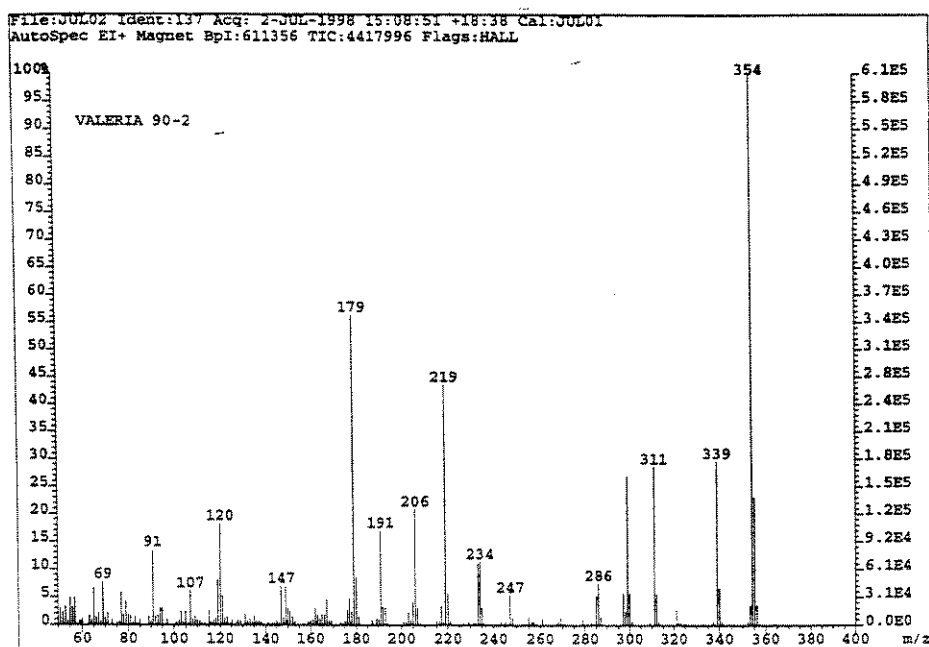


E62- RMN-2D a uma ligação (^1H , ^{13}C - HETCOR) da flavanona (4) (Ampliação)

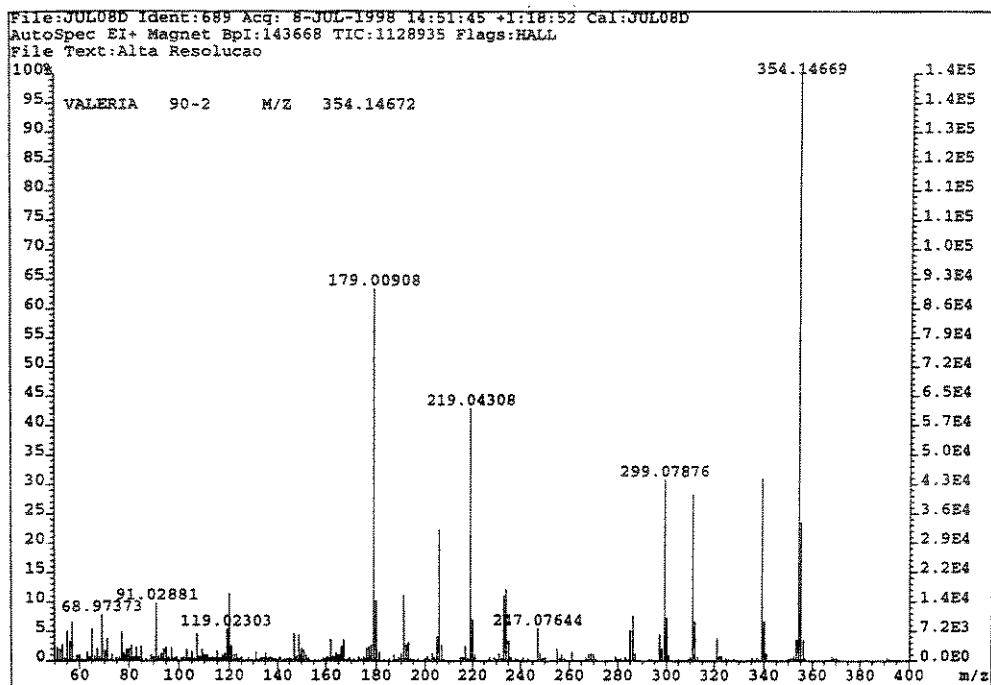
E63- RMN-2D a várias ligações (^1H , ^{13}C - COLOC) da flavanona (4)E64- RMN-2D a várias ligações (^1H , ^{13}C - COLOC) da flavanona (4) (Ampliação)



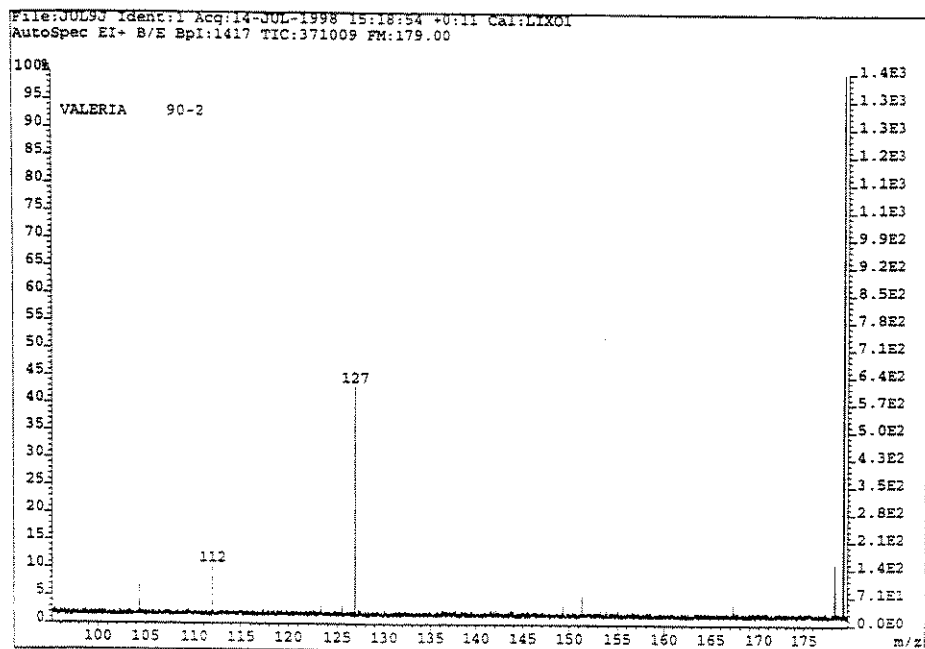
E65- RMN-2D a várias ligações (^1H , ^{13}C - COLOC) da flavanona (4) (Ampliação)



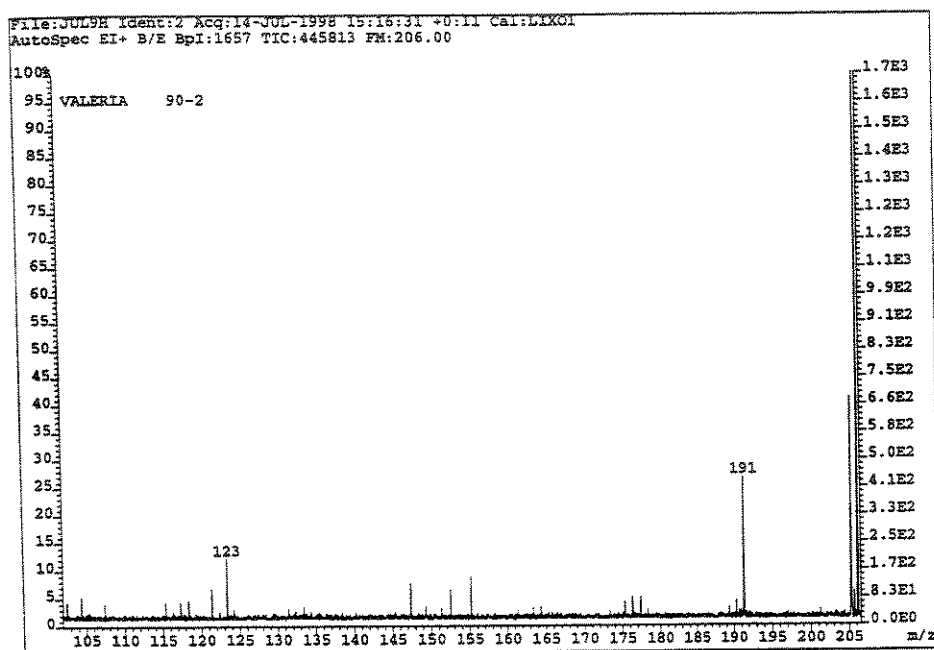
E66-Espectro de massas (IE, 70 eV) da flavanona (4)



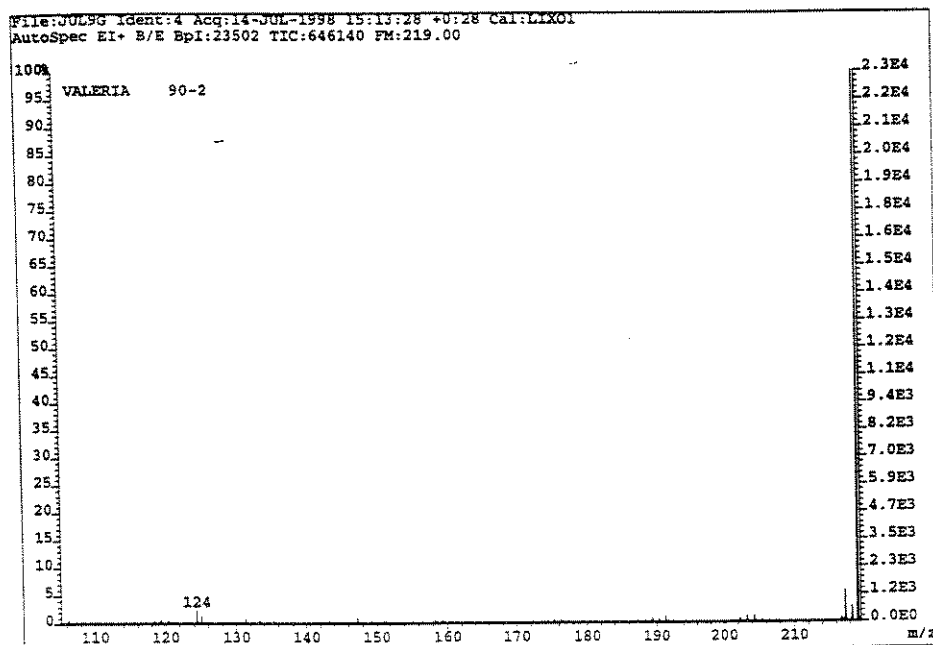
E67-Espectro de massas de alta resolução (IE, 70 eV) da flavanona (4)



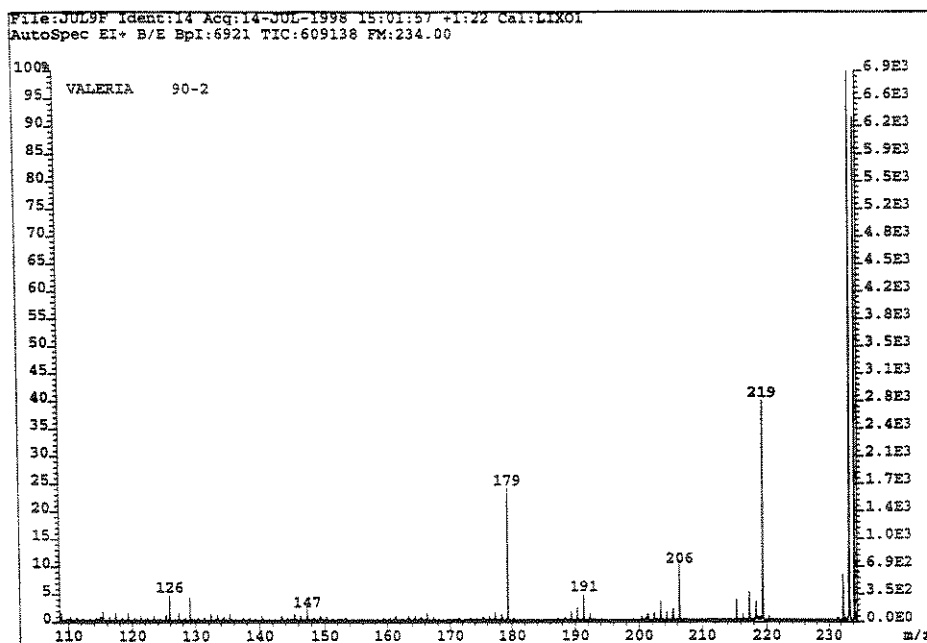
E68-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da flavanona (4)
 selecionando o íon de m/z 179



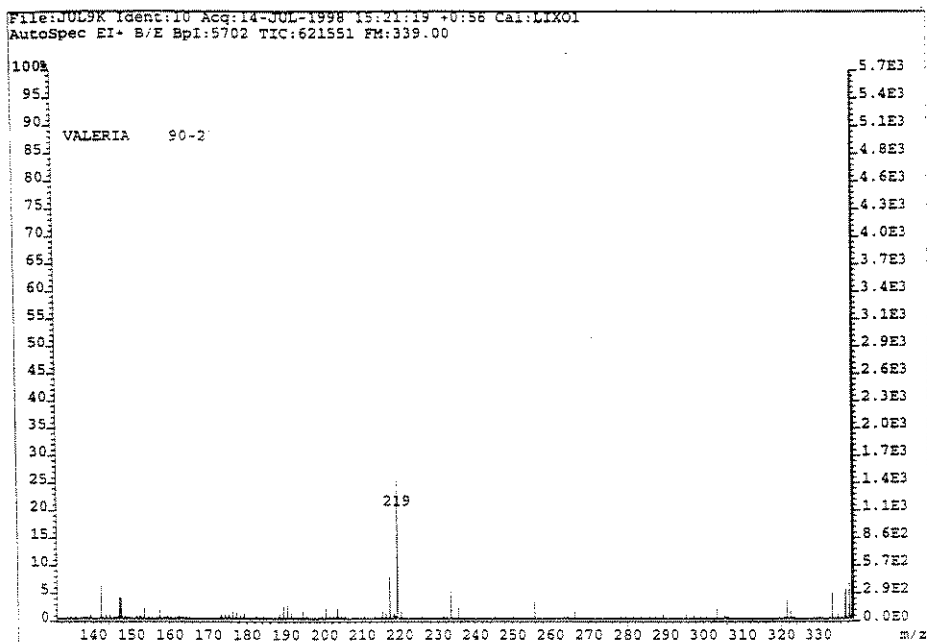
E69-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da flavanona (4)
selecionando o íon de m/z 206



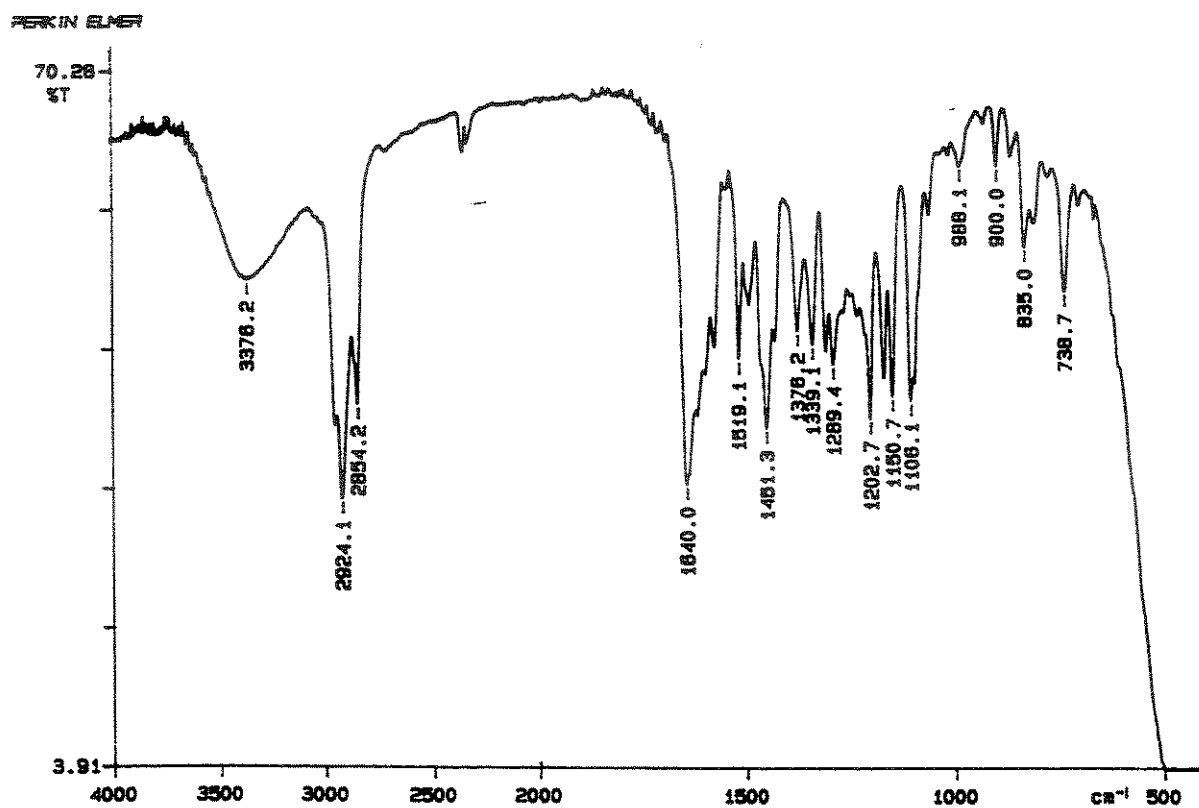
E70-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da flavanona (4)
selecionando o íon de m/z 219



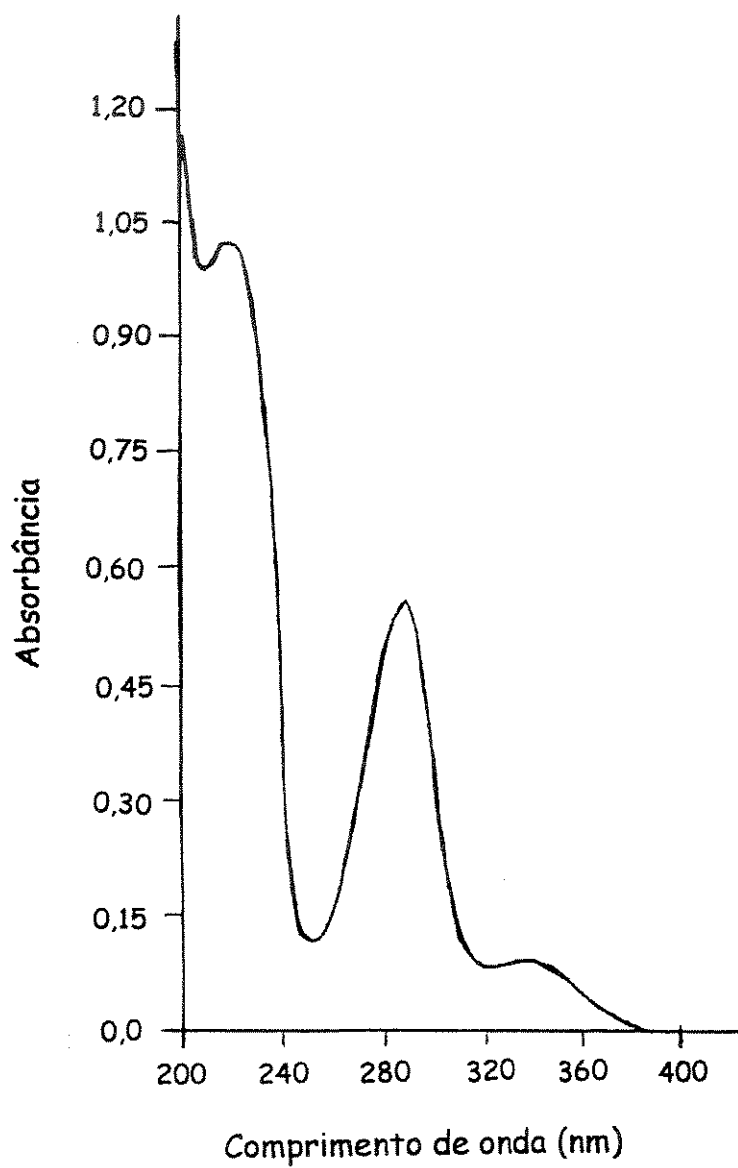
E71-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da flavanona (4)
selecionando o íon de m/z 234



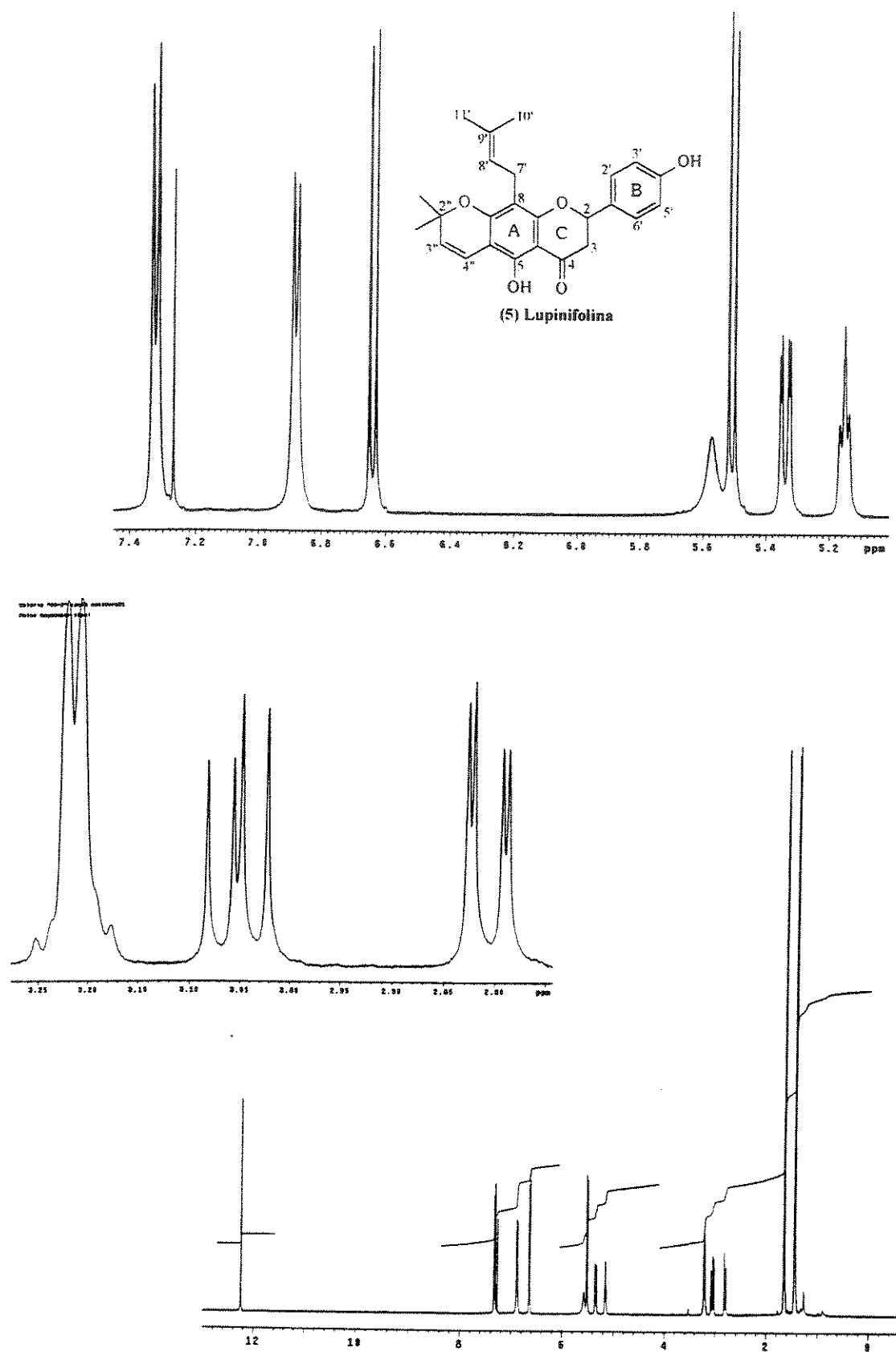
E72-Espectro de massas do experimento EM/EM (IE, 70 eV) da flavanona (4)
selecionando o íon de m/z 339

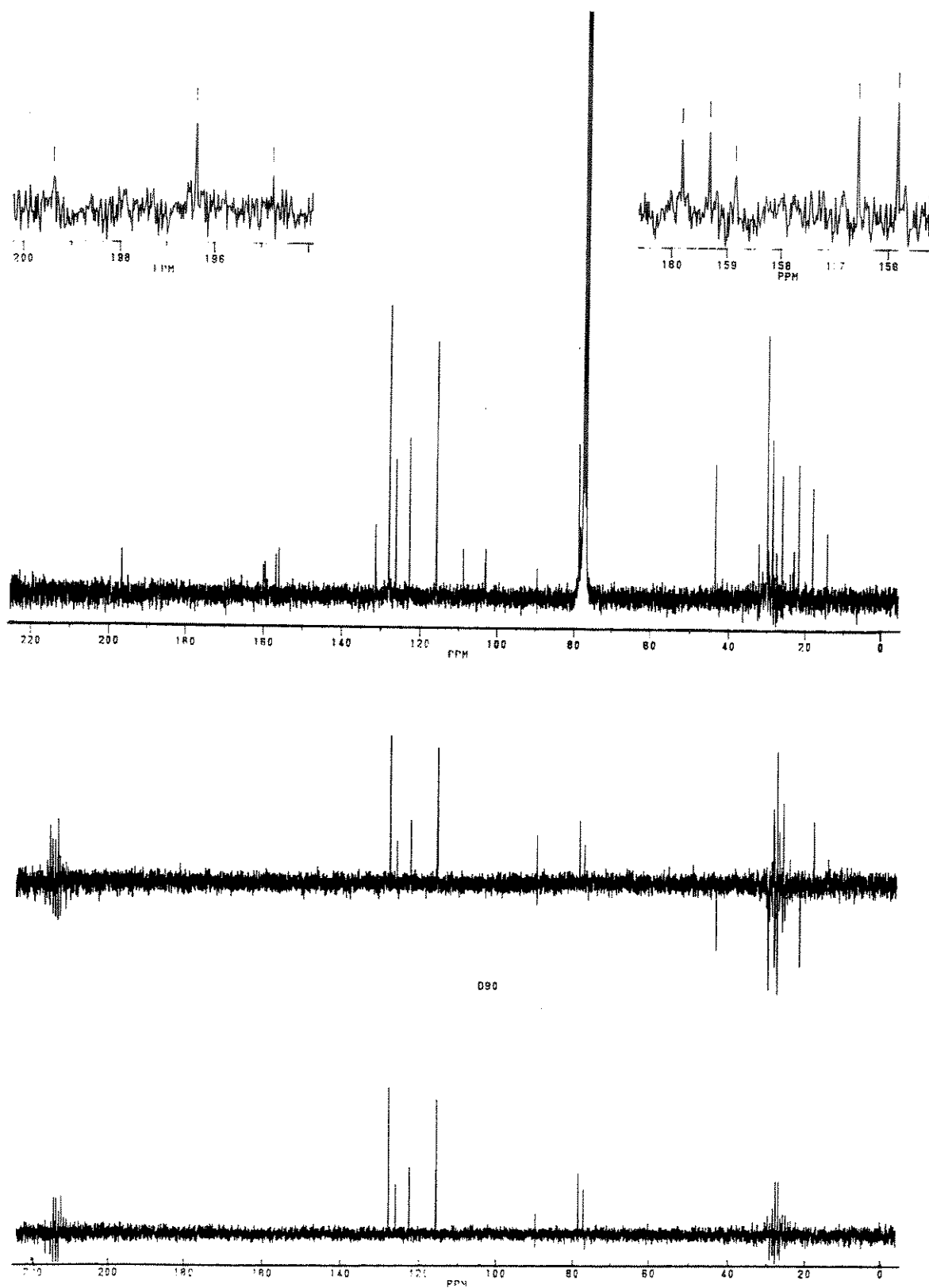


E73-Espectro no IV (cela KBr) da flavanona (4)

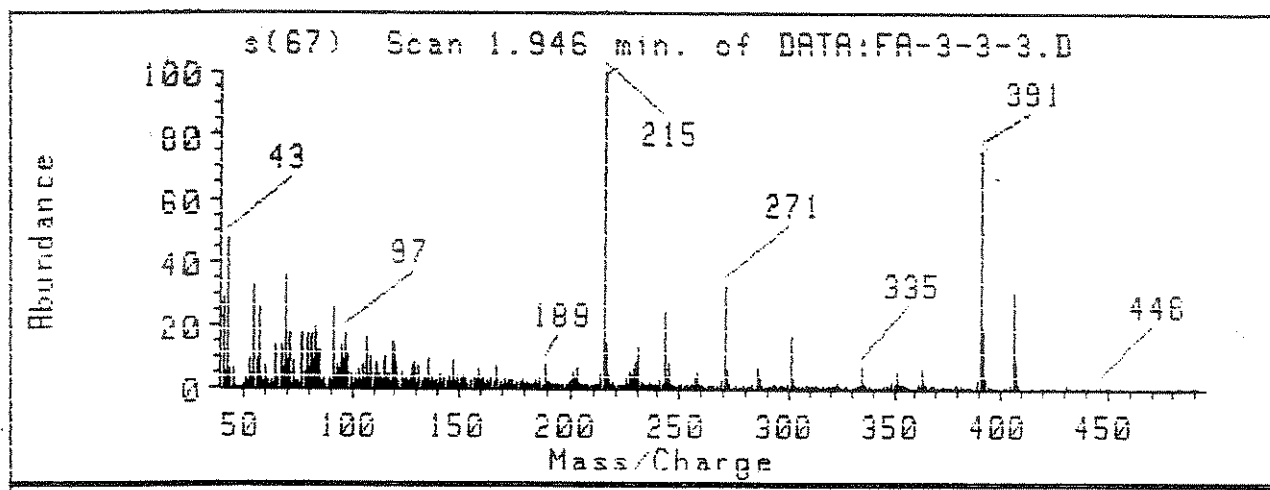


E74- Espectro no UV (MeOH) da flavanona (4)

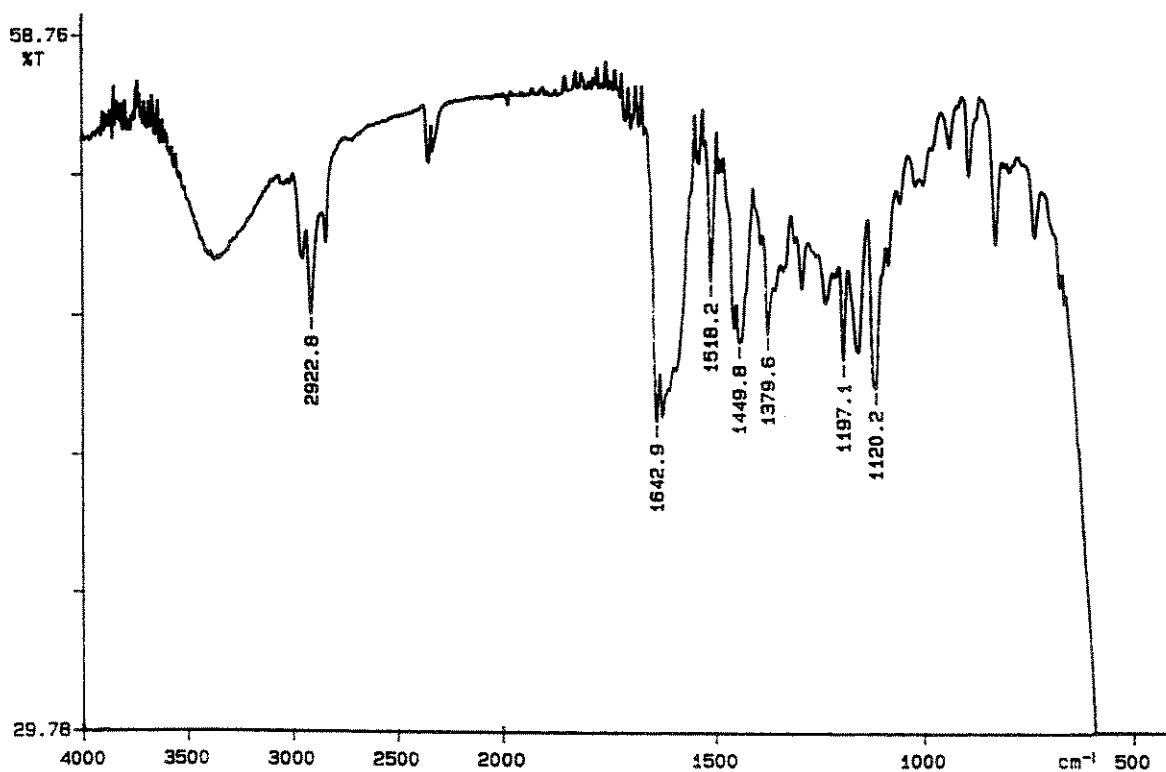
E75-RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3/TMS) da lupinifolina (5)



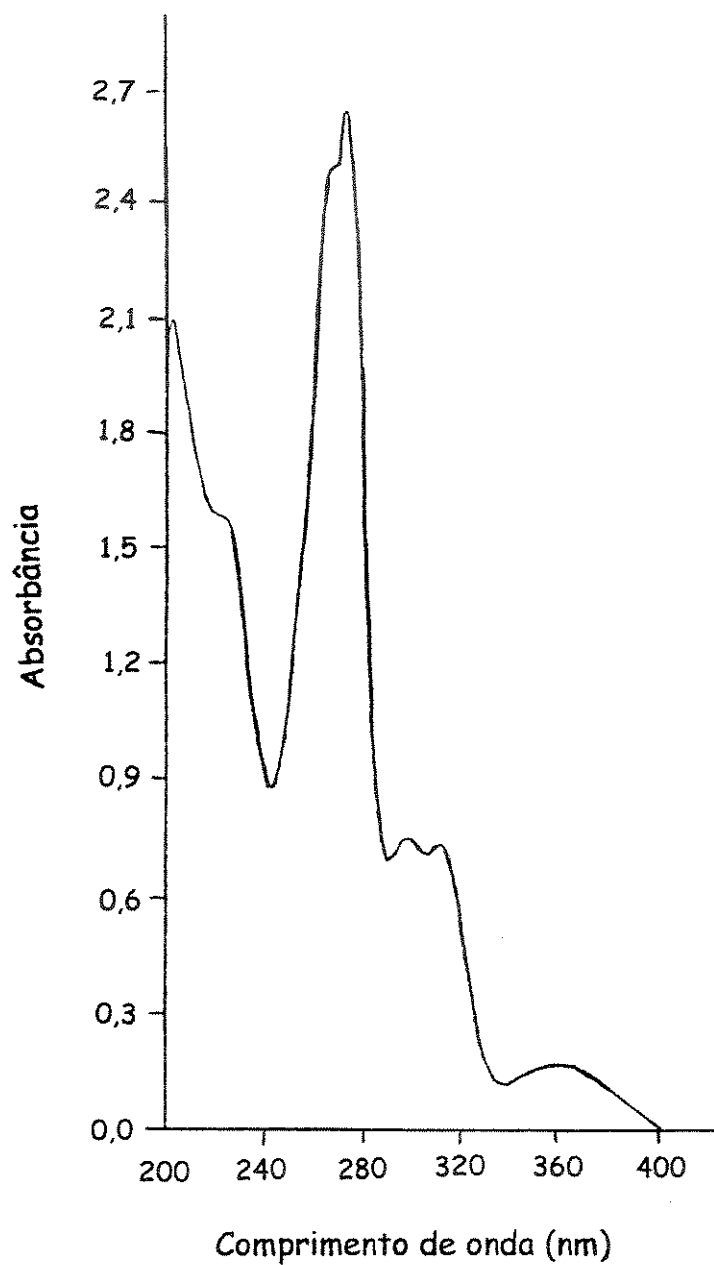
E76-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) da lupinifolina (5)



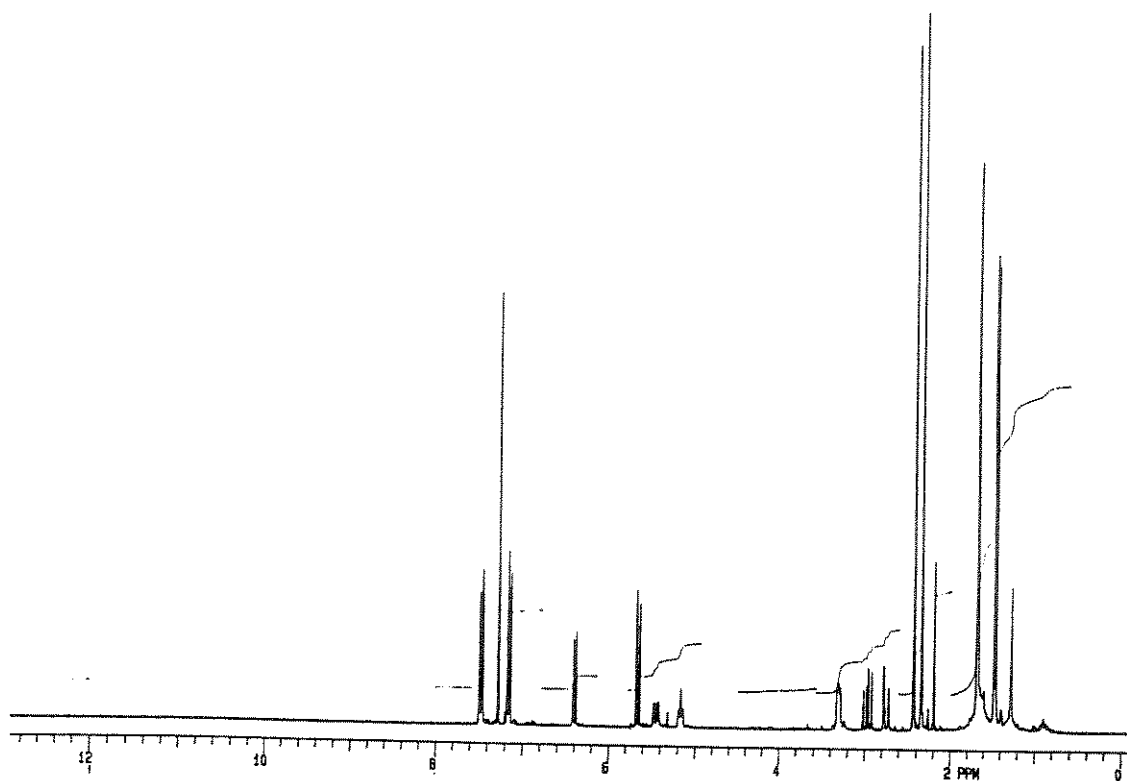
E77-Espectro de massas (IE, 70 eV) da lupinifolina (5)



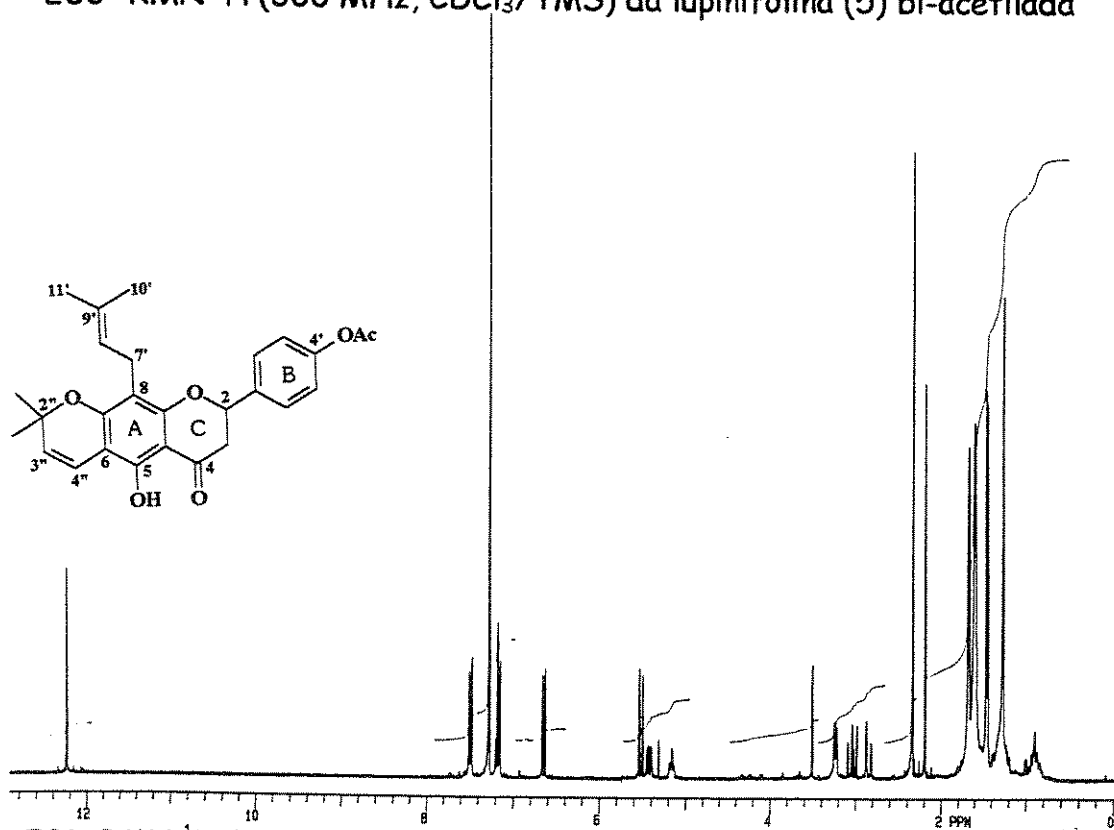
E78-Espectro no IV (cela KBr) da lupinifolina (5)



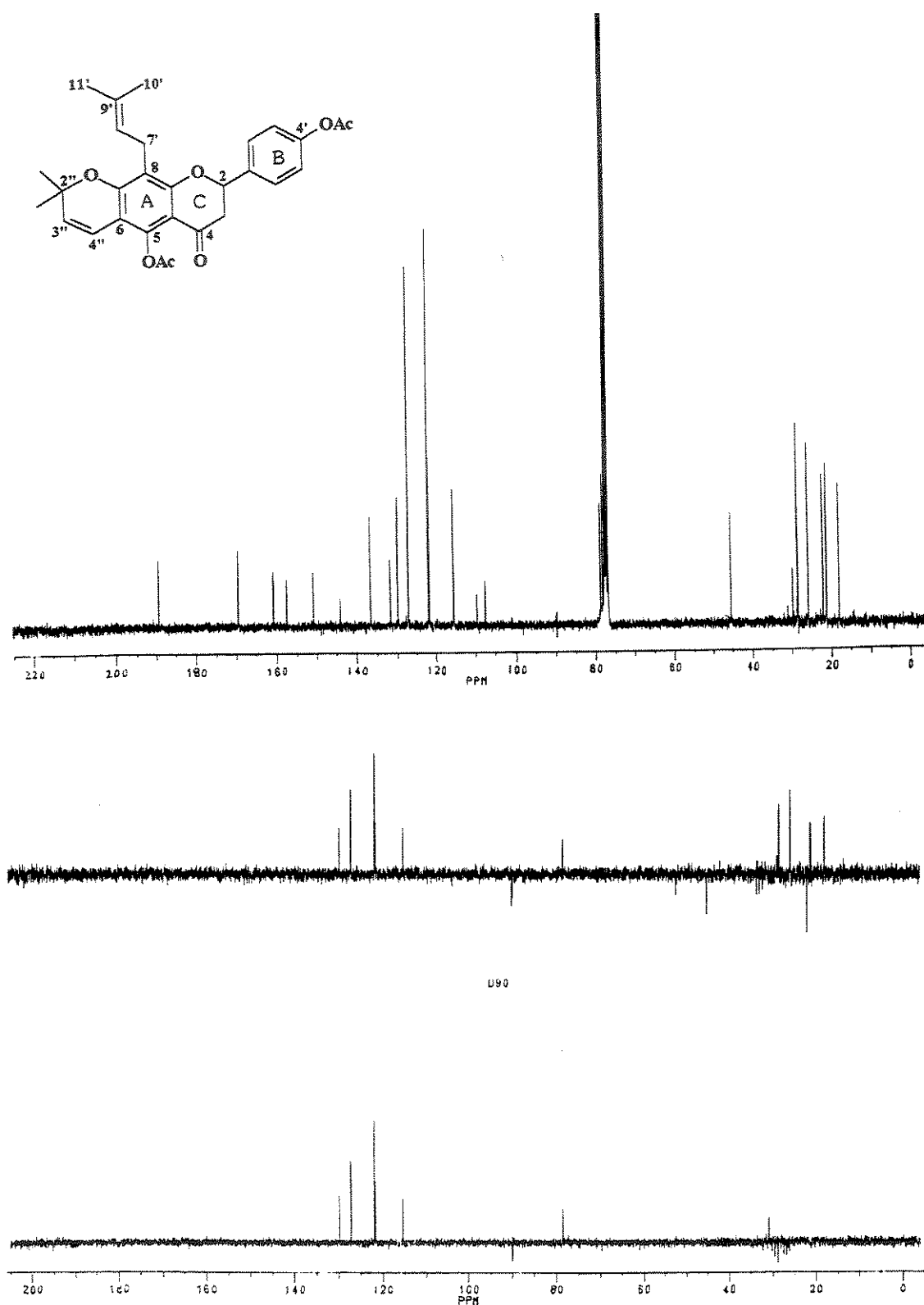
E79-Espectro no UV (MeOH) da lupinifolina (5)



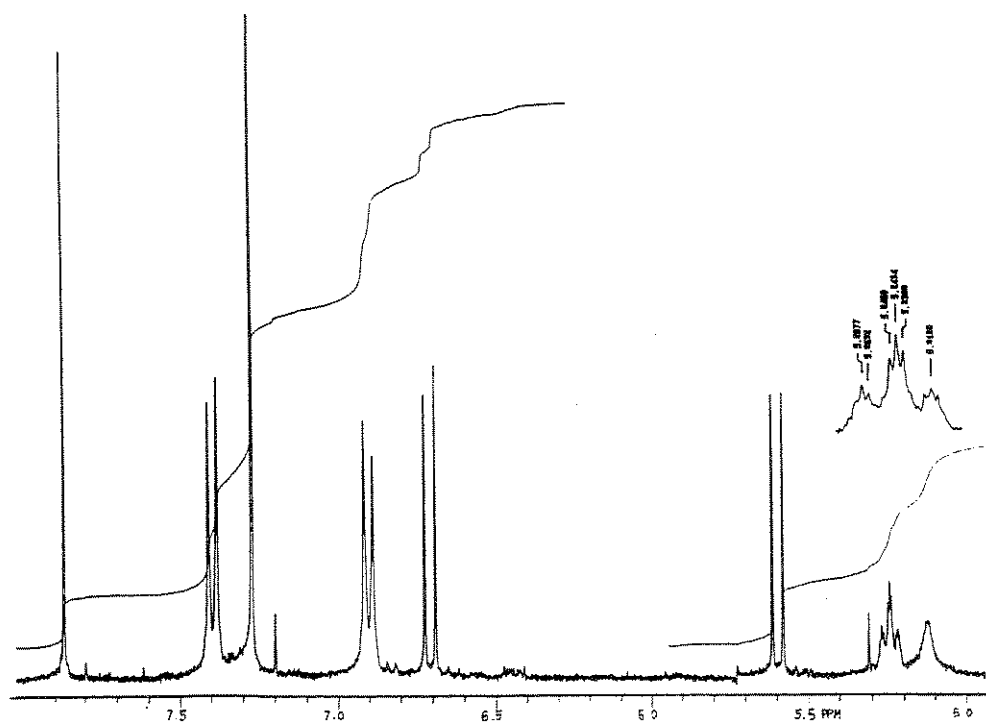
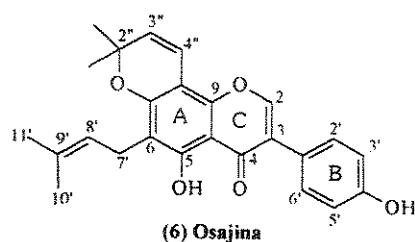
E80- RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da lupinifolina (5) bi-acetilada



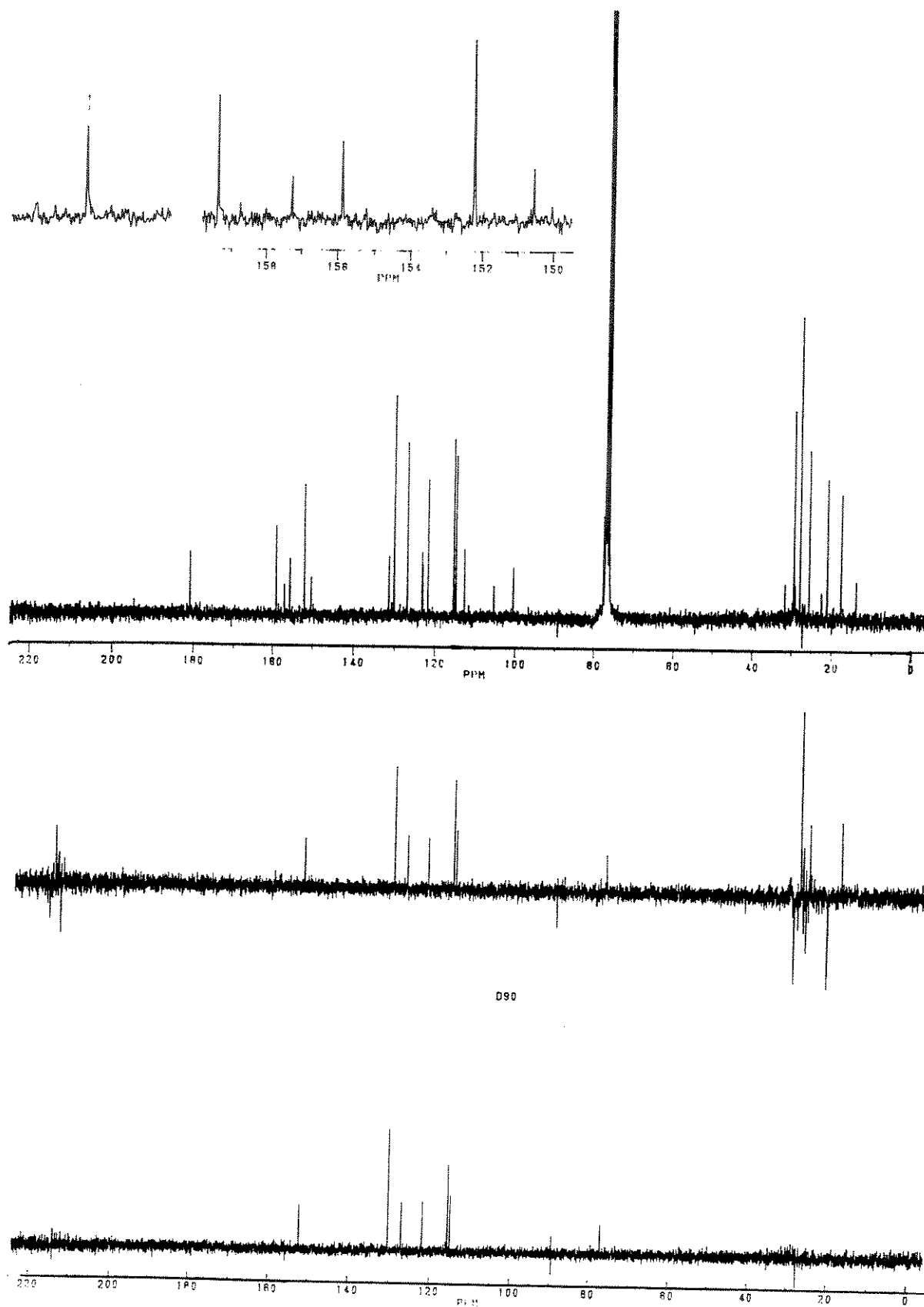
E81- RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da lupinifolina (5) mono-acetilada



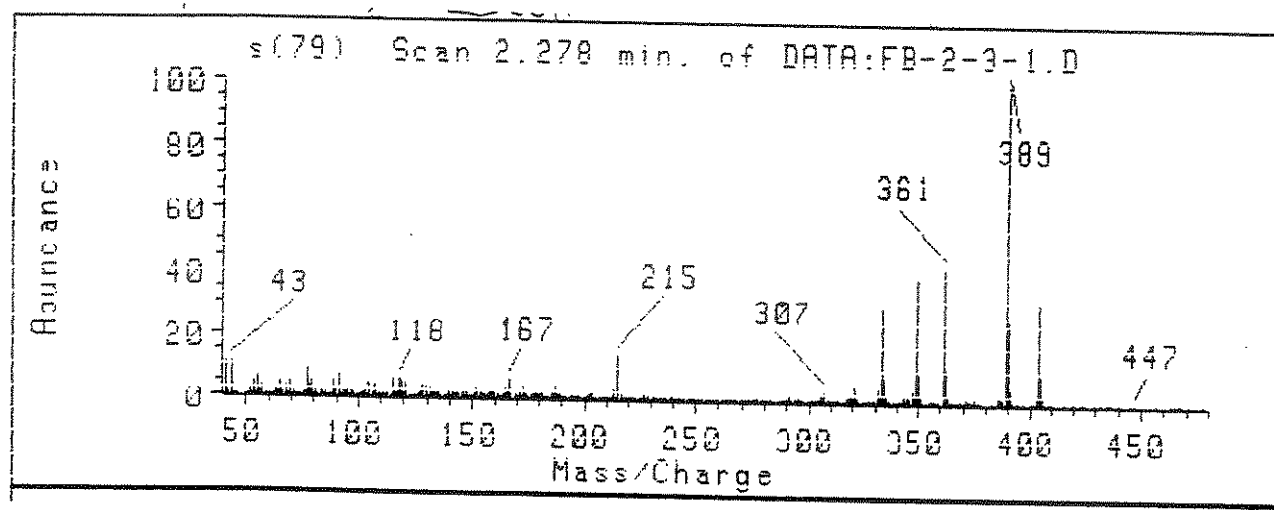
E82- RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) da lupinifolina (5) bi-acetilada



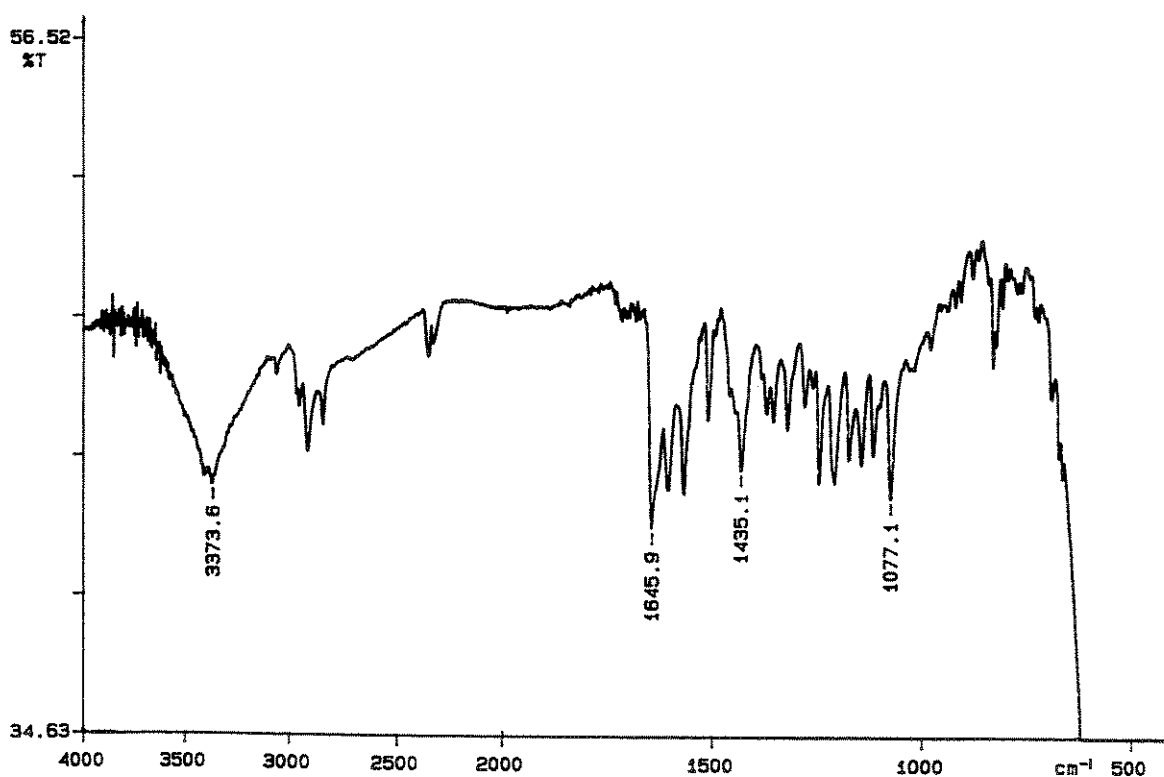
E83-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da osajina (6)

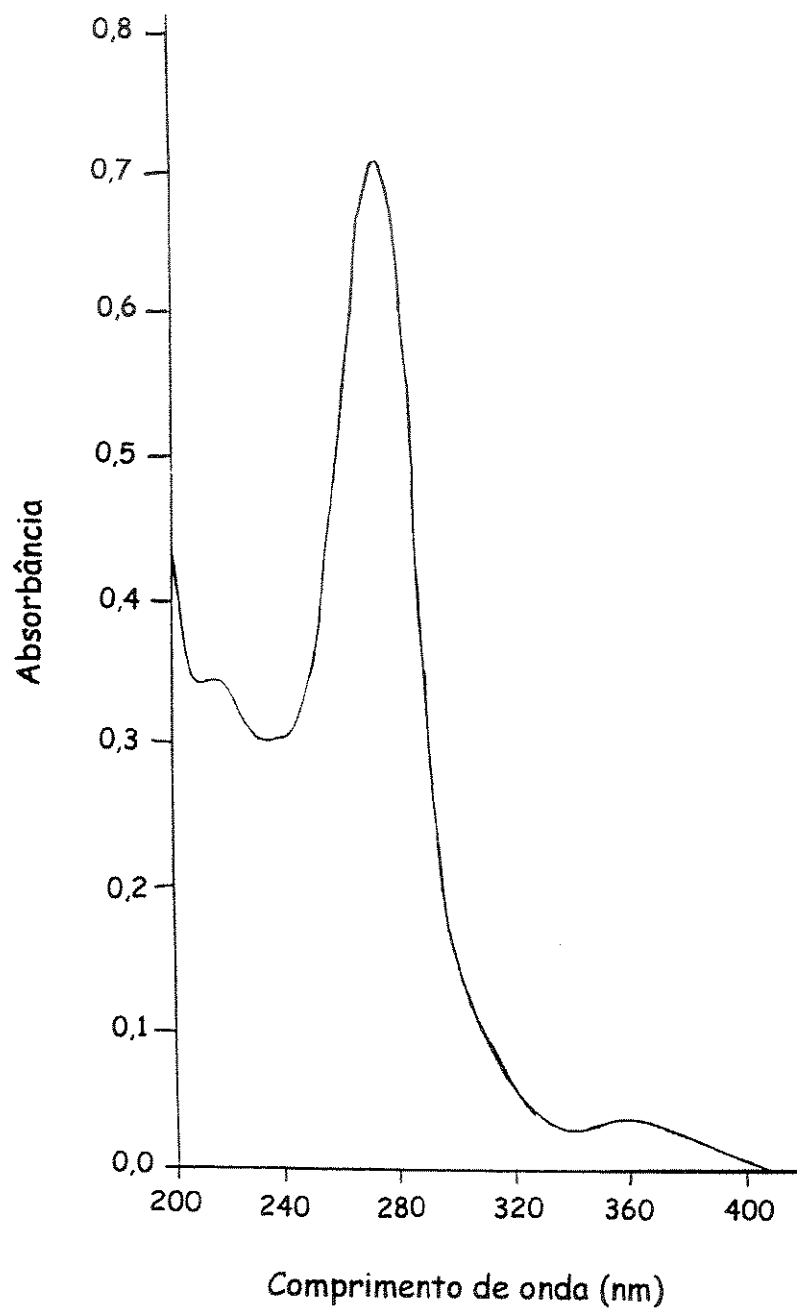


E84-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) da osajina (6)

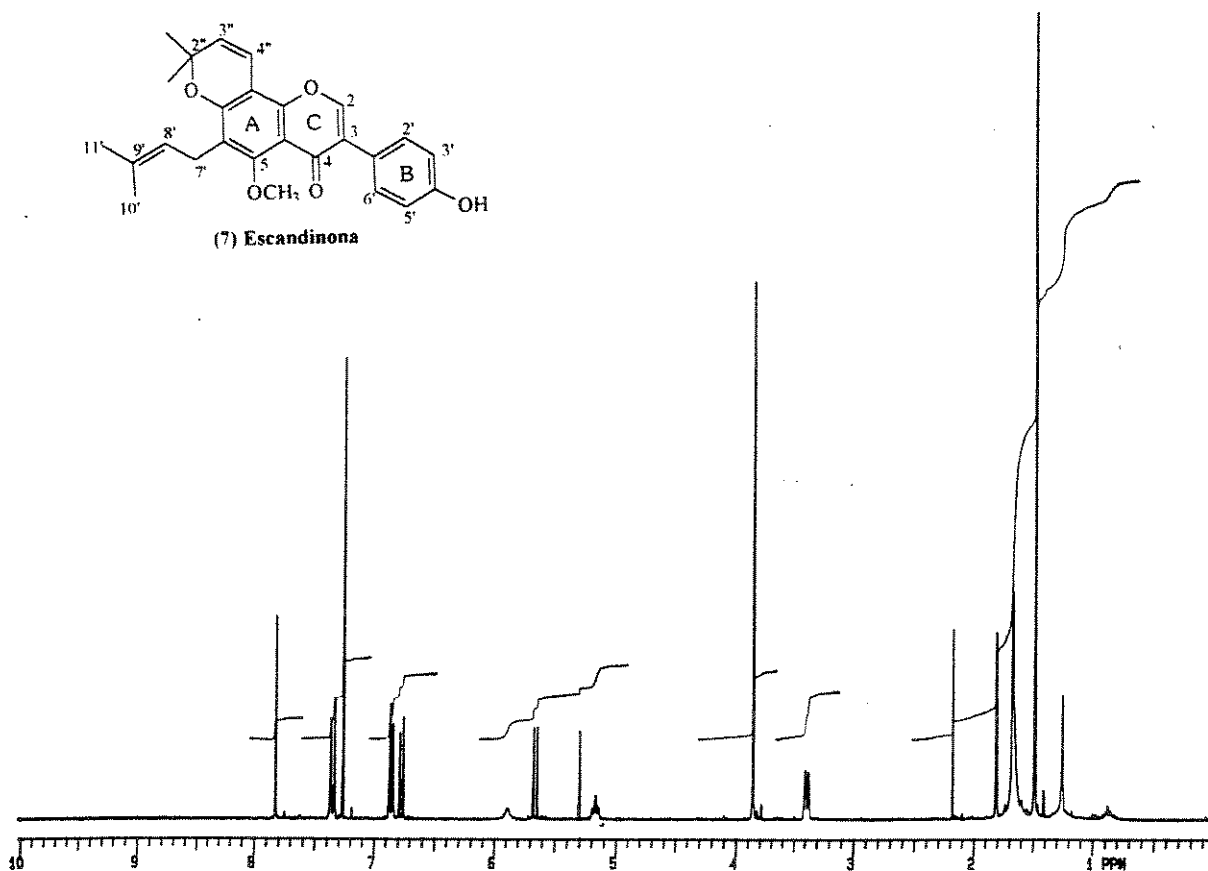
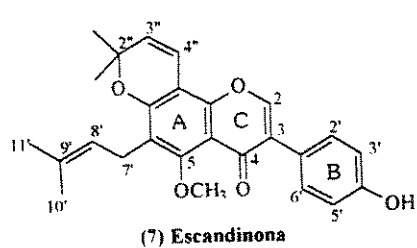
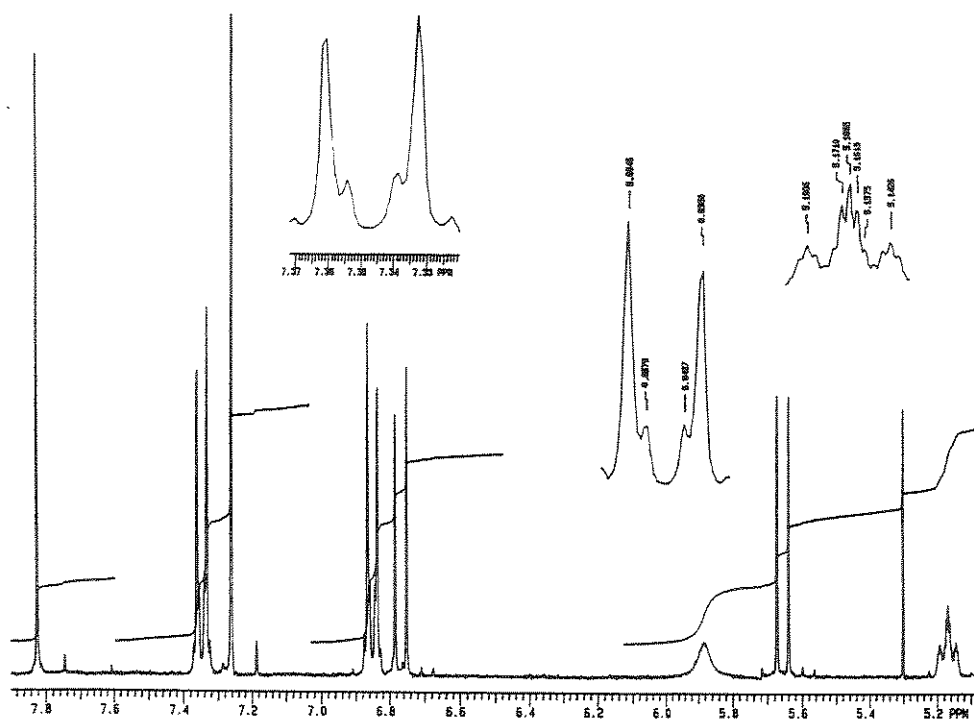


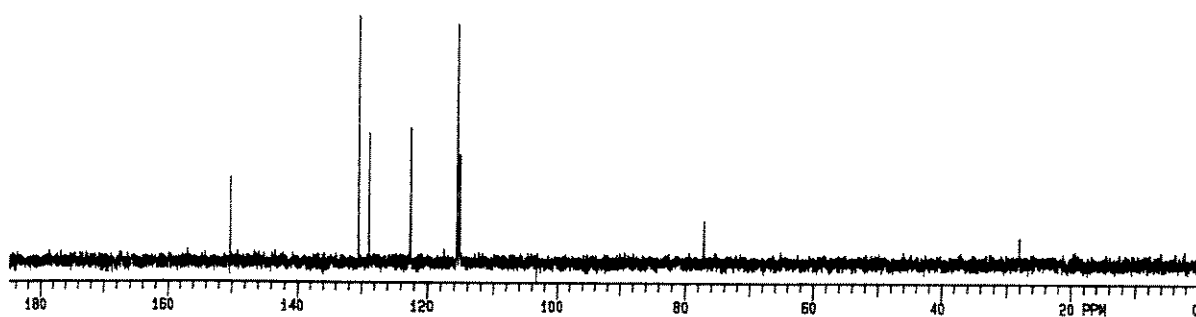
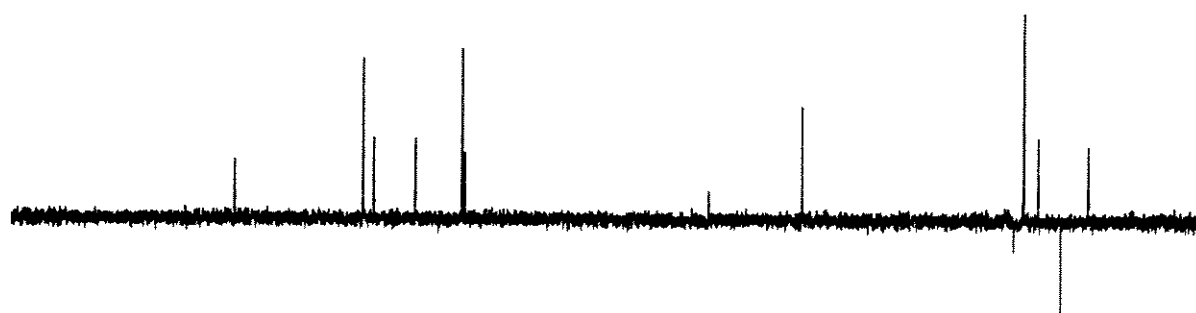
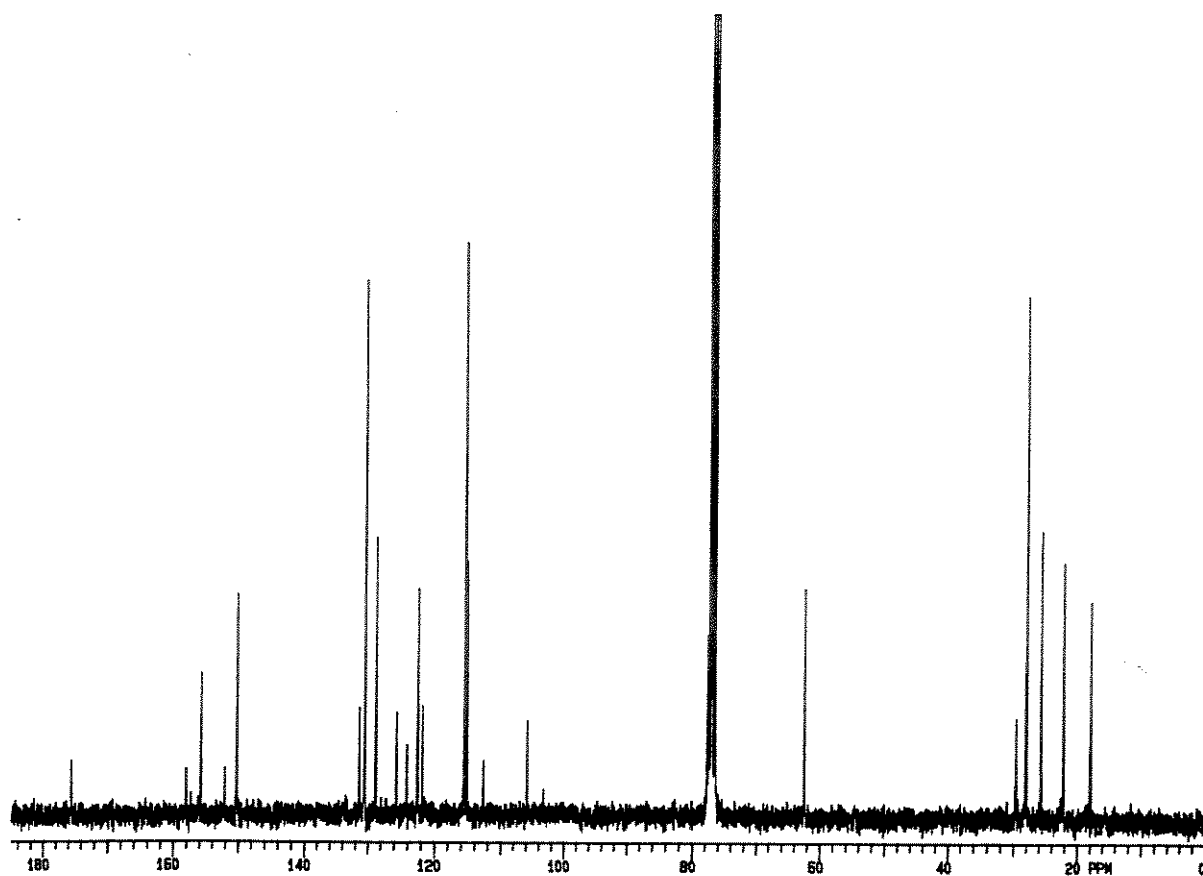
E85- Espectro de massas (IE, 70 eV) da osajina (6)

E86- Espectro no IV (Filme CH_2Cl_2) da osajina (6)

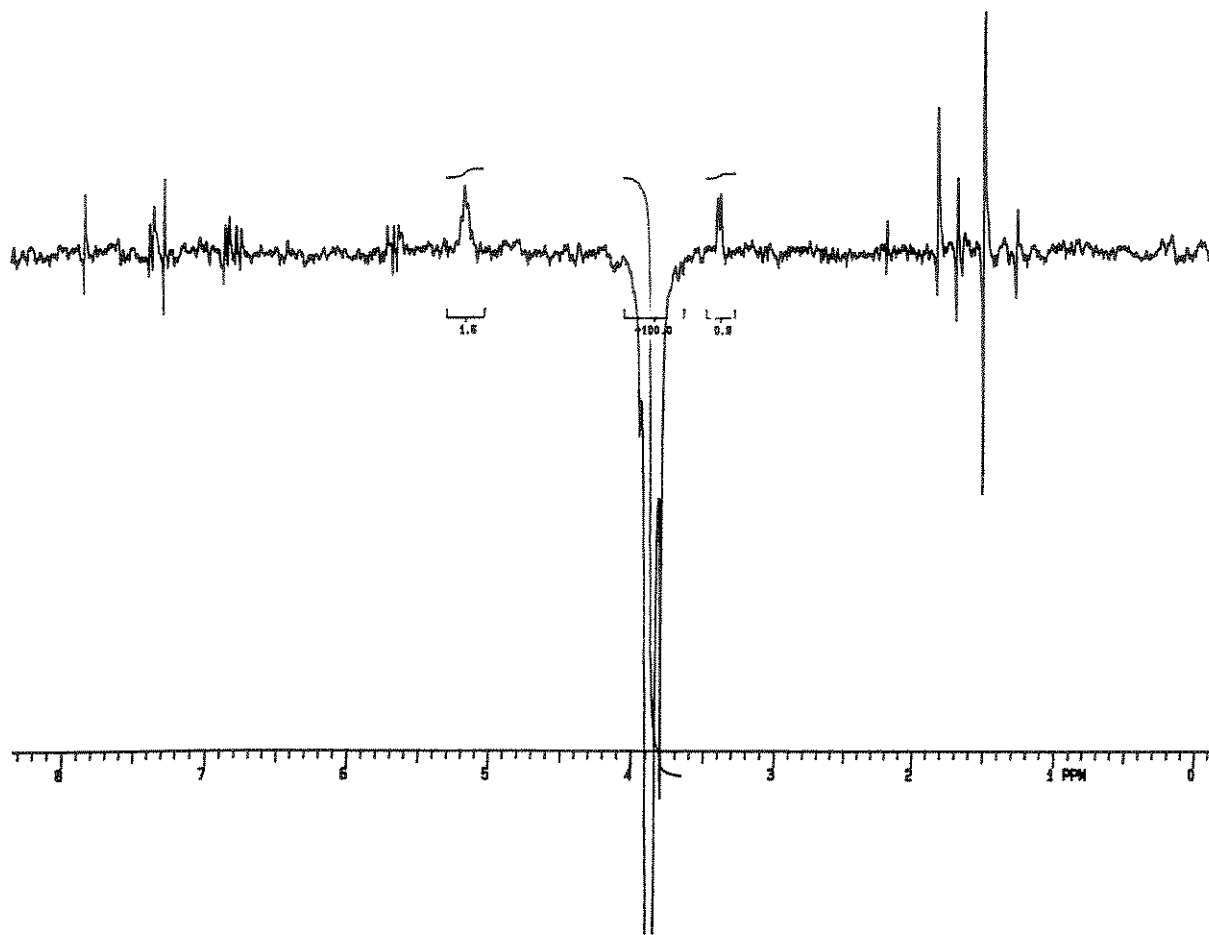
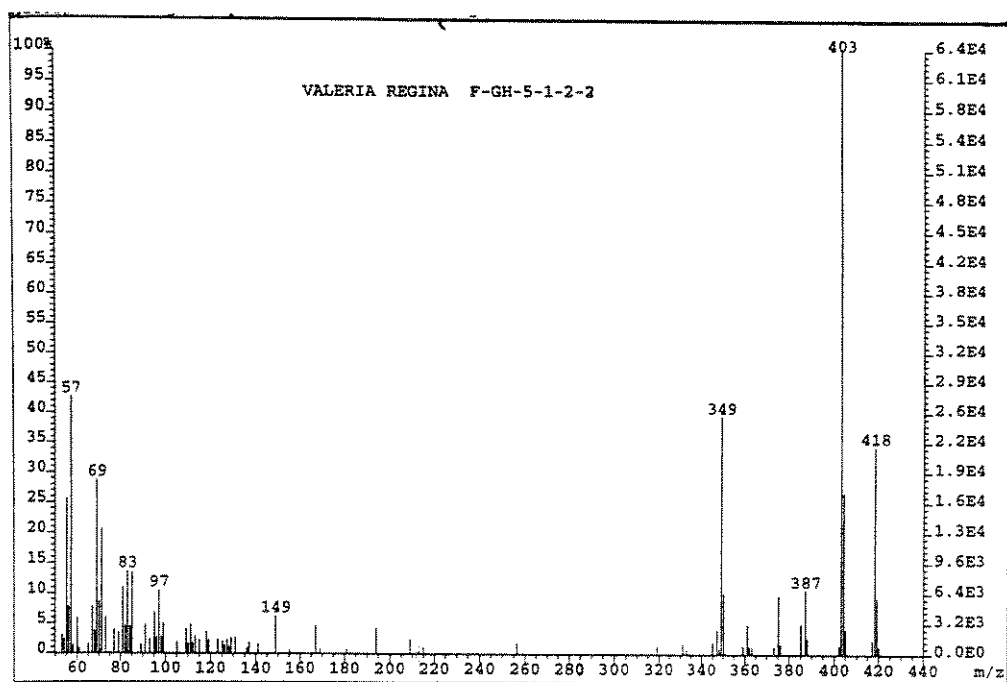


E87-Espectro no UV (MeOH) da osajina (6)

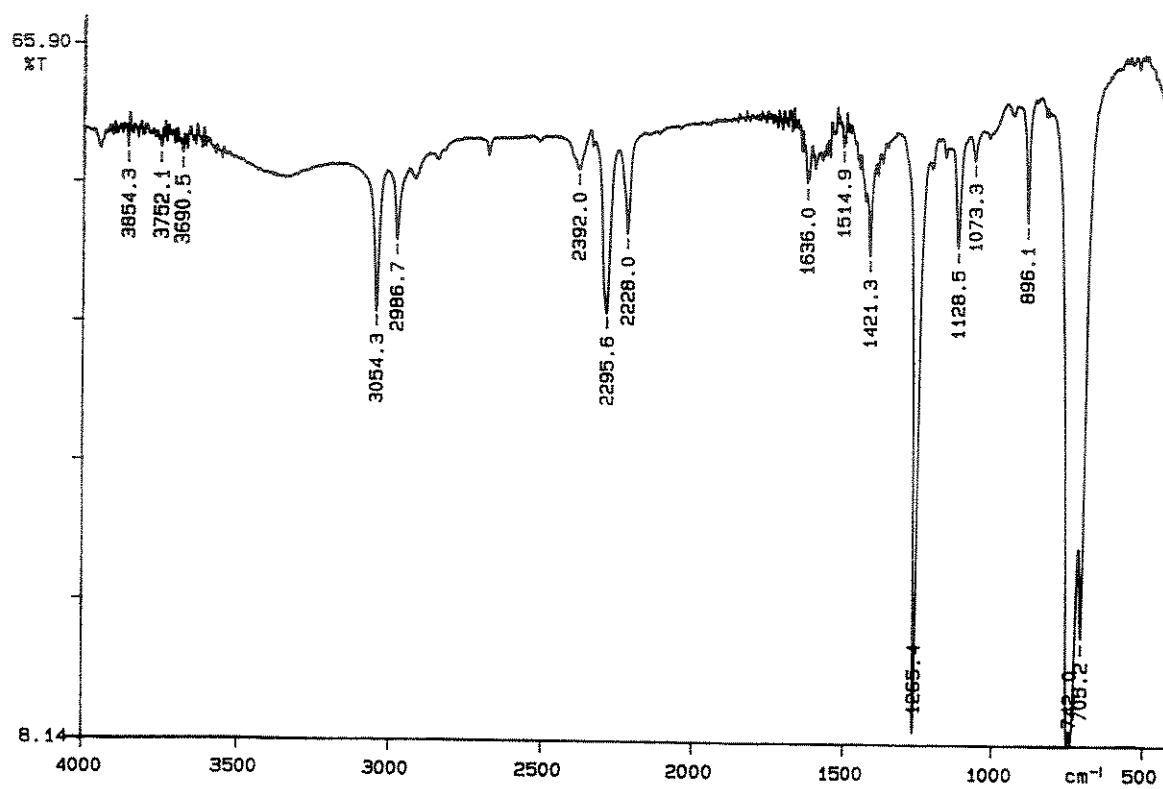
E88-RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) da escandinaona (7)



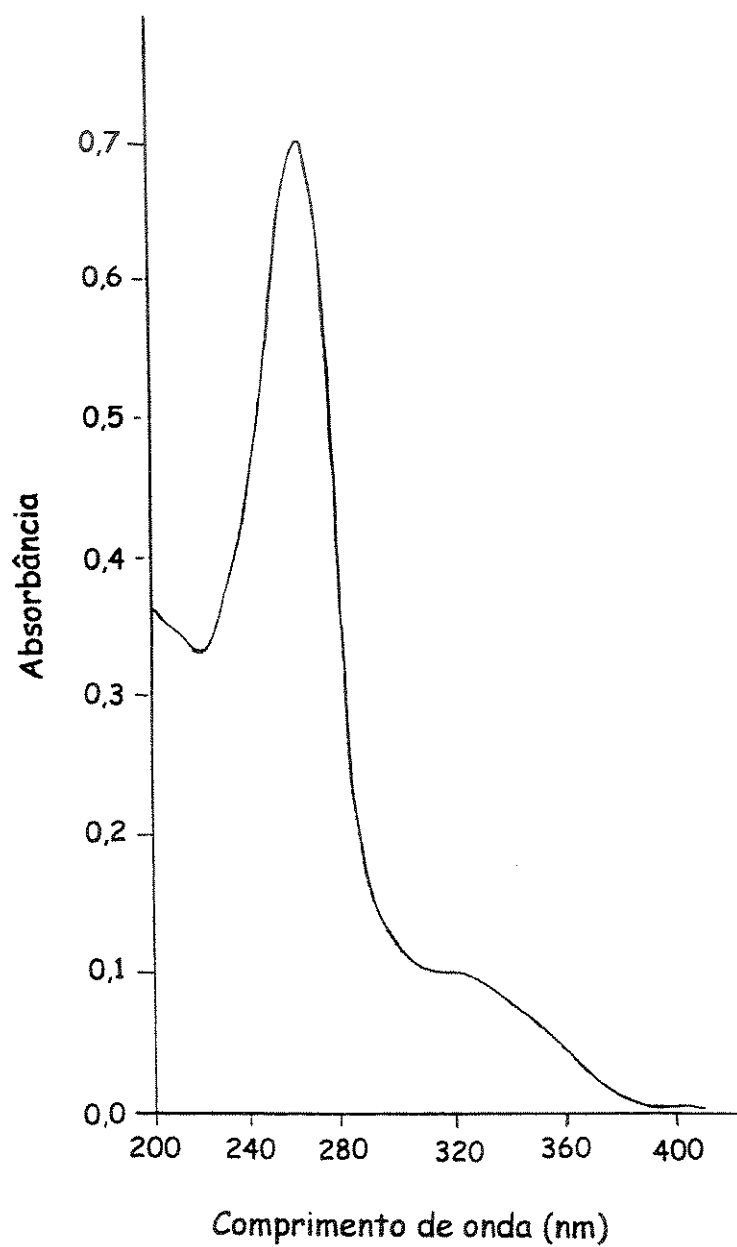
E89-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) da escandirona (7)

E90-Espectro de diferença de NOE (δ 3,86) da escandionona (7)

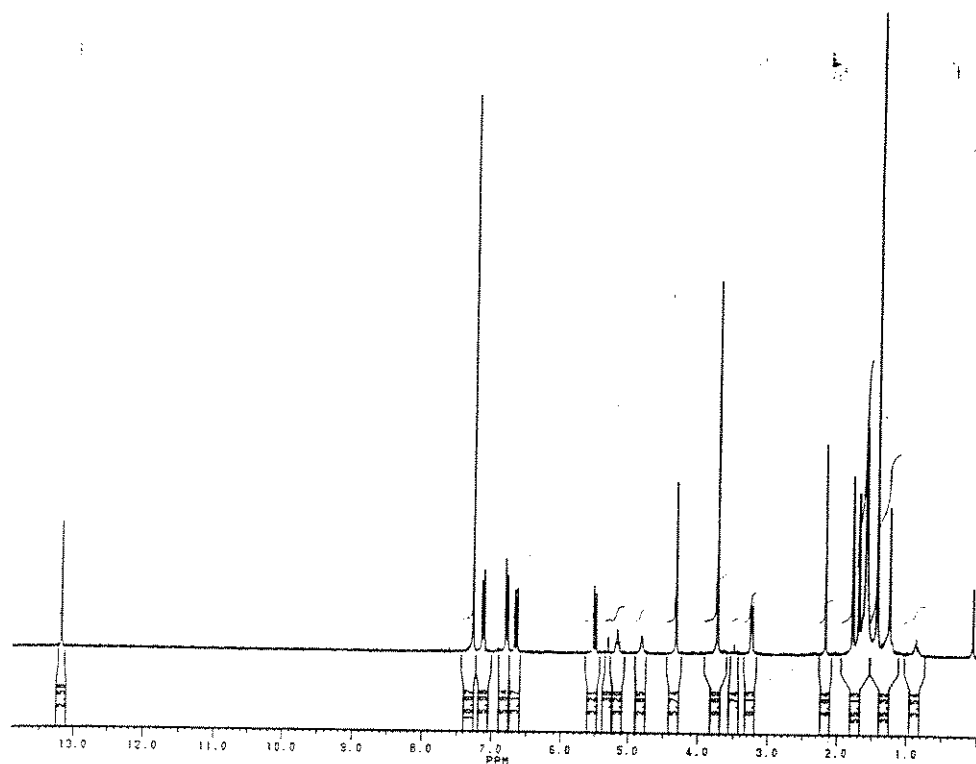
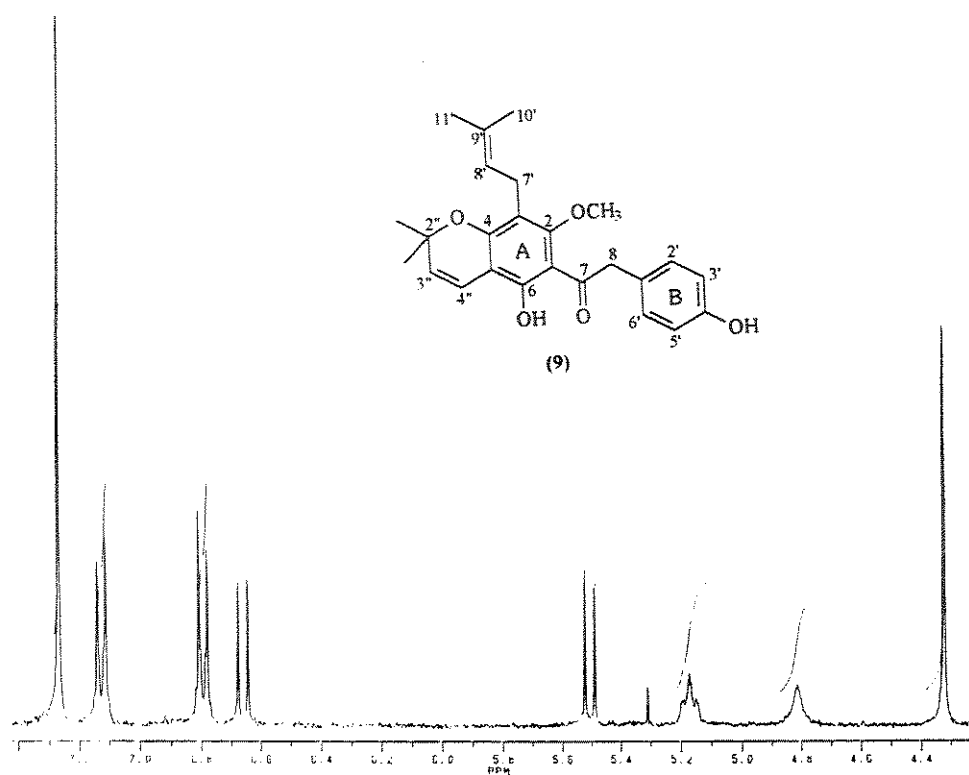
E91-Espectro de massas (IE, 70 eV) da escandionona (7)

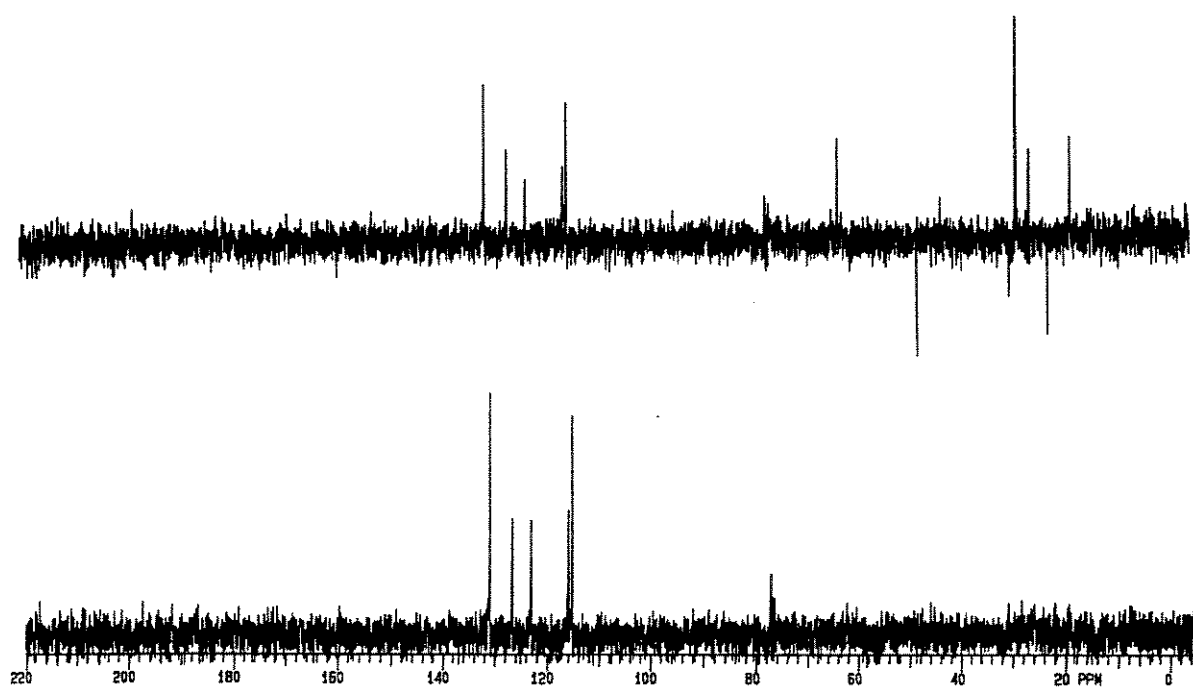
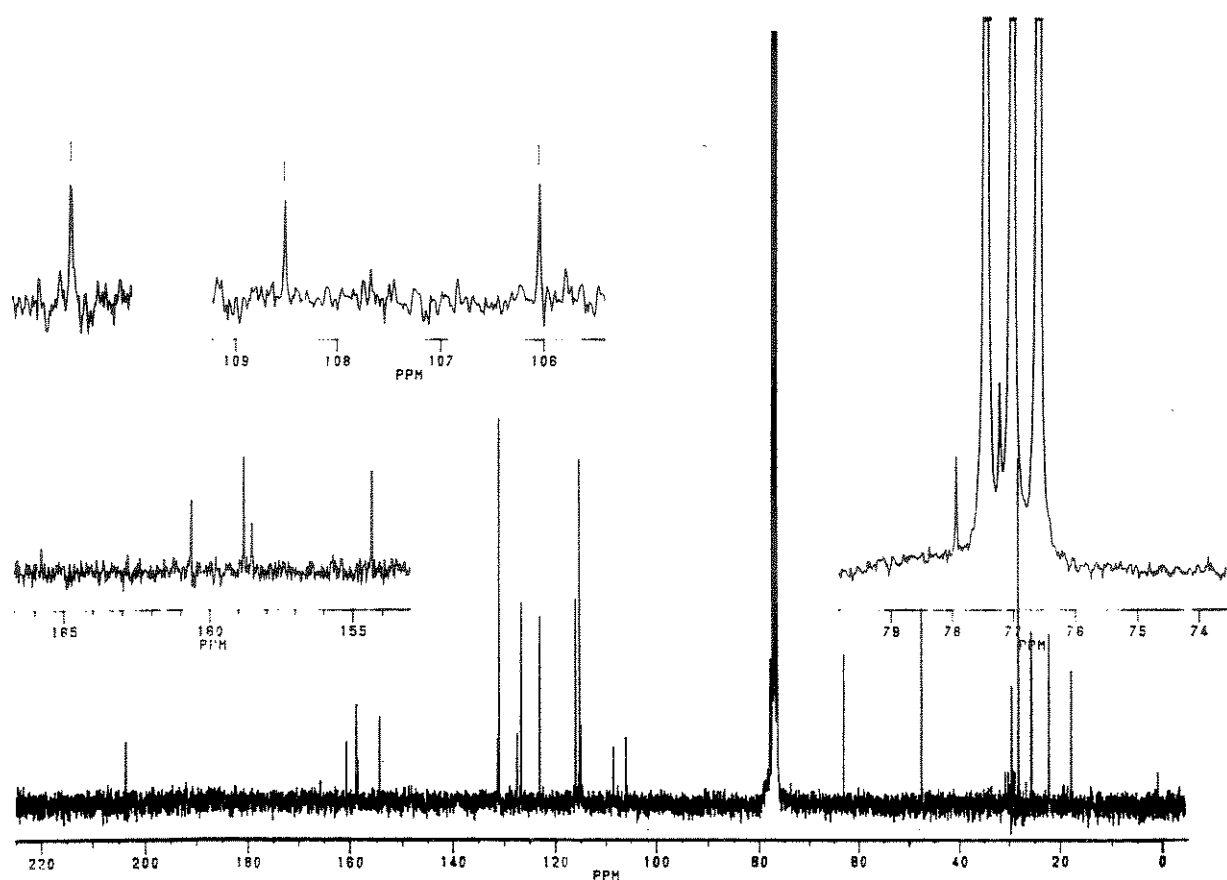


E92-Espectro no IV (cela KBr) da escandionona (7)



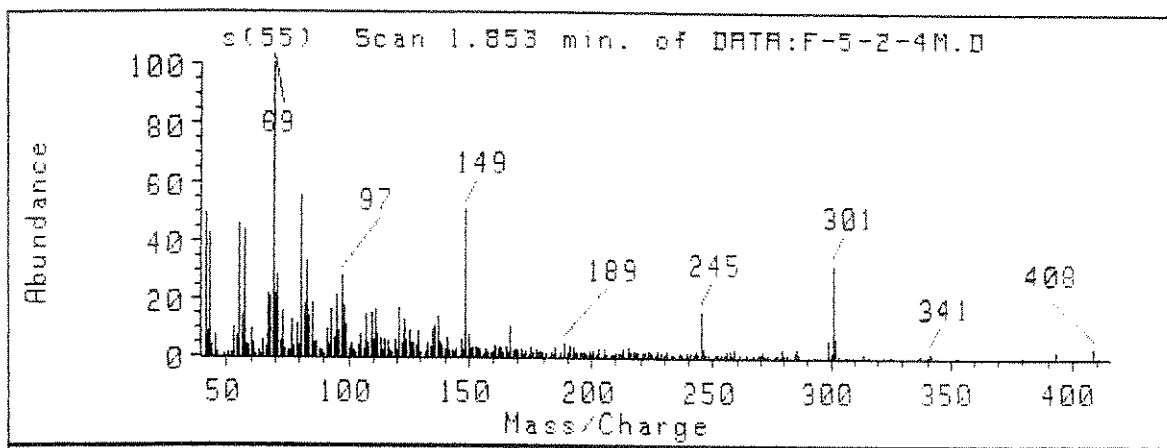
E93-Espectro no UV (MeOH) da escandionona (7)

E94-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da desoxibenzoína (9)

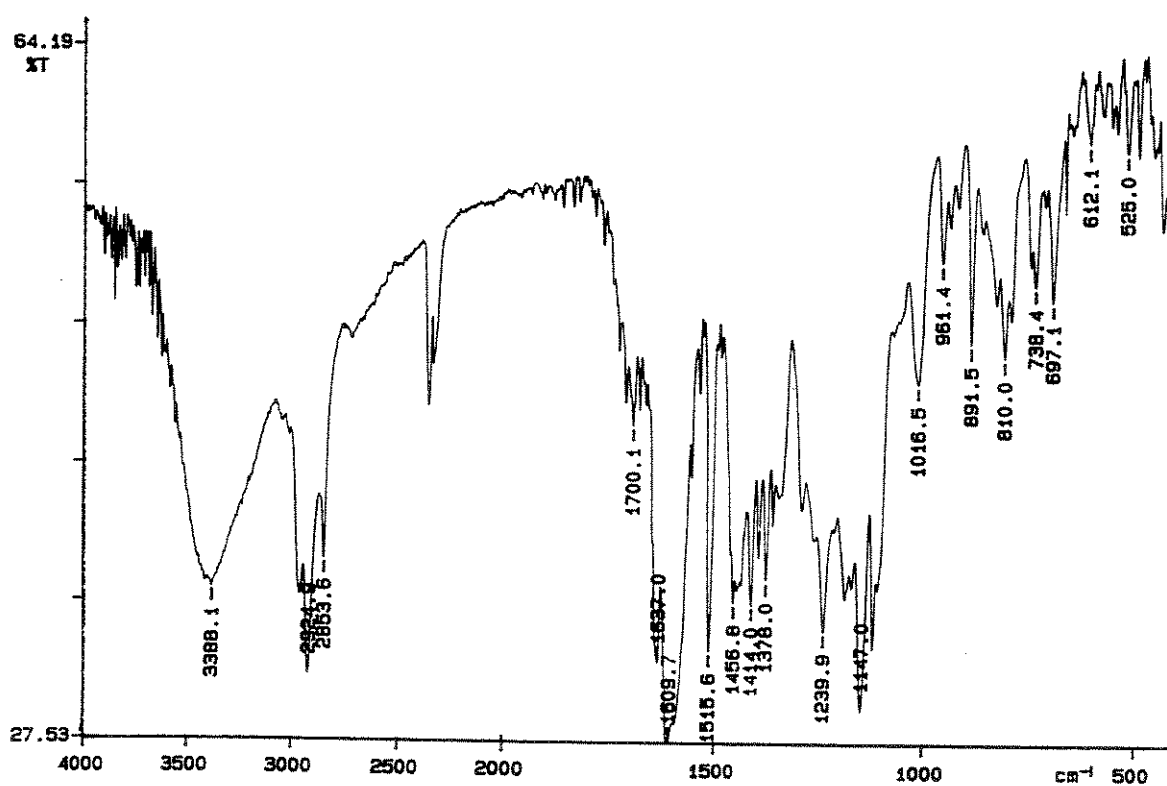


E95-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) da desoxibenzoína (9)

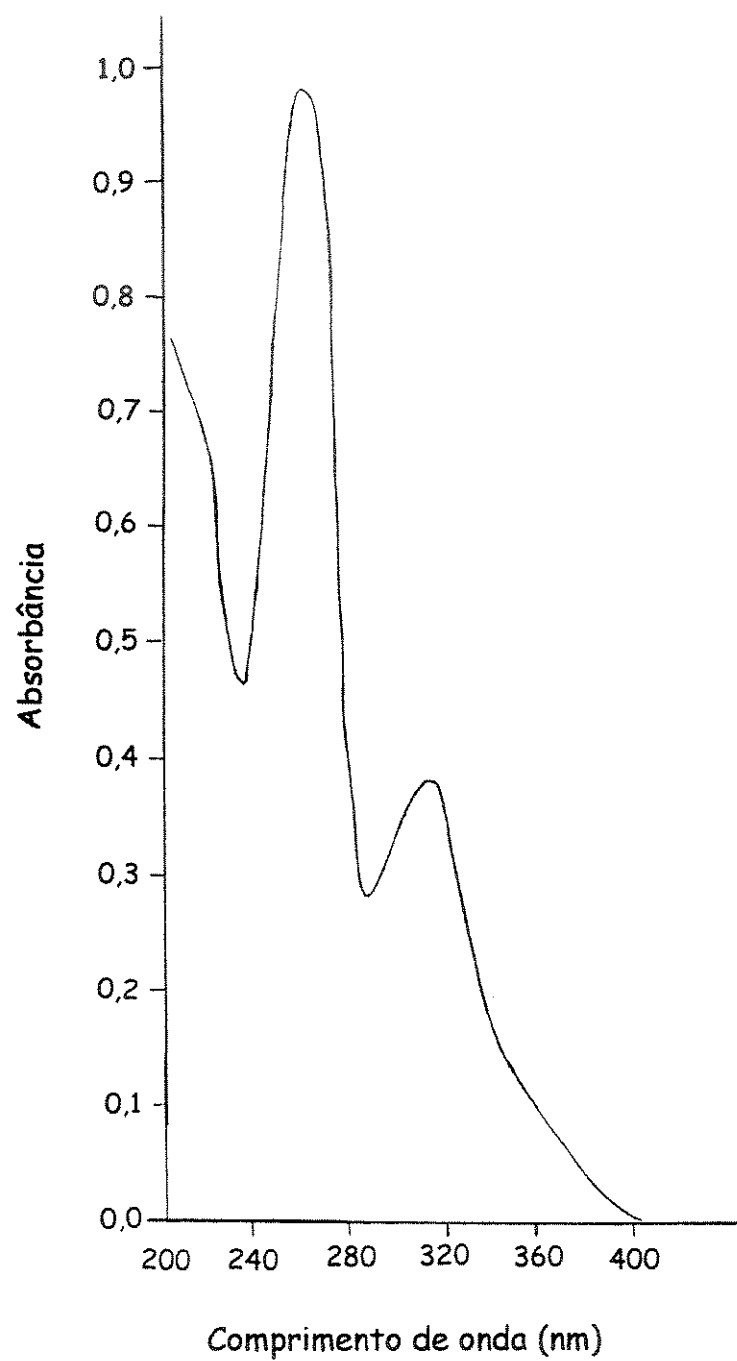




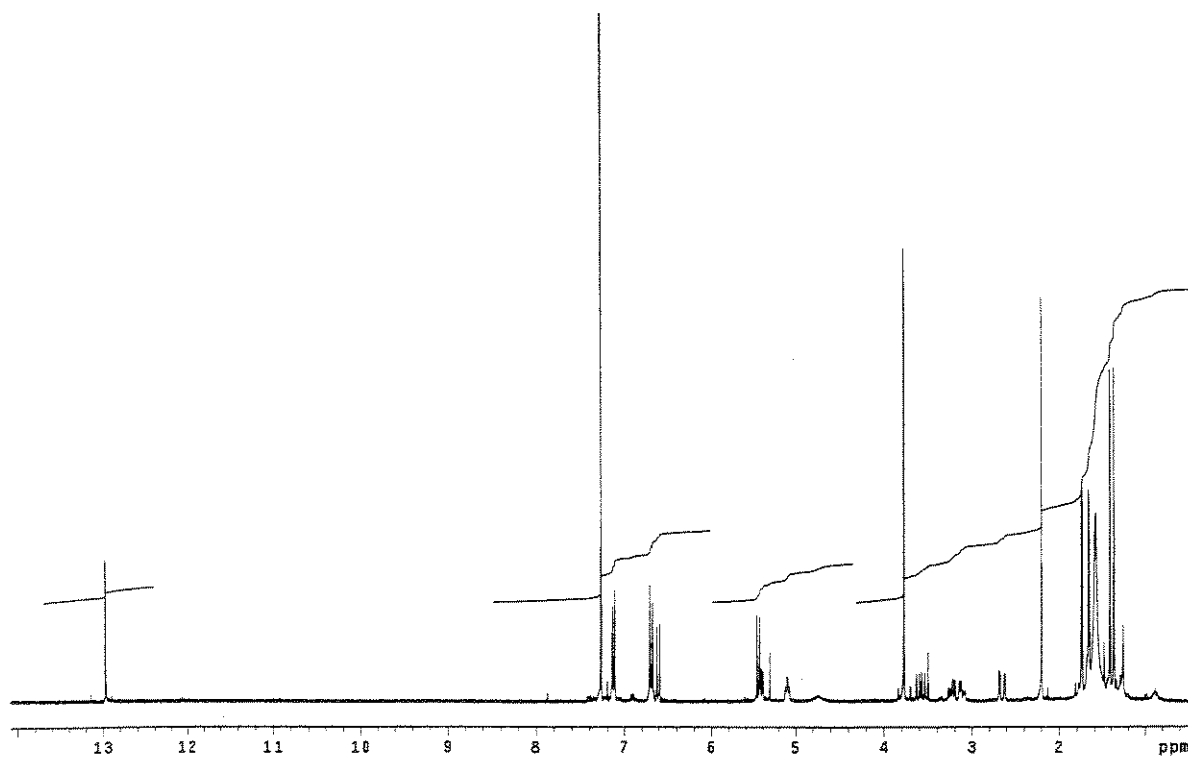
E98- Espectro de massas (IE, 70 eV) da desoxibenzoína (9)



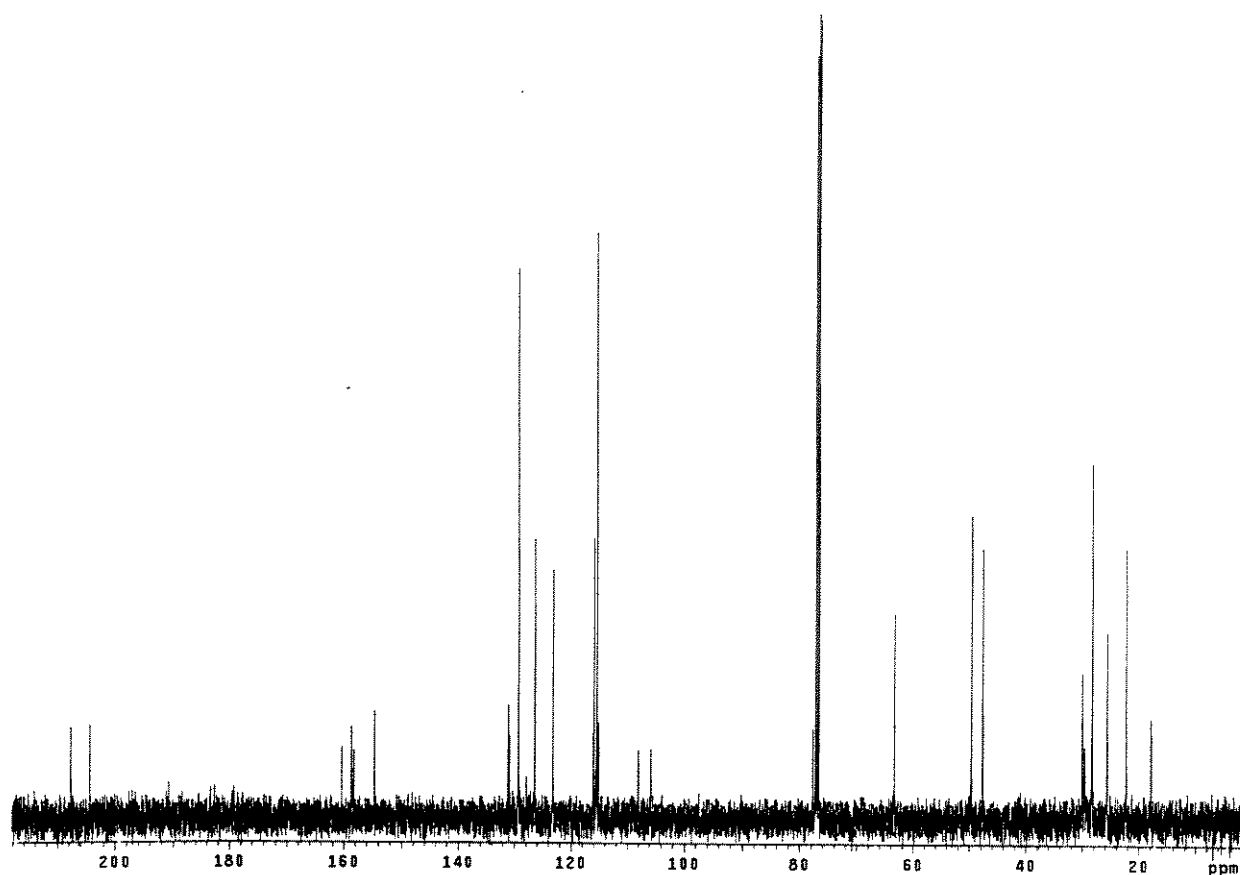
E99- Espectro no IV (Filme CH₂Cl₂) da desoxibenzoína (9)



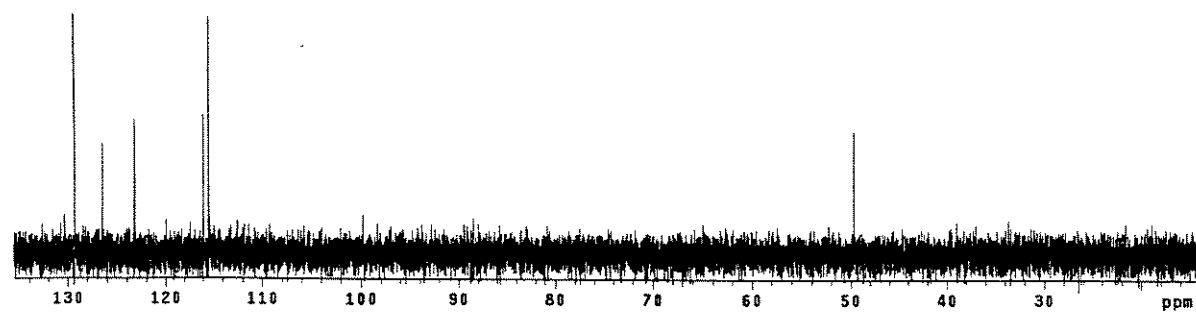
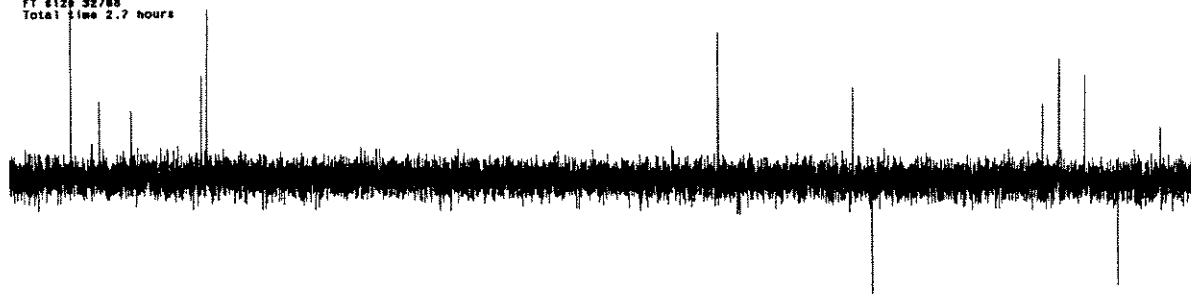
E100-Espectro no UV (MeOH) da desoxibenzoína (9)



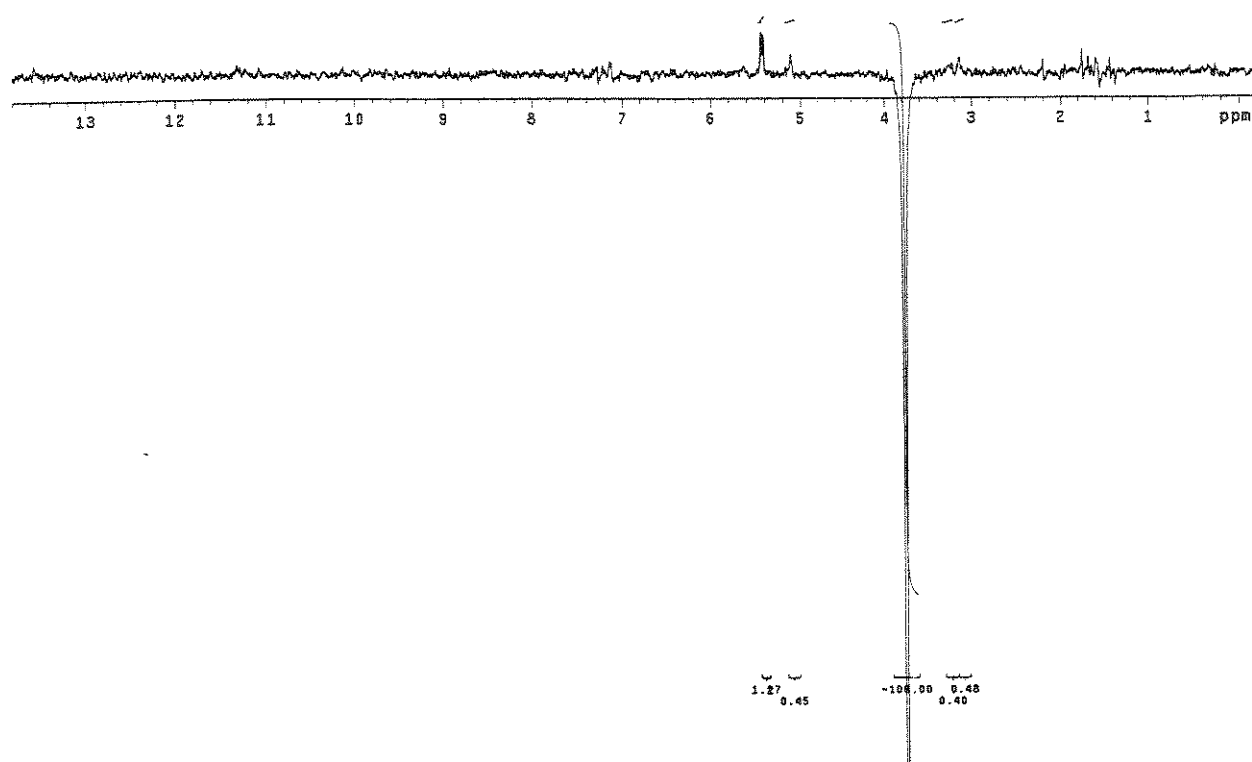
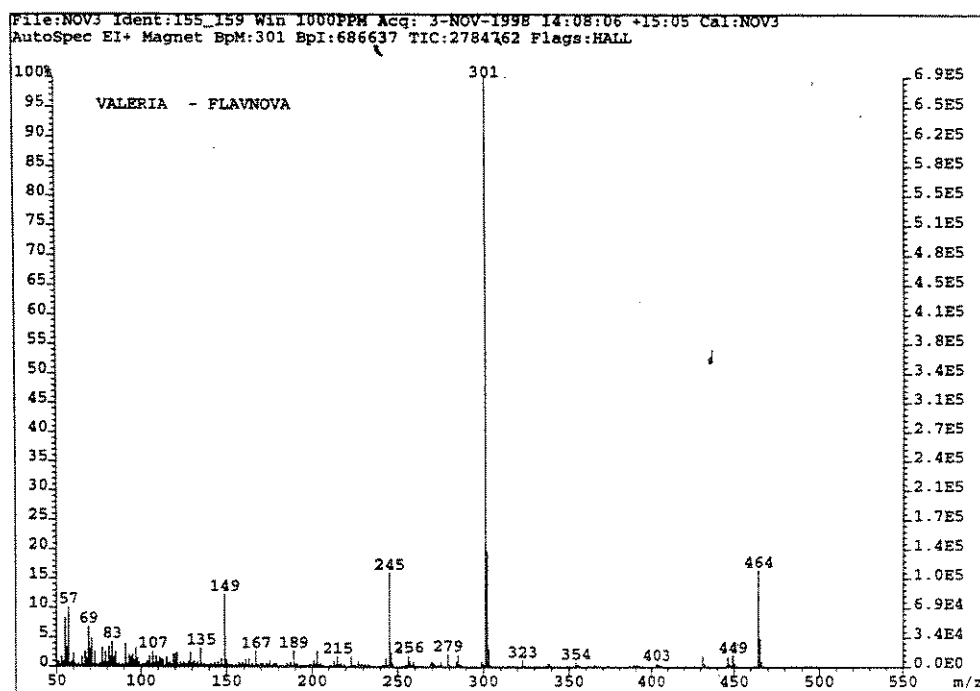
E101-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da desoxibenzoína (12)



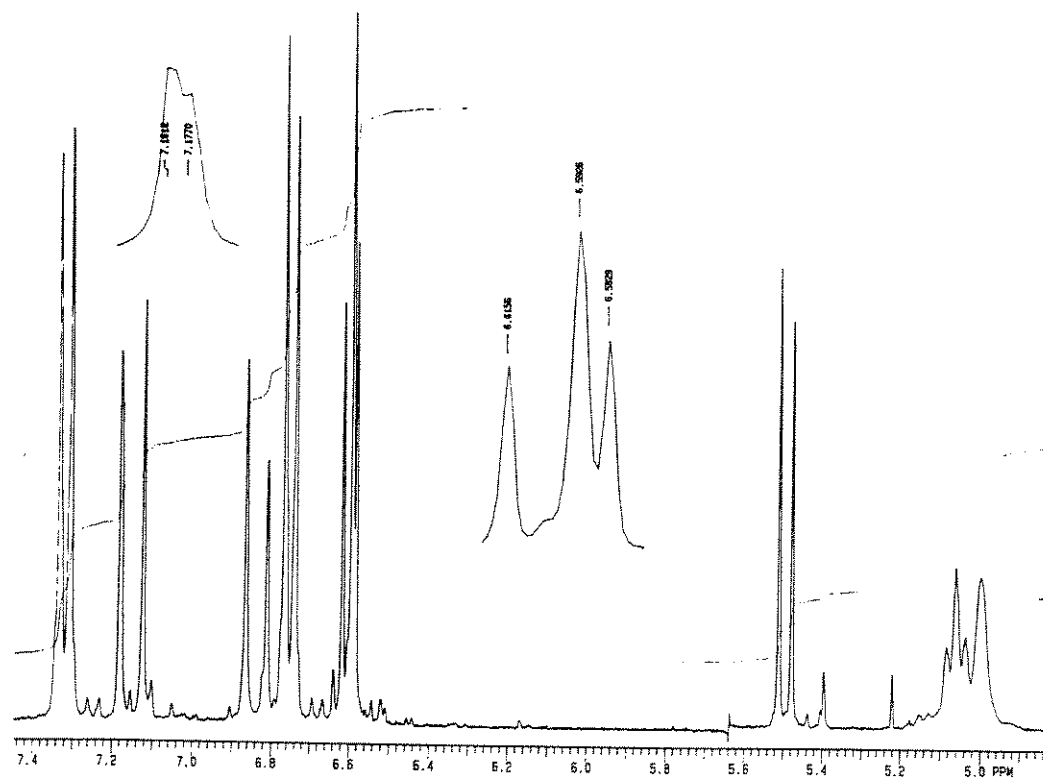
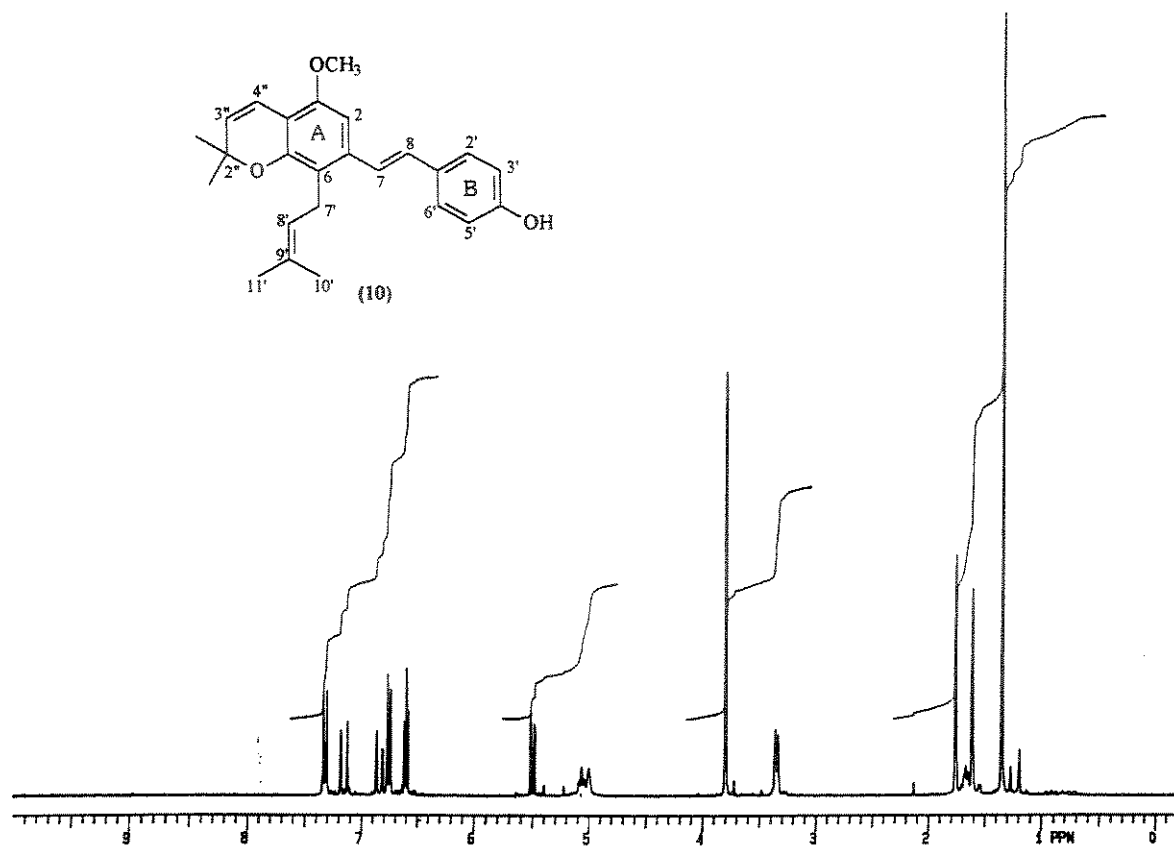
on during de...
off during de...
WALTZ-16 module
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 2.7 hours



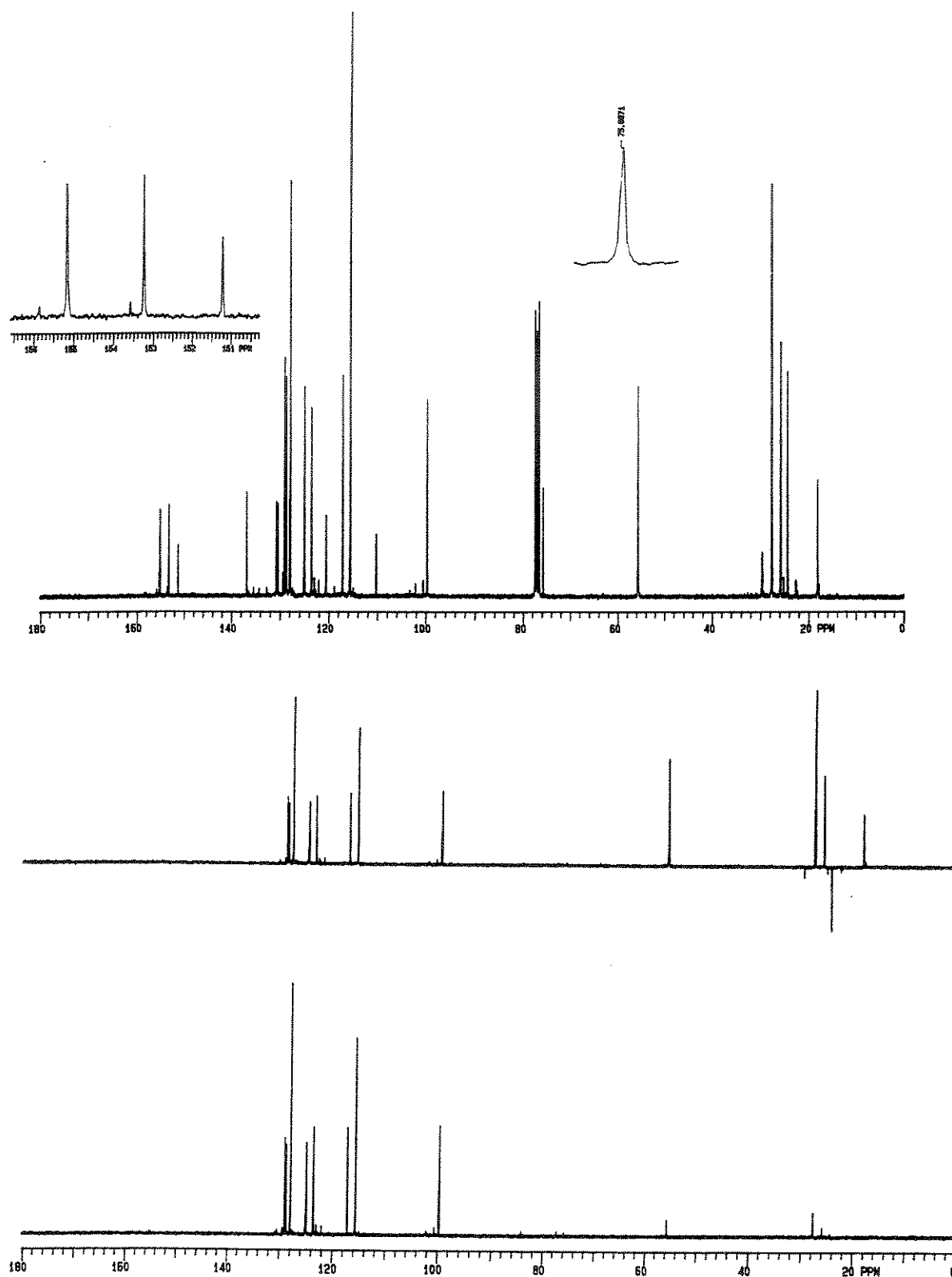
E102-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) da desoxibenzoína (12)

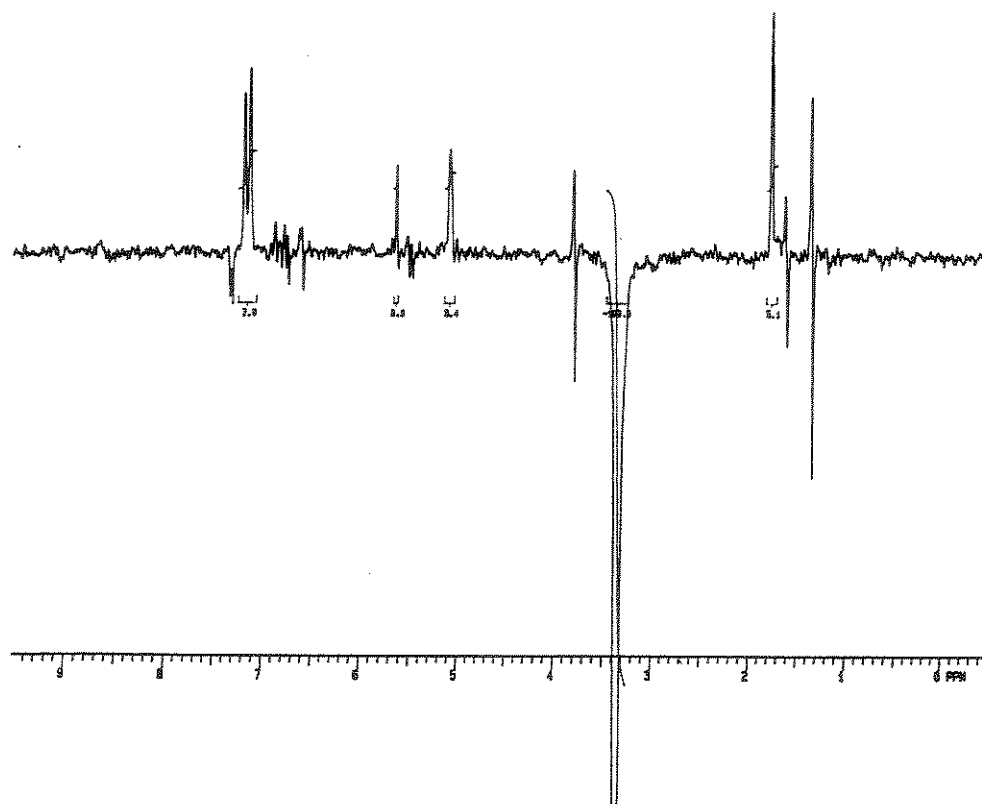
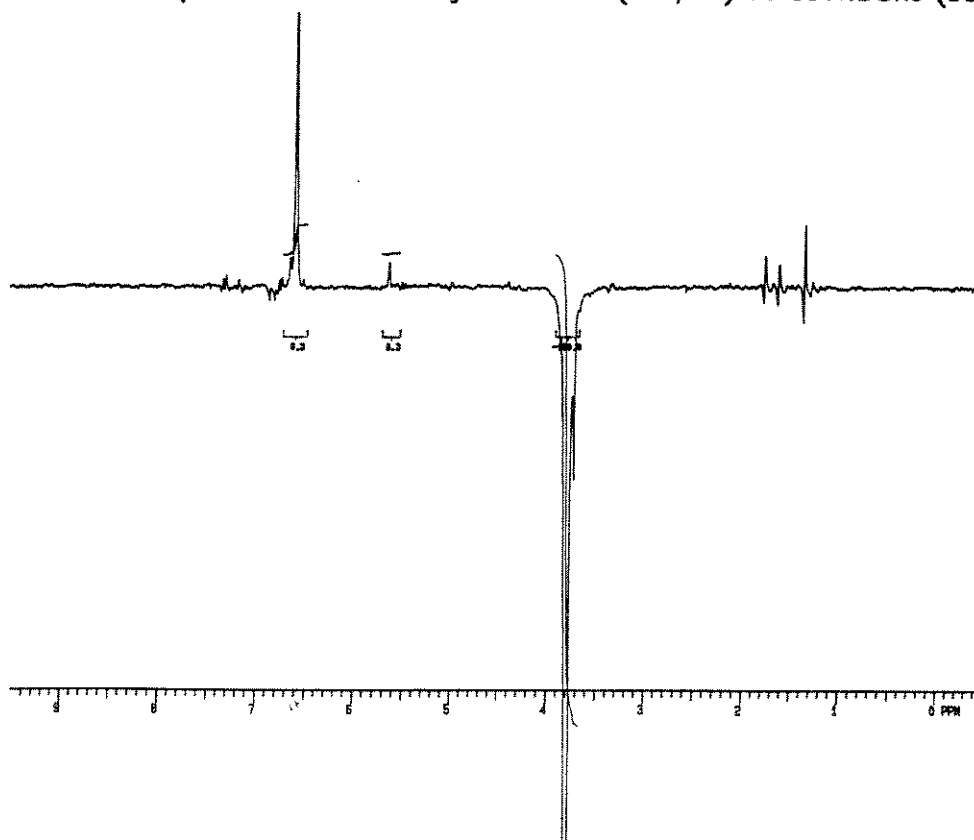
E103-Espectro de diferença de NOE (δ 3,77) da desoxibenzoína (12)

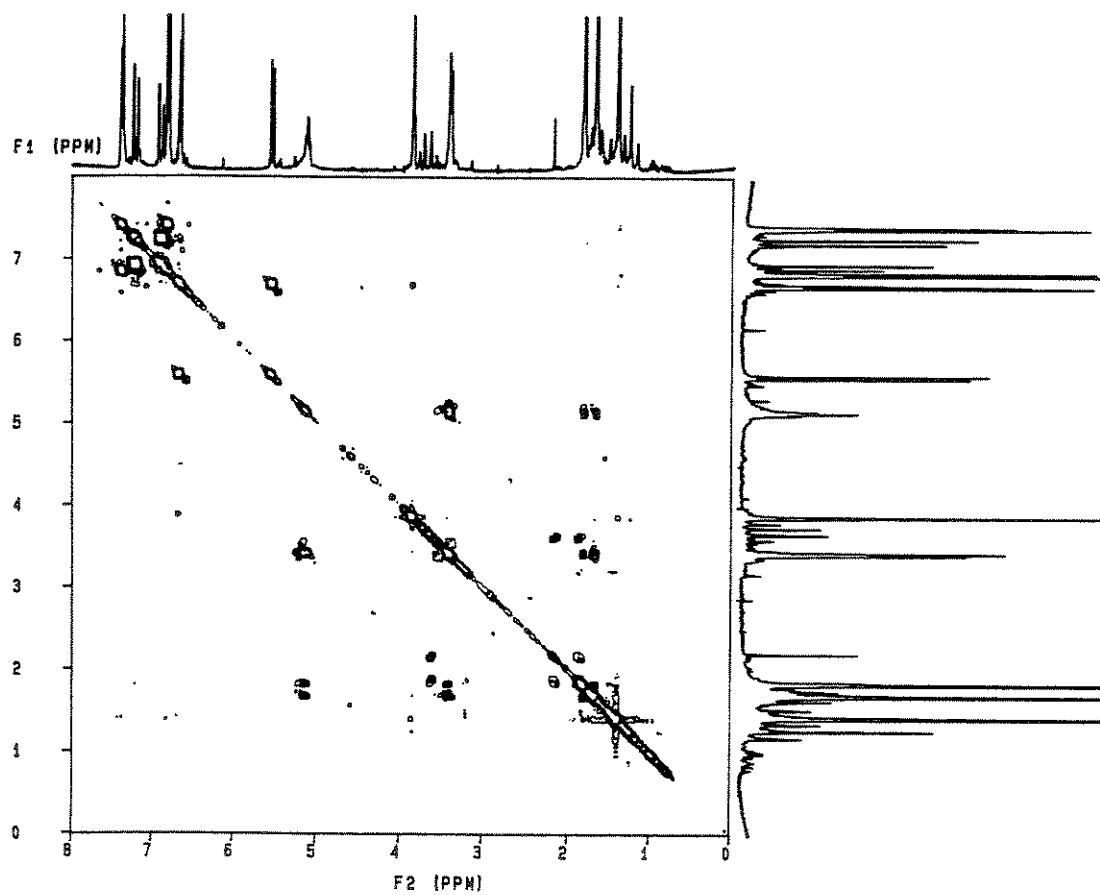
E104-Espectro de massas (IE, 70 eV) da desoxibenzoína (12)



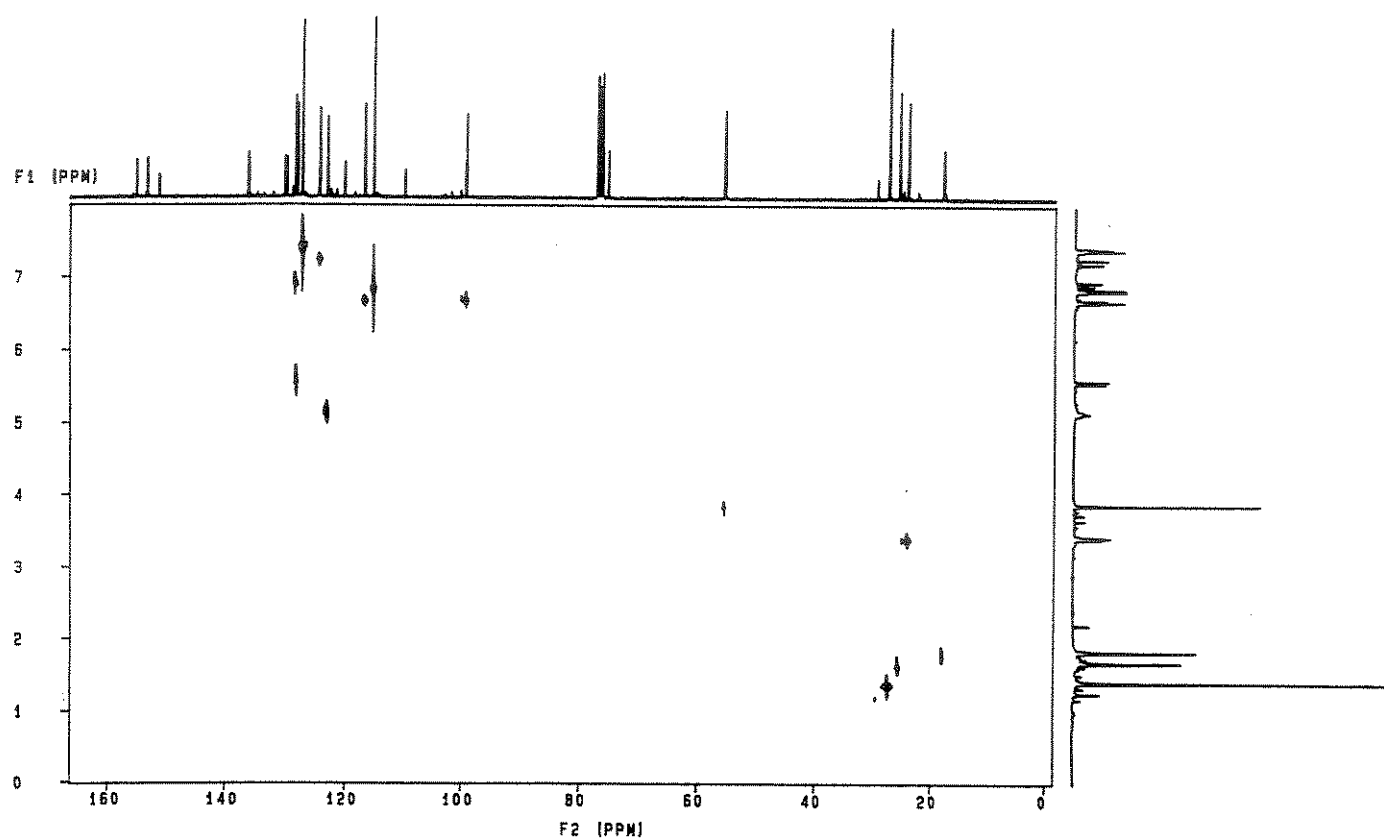
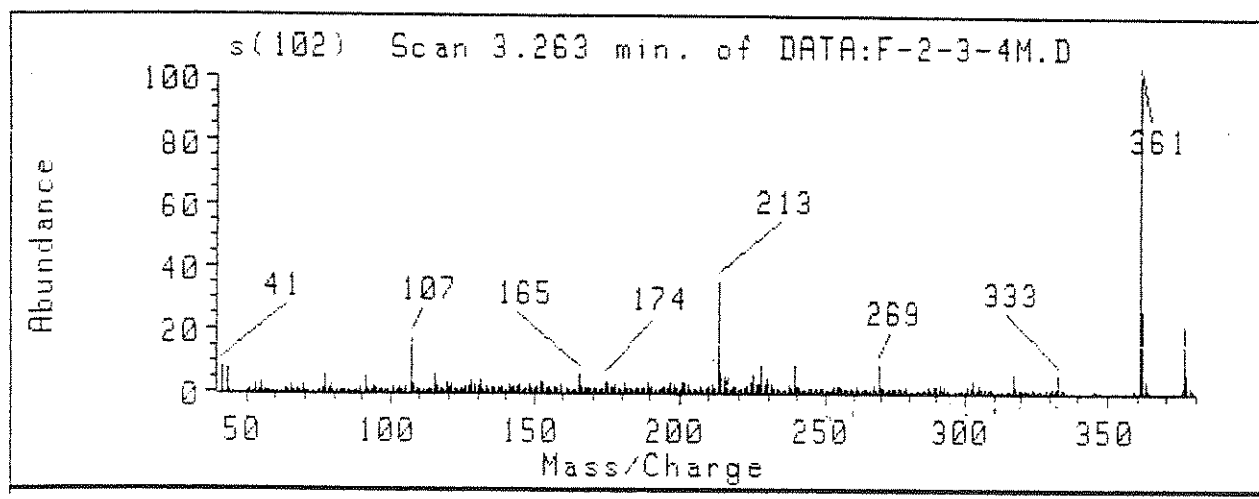
E105-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do estilbeno (10)

E106-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) do estilbeno (10)

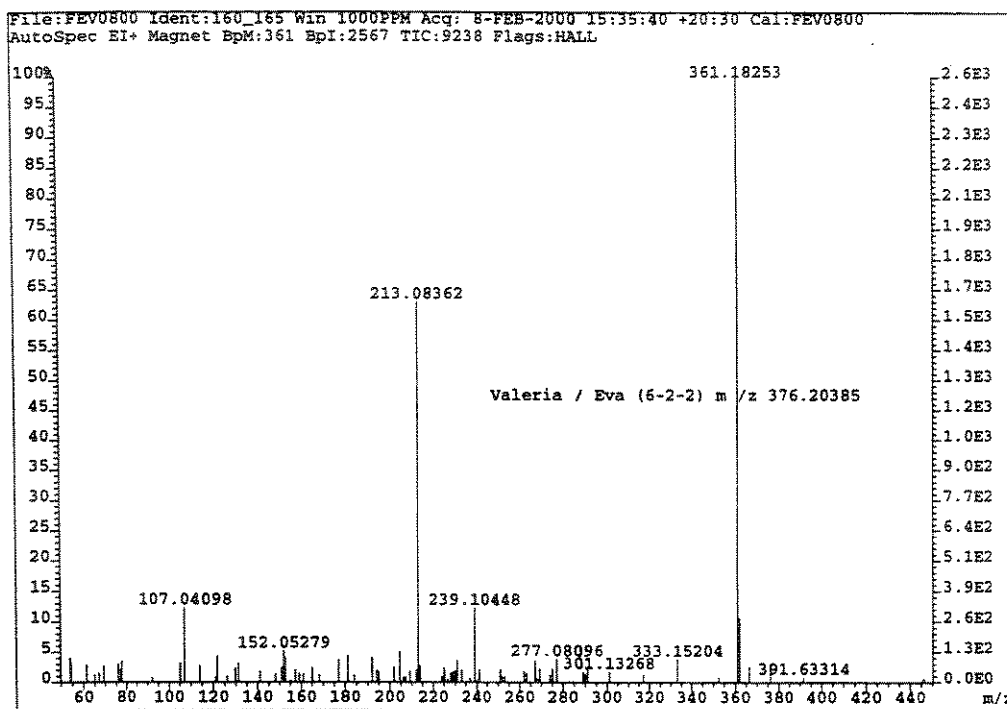
E107-Espectro de diferença de NOE (δ 3,34) do estilbeno (10)E108-Espectro de diferença de NOE (δ 3,79) do estilbeno (10)



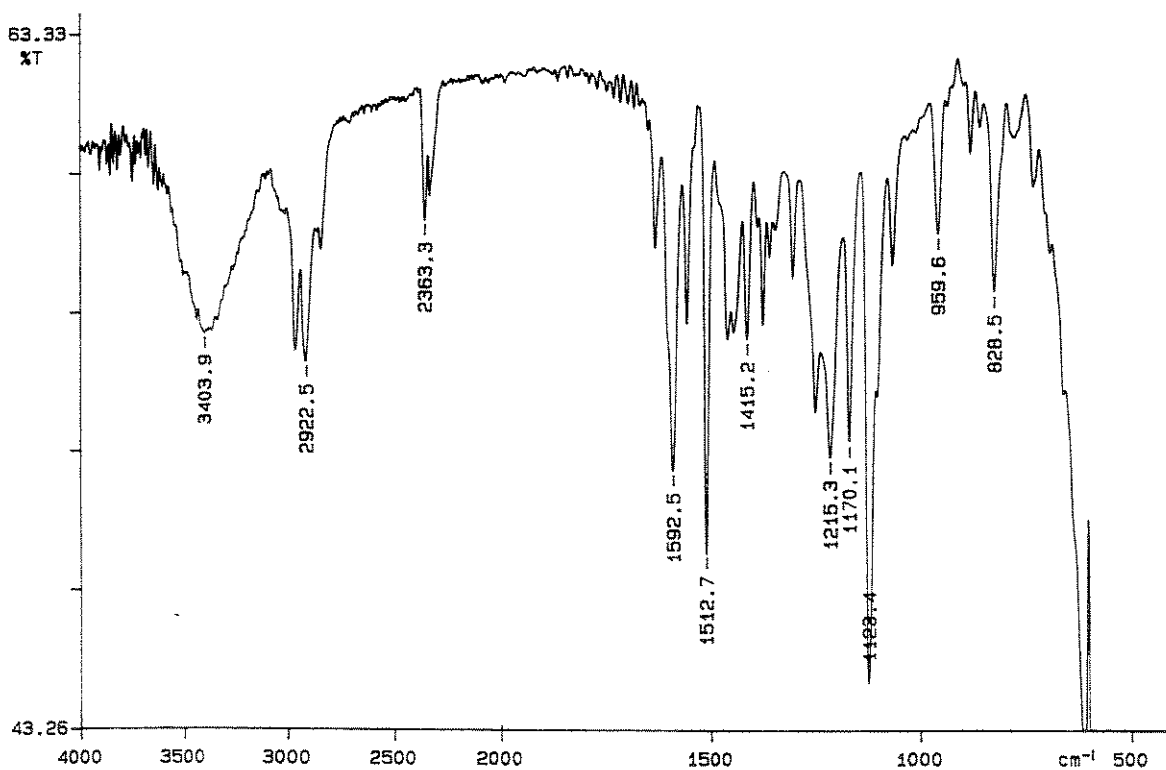
E109-RMN-2D (^1H , ^1H - COSY) do estilbeno (10)

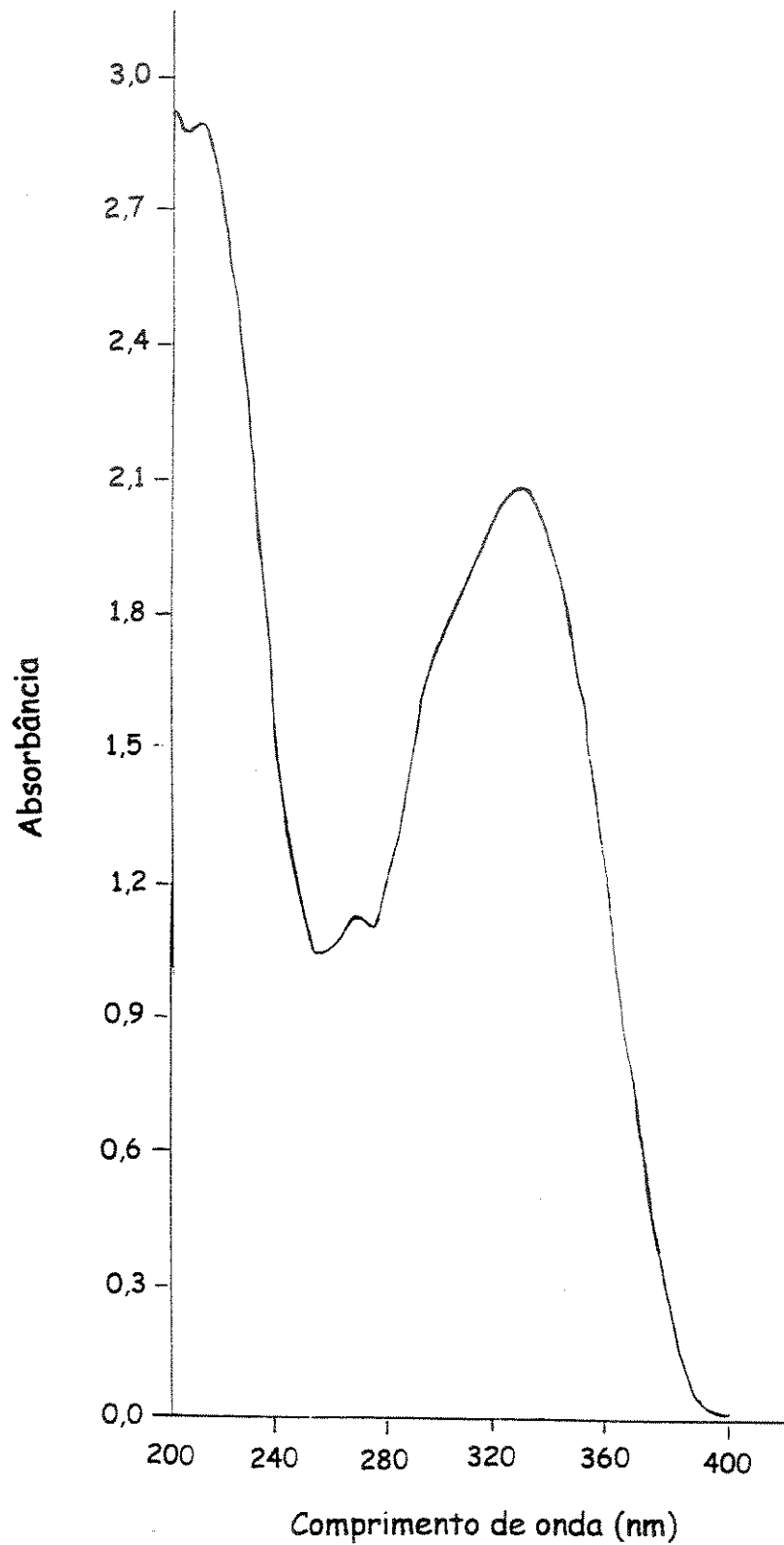
E110- RMN-2D a uma ligação (^1H , ^{13}C -HETCOR) do estilbeno (10)

E111-Espectro de massas (IE, 70 eV) do estilbeno (10)

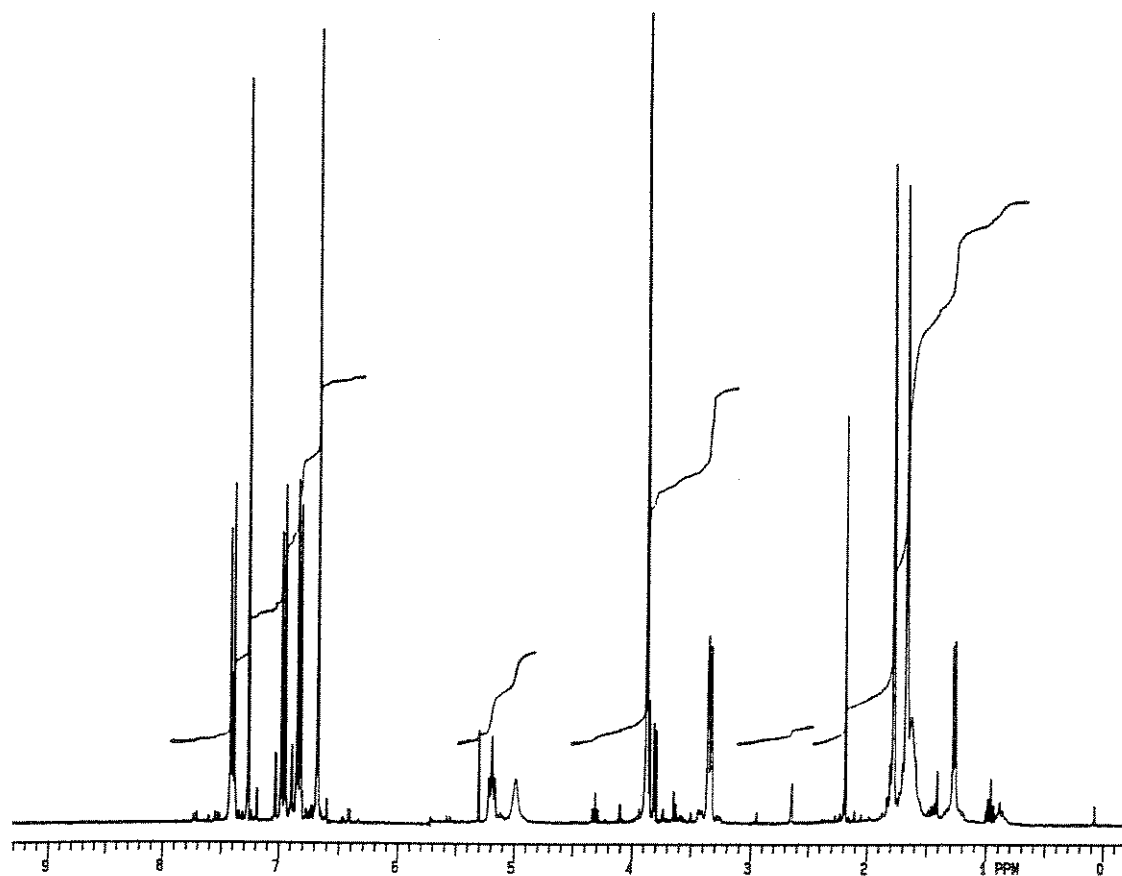
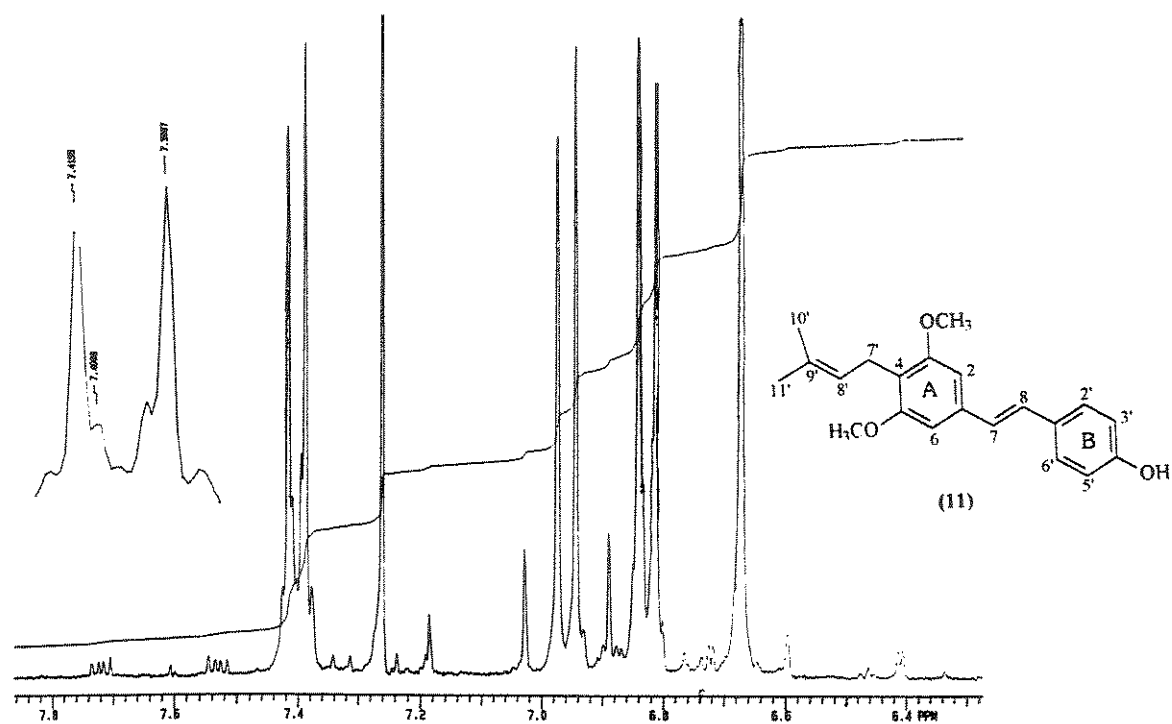


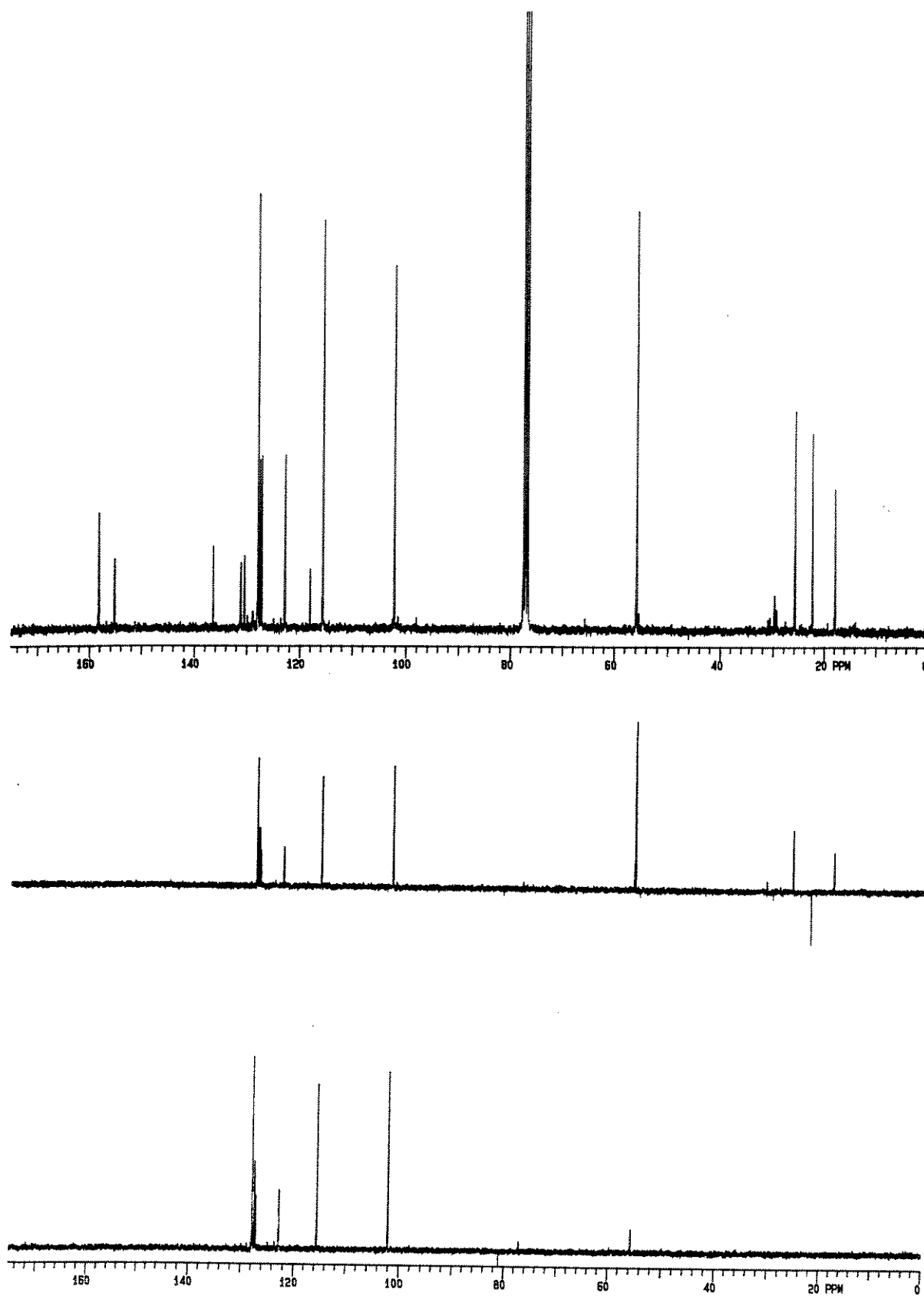
E112-Espectro de massas de alta resolução (IE, 70 eV) do estilbeno (10)

E113-Espectro no IV (Filme CH₂Cl₂) do estilbeno (10)

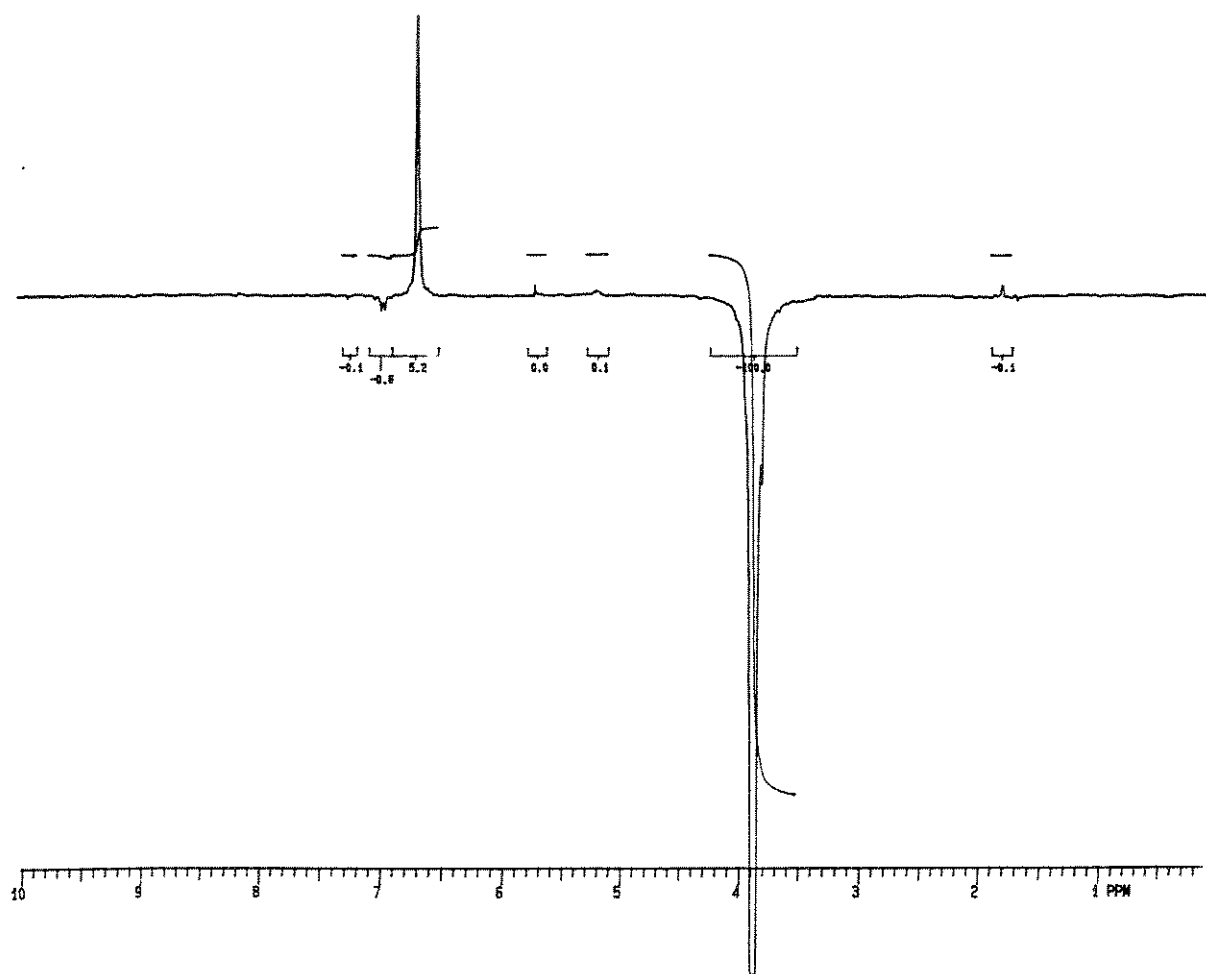


E114- Espectro no UV (MeOH) do estilbeno (10)

E115-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do estilbeno (11)

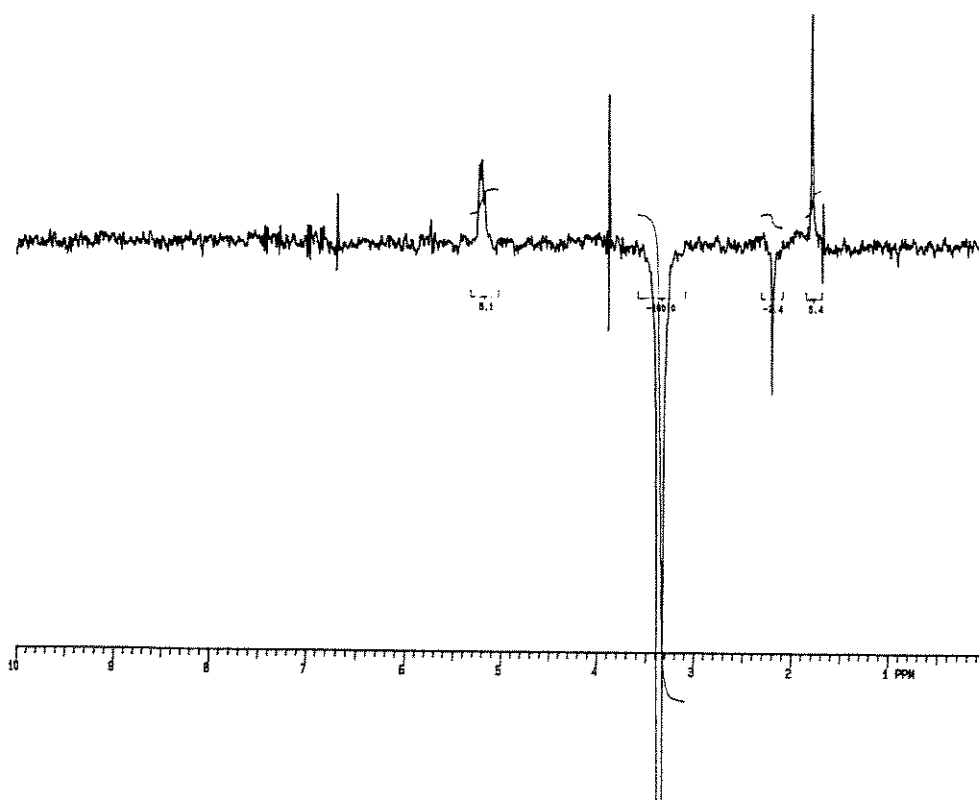


E116-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) e DEPT (90° e 135°) do estilbeno (11)

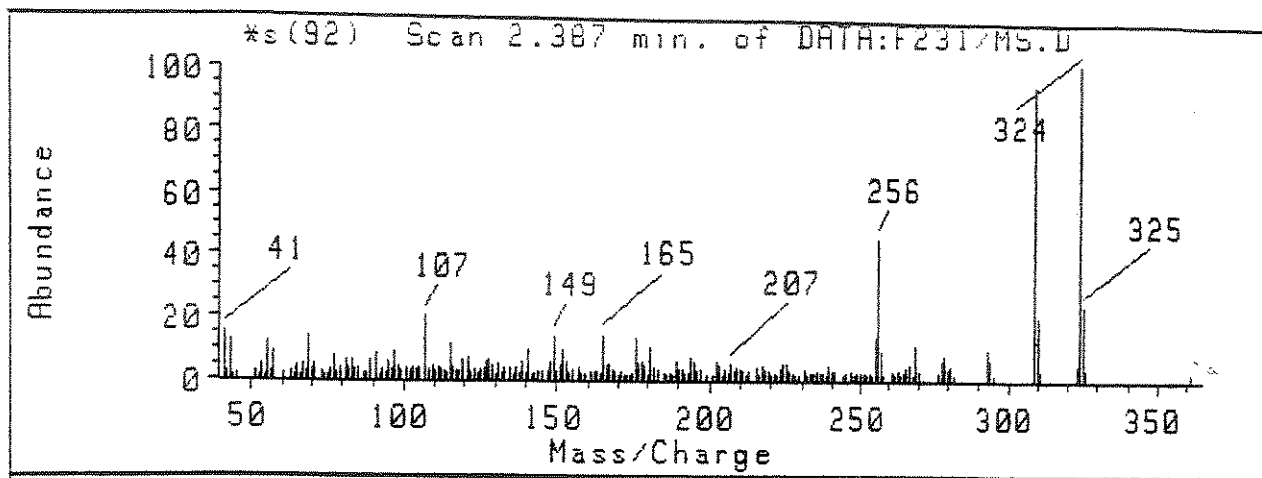


E117-Espectro de diferença de NOE (δ 3,86) do estilbeno (11)

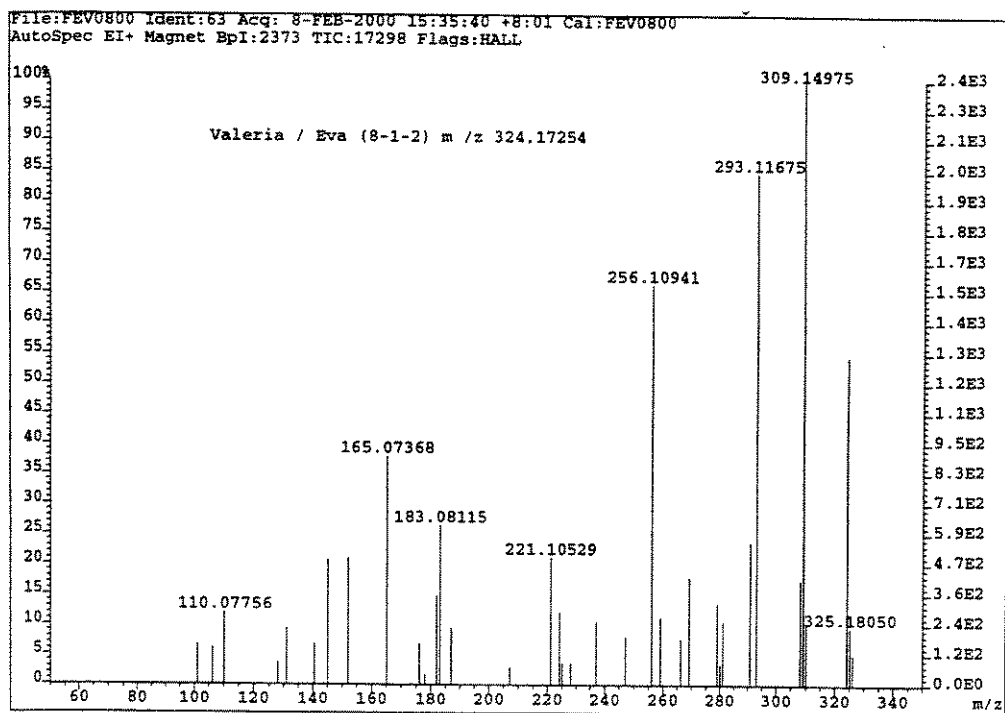
E118-Espectro de diferença de NOE (δ 6,67) do estilbeno (11)



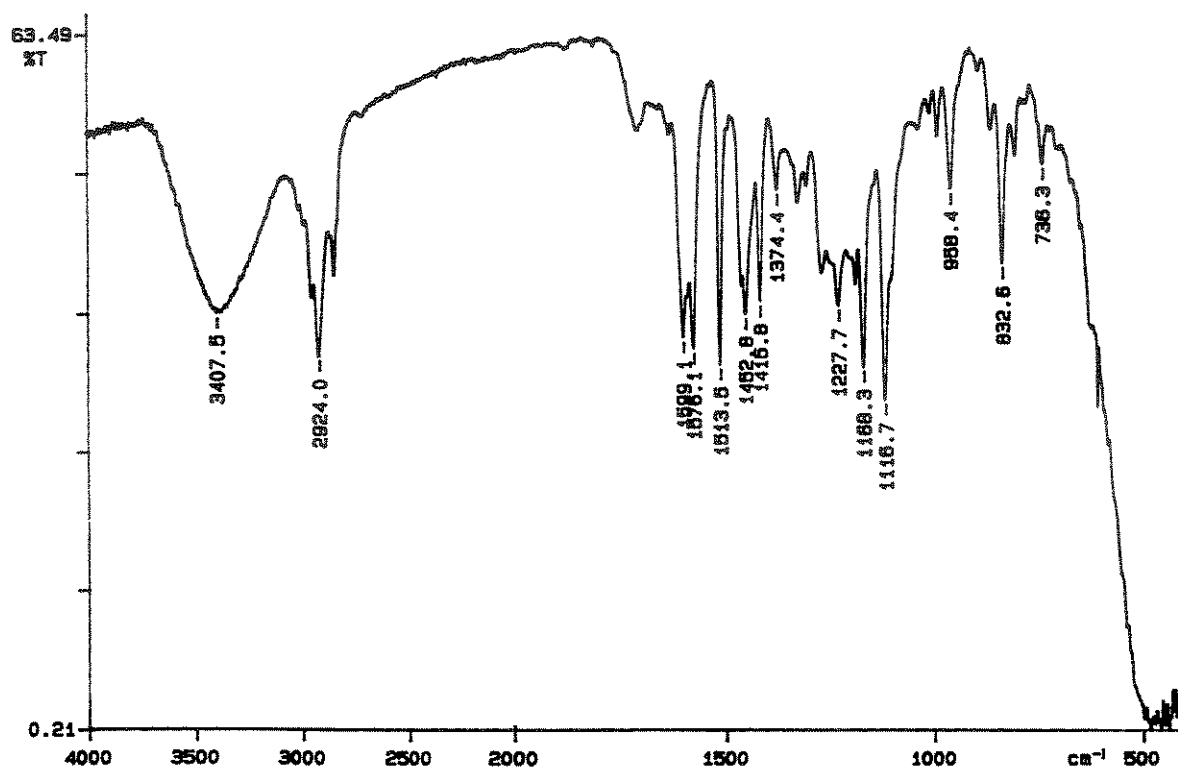
E119- Espectro de diferença de NOE (δ 3,34) do estilbeno (11)

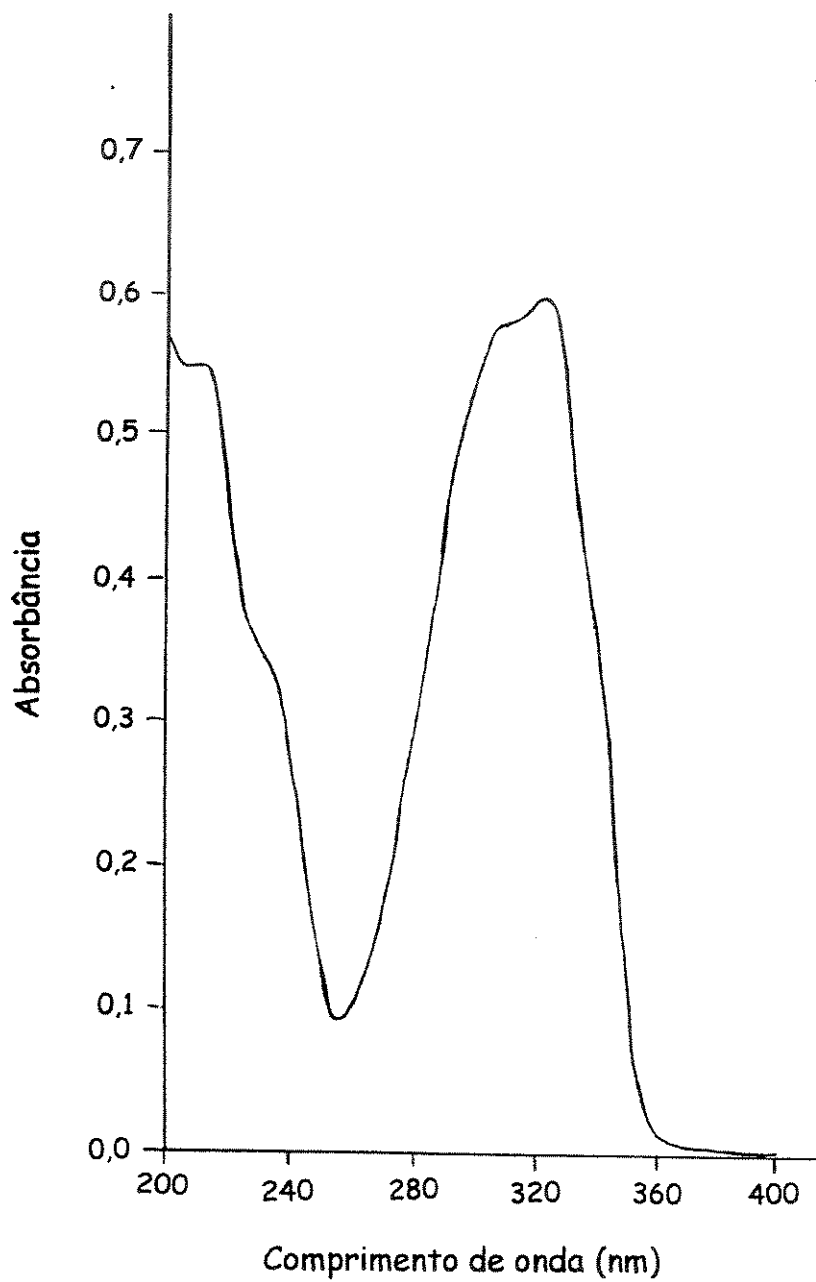


E120-Espectro de massas (IE, 70 eV) do estilbeno (11)

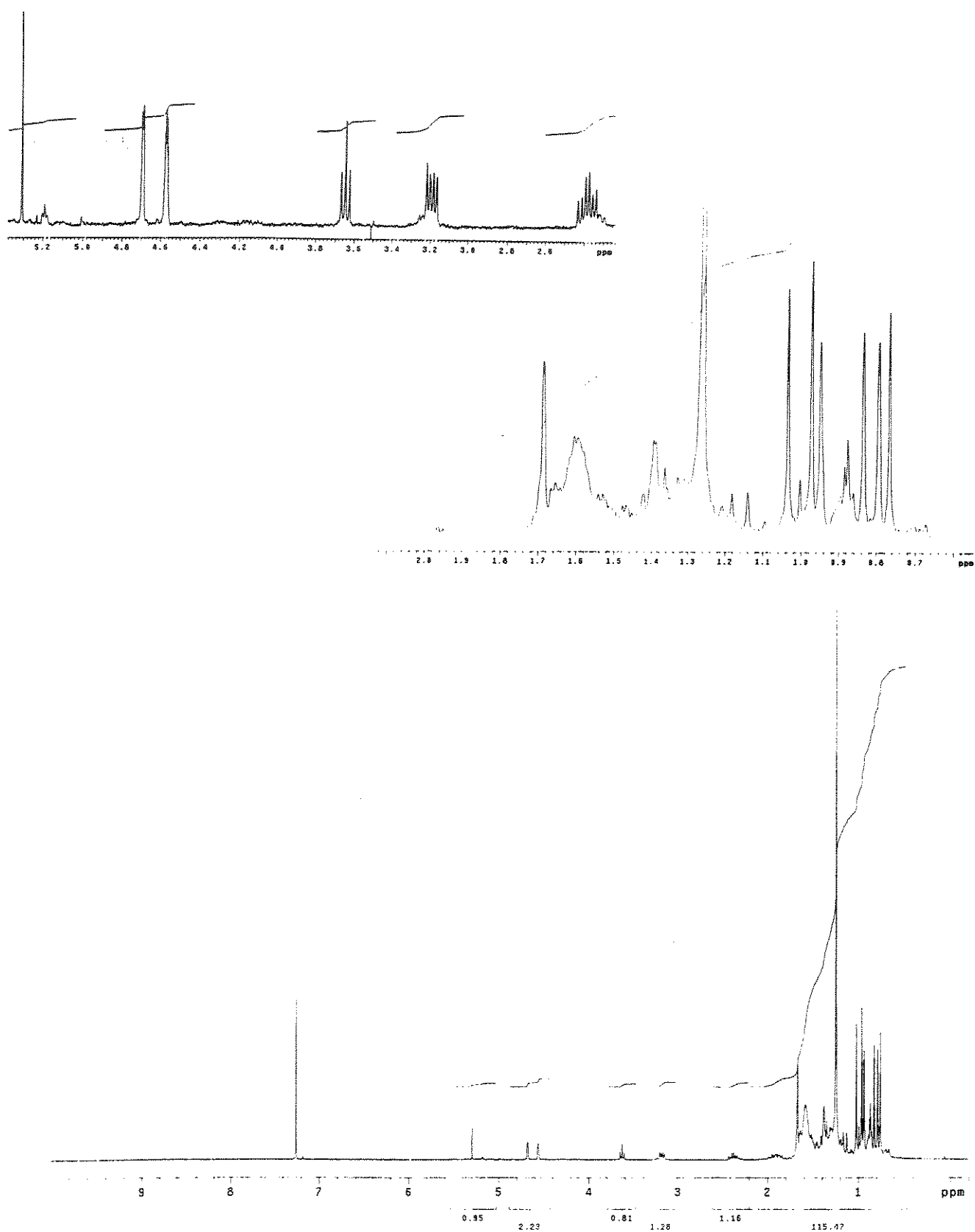


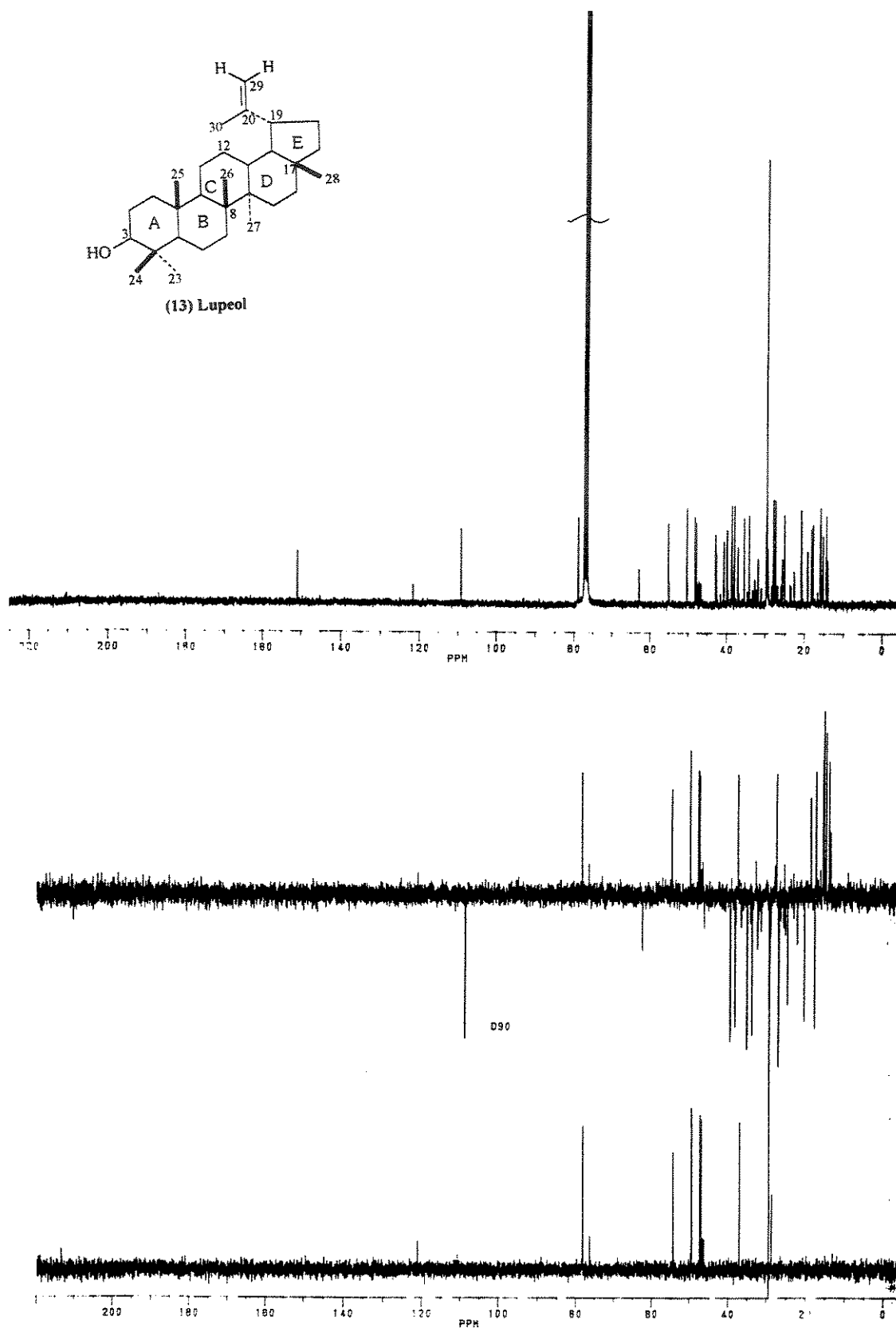
E121-Espectro de massas de alta resolução (IE, 70 eV) do estilbeno (11)

E122-Espectro no IV (Filme CH_2Cl_2) do estilbeno (11)

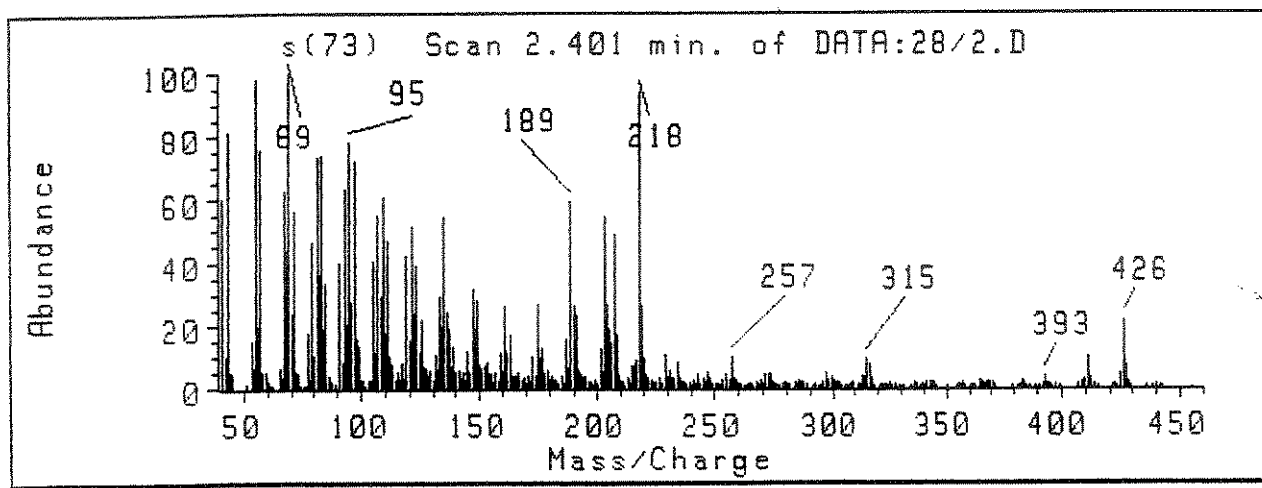


E123-Espectro no UV (MeOH) do estilbeno (11)

E124-RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Lupeol (13)



E125-RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) e DEPT (90° e 135°) do Lupeol (13)



E126-Espectro de massas (IE, 70 eV) do Lupeol (13)