

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Instituto de Química

Estudo Fitoquímico de *Lecointea hatschbachii* Barneby

Dissertação de Mestrado

Aluno: Carlos Alberto Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães

Campinas, junho de 2004.

UNIDADE	BC
CHAMADA	UNICAMP
	B234e
EX	
IMBO, BC/	617.97
IOC.	16.86.05
C	☐
D	☒
EÇO	11.00
ITA	10-2.05
CPD	

61797

Rev. id. 349303

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

B234e

Barbosa, Carlos Alberto.

Estudo fitoquímico de *Lecointea hastchbachii*
Barneby / Carlos Alberto Barbosa. -- Campinas, SP:
[s.n], 2004.

Orientador: Aderbal Farias Magalhães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Flavonóides. *2. Papilionodeae.
3. Cumestanos. 4. *Lecointea. I. Magalhães,
Aderbal Farias. II. Universidade Estadual de
Campinas. III. Título.

*A minha esposa Maria
e a meus pais Josephina e Leonel*

AGRADECIMENTOS

A Aderbal Farias Magalhães pela orientação segura e apoio.

A Eva por compartilhar seus conhecimentos e valiosas sugestões.

A Ana Lúcia, André, Adriana, Beatriz, Cláudio, Celira, Laverde, Lourdes, Lucimar, Luiz Antônio, Mariângela, Marisa, Miriam, Samísia, Sérgio e Suzan pelo excelente ambiente de trabalho.

A Ana Maria Tozzi pela coleta e identificação da planta.

Aos funcionários da UNICAMP pelos inúmeros serviços prestados.

Aos professores do IQ pela acessibilidade e colaboração.

A FAPESP pelo suporte financeiro.

CURRICULUM VITAE

1. ENSINO MÉDIO

1.1. Concluído na Escola de 2º Grau “Professor Raymundo Moniz de Aragão”, de Espírito Santo do Pinhal, no ano letivo de 1978.

2. GRADUAÇÃO

2.1. Graduado em ENGENHARIA AGRONÔMICA, pela Faculdade de Agronomia e Zootecnia “Manoel Carlos Gonçalves”, no ano de 1983, com diploma registrado sob nº 96552, em 29 de novembro de 1983.

3. EXPERIENCIA DE MAGISTÉRIO

3.1. Segundo grau.

3.1.1. Foi professor das disciplinas ANÁLISE QUÍMICA, QUÍMICA GERAL, PROCESSOS INDUSTRIAIS E ORGANIZAÇÃO E NORMAS, junto à escola de 2º Grau “Professor Raymundo Moniz de Aragão”, no período de 03 de maio de 1982 a 03 de maio de 1989.

3.2. Superior.

3.2.1. Foi professor de QUÍMICA GERAL, QUÍMICA ANALÍTICA e QUÍMICA ORGÂNICA, no curso de Engenharia Agrônômica “Manoel Carlos Gonçalves”, desde março de 1985 até agosto de 1999.

3.2.2. Foi professor auxiliar nas aulas práticas de BIOQUÍMICA E QUÍMICA FISIOLÓGICA, do Curso de Medicina Veterinária “Prof. Antonio Secundino de São José”, desde fevereiro de 1988 até fevereiro de 1999.

3.2.3. É professor de QUÍMICA ORGÂNICA e QUÍMICA ANALÍTICA junto ao Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, desde agosto de 1999, permanecendo até a presente data.

4. RESUMOS PUBLICADOS

4.1. Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; Barbosa, C. A.. **Um Novo Cumestano e Pterocarpano de *Lecointea hatschbachii* Barneby.** XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, 20 a 23 de maio de 2002.

4.2. Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; Barbosa, C. A.. **Novos Isoflavonoides de *Lecointea hatschbachii* Barneby.** XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, 20 a 23 de maio de 2003.

4.3. Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; Barbosa, C. A., Oliveira, A. C.; Mansano, V. F.. **Fitoquímica de *Harleyodendron* e *Lecointea* e sua contribuição à taxonomia.** XXV Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, Campos do Jordão, 16 a 18 de outubro de 2003.

Resumo

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Lecointea hatschbachii* BARNEBY teve o propósito de isolar e elucidar as estruturas dos flavonóides presentes nos extratos das raízes da planta *Lecointea hatschbachii* Barneby. O gênero *Lecointea* possui seis espécies descritas, todas quimicamente inexploradas, e está localizado junto ao grupo *Lecointea*, tribo *Swartzia*, subfamília *Papilionoideae*, de *Leguminosae*, com outras espécies da tribo *Swartzia*. Alguns estudos recentes sugerem que o grupo *Lecointea* não é monofilético, o que inspirou o nosso grupo de pesquisa a estudá-lo para verificar correlações quimiotaxonômicas que possam corroborar com a revisão taxonômica sugerida por Tozzi, A. M. G. A.. A análise do extrato clorofórmico da raiz de *Lecointea hatschbachii* Barneby, resultou no isolamento de cinco isoflavonóides, dos quais três são inéditos, a saber: 7,2',4'- triidróxi-6'(α,α -dimetilalil)-3'-metoxiisoflavona; 3-hidróxi-9,10-cromenocumestano; e 3,9-diidróxi-7(α,α -dimetilalil)-10-metóxi-cumestano, além dos já conhecidos isosojagol e medicarpina. A identificação dos compostos foi realizada por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , COSY de ^1H , HMBC, HSQC, NOE, UV, IV e espectrometria de massas de alta resolução. O fato da maioria das substâncias isoladas serem isoflavonóides com similares padrões de oxidação, além de taxa de oxidação/metilação típicas da tribo *Swartzia*, constituem evidências de que *Lecointea hatschbachii* está bem alocada na tribo proposta. Após ensaio de letalidade a *Artemia salina*, constatou-se atividade do extrato hexânico, da medicarpina e dos dois cumestanos inéditos, e por bioautografia, constatou-se a atividade da nova isoflavona a *Penicillium funiculosum*, da medicarpina a *Aspergillus niger* e do novo cumestano triidroxilado a *Staphylococcus aureus* e a *Alternaria alternata*.

ABSTRACT

A PHYTOCHEMICAL STUDY ABOUT *Lecointea hatschbachii* BARNEBY had the purpose to isolate and elucidate the present flavonoid structures in the roots extracts of the plant *Lecointea hatschbachii* Barneby. The genus *Lecointea* has six reported species, all of them chemically unexplored, and it is localized inside the *Lecointea* group, *Swartzia* tribe, *Papilionoideae* subfamily, of *Leguminosae*, the *Swartzia* tribe encompasses species. Some recent studies propose that the *Lecointea* group is not monophyletic, which inspired our research group in order to verify chemotaxonomic correlations which could support the taxonomic review suggested by Tozzi, A.M. G. A. The analysis of the chloroformic extract from *Lecointea hatschbachii* Barneby roots resulted in the isolation of five isoflavonoids, (being three of them unreported), namely: 7, 2, 4 - trihydroxy - 6 (α,α - dimethylallyl) - 3 - methoxyisoflavone, 3 - hydroxy-9,10-chromenecoumestan, e 3,9-dihydroxy -7(α,α -dimethylallyl) -10-methoxy-coumestan, besides the already known isosojagol e medicarpin, were isolated. The compounds identification was performed by of ^1H and ^{13}C RMN, COSY of ^1H , HMBC, HSQC, NOE, UV and IR spectroscopy and high resolution mass spectrometry. The fact that the isolated substances are isoflavonoids with a similar oxidation pattern, besides the oxidation/methylation ratio typical of the *Swartzia* tribe species, evidenciated that *Lecointea hatschbachii* is well placed inside the same tribe. After the *Artemia salina* lethality test, it was evident hexane extract activity, medicarpin activity and two inedited coumestans activity, and by bioauthography, it was evident the new isoflavone activity, against *Penicillium funiculosum*, medicarpin activity, against *Aspergillus niger* and new trihydroxy coumestan activity, against *Staphylococcus aureus* and *Alternaria alternata*.

INDICE

		PÁGINA
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	QUIMIOTAXONOMIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA	4
1.2	FLAVONÓIDES	5
1.2.1	BIOSSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES	6
1.2.2	ISOFLAVONAS	11
1.2.3	CUMESTANOS	13
1.2.4	PTEROCARPANOS	17
1.3	O GÊNERO <i>Lecointea</i>	20
1.4	OBJETIVOS	25
2	PARTE EXPERIMENTAL	27
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1.1	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	27
2.1.2	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	27
2.1.3	MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS	28
2.2	ESTUDO FITOQUÍMICO	28
2.2.1	COLETA E PREPARAÇÃO DAS RAÍZES	28
2.2.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	29
2.2.3	ISOLAMENTO	31
2.2.3.1	ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO	31
2.2.3.2	ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO	31
2.2.3.3	ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO	33

2.2.3.4	DADOS FÍSICOS E FLUXOGRAMAS DE ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DE <i>Lecointea hatschbachii</i> BARNEBY	34
2.2.3.4.1	ISOFLAVONA I	34
2.2.3.4.2	CUMESTANO I	36
2.2.3.4.3	CUMESTANO II	38
2.2.3.4.4	CUMESTANO III	40
2.2.3.4.5	PTEROCARPANO I	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1	ISOFLAVONA I	45
3.2	CUMESTANO I	53
3.3	CUMESTANO II	60
3.4	CUMESTANO III	67
3.5	PTEROCARPANO I	74
3.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
4	ENSAIOS BIOLÓGICOS	79
4.1	INTRODUÇÃO	79
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	80
4.2.1	LETALIDADE À <i>Artemia salina</i>	80
4.2.2	BIOAUTOGRAFIA	81
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.3.1	LETALIDADE À <i>Artemia salina</i>	83
4.3.2	BIOAUTOGRAFIA	87
5	CONCLUSÕES	91
6	BIBLIOGRAFIA	93
E.1	APENDICE (Espectros)	101
T.1	APENDICE (Tabelas HMBC)	162

INDICE DE TABELAS

1.2.2.1	Padrões de oxidação das Isoflavonas e sua ocorrência.	12
1.2.3.1	Padrões de oxidação dos Cumestanos e sua ocorrência.	16
2.2.3.2.1	Relação entre os grupos de frações, dados da cromatografia em coluna do extrato clorofórmico II, e das substâncias isoladas.	32
2.2.3.2.2	Relação entre os grupos de frações, dados da cromatografia em coluna do extrato clorofórmico I, e das substâncias isoladas.	33
3.1.1	Dados de RMN de ^1H para a Isoflavona I.	47
3.1.2	Dados de RMN de ^{13}C e HSQC para a Isoflavona I.	49
3.2.1	Dados de RMN de ^1H para o Cumestano I.	54
3.2.2	Dados de RMN de ^{13}C e HSQC para o Cumestano I.	56
3.3.1	Dados de RMN de ^1H para o Cumestano II.	62
3.3.2	Dados de RMN de ^{13}C e HSQC para o Cumestano II.	63
3.4.1	Dados de RMN de ^1H para o Cumestano III.	68
3.4.2	Dados de RMN de ^{13}C e HSQC para o Cumestano III.	70
3.5.1.	Dados de RMN de ^1H para o Pterocarpano I.	75
4.3.1.1	Estimativa da CL_{50} e o intervalo de confiança pelo Método de Probit.	86
4.3.2.1	Resultados obtidos nos testes de bioautografia para os Extratos e substâncias isoladas de <i>L. hatschbachii</i> .	88
T.1	Dados de RMN em HMBC para a Isoflavona I.	162
T.2	Dados de RMN em HMBC para o Cumestano I.	163
T.3	Dados de RMN em HMBC para o Cumestano II.	164
T.4	Dados de RMN em HMBC para o Cumestano III	165

INDICE DE FIGURAS

1.2.1.1	Origem biossintética dos flavonóides 5-hidróxi e 5-desóxi.	7
1.2.1.2	Mecanismo da migração 1-2 do anel aromático.	7
1.2.1.3	Derivados biossintéticos das isoflavonas.	8
1.2.1.4	Biossíntese de unidades IPP e DMAPP em plantas.	9
1.2.1.5	Substituintes derivados da inclusão e modificação de grupos prenila, observados em isoflavonóides naturais.	10
1.2.2.1	O hormônio β estradiol.	11
1.2.2.2	Esqueleto e numeração das isoflavonas.	12
1.2.2.3	A isoflavona genisteína	13
1.2.3.1	Comparação entre os modelos: um cumestano e β estradiol.	14
1.2.3.2	O cumestano cumestrol	15
1.2.3.3	Numeração dos cumestanos, segundo as isoflavonas.	16
1.2.3.4	O cumestano wedelolactona de <i>Eclipta prostrata</i> .	17
1.2.4.1	Conformações do esqueleto básico pterocarpânico RR.	18
1.2.4.2	O pterocarpano medicarpina e sua numeração.	19
1.3.1	Classificação da tribo Swartzia.	21
1.3.2	Espécies descritas para o gênero <i>Lecointea</i> .	23
1.3.3	Aspectos morfológicos de <i>Lecointea hatschbachii</i> .	23
2.2.2.1	Fluxograma de obtenção dos extratos de <i>L. hatschbachii</i> .	30
2.2.3.4.1.1	Fluxograma de isolamento da isoflavona I.	34
2.2.3.4.1.2	Isoflavona I.	35
2.2.3.4.2.1	Fluxograma de isolamento do cumestano I.	36
2.2.3.4.2.2	Cumestano I.	37
2.2.3.4.3.1	Fluxograma de isolamento do cumestano II.	38
2.2.3.4.3.2	Cumestano II.	39

2.2.3.4.4.1	Fluxograma de isolamento do cumestano III.	40
2.2.3.4.4.2	Cumestano III.	41
2.2.3.4.5.1	Fluxograma de isolamento do pterocarpano I.	42
2.2.3.4.5.2	Medicarpina.	43
3.1.1	Estruturas parciais propostas em função da biossíntese para a isoflavona I.	48
3.1.2	Interações de HMBC observadas para a isoflavona I	50
3.1.3	Principais incrementos de NOE/% observados para o anel B da isoflavona I.	50
3.1.4	Proposta para a isoflavona I e sua numeração.	51
3.1.5	Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para a isoflavona I.	52
3.2.1	Proposta em função da biossíntese para o cumestano I.	55
3.2.2	Interações de HMBC observadas para o cumestano I.	57
3.2.3	Proposta para o cumestano I e sua numeração.	58
3.2.4	Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para o cumestano I.	59
3.3.1	Proposta em função da biossíntese para o cumestano II.	61
3.3.2	Interações a longa distância por HMBC observadas para o cumestano II.	65
3.3.3	Proposta para o cumestano II e sua numeração.	65
3.3.4	Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para o cumestano II.	66
3.4.1	Proposta baseada na biossíntese para o cumestano III e sua numeração.	71
3.4.2	Interações a longa distância por HMBC, observadas para o cumestano III	71

3.4.3	Proposta para o cumestano III e sua numeração (isosojagol)	72
3.4.4	Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para o cumestano III.	73
3.5.1	Proposta para o pterocarpano I e sua numeração	74
3.5.2	Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para o pterocarpano medicarpina.	76
4.1	Controles padrões em bioautografia	82
4.3.2.1	Localização da Isoflavona I, e sua atividade fungicida à <i>Penicilium funiculosum</i> no ensaio de bioautografia.	89
4.3.2.2	Localização do Pterocarpano I, e sua atividade fungicida à <i>Aspergillus niger</i> , no ensaio de bioautografia.	89
4.3.2.3	Localização do Cumestano II, e sua atividade fungicida à <i>Alternaria alternata</i> , no ensaio de bioautografia.	90
4.3.2.4	Localização do Cumestano II, e sua atividade bactericida à <i>Staphylococcus aureus</i> , no ensaio de bioautografia.	90

INDICE DE ESPECTROS

E.1.1.1	Espectro de RMN de ^1H da isoflavona I.	101
E.1.1.2	Expansão do espectro de RMN de ^1H da isoflavona I.	102
E.1.2	Espectro de RMN COSY de ^1H da isoflavona I.	103
E.1.3	Espectro de RMN de ^{13}C da isoflavona I.	104
E.1.4	Espectro DEPT da isoflavona I.	105
E.1.5.1	Expansão do espectro de RMN HSQC da isoflavona I.	106
E.1.5.2	Expansão do espectro de RMN HSQC da isoflavona I.	107
E.1.6	Espectro de RMN em HMBC da isoflavona I.	108
E.1.7.1	Espectro NOESY1D da isoflavona I (irradiando H δ 1,2).	109
E.1.7.2	Espectro NOESY1D da isoflavona I (irradiando H δ 1,3).	109
E.1.7.3	Espectro NOESY1D da isoflavona I (irradiando H δ 3,7).	110
E.1.7.4	Espectro NOESY1D da isoflavona I (irradiando H δ 6,8).	110
E.1.7.5	Espectro NOESY1D da isoflavona I (irradiando H δ 7,7).	111
E.1.8	Espectro de massas de alta resolução da isoflavona I.	112
E.1.9	Espectro no U.V. para a isoflavona I.	113
E.1.10	Espectro no I.V. para a isoflavona I.	114
E.2.1.1	Espectro de RMN de ^1H do cumestano I.	115
E.2.1.2	Expansão do espectro de RMN de ^1H do cumestano I.	116
E.2.2.1	Espectro de RMN COSY de ^1H do cumestano I.	117
E.2.2.2	Expansão do espectro de RMN COSY de ^1H do cumestano I.	118
E.2.3	Espectro de RMN de ^{13}C do cumestano I.	119
E.2.4	Espectro de DEPT do cumestano I.	120
E.2.5.1	Espectro de RMN em HSQC do cumestano I.	121
E.2.5.2	Expansão do espectro de RMN em HSQC do cumestano I.	122
E.2.6.1	Espectro de RMN em HMBC do cumestano I.	123

E.2.6.2	Expansão I do espectro de RMN em HMBC do cumestano I.	124
E.2.6.3	Expansão II do espectro de RMN em HMBC do cumestano I.	125
E.2.8	Espectro de massas de alta resolução do cumestano I.	126
E.2.9	Espectro no U.V. do cumestano I.	127
E.2.10	Espectro no I.V. do cumestano I.	128
E.3.1.1	Espectro de RMN de ^1H do cumestano II.	129
E.3.1.2	Expansão do espectro de RMN de ^1H do cumestano II.	130
E.3.2.1	Espectro de RMN COSY de ^1H do cumestano II.	131
E.3.2.2	Expansão I do espectro de RMN COSY de ^1H do cumestano II.	132
E.3.2.3	Expansão II do espectro de RMN COSY de ^1H do cumestano II.	133
E.3.3	Espectro de RMN de ^{13}C do cumestano II.	134
E.3.4	Espectro de DEPT do cumestano II.	135
E.3.5.1	Espectro de RMN em HSQC do cumestano II.	136
E.3.5.2	Expansão do espectro de RMN em HSQC do cumestano II.	137
E.3.6.1	Espectro de RMN em HMBC do cumestano II.	138
E.3.8	Espectro de massas de alta resolução do cumestano II.	139
E.3.9	Espectro no U.V. do cumestano II.	140
E.3.10	Espectro no I.V. do cumestano II.	141
E.4.1.1	Espectro de RMN de ^1H do cumestano III.	142
E.4.1.2	Expansão do espectro de RMN de ^1H do cumestano III.	143
E.4.2.1	Espectro de RMN COSY de ^1H do cumestano III.	144
E.4.2.2	Expansão do espectro de RMN COSY de ^1H do cumestano III.	145
E.4.3	Espectro de RMN de ^{13}C do cumestano III.	146
E.4.4	Espectro DEPT do cumestano III.	147

E.4.5.1	Expansão I do espectro de RMN em HSQC do cumestano III.	148
E.4.5.1	Expansão II do espectro de RMN em HSQC do cumestano III.	149
E.4.6	Espectro de RMN em HMBC do cumestano III.	150
E.4.8	Espectro de massas de alta resolução do cumestano III.	151
E.4.9	Espectro no U.V. do cumestano III.	152
E.4.10	Espectro no I.V. do cumestano III.	153
E.5.1.1	Espectro de RMN de ^1H do pterocarpano I.	154
E.5.1.2	Expansão I do espectro de RMN de ^1H do pterocarpano I.	155
E.5.1.3	Expansão II do espectro de RMN de ^1H do pterocarpano I.	156
E.5.1.4	Expansão III do espectro de RMN de ^1H do pterocarpano I.	157
E.5.1.5	Expansão IV do espectro de RMN de ^1H do pterocarpano I.	158
E.5.8	Espectro de CG/EM do pterocarpano I.	159
E.5.9	Espectro no U.V. do pterocarpano I.	160

INDICE DE QUADROS E GRÁFICOS

Q 4.3.1.1	Quadro resumo das tabelas de contingência para os extratos de <i>L. hatschbachii</i> .	77
Q 4.3.1.2	Quadro resumo das tabelas de contingência para as substâncias isoladas de <i>L. hatschbachii</i> .	78
Q 4.3.1.2	Quadro resumo das tabelas de contingência para as substâncias isoladas de <i>L. hatschbachii</i> (continuação).	79
G 3.6.1	Gráfico de Afinidades Evolutivas para as espécies de composição fitoquímica conhecidas da tribo Swartzia.	85
G 3.6.2	Gráfico de Oxidação X Metilação para a maioria das espécies de composição fitoquímica conhecidas da tribo Swartzia.	85
G 5.1	Curva de ORD (CHCl ₃) para o pterocarpano I (Medicarpina).	161

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac.Et.	Acetato de etila.
AcCoA	Acetil-coenzima A.
ADP	Difosfato de adenosina.
ATP	Trifosfato de adenosina.
CCD	Cromatografia em camada delgada.
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa.
CG	Cromatografia gasosa.
CL ₅₀	Concentração letal a 50% dos espécimes do organismo testado.
Clor.	Clorofórmio.
COSY	Experimento de correlação espectroscópica homonuclear.
δ	Deslocamento químico.
<i>d</i>	Dubleto.
<i>dd</i>	Duplo dubleto.
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto.
DEPT	Experimento de RMN de ¹³ C utilizando transferência de polarização.
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato.
EBSCO	Diversos materiais bibliográficos em formato eletrônico.
EM	Espectro de massas.
Éter et.	Éter etílico.
Hex.	Hexano.
HMBC	Experimento de correlação heteronuclear usando acoplamentos a longa distância.
HS-CoA	Coenzima A.
HSQC	Experimento de correlação heteronuclear usando acoplamentos a uma ligação.

IPP	Isoprenilpirofosfato.
IV	Infravermelho.
<i>J</i>	Constante de acoplamento.
<i>m/z</i>	Relação entre a massa do íon e a sua carga (Daltons/unidade de carga).
Met.	Metanol.
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo.
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.
NOE	Efeito Overhauser nuclear.
NOESY1D	Experimento de NOE.
PROBE	Bibliotecas Eletrônicas.
Quant.	Quantidade.
RMN	Ressonância magnética nuclear.
RPO	Probabilidade relativa de ocorrência.
<i>s</i>	Singleto.
<i>tsept.</i>	Trisepteto.
UNIBIBLI	Base de Dados USP, UNICAMP, UNESP.
UV	Ultravioleta.

1. INTRODUÇÃO

A família de plantas Leguminosae, também citada como Fabaceae, é constituída por cerca de 17.500 espécies, distribuídos em cerca de 650 gêneros (Polhill, 1994)¹, incluindo árvores, arbustos, lianas e ervas, com distribuição cosmopolita. A família Leguminosae destaca-se principalmente pela sua significância na natureza, representando quase um décimo de todas as espécies de plantas floríferas, só comparável em número de espécies entre as Angiospermas às famílias Orchidaceae e Asteraceae (Raven et alii 1996)². Na classe dicotiledônea a família é tão importante economicamente quanto às gramíneas entre as monocotiledôneas (fonte de cereais), pois além de contribuir com espécies de legumes comestíveis, de alto valor protéico, tais como diversos feijões e favas (dos gêneros *Phaseolus* e *Vicia* respectivamente), e a soja (*Glycine hispida*), é fonte de madeiras de lei, tais como Pau Brasil (*Caesalpinia echinata*), os jacarandás (diversas espécies de *Dalbergia* e *Machaerium*), as sucupiras (diversas espécies de *Gonphina* e *Pterodon*), as copaíbas (diversas espécies de *Copaifera*), entre outras (Lorenzi, 1992 e 1999)^{3,4}, também é representativo nesta família o número de plantas descritas com propriedades medicinais como a própria copaiba (Tambe et alii 1996)⁵ e o fedegoso (*Cassia occidentalis*) (Simões et alii 1999, Matos 2002)^{6,7}.

Há muitas décadas os taxonomistas estabeleceram uma subdivisão da família Leguminosae em três subfamílias, Mimosoideae, Caesalpinioideae, Papilionoideae, das quais a subfamília Papilionoideae compreende 2/3 das espécies, com distribuição geográfica mais ampla, incluindo regiões temperadas, se estendendo desde florestas úmidas até desertos secos e frios (Polhill 1981)⁸, sendo a mais representativa dentro da família Leguminosae. De acordo com Polhill (1994)¹ esta subfamília subdivide-se em 30 tribos com cerca de 440 gêneros, incluindo entre outros *Swartzia* e *Zollernia* de Swartzieae, *Andira* e *Dalbergia* de Dalbergieae,

Tephrosia, *Derris* e *Lonchocarpus* de Millettieae, *Medicago* de Trifolieae, *Psoralea* de Psoraleae, amplamente citados na literatura como fonte de compostos biologicamente ativos (Di Stasi & Hiruma-Lima 2002, Lorenzi & Matos 2002)^{9,10} e *Phaseoleae* de Phaseollus, como fonte de alimento.

Devido ao seu enorme uso prático a família Leguminosae tem sido extensivamente explorada em seus metabólitos secundários resultando na descoberta de cerca de 28% dos flavonóides conhecidos hoje em dia e de 95% de todos os isoflavonóides. A importância dos metabólitos secundários é clara, basta examinar o recente artigo “Advances in flavonoids research since 1992” em que os autores Harborne & Williams (1992)¹¹ abordam o papel das antocianinas e flavonas na estabilização das cores azuis das flores de plantas angiospermas, em relação ao fenômeno de polinização por abelhas; a contribuição dos flavonóides na proteção das folhas das plantas que o produzem contra radiação UV-B; o papel dos flavonóides na proteção contra infecção microbiana e predadores herbívoros, e as propriedades dos flavonóides quanto a seus valores nutricionais e medicinais, ressaltando a importância da abordagem multidisciplinar e a compreensão de fenômenos ecológicos.

No entanto o aspecto prioritário que motivou o desenvolvimento deste trabalho, foi o argumento quimiotaxonômico, pois embora Gottlieb (1982)¹² advirta para que o fato da presença ou ausência de determinados metabólitos em plantas, deva ser interpretado com cautela, em especial a presença de flavonóides no âmbito da família leguminosae, tem sido altamente proficiente nas revisões taxonômicas mais atuais. E ainda apesar de Harborne (2000)¹³ ter afirmado que “a época de ouro da quimiotaxonomia” tenha ocorrido no período de 1965 a 1985, declinando provavelmente com o advento da “genômica”, ora em plena fascinação, neste seu mesmo artigo “Arsenal for survival: secondary Plant Products” o autor comenta: ... “nesta situação em que o sequenciamento de DNA é preponderante,

pode se muito bem propor a questão: tem futuro a quimiosistemática envolvendo a investigação de metabólitos secundários em plantas? (ele mesmo responde) No meu ponto de vista a resposta é inequivocamente sim"... por várias razões que passa a defender. E é dentro do espírito da terceira razão defendida por Harborne, a qual é à busca de características independentes que possam auxiliar a classificação das plantas no intervalo entre família e gênero, que predominantemente residem nossos motivos.

Há mais de vinte anos o grupo de Magalhães, A. F. e Magalhães, E. G., a que pertence o autor desta monografia, vem se dedicando ao estudo fitoquímico de plantas nativas, quimicamente inexplorada, com interesse quimiotaxonômico, tendo nos últimos quinze anos estabelecido uma estreita colaboração com a botânica Tozzi, A. M. G. A., do departamento de botânica da Universidade de Campinas, no empenho de estabelecer possíveis correlações entre o estado de evolução dos flavonóides presentes com os táxons dos espécimes estudados.

A locação das espécies em subfamília e tribo é particularmente complexa, não apenas pela quantidade de gêneros e espécies, mas também por fatores inerentes à própria evolução. As interações com outros organismos e a competição por luz e nutrientes dentro de um ecossistema, tem como consequência o paralelismo, divergência e convergência, que são mecanismos pelos quais a evolução acontece. Estes mecanismos ocorrem em taxas diferenciadas e mesclam as características de filogenias diferentes, dificultando o levantamento de seu histórico. Todas as árvores filogenéticas, nas quais a classificação das espécies está fundamentada são hipóteses sobre a história da evolução, e portanto é possível agrupar evidências favoráveis e contrárias a uma determinada proposta (Futuyma 1992)¹⁴. A compreensão dos meandros da evolução é dificultada, em parte também, devido ao pequeno número de espécies atuais em comparação com as já extintas (Gottlieb 1982)¹², diminuindo a possibilidade de uma descendência direta

e o estabelecimento de relações paleobotânicas. As dificuldades no reconhecimento da história da evolução e por consequência, na classificação, tornam preciosas novas informações que corroborem com seu esclarecimento.

1.1 QUIMIOTAXONOMIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A classificação de plantas com relação à composição química teve início muito antes da anunciação da teoria da evolução por Darwin, com as explorações de terras distantes a procura de especiarias, principalmente canela, chá e eventuais substitutos amplamente comercializados e consumidos na Europa, além da busca de plantas com atividades farmacológicas. Estas propriedades decorrem da presença de certos metabólitos secundários, específicos de certas plantas ou grupos de plantas, em alguns casos as semelhanças eram morfológicas e químicas, o que servia de guia aos exploradores, no processo de seleção dos espécimens a serem testados.

A presença de metabólitos secundários em plantas é um exemplo de resposta evolutiva em um determinado ecossistema, destacando-se a função protetiva dos metabólitos secundários contra outros organismos e fatores ambientais. Considerando por este âmbito fica clara a relação entre evolução química dos metabólitos e ecologia, culminando com a possibilidade de algumas destas substâncias serem bons marcadores taxonômicos. As moléculas biomarcadoras têm em comum rotas biossintéticas complexas, assim mesmo uma molécula simples, implica na manifestação de inúmeros cofatores e enzimas, que são manifestações implícitas da espécie (Gottlieb 1982)¹².

O estabelecimento de relações filogenéticas em plantas a partir da composição química é dificultado, ainda que dentro de certos limites, por fatores ambientais e geográficos, anomalias bioquímicas são mais facilmente fixadas em

populações pequenas, em grupos estreitamente aparentados ou sobre segregação em regiões geograficamente restritas. A correlação entre a flutuante pressão seletiva de herbívoros e a presença de metabólitos secundários é inegável, também é fato observado que espécies aparentadas tendem a diversificação química quando coexistem em uma mesma área, podendo ser semelhantes quando em regiões diferentes, mas é incontestável a relação entre a composição química de uma linhagem vegetal e o ambiente geográfico.

Um mecanismo biossintético é limitado por restrições genéticas de longo prazo, mas pode sofrer ajustamento em curto prazo em resposta a perturbações e influenciar a estrutura de uma comunidade. A complexidade dos aspectos químicos exigem estudos multidisciplinares envolvendo biossíntese, fisiologia, ecologia, genética, evolução e até geografia dotando a sistemática moderna de dados preditivos, que aliados a outras fontes permitem uma classificação mais lógica e abrangente (Gottlieb 1982, Harborne & Mabry 1982)^{12,15}.

1.2 FLAVONÓIDES

Dentre os metabólitos secundários como moléculas biomarcadoras destacam-se os flavonóides, sua distribuição nas plantas superiores, além de sua estabilidade química e diversidade estrutural, são especialmente convenientes aos estudos quimiosistemáticos (Hegnauer & Grayer-Barkmeijer)¹⁶. Os flavonóides estão presentes por toda a planta, apresentando amplas funções biológicas, que vão desde a cor das flores, proteção contra radiação U.V., até interações biológicas complexas com outros organismos (Grayer & Kokubum 2001, Chansakaow 2000)^{17,18}, revelando uma fonte de idéias para o planejamento de novas moléculas

bioativas, entre elas fármacos (Harborne 2000, Barreiro 2001, Barreiro e Fraga 2001)^{13, 19, 20}.

Apesar das restrições de natureza fitogeográficas e ecológicas, numerosos casos já estudados estabelecem correlação entre a composição em flavonóides e classificação de plantas em subfamília e família, mostrando ser um promissor grupo de marcadores na avaliação de classificações competitivas, com equivalentes dados biológicos satisfatórios (Gottlieb 1982)¹².

A presença de flavonóides é especialmente notável na família Fabaceae (Leguminosae). Entre as estruturas dos flavonóides atribuídos a esta família, uma quantidade expressiva apresenta grupos prenila, e/ou a ausência de funções oxigenadas em C-5 (figura 1.2.1.1), é notável também que a grande maioria dos isoflavonóides, flavonóides que sofreram a migração arila 1-2 (figura 1.2.1.2), estão delimitados quase que exclusivamente a subfamília Papilionoideae (Hegnauer & Barkmeijer 1993)¹⁶.

1.2.1 BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides apresentam dois anéis aromáticos, o anel A formado por três unidades C₂ de acetil ou malonil Coenzima A e o anel B, formado a partir do aminoácido fenilalanina, que por sua vez é resultante no metabolismo primário da glicose, pela rota do ácido chiquímico (Knaggs 2000, Dewick 1997)^{21,22}. Durante a formação da chalcona a manifestação de uma redutase resulta na eliminação da hidroxila do carbono C-5, formando os flavonóides 5-desóxi (Hegnauer & Barkmeijer 1993)¹⁶, evidenciando a facilidade biossintética na produção de moléculas com substituintes oxigenados nos carbonos C-7, C-9, C-4' ou C-5, C-7, C-9, C-4', (figura 1.2.1.1).

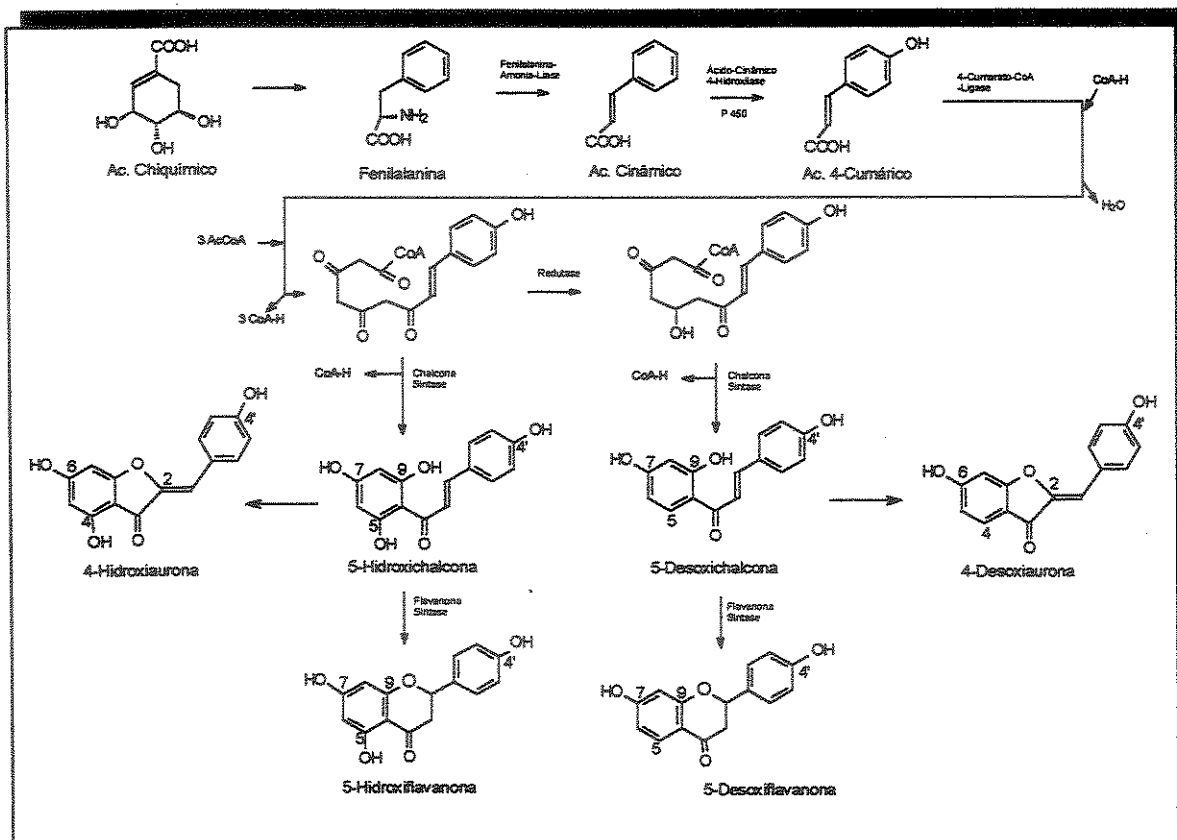


Figura 1.2.1.1 Origem biossintética dos Flavonóides 5-hidróxi e 5-desóxi.

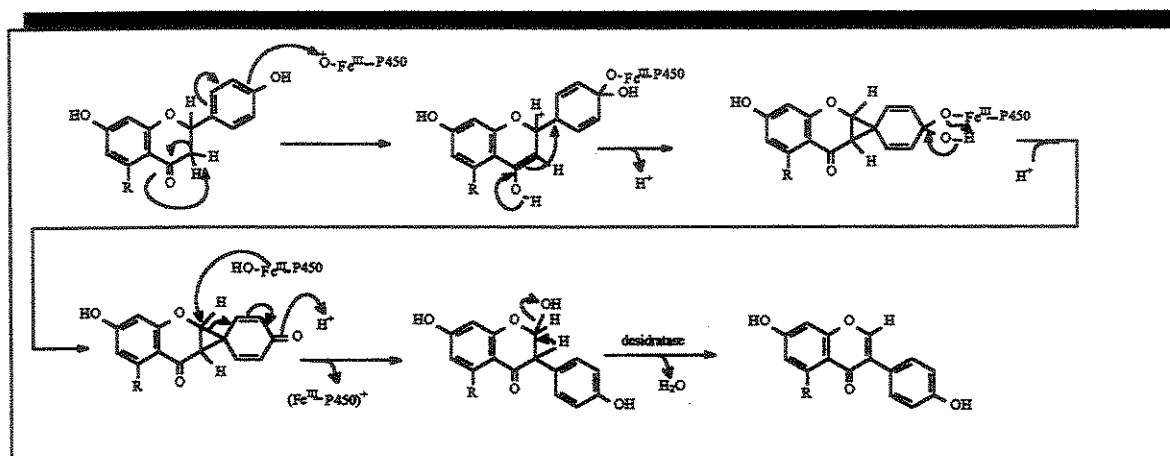


Figura 1.2.1.2 Mecanismo de migração 1-2 do anel aromático.

A partir das chalconas, com a participação da enzima chalcona isomerase são sintetizadas as flavanonas, que na sequência com a participação do citocromo P-450 e cofatores, promove a migração 1-2 do anel aromático (Crombie & Whiting 1998)²³, em seguida a eliminação de água pela ação de uma desidratase completa a síntese das isoflavonas (figura 1.2.1.2), primeira de uma distinta subclasse dos flavonóides denominada de isoflavonóides. Das isoflavonas ocorre a diferenciação de todas as outras classes de isoflavonóides (figura 1.2.1.3), principalmente pela variação da oxidação do anel C e a formação de anéis adicionais, comuns aos compostos apresentados neste trabalho (Tahara & Ibrahim 1994)²⁴.

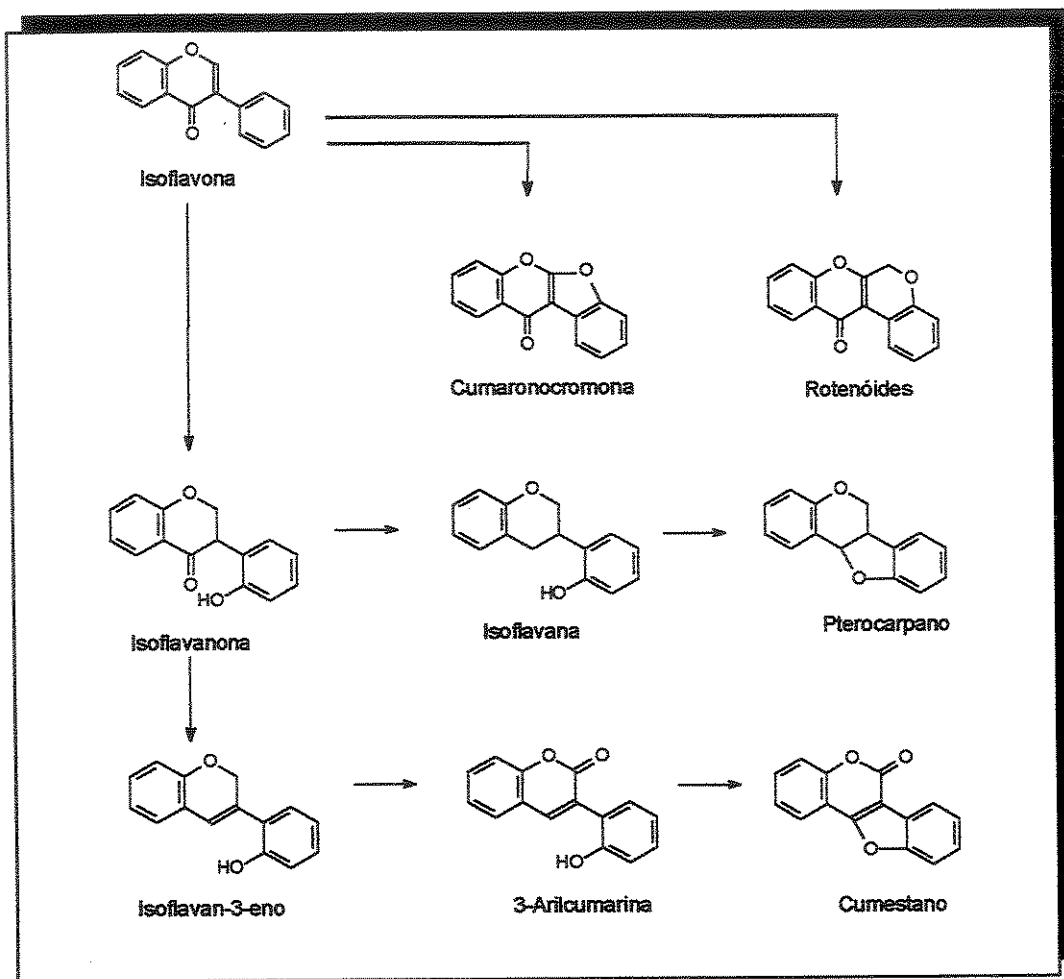


Figura 1.2.1.3 Derivados biossintéticos das Isoflavonas

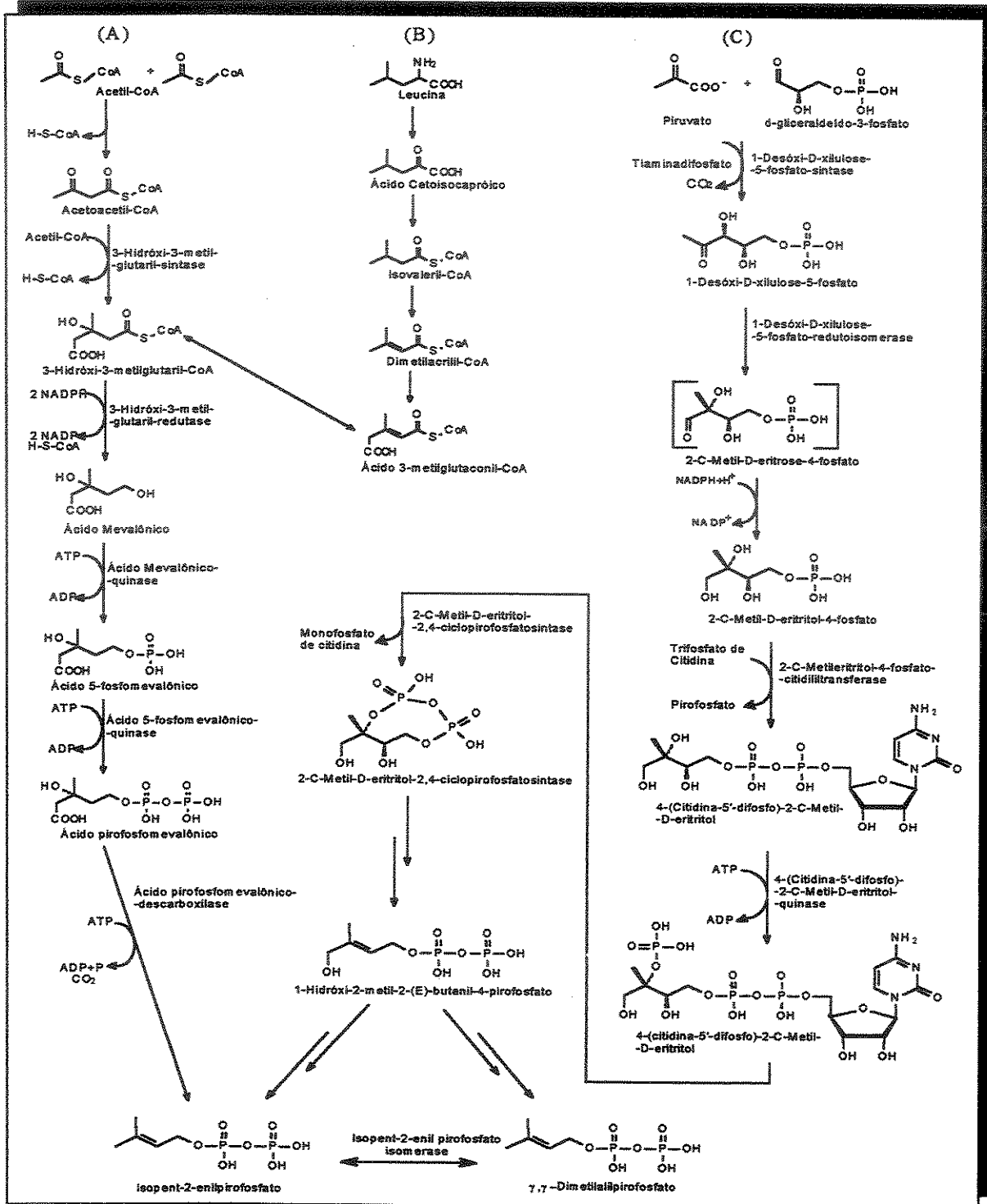


Figura 1.2.1.4 Biossíntese de unidades de IPP e DMAPP em plantas, A) caminho do mevalonato, B) degradação da leucina e C) caminho da desoxixilulose-5-fosfato. (Ramos-Valdivia *et alli*,1997; Kuzuyama & Seto,2003; Eisenreich *et alli* 2004)^{25, 26, 27}

A variação do padrão de oxidação e substituição do anel C, gera as diversas classes de isoflavonóides enquanto que a ausência ou presença de funções oxigenadas típicas, inclusão de grupos prenila, hidroxilas extras, metilação de hidroxilas, formação de anéis pirano e furano a partir de grupos prenil e a formação de grupos metilenodióxido são responsáveis pela extensa diversificação estrutural destas classes. A inclusão de substituintes e sua modificação sugerem a presença de enzimas como dimetilalil-transferases, as do citocromo P-450, metil-transferase entre outras e seus cofatores, demonstrando o caráter complexo da biossíntese e sua clara relação com o genótipo de uma linhagem.

Pressões ambientais ou ecológicas, causadas pela instalação em novas áreas, contato com novas espécies e fatores climáticos adversos, modificam a biossíntese dos metabólitos secundários. Nos flavonóides a alteração biossintética mais simples e recente é o aumento da taxa de oxidação, permitindo classificar as plantas com flavonóides de alta taxa de oxidação como mais evoluídas (Gottlieb 1982)¹².

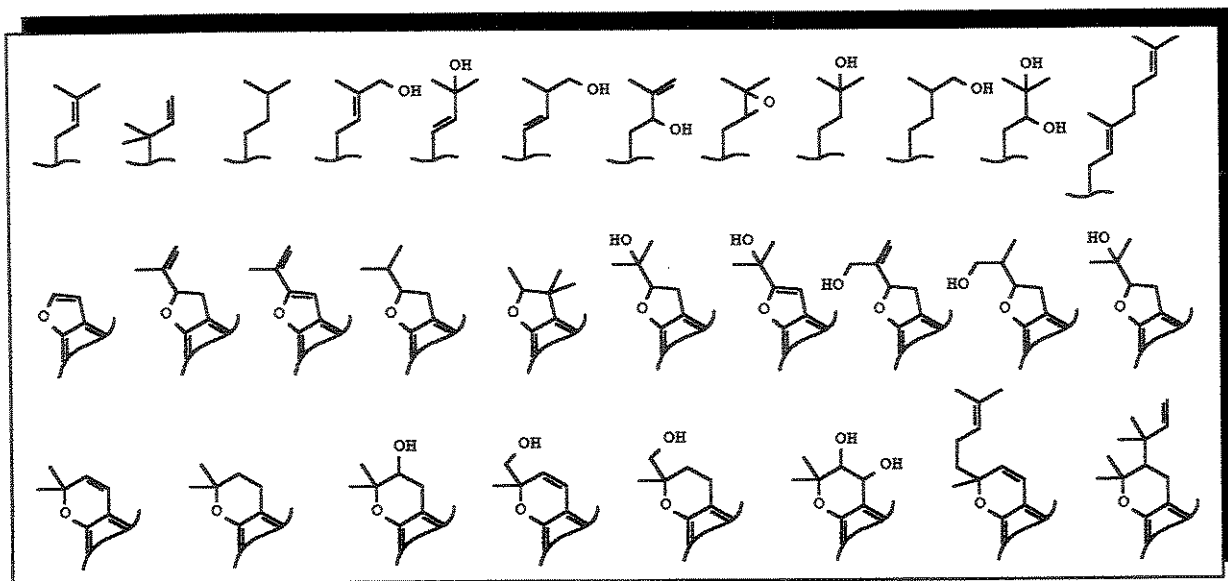


Figura 1.2.1.5 Substituintes derivados da inclusão e modificação de grupos prenila, observados em isoflavonóides naturais (Tahara & Ibrahim 1995)²⁴.

1.2.2 ISOFLAVONAS

As isoflavonas constituem o maior grupo de isoflavonóides, com mais de 334 compostos descritos na literatura, dos quais cerca de 88% estão presentes nas Leguminosas, apesar da restrição botânica, obviamente por motivos biossintéticos, as isoflavonas, apresentam alta diversidade estrutural, sendo descritos na literatura cerca de 40 padrões diferentes de oxidação (Tahara & Ibrahim, 1994)²⁴, dos quais os mais comuns são observados na tabela 1.2.2.1.

Os substituintes mais comuns das isoflavonas são os grupamentos hidroxila, metoxila, metilenodióxido, prenila (41%) , são freqüentes as estruturas C-5-desóxi (46%) e as hidroxiladas nas posições C-6 e C-2', além das já esperadas C-7 e C-4'. O número relativo de isoflavonas isoladas na forma aglicona é expressivo (83% do total), da mesma forma que nas chalconas (80% do total), mas contrasta com o pequeno número nas flavonas (33% do total), revelando a especificidade enzimática nas reações que envolvem as transformações entre estas moléculas.

Uma das propriedades biológicas mais importantes das isoflavonas é a atividade estrogênica relacionada a mimetização (forma e polaridade) do hormônio estrogênio (β -estradiol, principal estrogênio, figura 1.2.2.1), com a possibilidade de afetar a reprodução de animais herbívoros, e também antifúngica e antibacteriana comuns a muitos isoflavonóides fitoalexinas.

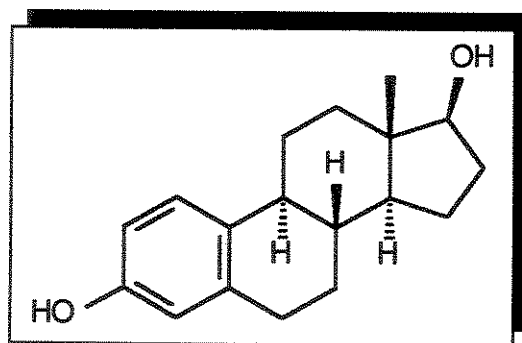


Figura 1.2.2.1 O hormônio β -estradiol

Tabela 1.2.2.1 Padrões de oxidação das Isoflavonas e sua ocorrência.

PRESENÇA DE OXIGRUPOS EM	FREQUÊNCIA	OCORRÊNCIA RELATIVA ENTRE AS ISOFLAVONAS	RPO
5,7,4'	56	19%	1/30 = 0,0333
5,7,2'4'	50	17%	2/18 = 0,1111
5,7,3',4'	33	11%	2/20 = 0,1000
5,7,2',4',5'	13	4%	3/13 = 0,2308
7,4'	13	4%	2/22 = 0,0909
7,3',4'	12	4%	3/11 = 0,2727
7,2',4',5'	11	4%	4/55 = 0,0727
Outros 33 padrões	105	36%	-

RPO = Probabilidade Relativa de Ocorrência da Substituição do Flavonóide, (Cagnin & Gottlieb 1978)²⁸, definida pelo número de passos adicionais de oxidação/redução a partir de isoflavonóide 5,7,4'-oxigenado/frequência de ocorrência do padrão entre os isoflavonóides de leguminosas conhecidas.

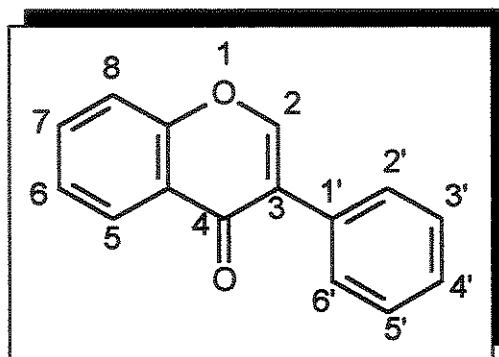


Figura 1.2.2.2 Esqueleto e numeração das isoflavonas

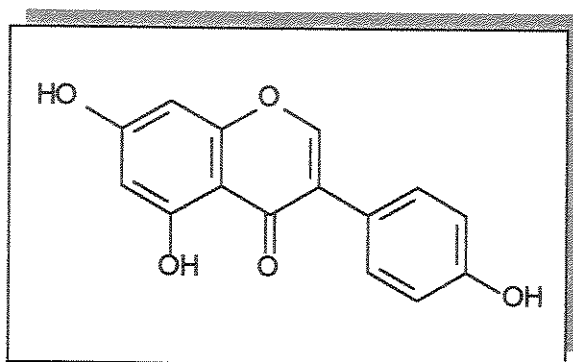


Figura 1.2.2.3 A isoflavona Genisteína

A genisteína (figura 1.2.2.3) é uma isoflavona típica, intensamente estudada, para a qual diversas atividades tem sido relatadas, entre elas a ação como um potente inibidor da tirosina quinase, enzimas receptoras de hormônio de crescimento e produtos de oncogenes virais, e também na inibição da enzima topoisomerase, que altera o processo de proliferação celular (Creczynsky-Pasa & Pedrosa 2001)²⁹.

1.2.3 CUMESTANOS

Os cumestanos são representados por cerca de 50 compostos em 14 padrões diferentes de distribuição de substituintes oxigenados. As posições oxigenadas de maior ocorrência são as esperadas pela biossíntese, ressaltando a manifestação eficiente de uma redutase, durante a formação do anel A destas substâncias, o que resulta em uma elevada taxa de cumestanos 5 desóxi (86%), além da significativa quantidade de 3'-oxigenados (42%) e da ausência até o presente trabalho de moléculas 5'-oxigenadas.

Entre as propriedades biológicas atribuídas aos cumestanos, assim como as isoflavonas, destacam-se as relacionadas a mimetização do hormônio estrogênio. Em geral a habilidade de uma substância produzir ou bloquear um efeito biológico (agonista ou antagonista) requer peculiaridades estruturais e eletrônicas, em que as distâncias e localização relativa de grupos bioisósteros são muito semelhantes ao do hormônio mimetizado, e mesmo assim nem todas as propriedades biológicas serão comuns, decorrentes das diferenças de interações com os sítios ativos dos receptores hormonais.

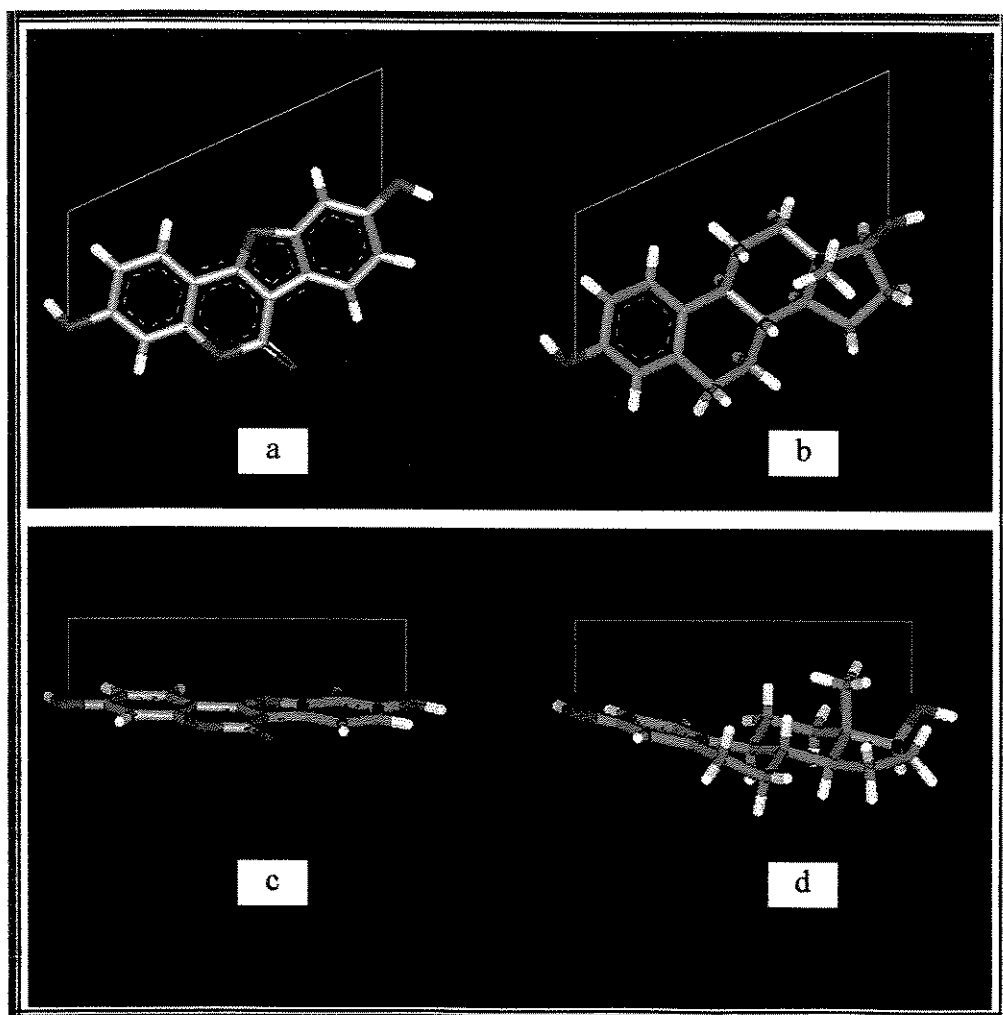


Figura 1.2.3.1 Comparação entre os modelos; a, c - um cumestano (cumestrol), b, d – um estrogênio (β -estradiol). Em amarelo distância entre dois grupos oxigenados (aprox. 1,1 nm.).

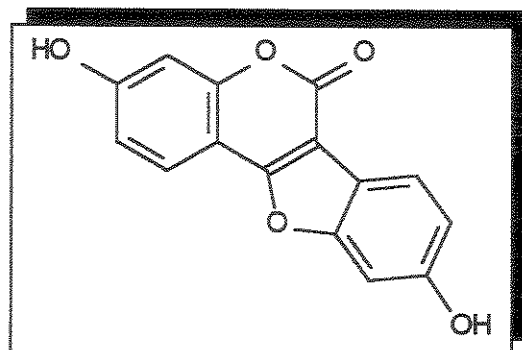


Figura 1.2.3.2 O cumestano Cumestrol

A exemplo do hormônio estrogênio, são conhecidos os receptores estrogênicos α e β , distribuídos em proporções características em diferentes tecidos. Com relação ao estrogênio algumas isoflavonas e cumestanos são fracos agonistas aos receptores α e potentes agonistas aos receptores β , produzindo uma ação biológica diferenciada do hormônio original, apresentando ação estrogênica em alguns e antiestrogênica em outros, comparativamente. Esta propriedade de alguns cumestanos e isoflavonas tem despertado crescente interesse na pesquisa de novos fármacos não esteroidais para reposição hormonal em mulheres pós-menopausa, com efeitos estrogênicos nos ossos e sistema cardiovascular (maior número de receptores β), e antiestrogênico no útero e mama (maior número de receptores α), com possibilidade de reduzir o risco de câncer de mama e de útero a que se predispõe o paciente em tratamento de reposição com estrogênio (Creczynski-Pasa & Pedrosa 2001)²⁹.

Tabela 1.2.3.1 Padrões de oxidação dos cumestanos e sua ocorrência.

PRESENÇA		OCORRÊNCIA	
DE	FREQUÊNCIA	RELATIVA	RPO
OXIGRUPOS		ENTRE OS	
EM		CUMESTANOS	
7,2',4'	17	34%	$3/38 = 0,0789$
7,2',4',5'	11	22%	$4/55 = 0,0727$
7,8,2',4'	3	6%	$4/3 = 1,3333$
7,2',4',6'	3	6%	$4/3 = 1,3333$
6,7,2',4',5'	3	6%	$5/10 = 0,5000$
7,2',3'	2	4%	$6/2 = 3,0000$
5,7,2',4'	2	4%	$2/18 = 0,1111$
Outros 7 padrões	9	13%	-

RPO = Probabilidade Relativa de Ocorrência da Substituição do Flavonóide, (Cagnin & Gottlieb 1978)²⁸, definida pelo número de passos adicionais de oxidação/redução a partir de isoflavonóide 5,7,4'-oxigenado / frequência de ocorrência do padrão entre os isoflavonóides de leguminosas conhecidas.

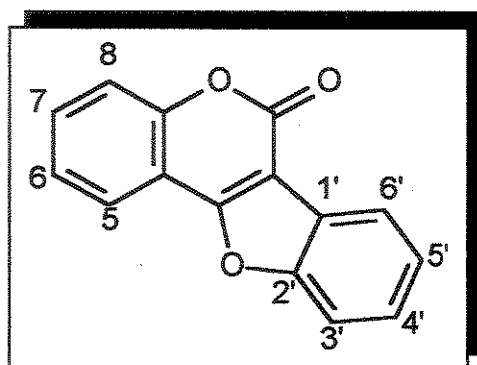


Figura 1.2.3.3 Numeração dos cumestanos segundo as isoflavonas, aplicado à tabela 1.2.3.1.

É descrita também na literatura a atividade antimiotóxica, antihemorrágica e antiproteolítica do cumestano Wedelolactona de *Eclipta prostrata* na proteção contra o veneno de diferentes serpentes Brasileiras e Norte Americanas, o que inspirou a síntese de diversos outros cumestanos não naturais com a finalidade de investigar estas atividades (Silva *et alli* 2001)³⁰.

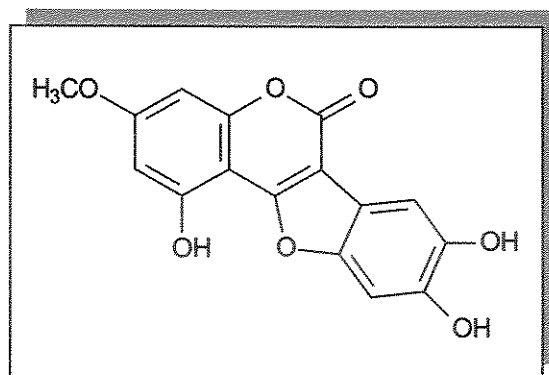


Figura 1.2.3.4 O cumestano Wedelolactona de *Eclipta prostrata*.

1.2.4 PTEROCARPANOS

Os pterocarpanos são o segundo maior grupo de isoflavonóides com cerca de 200 compostos não glicosilados conhecidos. No esqueleto pterocarpânico estão presentes dois centros quirais, um em cada carbono que funde dos anéis C e D, mas na natureza apenas as configurações RR e SS são observadas (fusão Cis), estudos de mecânica molecular confirmam que as configurações RS e SR (trans) são desfavoráveis por conferirem maiores tensões à molécula. A conformação mais estável do anel C, confirmada por RMN de ¹H é a meia cadeira (Pachler & Underwood 1967)³¹, com os carbonos C-6 e C-6a em um plano diferente do anel A, de tal forma que o hidrogênio H-6a forme um ângulo diedro de aproximadamente 180° com o hidrogênio H-6 axial (figura 1.2.4.1).

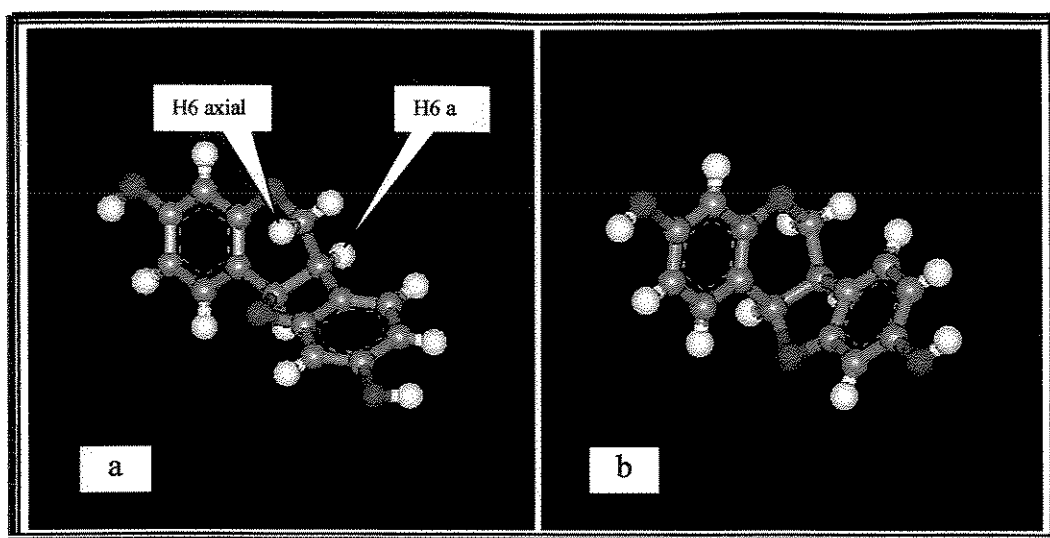


Figura 1.2.4.1 Conformações do esqueleto básico pterocarpânico RR.

a) majoritário, b) minoritário.

Muitos pterocarpanos e isoflavanos destacam-se entre as fitoalexinas, que são substâncias de defesa, produzidas pelas plantas quando atacadas por fungos ou bactérias potencialmente patogênicos.

A síntese de fitoalexinas é regulada por substâncias liberadas da parede celular do organismo agressor (elicitores) por enzimas da planta atacada, desencadeando um sinal. Estas substâncias, por difusão, encontram os receptores das células vegetais que controlam por retroalimentação a síntese induzida de enzimas, que irão catalisar as etapas biossintéticas necessárias à produção das fitoalexinas (Ingham 1990)³². Por fim estas substâncias servirão como uma barreira química ao ataque do agressor. Desta forma fica evidente um dos aspectos notáveis das fitoalexinas, o fato delas não se acumularem em tecidos saudáveis, sendo produzidas em situações de risco.

As Papilionoideae são reconhecidas pela sua capacidade de produzir isoflavonóides fitoalexinas, com a possibilidade de serem usadas como demonstração química independente de descendência das formas herbáceas a partir de ancestrais lenhosos, com o uso de técnicas de indução (Ingham 1990)³².

O pterocarpano medicarpina é o isoflavonóide fitoalexina de maior ocorrência entre as Papilionoideae.

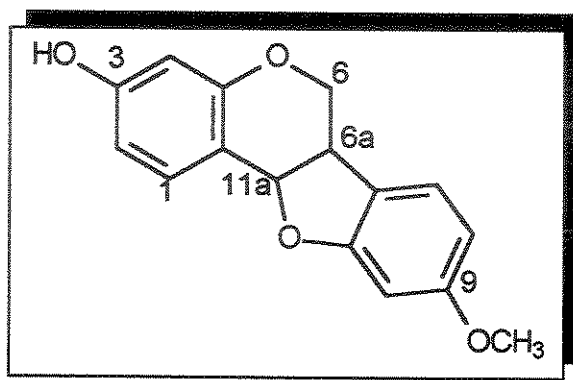


Figura 1.2.4.2 – O pterocarpano Medicarpina e sua numeração.

1.3 O GÊNERO *Lecointea*

O gênero *Lecointea*, com seis espécies, está incluído na subfamília Papilionoideae, localizado em um grupo basal, junto à tribo Swartzieae (Barneby 1989)³³, com mais 29 tribos. Morfologicamente o gênero *Lecointea* é considerado próximo aos gêneros *Exostiles* e *Harleyodendron* (Barneby 1992)³⁴. A posição da tribo Swartzieae, é controversa desde que Bentrán em 1865 a propôs anexada a subfamília Papilionoideae, pois grande quantidade de características morfológicas da maioria dos gêneros que a compõem demonstram proximidade à tribo Sophoreae de Papilionoideae, embora a aparência dos frutos e sementes seja semelhante aos membros da subfamília Caesalpinioideae. A falta de representantes conhecidos com relação de parentesco em Caesalpinioideae reafirma o posicionamento de Bentrán. Estudos sorológicos e palinológicos, mais recentes levantaram a possibilidade da semelhança com a tribo Sophoreae ser apenas física e a tribo Swartzieae ter mais afinidade com a subfamília Caesalpinioideae, enquanto que a descrição de um novo gênero, *Bobgunnia*, locado na tribo Swartzieae, em função da semelhança das flores, permitiram aos autores Kirkbride & Wiersema (1997)³⁵ afirmar que as diferenças entre os frutos e sementes desta tribo são conseqüências de uma reversão e que seus ancestrais deveriam ser semelhantes nestas características as outras Papilionoideae. Em sua tese de doutorado Santos (2002)³⁶ do grupo de Magalhães, A., com base em substâncias isoladas de *Swartzia Langsdorffii*, reafirmou esta correção, corroborando a proposta destes autores. Estudos recentes também modificaram a estrutura da tribo: com base na análise cladística da morfologia do pólen, Ferguson e Schire (1994)³⁷, definiram a tribo Swartzieae como polifilética, recentemente confirmado por métodos baseados no sequenciamento de fragmentos específicos de DNA, que também apontam esta tribo como basal.

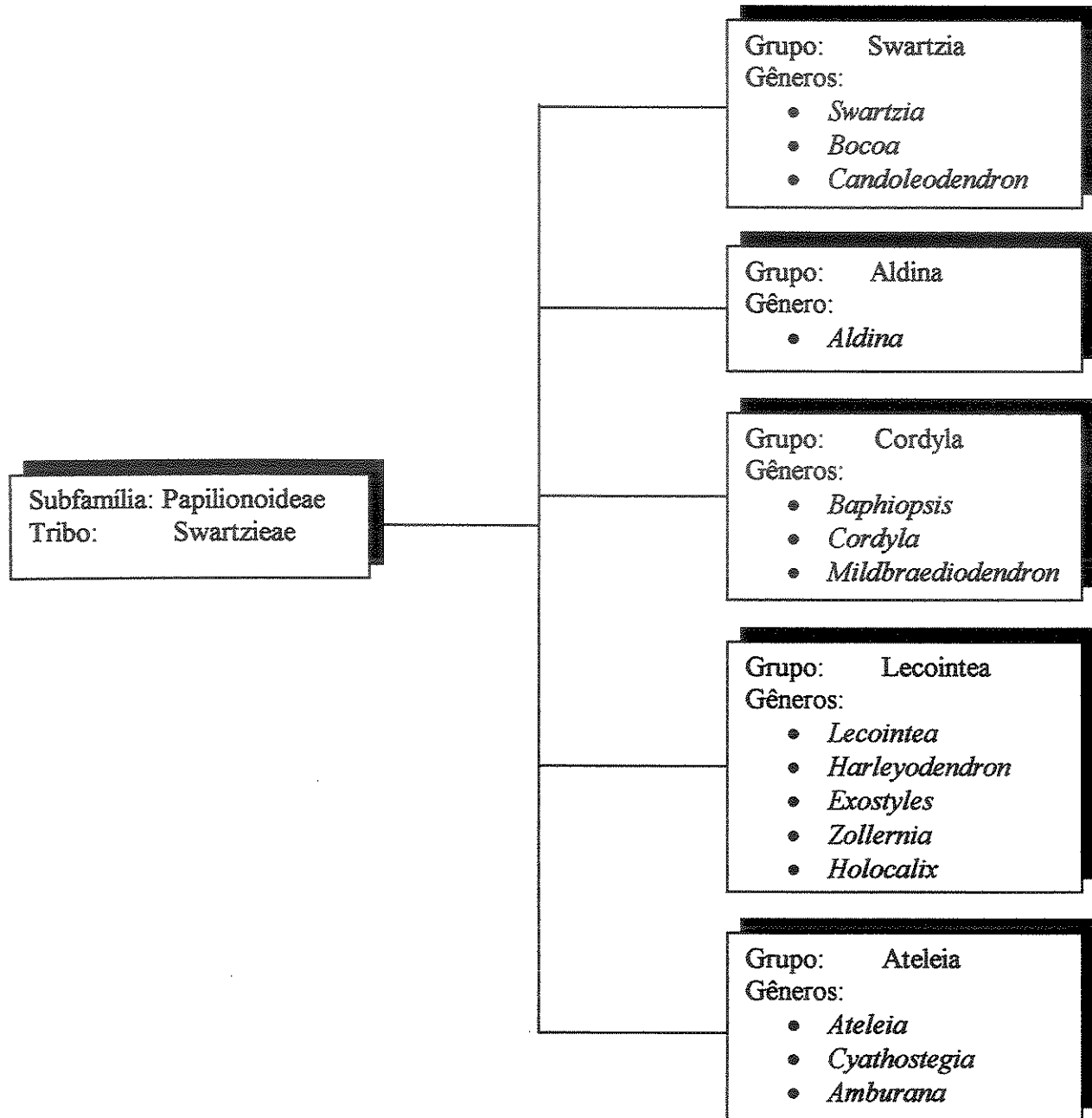


Figura 1.3.1 Classificação da tribo Swartzia, segundo Polhill (1994)¹.

Na tentativa de tornar a classificação mais condizente com vários parâmetros morfológicos, diversos gêneros foram incluídos ou excluídos desta tribo, segundo Pennington et alii. (2001)³⁸ até mesmo o grupo *Lecointea* é polifilético, reconhecendo dois ramos, *Vataireoide* com os gêneros *Sweetia* e *Luetzelburgia* anteriormente locado em *Sophoreae*, *Vatairea* e *Vataireopsis*, anteriormente de *Dalbergieae* e *Exostiles* e *Harleyodendron* e o ramo *Lecointeoides* com os gêneros *Holocalyx*, *Zollernia* e *Lecointea*. Em sua tese de doutorado, Mansano, V. (2002)³⁹ do grupo da Botânica Tozzi, A. M. G. A. com base em dados morfológicos combinados com sequenciamento do íntron trnL do DNA de cloroplasto afirma que novas espécies devem ser incluídas ao ramo *Lecointeoides* para resolve-lo melhor e sugere a inclusão do gênero *Uribea* de *Sophoreae* e a reinclusão de *Exostiles* e *Harleyodendron*.

O centro de ocorrência do gênero *Lecointea* é na América Central, Guiana, Venezuela e na Amazônia Brasileira (Barneby 1989)⁴⁰. A descoberta de uma nova espécie, *Lecointea hatschbachii*, na mata Atlântica do Paraná é inesperada (Barneby 1992)⁴¹, visto que as outras espécies do gênero não são encontradas mais ao sul do que 12°S, embora não seja tão incomum a ocorrência de novas espécies com distribuições geográficas atípicas (Barneby 1992)⁴¹. A espécie *Lecointea hatschbachii* foi encontrada apenas a 24°45'S, 49°W, nas proximidades de Ribeirão do Rocha, Paraná, e são árvores de 3 m de altura com ramos delicados, muito semelhantes às espécies *Lecointea amazonica* Ducke e *Lecointea marcanobertii* Barneby, as margens das folhas são espinho-dentadas, as inflorescências são pequenos racemos de 9 a 15 flores, cada flor com 8 mm de comprimento, cálice campanulado, cinco pétalas e 9 a 10 estames uniformes, o florescimento é de julho a agosto e os frutos ainda são desconhecidos (Barneby 1992)⁴¹.

Gênero: *Lecointea*

Lecointea hatschbachii Barneby
Lecointea amazonica Ducke
Lecointea marcano-bertii Barneby
Lecointea ovaliofolia
Lecointea peruviana
Lecointea tango

Figura 1.3.2 Espécies descritas para o gênero *Lecointea*

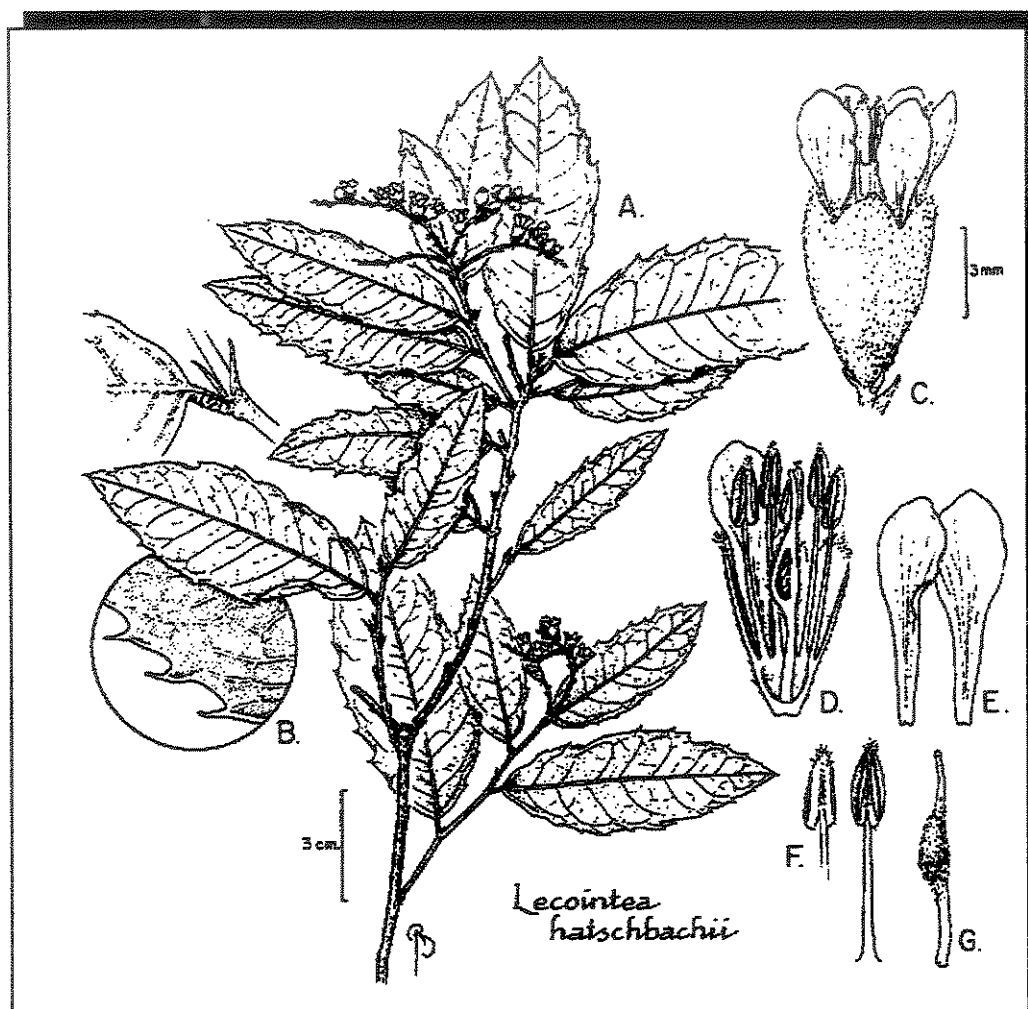


Figura 1.3.3 Aspectos morfológicos de *Lecointea hatschbachii*. (Barneby 1992)⁴⁰

1.4 OBJETIVOS

O presente trabalho teve o objetivo de isolar, e determinar a estrutura dos flavonóides presentes nos extratos das raízes da espécie *Lecointea hatschbachii* Barneby. O estudo fitoquímico de uma das espécies do gênero *Lecointea* é inédito, além do mais sua ocorrência atípica a torna única, não só pelas diferenças implícitas da espécie, como também pela localização geográfica que pode inferir a variações nas características fitoquímicas (Gottlieb 1982)¹². A restrição geográfica da espécie e o risco eminente de exposição a fatores externos, ocasionado pela proximidade dos grandes centros urbanos também foi relevante na escolha da espécie a ser estudada. Este trabalho visa contribuir com um projeto maior, com a participação da botânica Dra. Ana Maria Azevedo Tozzi que procura apoiar o esclarecimento da classificação destas plantas e de outras de gêneros próximos, levando em conta aspectos quimiotaxonômicos.

Este trabalho também teve a finalidade de detectar possíveis atividades biológicas dos extratos e das novas substâncias isoladas em testes “in vitro”.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

Na cromatografia em camada delgada (CCD), empregou-se placas de sílica gel GF₂₅₄ - base de alumínio, reveladas sob luz ultravioleta 254 nm e 365 nm, e por nebulização com solução de anisaldeído (etanol / anisaldeído / ácido sulfúrico / ácido acético 90 : 5 : 5 : 1) seguido de aquecimento com ar quente.

As placas de cromatografia em camada delgada preparativa foram confeccionadas com sílica gel 60 GF₂₅₄ para TLC, com 1mm de espessura e ativadas a 130 °C por pelo menos 4 horas.

As cromatografias em coluna foram realizadas baseadas na metodologia "FLASH", (Still et alii 1978)⁴², empacotadas em hexano, com sílica gel 60 (tamanho de partícula 40 – 63 µm), sob pressão de 7 libras.pol⁻¹ em tubo de diâmetro 65 mm com uma razão sílica/extrato acima de 50:1 e altura da sílica no tubo em torno de 140 mm. A amostra foi aplicada pré-adsorvida em 15 cm³ da mesma sílica e pelo uso de ar comprimido sobre o eluente a vazão mantida em 160 cm³.min⁻¹.

2.1.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.

Os espectros de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, COSY de ¹H, foram obtidos nos equipamentos Varian Gemini 2000 e Inova 500 respectivamente de 7,0 Tesla e

11,0 Tesla. Espectros bidimensionais de RMN em HSQC e HMBC e NOE foram obtidos no Inova 500.

Os espectros de absorção no ultravioleta foram realizados em um espectrofotômetro Cary 5G UV-VIS NIR Spectrophotometer. O solvente utilizado foi metanol para HPLC em cela de quartzo de percurso ótico 10 mm.

Os espectros de absorção no infravermelho foram realizados em espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 1600 em pastilha de brometo de potássio, utilizando como referência à absorção em 1601 cm^{-1} de um filme de poliestireno.

2.1.3 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

A espectros de massas de alta resolução foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV, em equipamento VG Autospec.

2.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

2.2.1 COLETA E PREPARAÇÃO DAS RAÍZES.

As raízes de *Lecointea hatschbachii* Barneby foram coletadas nas proximidades de Ribeirão do Rocha, Paraná, pela botânica A. M. A. Tozzi em setembro de 2000. Após remoção da terra com escova de aço, procedeu-se a secagem em estufa com circulação de ar forçada por 72 horas à temperatura de 50°C . A seguir o revestimento externo, com aspecto escuro, baixa resistência mecânica e fracamente presa ao conjunto foi separada por raspagem e denominado aqui de casca externa. Abaixo desta camada verificou-se visualmente uma outra camada de revestimento de grande resistência mecânica e levemente rosada, que foi retirada em pequenos fragmentos com estilete e aqui denominada casca interna.

O material restante com resistência mecânica menor que a casca externa e aparência amarelo claro foi aqui denominado raiz nua. Na sequência as frações foram trituradas em moinho de facas até obter fragmentos inferiores a 5 mm de comprimento.

2.2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os fragmentos resultantes da raiz nua foram submetidos à extração em série, respectivamente com os solventes, hexano, clorofórmio e metanol em soxhlet por 50 horas e cerca de 400 horas de contato com cada solvente.

Os fragmentos da casca externa e interna, foram submetidos à extração por percolação com clorofórmio, substituindo o solvente a cada 48 h, perfazendo 480 horas de extração.

Os extratos foram obtidos por concentração dos solventes em rotoevaporador a temperatura do banho não superior a 40°C.

Após avaliação por CCD analítica, foram reunidos em uma única fração os extratos da casca externa e interna, por terem apresentado características semelhantes. Os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico da raiz nua foram mantidos separados do extrato clorofórmico da casca por terem apresentado menores complexidades, e separados entre si por serem verificadas diferentes características entre eles.

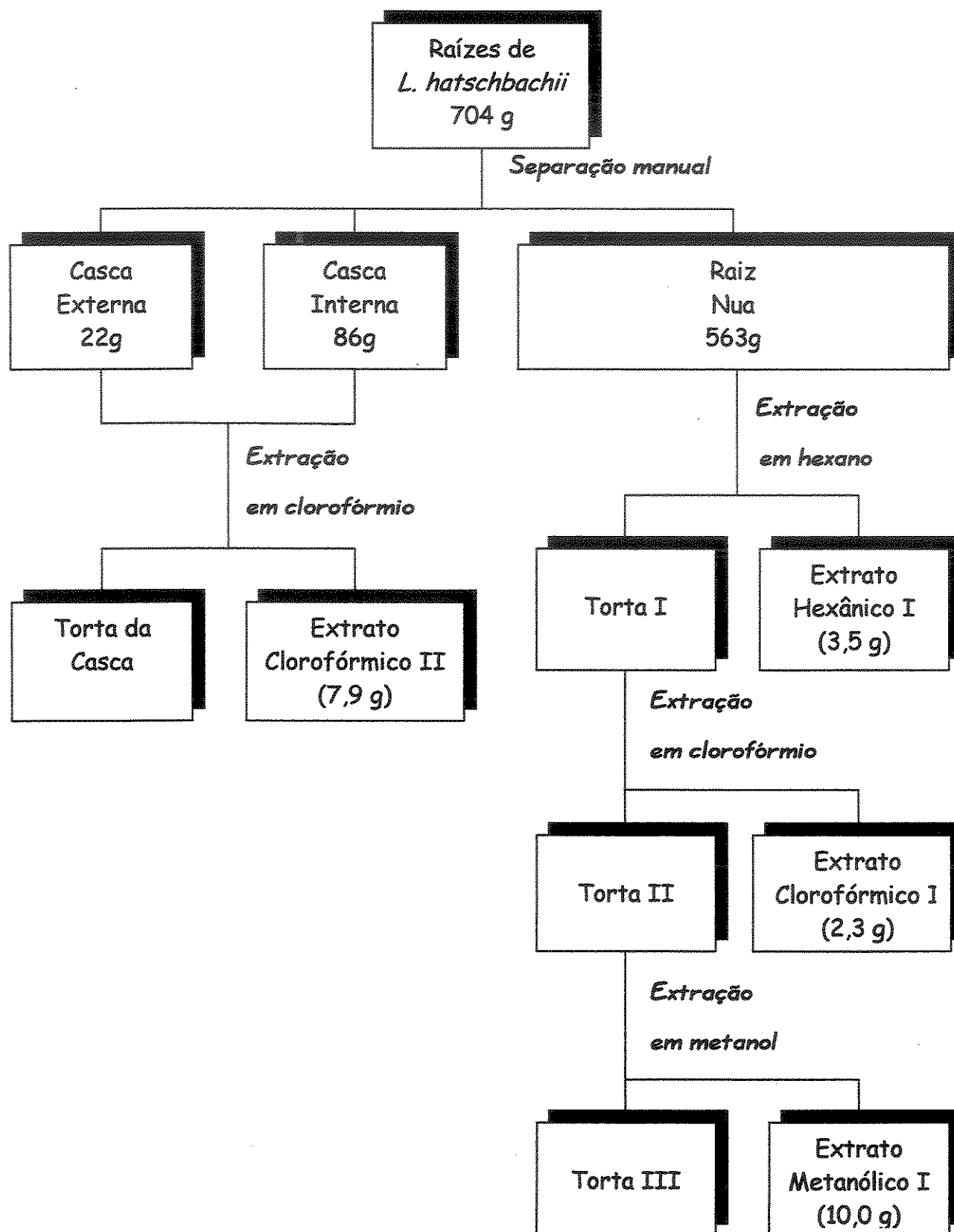


Figura 2.2.2.1 – Fluxograma de obtenção dos extratos de *L. hatschbachii*.

2.2.3 ISOLAMENTO

2.2.3.1 ESTUDO DO EXTRATO HEXÂNICO.

O extrato hexânico ao ser analisado por CCD e revelados em UV 254nm e 365nm e anisaldeído, não revelou bandas com características atribuíveis à fravonóides.

2.2.3.2 ESTUDO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO.

O extrato clorofórmico II (extrato clorofórmico da casca externa e interna) foi separado em frações em coluna de sílica gel, baseada na metodologia flash (Still *et alli*)⁴², com relação sílica: extrato 60:1, usando como eluente misturas de hexano, clorofórmio e metanol, em ordem crescente de polaridade e a seguir agrupadas por sua semelhança por comparação em CCD analítica.

O extrato clorofórmico I (extrato clorofórmico da raiz nua) foi separado em frações em coluna de sílica gel baseada na metodologia flash (Still *et alli*)⁴², relação sílica : extrato 100:1, usando como eluente misturas de hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade e a seguir agrupadas por sua semelhança em CCD analítica.

Os grupos de frações foram novamente fracionados por CCD preparativa e cristalização em clorofórmio, acompanhadas por CCD analítica para avaliar a pureza dos isolados. As novas frações a serem purificadas foram escolhidas segundo a quantidade em massa e o grau de complexidade de substâncias, avaliadas por CCD analítica.

Tabela 2.2.3.2.1 – Relação entre os grupos de frações, dados da cromatografia em coluna do Extrato clorofórmico II e das substâncias isoladas.

Grupo	Volume de Eluente/cm ³	Comp. média do eluente Clor: Met v:v	Massa do extrato eluído/mg	Substância detectada ou isolada	Quant/mg
1a	2000	1:0	513		
2a	240	5000:1	88		
3a	540	3700:1	114		
4a	240	2500:1	117		
5a	300	1250:1	79		
6a	600	810:1	268		
7a	480	625:1	134		
8a	840	425:1	201	Pterocarpano I	-
9a	540	285:1	248	Pterocarpano I	-
10a	540	195:1	188	Cumestano I	2,2
11a	540	160:1	158		
12a	840	160:1	304	Cumestano I	2,3
13a	540	160:1	129		
14a	1380	150:1	195		
15a	780	100:1	81		
16a	1560	85:1	167		
17a	2040	50:1	305		
18a	1440	50:1	196		
19a	600	50:1	86		
20a	420	50:1	55		
21a	780	50:1	92		
22a	2520	50:1	278	Isoflavona I	-
				Cumestano III	-
23a	1440	40:1	791	Isoflavona I	100
				Cumestano II	-
24a	1740	30:1	198	Isoflavona I	50
25a	1500	5:1	1020		
26a	1020	1:1	254		
27a	1020	1:1	266		
28a	1000	0:1	849		

Tabela 2.2.3.2.2 – Relação entre os grupos de frações, dados da cromatografia em coluna do Extrato clorofórmico I e das substâncias isoladas.

Grupo	Volume de Eluente/cm ³	Comp do eluente Hex/Ac. Et/Met. v:v:v	Massa do extrato eluído/mg	Substância detectada ou isolada	Quant/mg
1b	120	9:1:0	58		
2b	120	9:1:0	276	Pterocarpano I	6
3b	180	9:1:0	49		
4b	420	9:1:0	154	Cumestano I	-
5b	360	9:1:0	72		
6b	420	2:1:0	55		
7b	840	2:1:0	79	Cumestano III	4
8b	540	1:1:0	131		
9b	420	1:1:0	206	Cumestano II	4
10b	660	30:30:1	351	Isoflavona I	-
11b	420	20:20:1	235		
12b	Até o final	0:0:1	244		

2.2.3.3 ESTUDO DO EXTRATO METANÓLICO.

Uma fração do extrato metanólico da raiz nua foi analisada por CCD analítica, antes e após acetilação com anidrido acético-piridina, não permitindo o isolamento de flavonóides por estes métodos.

**2.2.3.4. DADOS FÍSICOS E FLUXOGRAMAS DE ISOLAMENTO
DOS CONSTITUINTES DO EXTRATO CLOROFÓRMICO
DE *Lecointea hatschbachii* Barneby.**

2.2.3.4.1 ISOFLAVONA I

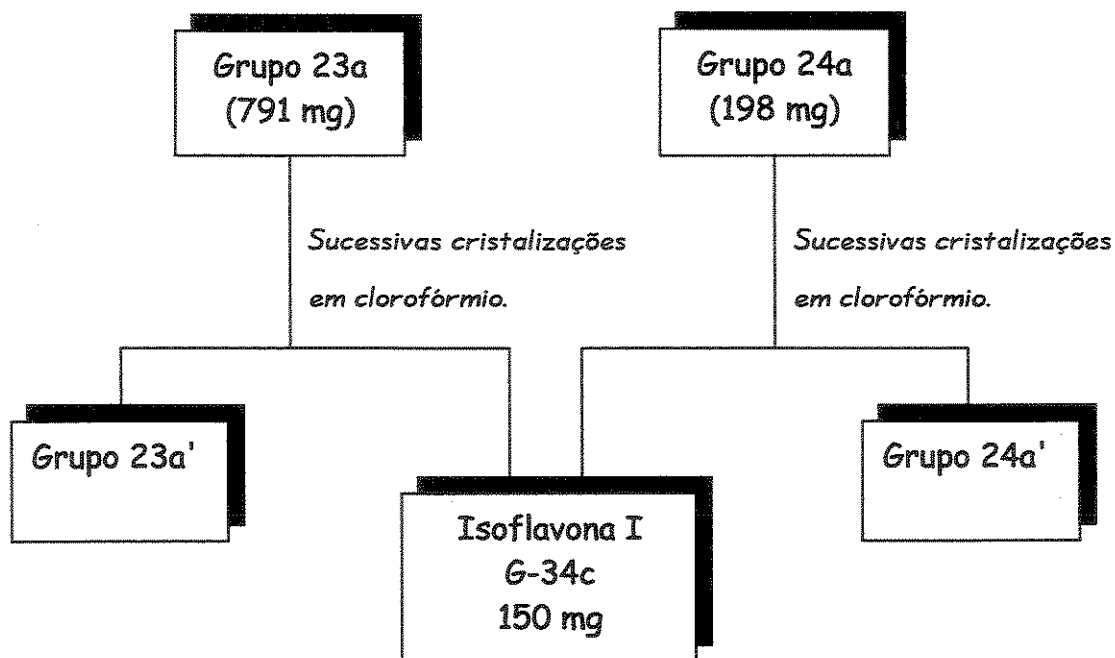


Figura 2.2.3.4.1.1 Fluxograma de isolamento da isoflavona I.

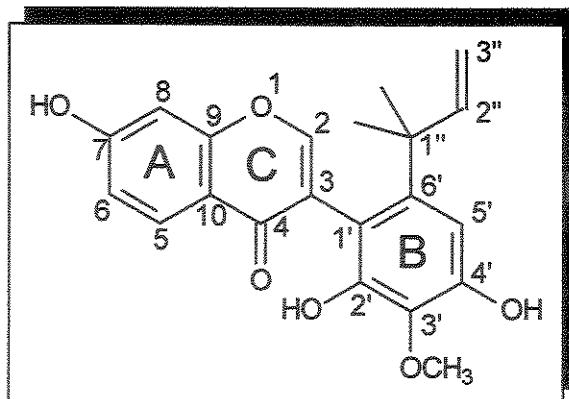


Figura 2.2.3.4.1.2 Isoflavona I

Nomenclatura: 7,2',4'-triidróxi-6', α,α -dimetilalil-3'-metóxi-isoflavona.

Cód : G-34C – Isoflavona I

Fórmula molecular: C₂₁H₂₀O₆

Aspecto Físico: sólido amorfo “branco pérola”.

Obs: pouco solúvel em clorofórmio.

Decomposição térmica sem fusão acima de 255°C

UV λ /nm, (log ϵ): (anexo E.1.9.) 249 (4,28), 300 (4,04).

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm⁻¹): (anexo E.1.10.) 3619, 3467, 3362, 3143, 2963, 1624, 1573, 1497, 1432, 1376, 1350, 1251, 1197, 1096, 1058, 829.

RMN de ¹H: tabela 3.1.1 e anexo E.1.1.1. e E.1.1.2

RMN de ¹³C: tabela 3.1.2 e anexo E.1.3

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 368,12599 Da

EM de alta resolução (m/z, %): (Figura 3.1.5 e anexo E.1.8) 368,12597 ([M⁺], 22), 300,0477 (31), 284,0084(31), 299,0441 (100), 137,0145 (30), 69,0623 (8).

2.2.3.4.2 - CUMESTANO I

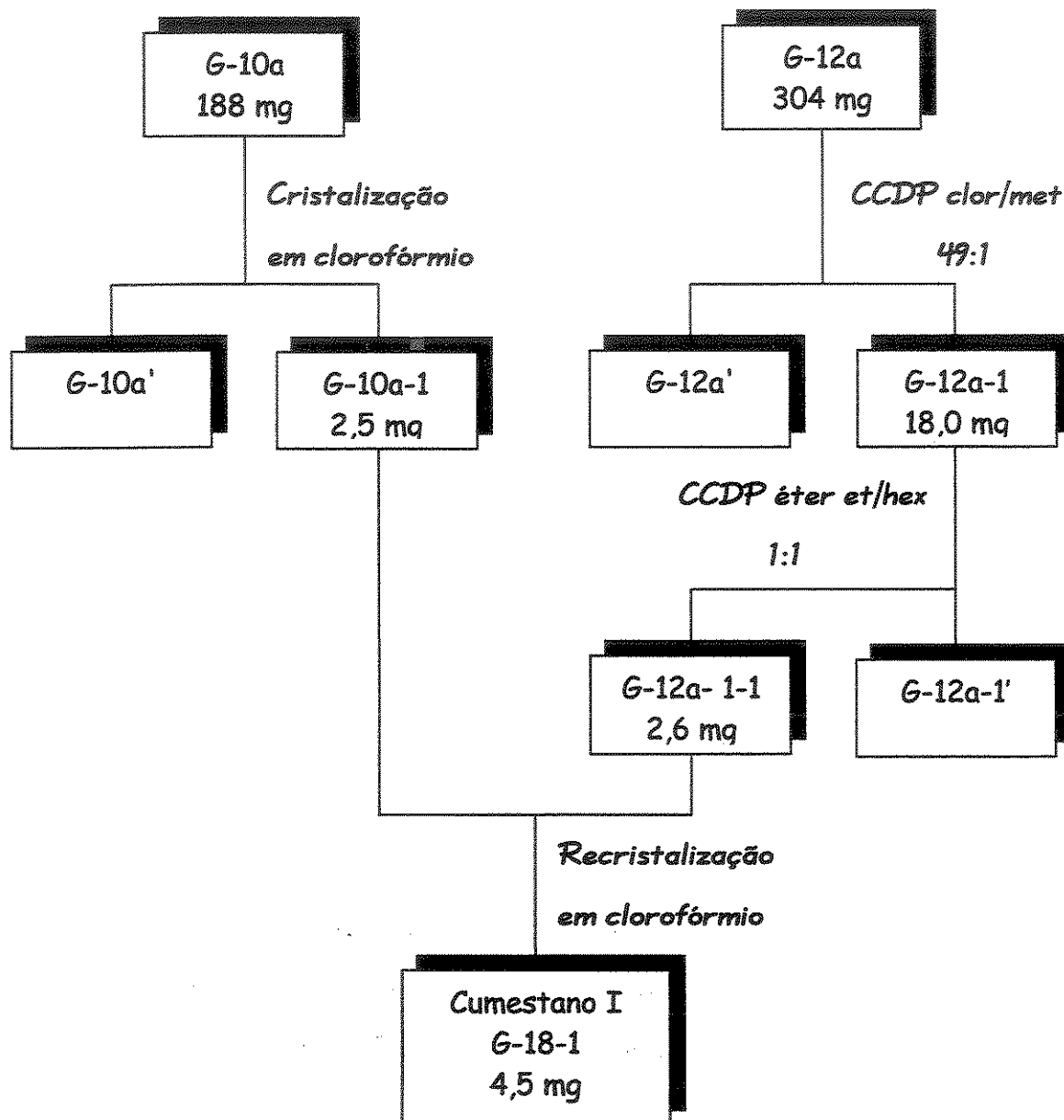


Figura 2.2.3.4.2.1 Fluxograma de isolamento do Cumestano I.

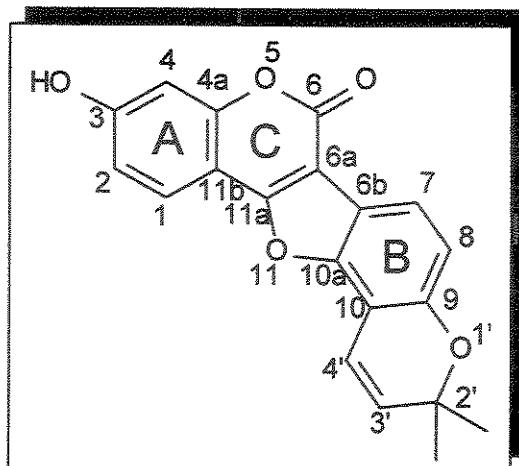


Figura 2.2.3.4.2.2 Cumestano I

Nomenclatura: 3-hidróxi-9,10-cromenocumestano.

Cód: G-18-1 – Cumestano I

Fórmula molecular: $C_{20}H_{14}O_5$

Aspecto Físico: sólido amorfo branco.

Obs: pouco solúvel em clorofórmio.

Decomposição térmica sem fusão acima de 215°C.

UV λ/nm , (log ϵ): (anexo E.2.9) 254 (4,20), 347 (4,04), 271 (3,97), 362,(4,03),.

IV ν_{max} (pastilha de KBr, cm^{-1}): (anexo E.2.10) 3431, 2925, 2856, 1723, 1630, 1261, 1042.

RMN de 1H : tabela 3.2.1. e anexo E.2.1.1. e E.2.1.2

RMN de ^{13}C : tabela 3.2.2 e anexo E.2.3.

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 334,08412 Da

EM de alta resolução(m/z , %): (Figura 3.2.4. anexo E.2.8) 334,0843 ($[M^+]$, 25), 319,0614 (100), 137,0230 (7), 68,0615 (9), 67,0529 (16).

2.2.3.4.3 CUMESTANO II

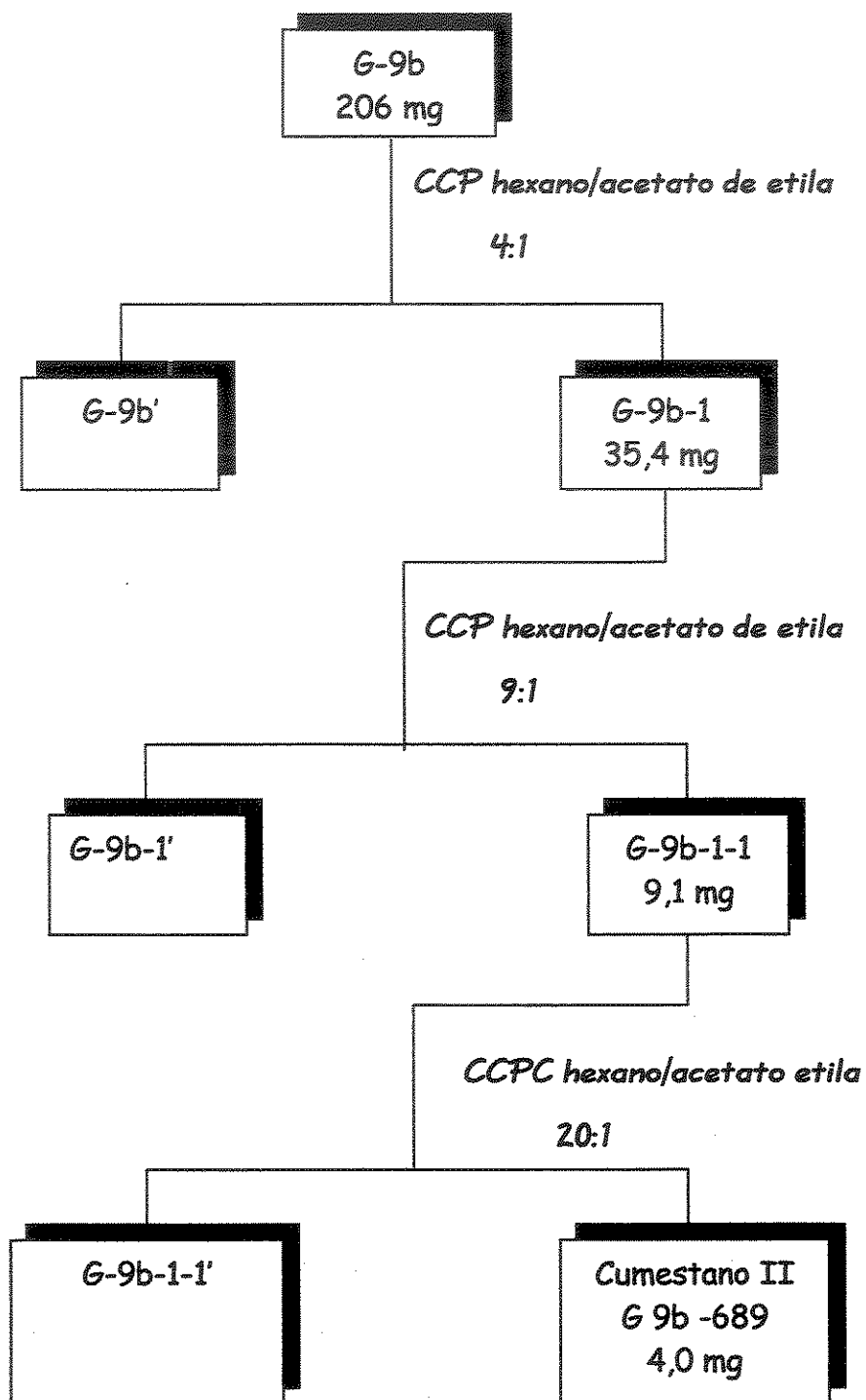


Figura 2.2.3.4.3.1 Fluxograma de isolamento do Cumestano II.

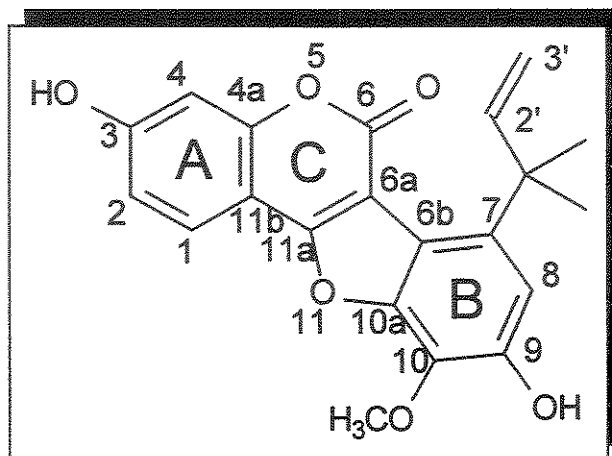


Figura 2.2.3.4.3.2 Cumestano II

Nomenclatura: 3,9-diidróxi-7, α,α -dimetilalil-10-metóxicumestano

Cód : G-9b-689 – Cumestano II

Fórmula molecular: $C_{21}H_{18}O_6$

Aspecto Físico: sólido amorfo “branco pérola”

Obs: pouco solúvel em clorofórmio.

Decomposição térmica sem fusão acima de 248°C

UV λ/nm , (log ϵ): (anexo E.3.9.), 208 (4,29), 346 (3,92) , 260 (3,91).

IV $\nu_{máx}$ (pastilha de KBr, cm^{-1}): (anexo E.3.10), 3397, 3217, 2923, 2852, 1709, 1619, 1498, 1413, 1372, 1289m, 1146, 982, 813, 670.

RMN de 1H : tabela 3.3.1 e anexo E.3.1.1 e E.3.1.2

RMN de ^{13}C : tabela 3.3.2 e anexo E.3.3

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 366,11034 Da

EM de alta resolução (m/z , %): (Figura 3.3.4 anexo E.3.8) 366,1118, ($[M^+]$, 100), 351,0849, (13), 325,0623, (23), 320,0547 (7), 319,0483 (37), 311,0519 (25), 69,0692 (40).

2.2.3.4.4 CUMESTANO III

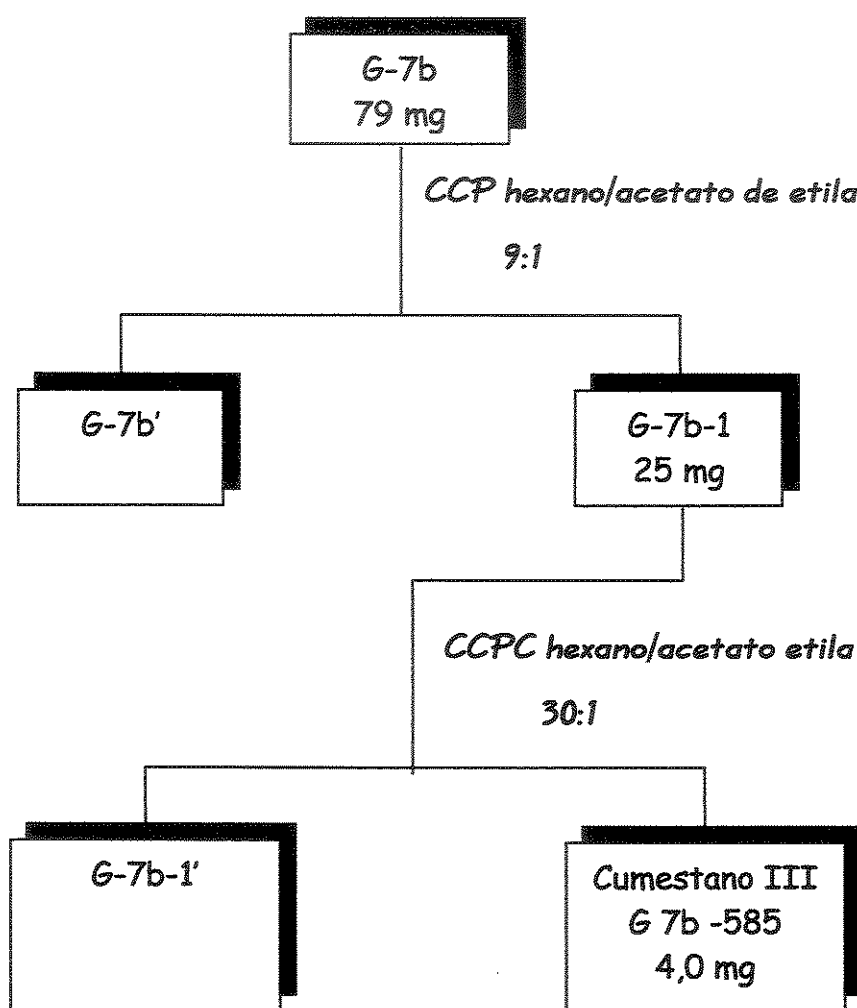


Figura 2.2.3.4.4.1 Fluxograma de isolamento do Cumestano III.

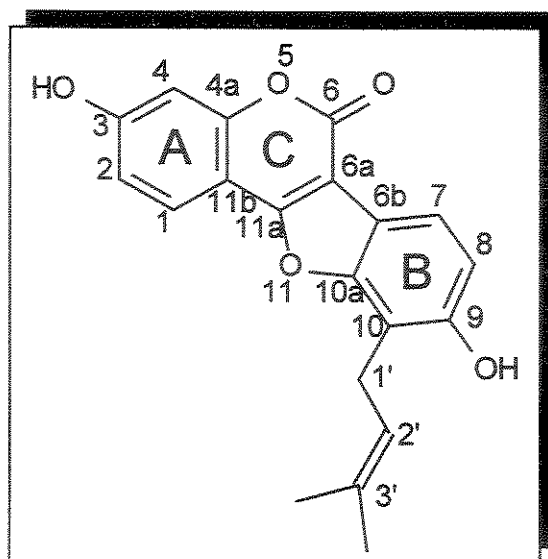


Figura 2.2.3.4.4.2 Cumestano III

Nomenclatura: 3,9-diidróxi-10-isoprenilcumestano ; Isosojagol⁴³

Cód: G-7b-585 – Cumestano III

Fórmula molecular: C₂₀H₁₆O₅

Aspecto Físico: sólido amorfo “branco pérola”.

Obs: pouco solúvel em clorofórmio.

Decomposição térmica sem fusão acima de 194°C.

UV λ /nm, (log ϵ): (anexo E.4.9.) 253 (4,34), 344 (4,36).

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm⁻¹): (anexo E.4.10.) 3433, 2923, 2856, 1727, 1616, 1450, 1431, 1380, 1265, 1239, 1161, 1028, 808.

RMN de ¹H: tabela 3.4.1 e anexo E.4.1.1. e E.4.1.2.

RMN de ¹³C: tabela 3.4.2 e anexo E.4.3.

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 336,09977 Da

EM de alta resolução (m/z , %): (Figura 3.4.3. anexo E.4.8.) 336,09985, ([M⁺], 54), 319,0634, (8), 281,0409, (49), 280,0352, (100), 149,0214, (11), 69,0677, (43).

2.2.3.4.5 PTEROCARPANO I (Medicarpina)

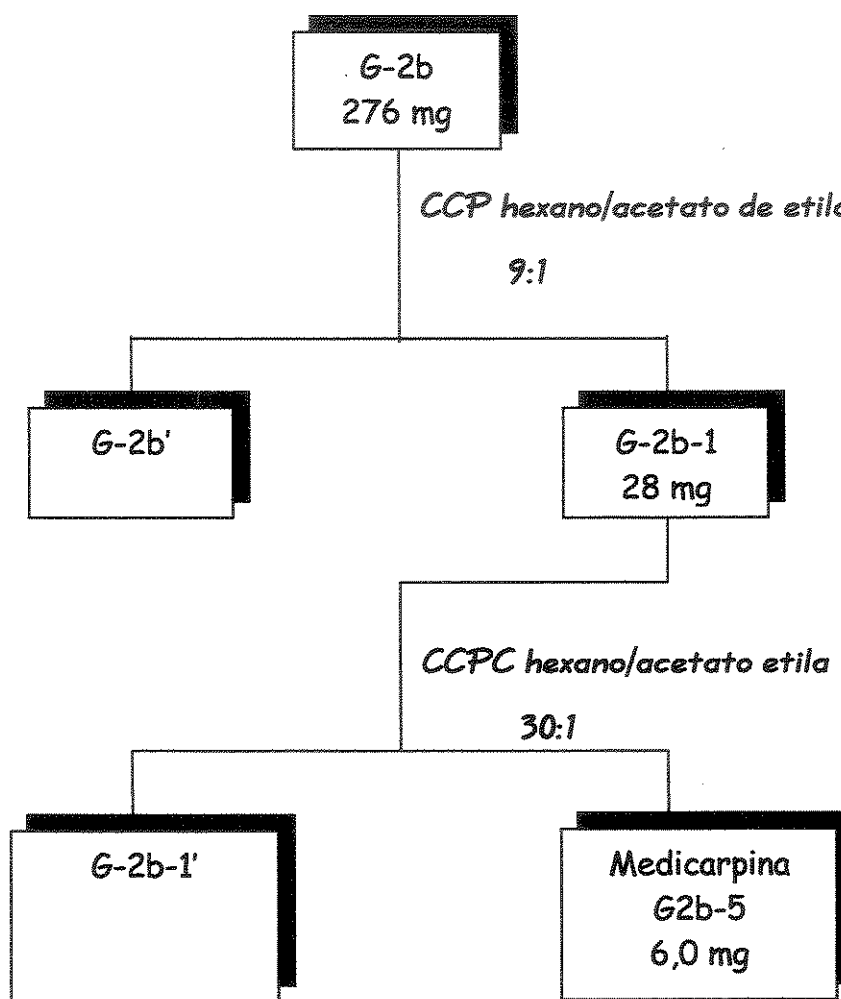


Figura 2.2.3.4.5.1 Fluxograma de isolamento da Medicarpina.

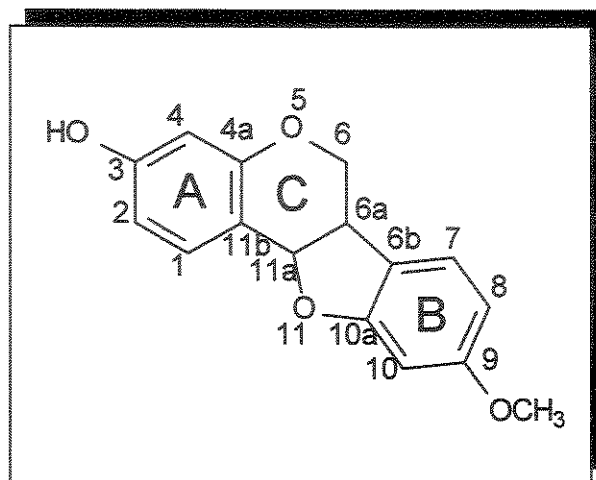


Figura 2.2.3.4.5.2 Medicarpina

Nomenclatura: 3-hidróxi-9-metoxipterocarpano; Medicarpina⁴⁴

Cód : G-2b-5 – Pterocarpano I

Fórmula molecular: C₁₆H₁₄O₄

Aspecto Físico: sólido cristalino branco

Ponto de Fusão: 127,5°C (Cristais em hexano: acetato de etila)

[α]_D²⁰ = -226° (metanol)

Configuração Absoluta (pelo sentido da polarização rotatória) : 6a(S), 11a(S).

UV λ/nm, (logε): (anexo E.5.9) 286 (3,78), 224 (4,03), 211 (4,39).

IV: (Herath *et alli* 1998)⁴⁴

RMN de ¹H: tabela 3.5.1 e anexo E.5.1.1.

RMN de ¹³C: (Herath *et alli* 1998)⁴⁴

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 270,0892Da

CG/EM Figura 3.5.2, anexo E.5.8 *m/z* (%) 270 ([M⁺], 100), 255 (27), 161 (10), 148 (20), 147 (11), 134 (6).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da análise dos três extratos obtidos, a partir das raízes da planta *Lecointea hatschbachii* Barneby, apenas o clorofórmico permitiu o isolamento de flavonóides: compreendendo uma isoflavona inédita, denominada aqui de isoflavona I, três cumestanos, dos quais dois são inéditos, denominados aqui de cumestano II e cumestano III, e o pterocarpano medicarpina.

Os dados de espectroscopia de RMN e espectrometria de massas foram fundamentais na determinação das estruturas das substâncias isoladas como descrito a seguir.

3.1 ISOFLAVONA I.

A isoflavona isolada teve seu esqueleto definido, pela presença de um sinal simples, no espectro de RMN de ^1H , em 7,68 ppm, referente ao hidrogênio em C-2, e pelos sinais δ 156,4, 123,5 e 179,7 no espectro de RMN de ^{13}C , totalmente desacoplado, relativos respectivamente a C-2, C-3 e ao carbono carbonílico C-4. Como veremos adiante a interpretação conjunta dos demais dados destes espectros configuram o esqueleto benzopiranona da isoflavona (Agrawal 1989)⁴⁵.

O espectro de RMN de ^1H , revelou claramente a existência de quatro hidrogênios aromáticos e uma metoxila, dentre outros substituintes, sendo que três destes hidrogênios constituem um sistema de acoplamento AMX, formado por dois hidrogênios em posições vicinais (orto), representados por um sinal duplo em δ 7,98 ($^3J = 8,8$ Hz) e um duplo dubleto em δ 6,90 ($^3J = 8,8$ Hz e $^4J = 2,2$ Hz). O outro hidrogênio deste sistema está representado por um dubleto a δ 6,83 ($^4J = 2,2$ Hz), orientado com relação aos dois primeiros como para e meta respectivamente. Na grande maioria das vezes, a biossíntese de flavonóides torna

inevitável a presença de uma função oxigenada na posição C-7, o que nos sugeriria postular, de imediato uma estrutura parcial “X” (Figura 3.1.1.), em que o anel A encontra-se monossustituído (Tahara & Ibrahim 1995, Heller & Forkmann 1988)^{24,46} em C-7, embora não pudéssemos até aqui, afastar definitivamente a hipótese de um anel A trissustituído, em detrimento ao anel B, o qual *a priori* admitimos suportar o único hidrogênio remanescente.

Um dado adicional nos permitiu atribuir ao sinal δ 7,98 ao H-5 em posição *peri* à carbonila (Agrawal 1989)⁴⁵. De fato o espectro de massas desta substância destaca o fragmento com m/z 137,014 ($C_7H_5O_3^+$), referente à clivagem retro Diels-Alder (Hedin & Phillips 1992)⁴⁸, que embora não seja tão característica nos sistemas isoflavonoídicos, confirmou nossa expectativa, além de definir a localização de uma hidroxila em C-7, como função oxigenada esperada.

E assim, deduzimos as demais atribuições dos sinais no espectro de RMN de 1H , referente aos hidrogênios do anel A, o que foi confirmado pelo experimento de COSY de 1H (tabela 3.1.1).

Um outro conjunto de sinais, desse espectro de RMN de 1H , (sistemas IV, VI e VII) integrado para um total de nove hidrogênios, foram atribuídos a dois grupos metílicos e um sistema vinílico de um resíduo isoprenílico, respectivamente representado por dois singletos em δ 1,33 e 1,25 (três hidrogênios cada), e três duplos dubletos a δ 4,68 ($^3J = 17,6$ Hz e $^2J = 1,3$ Hz), 4,56 ($^3J = 10,6$ Hz e $^3J = 1,3$ Hz) e também em δ 5,96 ($^3J = 17,6$ Hz e $^3J = 10,6$ Hz). Novamente o espectro de massas foi extremamente elucidativo, confirmando esta unidade isoprenilica, pela presença do pico base com $m/z = 299,044$ (100%) além do fragmento em m/z 69,062 (9%). Evidentemente este sistema está ligado ao anel B, que sustenta ainda uma metoxila e um hidrogênio remanescente, este representado por um singlete em δ 6,60.

Tabela 3.1.1 Dados de RMN de ^1H , (300 MHz, 7,0 Tesla, CD_3OD) para a Isoflavona I, (E.1.1.).

	Atribuição de H	$\delta\text{H/ppm}$	Int/H	Multiplicidade de Sinais	Constantes/Hz
Sistema I	5	7,98	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H5-H6}} = 8,8$
	6	6,90	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H6-H5}} = 8,8$ $^4J_{\text{H6-H8}} = 2,2$
	8	6,83	1	<i>d</i>	$^4J_{\text{H8-H6}} = 2,2$
Sistema II	2	7,68	1	<i>s</i>	
Sistema III	5'	6,60	1	<i>s</i>	
Sistema IV	2''	5,96	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H2''-H3''trans}} = 17,6$ $^3J_{\text{H2''-H3''cis}} = 10,6$
	3''trans	4,68	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H3''trans-H2''}} = 17,6$ $^2J_{\text{H3''trans-H3''cis}} = 1,3$
	3''cis	4,56	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H3''cis-H2''}} = 10,6$ $^2J_{\text{H3''cis-H3''trans}} = 1,3$
Sistema V	OCH_3	3,80	3	<i>s</i>	
Sistema VI	CH_3	1,33	3	<i>s</i>	
Sistema VII	CH_3	1,25	3	<i>s</i>	

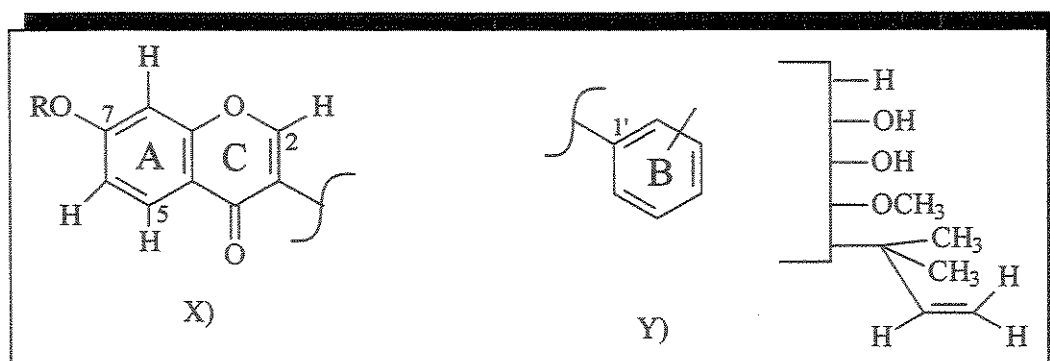


Figura 3.1.1 Estruturas parciais propostas em função da biossíntese para a Isoflavona I : X e Y

A perda do fragmento m/z 137,014 (31%) ($C_7H_7O_3^+$), a partir do íon molecular $[M]^+$ m/z 368,126 (22%) ($C_{21}H_{20}O_6^+$) via clivagem retro Diels-Alder (Hedin & Phillips 1992)⁴⁸, resulta em um anel B, tetrassubstituído, restando apenas admitir a presença de mais duas unidades hidroxila compondo a possível estrutura “Y” (Figura 3.1.1).

Os dados dos experimentos de RMN em HSQC e HMBC permitiram atribuir razoavelmente a localização de cada carbono na estrutura, com bastante precisão, embora não totalmente conclusivos, quanto às posições relativas dos substituintes do anel B. Neste âmbito é notável que o carbono aromático δ 134,7 do espectro de RMN de ^{13}C está protegido o suficiente para suportar um grupo metoxila orto dissustituído (Agrawal 1989)⁴⁵ com funções oxigenadas, sustentado também pelo deslocamento do carbono metoxílico em δ 60,7 (típico de anel aromático orto-dissustituído com funções oxigenadas)(Agrawal 1989)⁴⁵. Por sua vez os experimentos de NOE revelam que H-5' sofre o incremento de 4,52% e 2,94% ao serem irradiadas as metilas δ 1,33 e 1,25 respectivamente, comprovando a proximidade estrutural, já evidente pelo experimento de HMBC, que mostrou uma interação a três ligações entre H-5' e C-1''.

Tabela 3.1.2 Dados de RMN de ^{13}C e HSQC (11,0 Tesla, CD_3OD) para a Isoflavona I, (E.1.3. e E.1.5.).

Atribuição	$\delta\text{C/ppm}$	Tipo	Hidrogênios Acoplados a 1 ligação $\delta\text{H/ppm}$
2	156,4	CH	7,68
3	123,5	C_0	
4	179,7	C_0	
5	128,3	CH	7,98
6	116,0	CH	6,90
7	164,2	C_0	
8	103,1	CH	6,83
9	159,7	C_0	
10	118,0	C_0	
1'	111,6	C_0	
2'	150,7	C_0	
3'	134,7	C_0	
4'	150,8	C_0	
5'	107,3	CH	6,60
6'	145,0	C_0	
1''	42,9	C_0	
2''	149,9	CH	5,96
3''	109,7	CH_2	4,68 e 4,56
Metilas	30,1	CH_3	1,33
	29,6	CH_3	1,25
Metoxila	60,7	$-\text{OCH}_3$	3,80

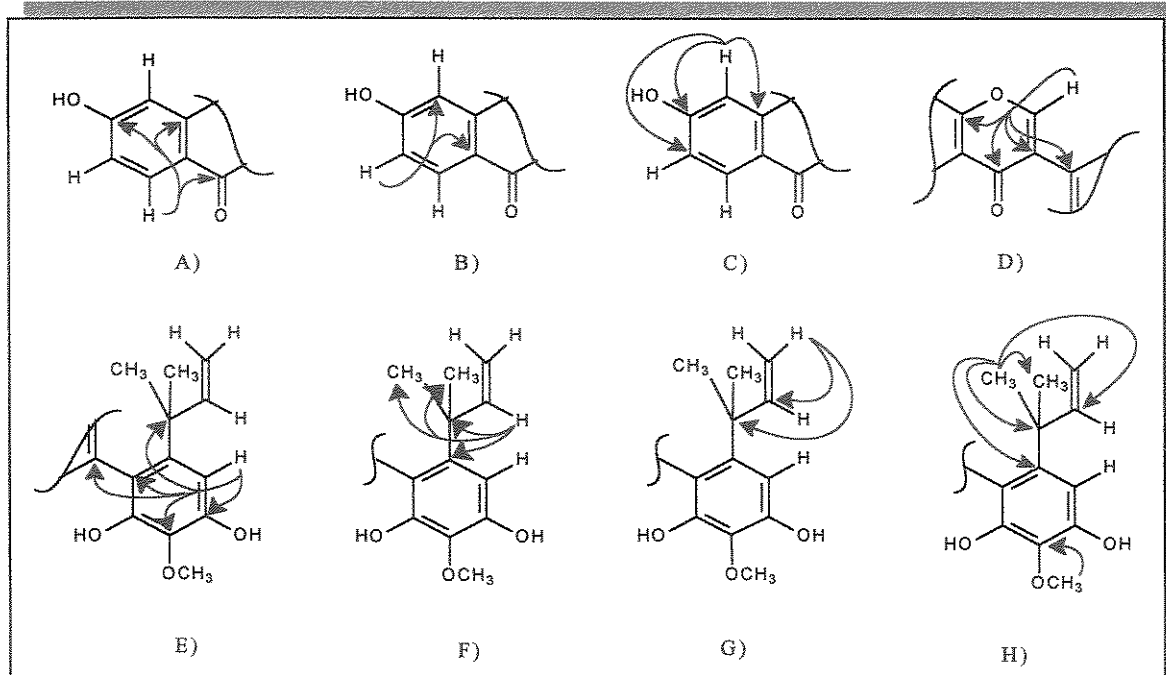


Figura 3.1.2 Interações de HMBC (11,0 Tesla, CD_3OD) observadas para a isoflavona I: A) a partir do hidrogênio H-5; B) do hidrogênio H-6; C) do hidrogênio H-8; D) do hidrogênio H-2; E) do hidrogênio H-5'; F) do hidrogênio H-2''; G) do hidrogênio H-3''; H) do hidrogênios das metilas e metoxilas, (E.1.6. e T.1.).

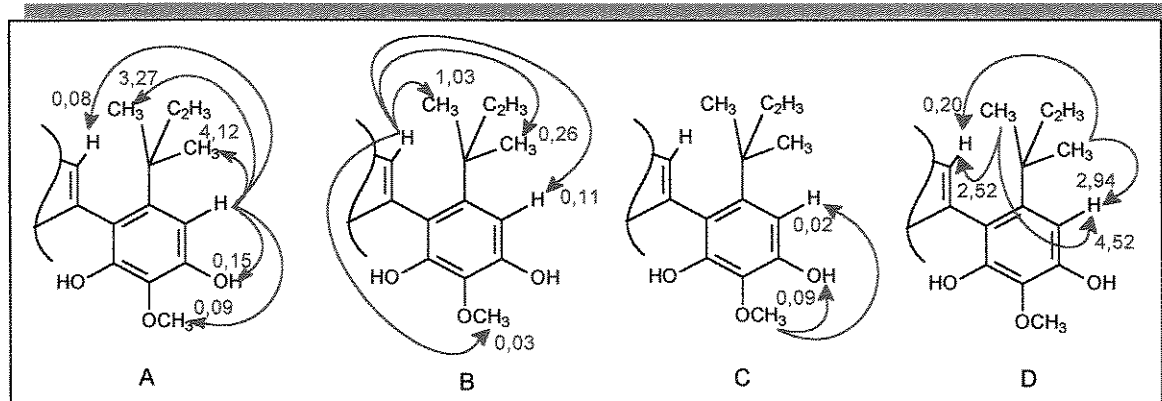


Figura 3.1.3 Principais incrementos de NOE / % observados para o anel B da Isoflavona I (11,0 Tesla, CD_3OD) mediante irradiação do: A) H-5'; B) H-2; C) hidrogênios da Metoxila 3'; D) hidrogênios das metilas 1'' a e 1''b, (E.1.7.)

O hidrogênio H-2 sofre o incremento de 2,52% e 0,20%, quando as mesmas metilas são respectivamente irradiadas. Os incrementos de H-2 quando H-5 é irradiado e vice-versa são de menor magnitude, respectivamente 0,08% e 0,11%, definindo a posição de H-5' e do grupo dimetilalila, este em C-6'. Conhecendo-se as posições do grupo dimetilalila e H-5', e considerando os dados de HMBC, restringimos a posição da metoxila a C-3', também confirmado por NOE, em que verificamos que a irradiação de H-5' produz um incremento maior para um substituinte hidroxila, do que para a metoxila, respectivamente 0,15% e 0,09%, sugerindo a presença de uma hidroxila intercalada entre o hidrogênio e a metoxila. Outros dados obtidos no experimento de NOE são condizentes com a estrutura proposta.

Dados obtidos em espectroscopia no U.V. (E.1.9.) e no I.V. (E.1.10.) e espectrometria de massas de alta resolução (E.1.8.) são compatíveis com a estrutura proposta.

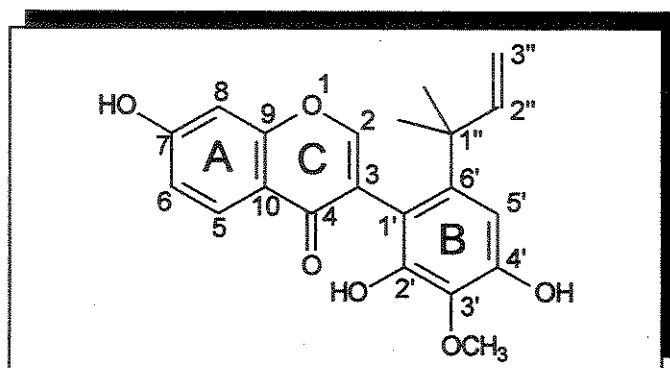


Figura 3.1.4 Proposta para a Isoflavona I e sua numeração.

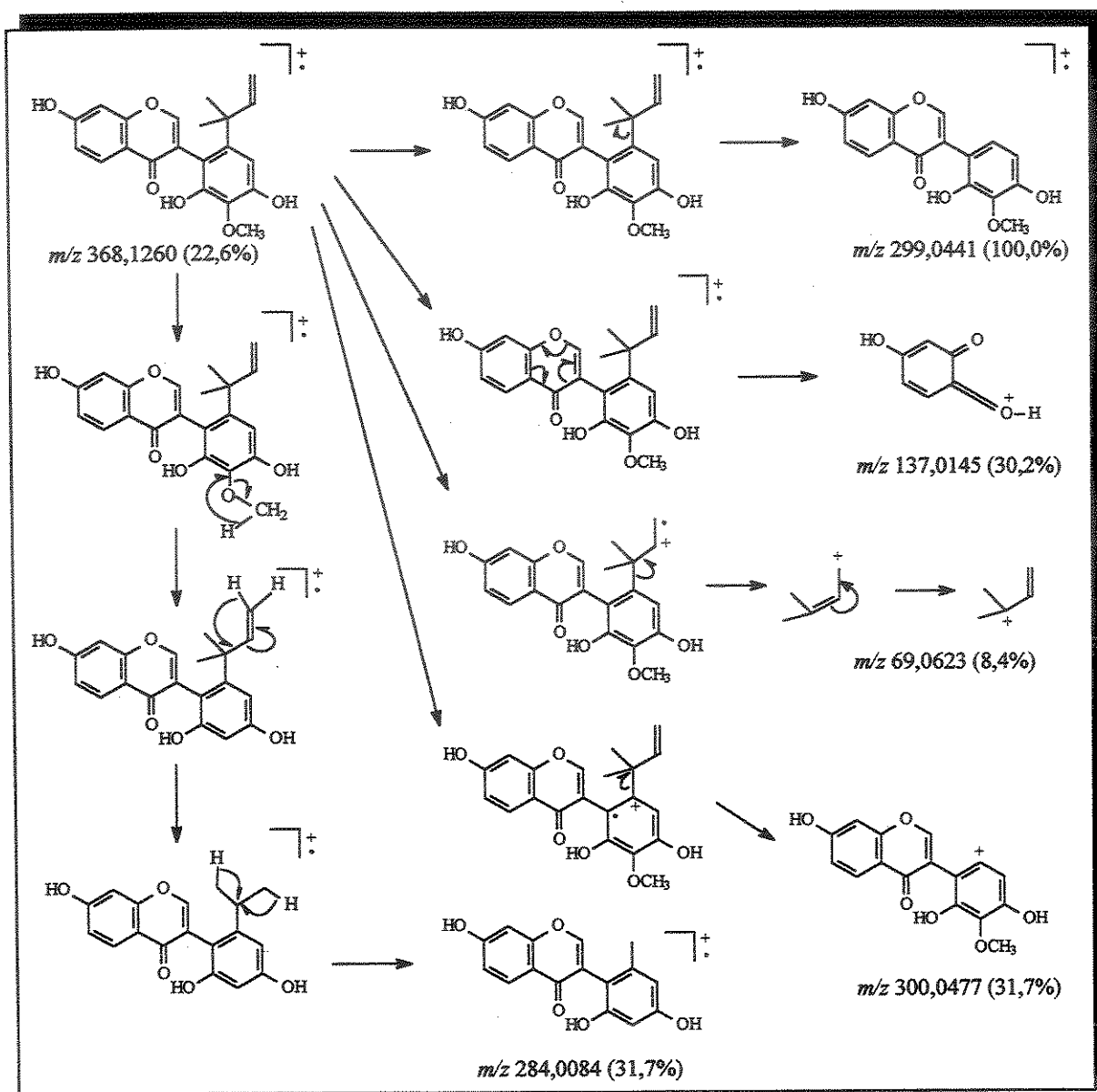


Figura 3.1.5 Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para a Isoflavona I

Em extensa pesquisa bibliográfica ao acervo e base de dados da BIQ-UNICAMP, envolvendo Chemical Abstracts, UNIBIBLI, Web of Science, PROBE – Bibliotecas eletrônicas, EBSCO on-line atualizados até o ano 2003 observamos que esta substância permaneceu inédita até aquela data.

3.2 CUMESTANO I

Um novo cumestano, denominado aqui de cumestano I, teve seu esqueleto determinado pela ausência de sinais no espectro de RMN de ^1H atribuíveis ao anel C, em conjunto com os sinais δ 160,5, 158,8 e 161,1 do espectro de RMN de ^{13}C , totalmente desacoplado, como C_0 mais desprotegidos, atribuídos respectivamente a C-6, C-11a e C-4a, que associados a C-6a e C-11b respectivamente δ 103,0 e 105,0 definem o padrão de substituição e oxidação do anel C. Os dados apresentados até aqui não são suficientes para segregar cumestanos de 4-hidróxi- 3-fenilcumarinas (Agrawal 1989)⁴⁵, que tem padrão de substituição e oxidação do anel C análogos, necessitando o uso de outras técnicas, como será visto a seguir.

O espectro de massas de alta resolução é conclusivo, na definição desta classe de isoflavonóide e o seu padrão de substituição, a presença do íon molecular m/z 334,084 (10,0%) define a fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_5$, cujo índice de insaturação é igual a 14. O número de carbonos presentes sugerem a presença de um resíduo isoprenílico, confirmado pelos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C como anel cromênico, enquanto que o número de hidrogênios confirma a presença de apenas uma hidroxila, entre os substituintes, visto que o espectro de RMN de ^1H tem integração igual a 13 para hidrogênios aromáticos em conjunto com os do grupo cromeno, e assim, para obter um índice de insaturação igual a 14, concluímos a presença de um anel furano, com dois lados fundidos a outros anéis da estrutura, além do anel cromênico, definindo de forma conclusiva a substância como um cumestano. Ainda no espectro de massas é notável a presença do pico base m/z 319,061, atribuído ao cátion $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{O}_5^+$ que ressalta a facilidade de eliminação de um radical metil a partir do íon molecular, evidenciando entre outras possibilidades a presença de um substituinte metila a duas ligações de um oxigênio como em anéis cromênicos, já que não há confirmação de nenhuma metoxila.

Tabela 3.2.1 Dados de RMN de ^1H , (300 MHz, 7,0 Tesla, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$) para o cumestano I, (E.2.1.).

	Atribuição de H	$\delta\text{H/ppm}$	Integração/H	Multiplicidade de Sinais	Constantes/Hz
Sistema I	1	7,80	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H1-H2}} = 8,5$
	2	6,91	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H2-H1}} = 8,5$ $^3J_{\text{H2-H4}} = 2,1$
	4	6,98	1	<i>d</i>	$^4J_{\text{H4-H2}} = 2,1$
Sistema II	7	7,73	1	<i>d</i>	$^4J_{\text{H7-H8}} = 8,7$
	8	6,87	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H8-H7}} = 8,7$
Sistema III	3'	5,78	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H3'-H4'}} = 9,8$
	4'	6,84	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H4'-H3'}} = 9,8$
Sistema IV	CH_3	1,48	6	<i>s</i>	

O espectro de RMN de ^1H revelou claramente a presença de cinco hidrogênios aromáticos, além dos presentes no anel cromênico, três deles constituindo um sistema AMX, formado por dois hidrogênios em posições vicinais (orto), representados por um sinal duplo em δ 7,80 ($^3J = 8,5$ Hz) e um duplo dubleto δ 6,91 ($^3J = 8,5$ Hz e $^4J = 2,1$ Hz), o outro hidrogênio deste sistema está orientado respectivamente na posição para e meta com relação aos dois primeiros, representado por um dubleto com δ 6,98 ($^4J = 2,1$ Hz). Os outros dois hidrogênios aromáticos constituem um sistema isolado AM formado por hidrogênio em posições vicinais, representado por dois dubletos em δ 7,63 e 6,87 ($^3J = 8,7$ Hz). Um terceiro conjunto de sistemas de spins integrado para oito hidrogênios, composto por um sinal simples em δ 1,48 referente a duas metilas e dois hidrogênios remanescentes compondo um sistema AM com δ 5,78 e δ 6,84 ($^3J = 9,8$ Hz) atribuídos respectivamente aos hidrogênios das metilas, e aos hidrogênios vicinais H-3', e H-4' de anel cromênico. A presença deste substituínte também é confirmada pelo espectro de RMN de ^{13}C no qual destaca-se entre outros o sinal δ 77,2 típico para C-2' de anel cromênico (Agrawal 1989)⁴⁵.

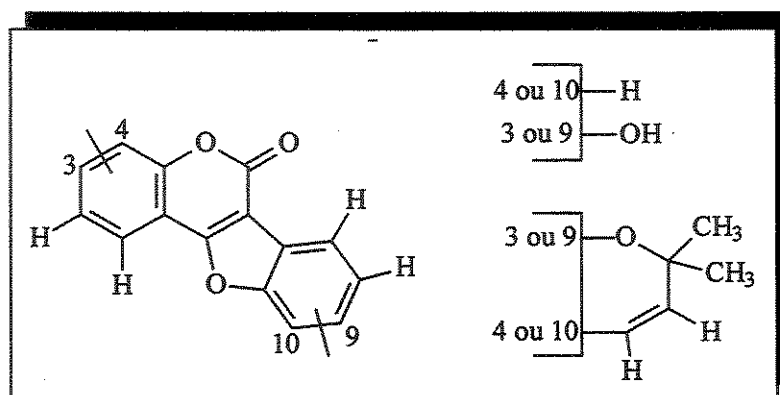


Figura 3.2.1 Proposta em função da biossíntese para o cumestano I.

Tabela 3.2.2 Dados de RMN de ^{13}C e HSQC (11,0 Tesla, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{DMSO}$) para o cumestano I, (E.2.3. e E.2.5.).

Atribuição	$\delta\text{C/ppm}$	Tipo	Hidrogênios Acoplados a 1 ligação $\delta\text{H/ppm}$
1	122,5	CH	7,80
2	113,8	CH	6,91
3	155,1	C_0	-
4	103,7	CH	6,98
4a	161,1	C_0	-
6	160,5	C_0	-
6a	103,0	C_0	-
6b	116,8	C_0	-
7	120,3	CH	7,73
8	114,3	CH	6,87
9	151,6	C_0	-
10	106,8	C_0	-
10a	151,1	C_0	-
11a	158,8	C_0	-
11b	105,0	C_0	-
2'	77,2	C_0	-
3'	131,5	CH	5,78
4'	115,2	CH	6,84
Metilas	27,6	CH_3	1,48

A biossíntese de cumestanos na maior parte das vezes resulta na presença de funções oxigenadas nos carbonos C-3 e C-9 (Tahara & Ibrahim 1995, Heller & Forkmann 1988)^{24,46}, tal fato em conjunto com a interpretação dos dados de RMN de ^1H nos permite postular *a priori* que um dos anéis é substituído por apenas uma hidroxila nas posições C-3 ou C-9, enquanto que o outro anel apresenta o anel cromênico em C-3/C-4 ou ainda C-9/C-10, de forma complementar, embora propostas discordantes das rotas biossintéticas básicas sejam viáveis com menores probabilidades.

A confirmação das posições dos substituintes e de cada carbono na estrutura foi possível através de experimentos de RMN de HSQC e HMBC, destacando-se a relação à longa distância 3J entre H-1 (δ 7,80) e C-11a (δ 158,8) e entre H-1 e C-4a (δ 161,1), confirmando a posição de uma hidroxila no carbono C-3 (δ 155,1). De forma igualmente eficiente à posição do anel cromênico foi definida pela presença de uma relação à longa distância 3J entre H-7 (δ 7,73) e C-6a (δ 103,0) confirmando uma das estruturas previstas *a priori* pelas rotas biossintéticas.

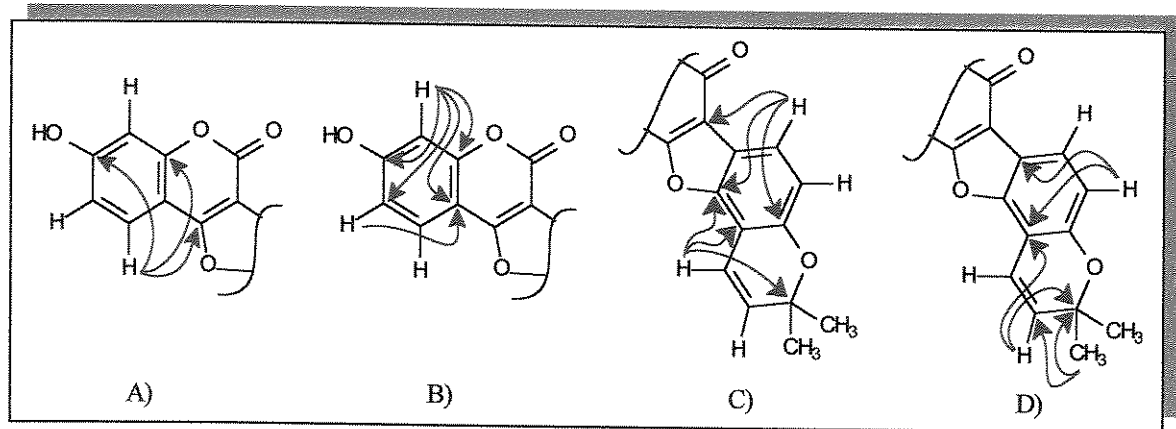


Figura 3.2.2 Interações de HMBC (11,0 Tesla, CD_3OD) observadas para o cumestano I: A) H-1; B) H-2 e H-4; C) H-7 e H-1'; D) H-2' e Hidrogênios de metilas, (E.2.6. e T.2.).

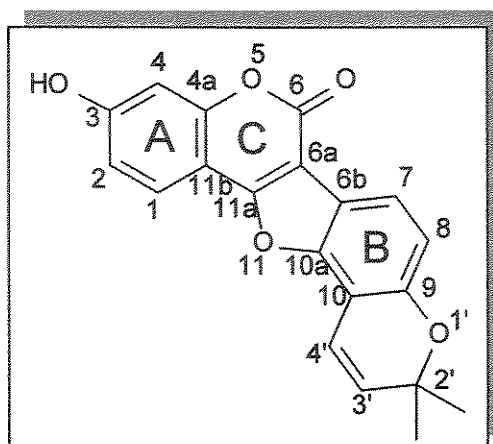


Figura 3.2.3 Proposta para o cumestano I e sua numeração.

Os demais dados de espectroscopia no U.V. (E.2.9.), no I.V. (E.2.10) e espectrometria de massas de alta resolução (E.2.8.) são compatíveis com a estrutura proposta.

Em extensa pesquisa bibliográfica ao acervo e a base de dados da BIQ-UNICAMP, envolvendo Chemical Abstracts, UNIBIBLI, Web of Science, PROBE – Bibliotecas eletrônicas, EBSCO on-line atualizados até o ano 2003 observamos que esta substância permaneceu inédita até aquela data.

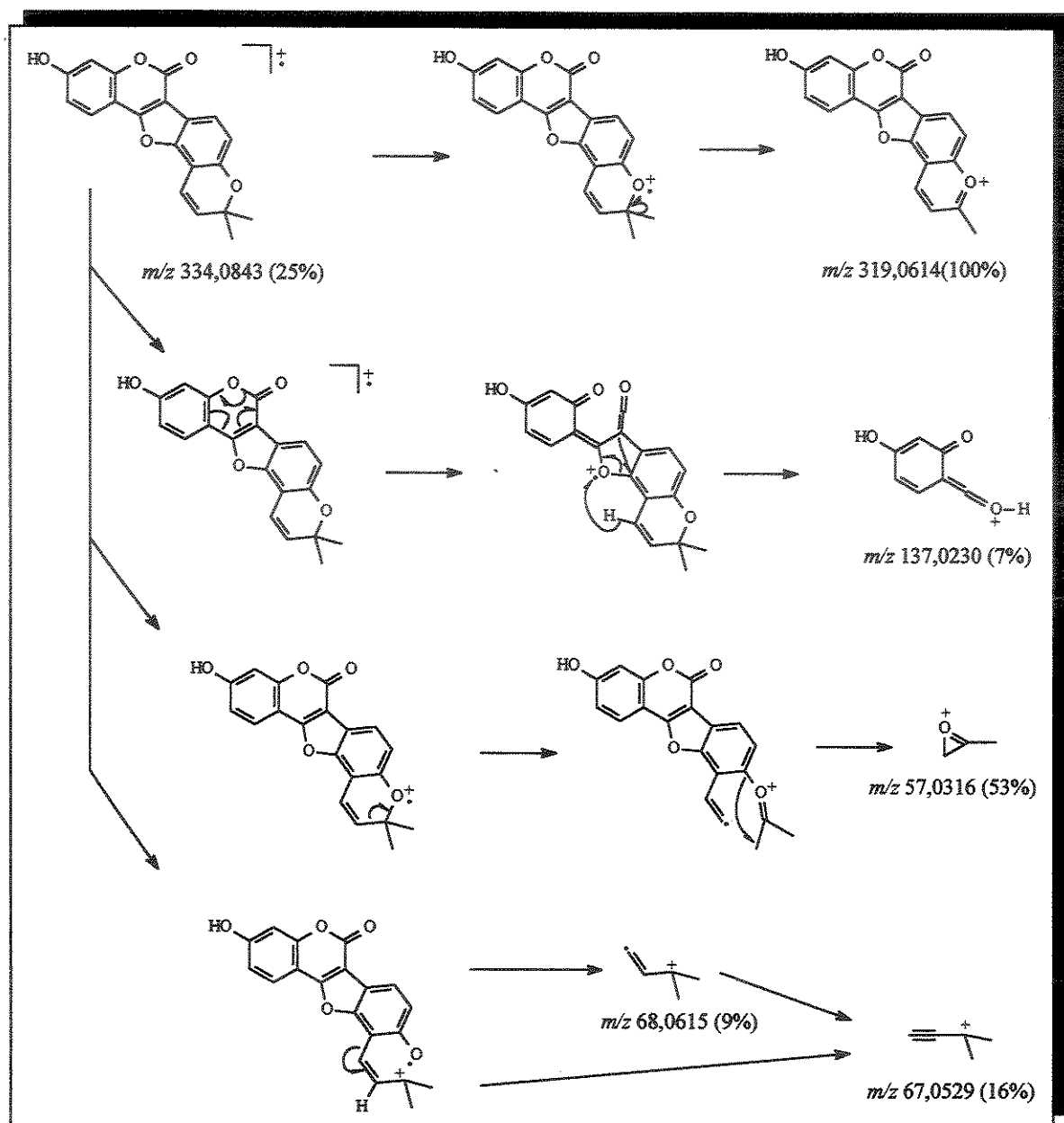


Figura 3.2.4 Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para o Cumestano I, (E.2.8).

3.3 CUMESTANO II

Um outro novo cumestano denominado aqui de cumestano II, teve seu esqueleto determinado de forma análoga ao anterior, pela ausência de sinais no espectro de RMN de ^1H atribuíveis aos hidrogênios do anel C em conjunto com os sinais δ 159,7, 157,8 e 160,4 do espectro RMN de ^{13}C , totalmente desacoplado, como C_0 mais desprotegidos, atribuídos respectivamente a C-6, C-11a, e C-4a, que associados a C-6a, e C-11b respectivamente δ 104,3 e δ 105,6, definem o padrão de substituição e oxidação do anel C, de forma análoga ao proposto para o cumestano I.

No espectro de massas de alta resolução a presença do íon molecular m/z 366,1118 (100%) como pico base define a fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$ com um índice de insaturação igual a 13. O número de carbonos sugerem a presença de um resíduo isoprenílico e um carbono extra (metoxila), compondo o conjunto de substituintes, confirmado pelo espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C . O número de hidrogênios define a presença de duas hidroxilas entre os substituintes, visto que o espectro de RMN de ^1H apresenta integração igual a 16 para os hidrogênios aromáticos, em conjunto com os do resíduo isoprenílico e metoxílico, dessa forma temos de admitir a existência de mais um anel na estrutura, que por não ser formado pelo resíduo isoprenílico, como demonstrado a seguir, confirma o anel furano com dois lados fundidos a outros anéis da estrutura, definindo a substância como um cumestano.

O espectro de RMN de ^1H revelou a presença de um substituinte dimetilalila, uma metoxila e quatro hidrogênios aromáticos, três deles constituindo um sistema AMX, formado por dois hidrogênios em posições vicinais (orto), representado por um sinal duplo em δ 7,91 ($^3J = 8,6$ Hz), e um dubleto

δ 6,93 ($^3J = 8,6$ Hz) e outro hidrogênio orientado respectivamente nas posições para e meta com relação aos primeiros representado por um singlet* em 7,11 ppm, confirmado por COSY de 1H . O hidrogênio aromático remanescente constitui um sistema isolado, representado por um singlet em 7,16 ppm.

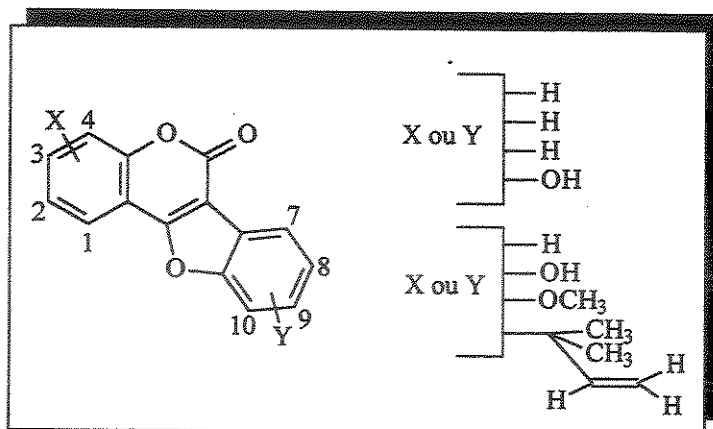


Figura 3.3.1 Proposta em função da biossíntese para o cumestano II

Um outro conjunto de sinais deste espectro de ressonância de 1H , integrado para um total de nove hidrogênios foi atribuído a dois grupos metílicos e um sistema vinílico, de um resíduo isoprenílico constituindo um substituinte dimetilalila, respectivamente representado por um singlet em δ 1,58 (integrado para seis hidrogênios), um duplo dubleto a δ 6,44 ($^3J = 17,4$ Hz e $^3J = 10,4$ Hz) e dois dubletos a δ 4,26 ($^3J = 17,4$ Hz) e δ 4,75 ($^3J = 10,4$ Hz). O substituinte metoxila foi reconhecido como um singlet em δ 4,24 e confirmado no espectro de RMN de ^{13}C como um sinal em 61,4 ppm, típico de metoxila de anel aromático orto-dissubstituído com funções oxigenadas (Agrawal 1989)⁴⁵.

* O esperado desdobramento do sinal em 7,11 ppm como dubleto, da mesma maneira que o sinal 6,93 ppm como duplo dubleto no espectro de RMN de 1H não foi observado na prática, a relação entre eles foi detectada apenas por COSY de 1H .

Tabela 3.3.1 Dados de RMN de ^1H , (500 MHz, 11,0 Tesla, CDCl_3) para o cumestano II, (E.3.1).

	Atribuição de H	$\delta\text{H/ppm}$	Integração/H	Multiplicidade de Sinais	Constantes/Hz
Sistema I	1	7,91	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H1-H2}} = 8,6$
	2	6,93	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H2-H1}} = 8,6$
	4	7,11	1	<i>s</i>	
Sistema II	8	7,16	1	<i>s</i>	
Sistema III	2'	6,44	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H2'-H3'trans}} = 17,4$ $^3J_{\text{H2'-H3'cis}} = 10,4$
	3'trans	4,26	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H3'trans-H2'}} = 17,4$
	3'cis	4,75	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H3'cis-H2'}} = 10,4$
Sistema IV	OCH_3	4,24	3	<i>s</i>	
Sistema V	CH_3	1,25	6	<i>s</i>	

Tabela 3.3.2 Dados de RMN de ^{13}C e HSQC (11,0 Tesla, CDCl_3) para o cumestano II, (E.3.3. e E.3.5.).

Atribuição	$\delta\text{C/ppm}$	Tipo	Hidrogênios Acoplados a 1 ligação $\delta\text{H/ppm}$
1	123,1	CH	7,91
2	113,4	CH	6,93
3	154,8	C_0	-
4	103,0	CH	7,11
4a	160,4	C_0	-
6	159,7	C_0	-
6a	104,3	C_0	-
6b	116,2	C_0	-
7	139,3	C_0	-
8	112,6	CH	7,16
9	145,5	C_0	-
10	129,9	C_0	-
10a	147,3	C_0	-
11a	157,8	C_0	-
11b	105,6	C_0	-
1'	42,6	C_0	-
2'	150,8	CH	6,44
3'	109,7	CH_2	4,26 e 4,75
Metilas	31,8	CH_3	1,25
Metoxila	61,4	OCH_3	4,24

A biossíntese de cumestanos sugere a presença de funções oxigenadas (Tahara & Ibrahim 1995, Heller & Forkmann 1988)^{24,46} em C-3 e C-9, tal fato em conjunto com os dados do espectro de RMN protônico permite postular *a priori* que um dos anéis A ou B é trissubstituído com dimetilalila, uma metoxila e uma hidroxila, enquanto que o outro apresenta apenas uma hidroxila como substituinte nas posições complementares C-3 ou C-9. Dentre os possíveis cumestanos isômeros destaca-se com maior probabilidade biossintética um com a disposição de substituintes análoga a isoflavona I, visto que estes são derivados próximos das isoflavonas, embora seja possível o fato destas moléculas não pertencerem à mesma linha biossintética viabilizando outras alternativas.

O emprego de técnicas bidimensional de espectroscopia de RMN em HSQC e HMBC permitiu identificar a posição de cada carbono e hidrogênio da estrutura, confirmando o conjunto de substituintes do anel A e B, assim como suas posições, destacando-se a relação à longa distância 3J entre H-1 (δ 7,91) e o carbono C-4a (δ 160,4) definindo o conjunto de substituintes do anel A, e a relação à longa distância 3J entre H-2 (δ 6,93) e o carbono C-11b (δ 105,6) confirmando a posição da hidroxila em C-3, para o anel B a relação à longa distância 4J entre H-8 (δ 7,16) e o carbono C-6a confirma o outro conjunto de substituintes, a relação 3J entre os hidrogênios da metoxila e o carbono C-10 (δ 129,9) confirma metoxila aromática orto dissustituída com funções oxigenadas, restando para os sinais δ 145,5 e 147,3 ppm serem atribuídos a C-9 e C-10a respectivamente, para os quais também é observado o efeito de proteção devido à presença da metoxila em orto. A posição do substituinte dimetilalila é definida pelas relações 3J entre o hidrogênio H-8 (δ 7,16) e os carbonos C-10 (δ 129,9), C-6b (δ 116,2) e C-1' (δ 42,6), confirmando plenamente a proposta biossintética mais provável.

Os demais dados de espectroscopia no U.V. (E.3.9.), no I.V. (E.3.10.) e de espectrometria de massas de alta resolução (E.3.8.) são compatíveis com a estrutura proposta.

Em extensa pesquisa bibliográfica ao acervo e a base de dados da BIQ-UNICAMP, envolvendo Chemical Abstracts, UNIBIBLI, Web of Science, PROBE – Bibliotecas eletrônicas, EBSCO on-line atualizados até o ano 2003 observamos que esta substância permaneceu inédita até a aquela data.

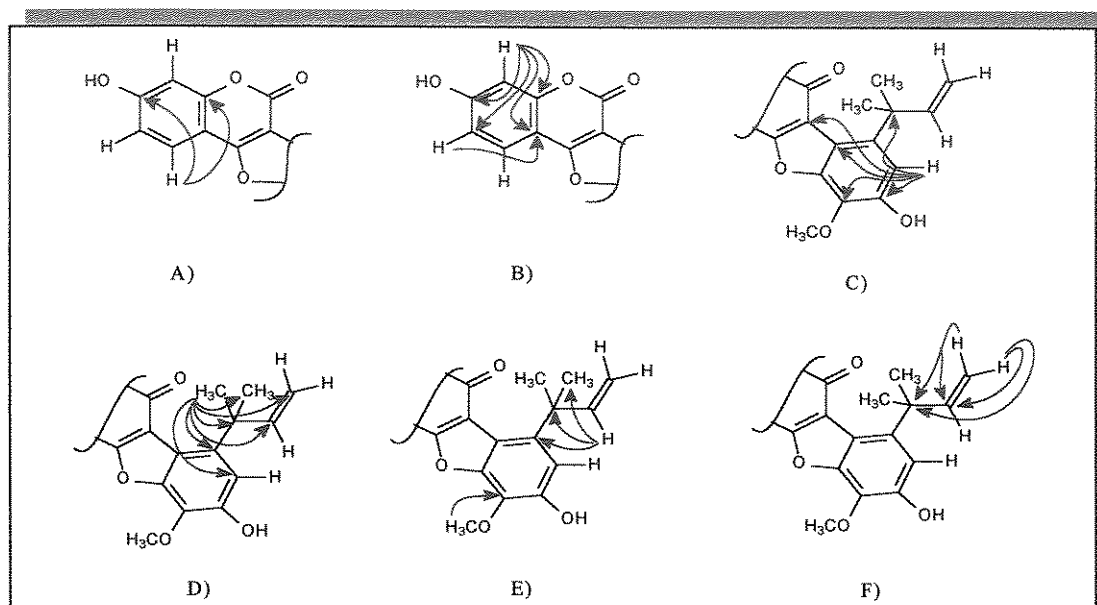


Figura 3.3.2 Interações a longa distância por HMBC (11,0 Tesla, CDCl_3) observadas para o cumestano II: A) H-1; B) H-2 e H-4; C) H-8 ; D) H-Metilas; E) H-2' e Metoxila e F) H-3' cis e H-3' trans, (E.3.6. e T.3.).

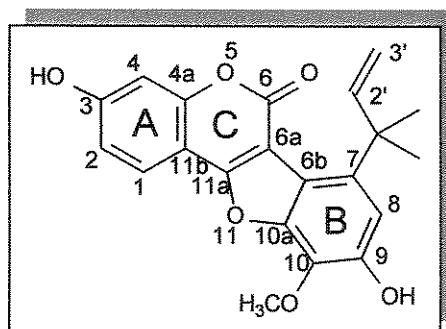


Figura 3.3.3 Proposta para o cumestano II e sua numeração.

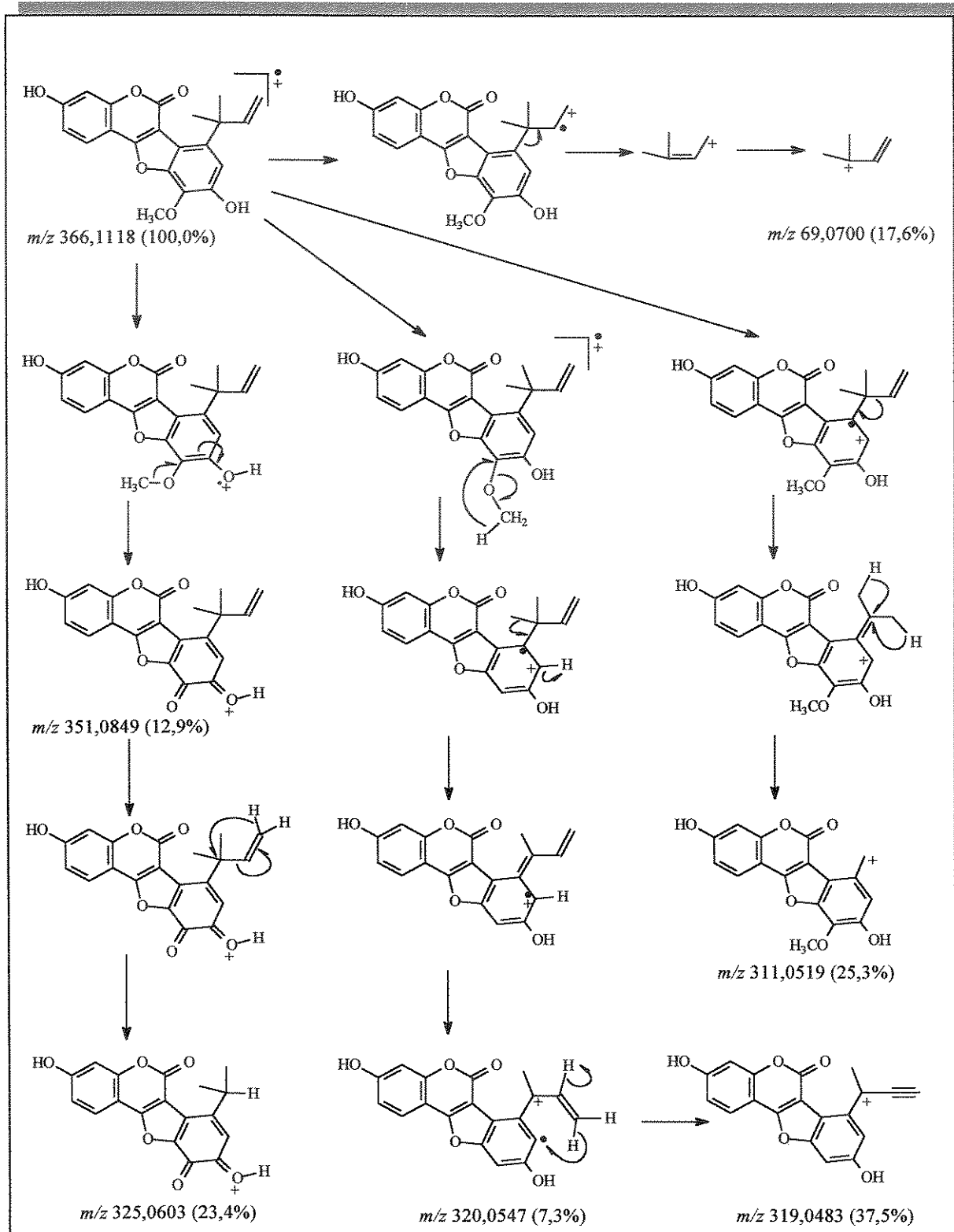


Figura 3.3.4 Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para o Cumestano II, (E. 3.8).

3.4 CUMESTANO III

Um outro cumestano, denominado isosojagol, teve seu esqueleto determinado pela ausência de sinais no espectro de RMN de ^1H atribuíveis ao anel C em conjunto com os sinais δ 161,6, 160,7 e 162,8 do espectro de RMN de ^{13}C , totalmente desacoplado, como C_0 mais desprotegidos, atribuídos respectivamente a C-6, C-11a, e C-4a, que associados a C-6a, e C-11b respectivamente δ 104,0 e 106,2 definem o padrão de substituição e oxidação do anel C. Para complementar a caracterização desta classe de isoflavonóides recorreremos ao espectro de massas de alta definição, no qual verificamos a presença do íon molecular m/z 336,100 (55%) que define para este cumestano a fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5$, cujo índice de insaturação é igual a 13. O número de carbonos presentes sugere a presença de um resíduo isoprenílico, confirmado pelos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C como isoprenil, como será descrito a seguir. O número de hidrogênios da fórmula confirma a presença de duas hidroxilas, visto que no espectro de RMN de ^1H a integração é igual a 14 para o conjunto dos hidrogênios aromáticos e do substituinte isoprenil. Em função dos substituintes presentes e do índice de insaturação temos de admitir a presença de um anel furano, com dois lados fundidos a outros anéis da estrutura, confirmando o esqueleto de um cumestano. Ainda no espectro de massas é característico a presença do pico base m/z 280,035 (100%) e o pico m/z 281,041 (49%) atribuídos respectivamente a eliminação de uma molécula de isobuteno e do radical isobut-1-enil a partir do íon molecular confirmando a presença do substituinte isoprenil.

Tabela 3.4.1 Dados de RMN de ^1H , (300 MHz, 7,0 Tesla, CD_3OD) para o cumestano III, (isosojagol) (E.4.1).

	Atribuição de H	$\delta\text{H/ppm}$	Integração/H	Multiplicidade de Sinais	Constantes/Hz
Sistema I	1	7,74	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H1-H2}} = 8,8$
	2	6,84	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H2-H1}} = 8,8$ $^4J_{\text{H2-H4}} = 2,2$
	4	6,79	1	<i>d</i>	$^4J_{\text{H4-H2}} = 2,2$
Sistema II	7	7,47	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H7-H8}} = 8,4$
	8	6,82	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H8-H7}} = 8,4$
Sistema III	1'a, 1'b	3,55	2	<i>d</i>	$^3J_{\text{H1'-(a,b)-H2'}} = 7,3$
	2'	5,29	1	<i>tsept</i>	$^3J_{\text{H2'-H1'-(a,b)}} = 7,3$ $^4J_{\text{H2'-H(metilas a,b)}} = 1,1$
	Metila a	1,62	3	<i>d</i>	$^4J_{\text{H2'-H(metilas a,b)}} = 1,1$
	Metila b	1,82	3	<i>d</i>	$^4J_{\text{H2'-H(metilas a,b)}} = 1,1$

O espectro de RMN de ^1H revelou claramente a presença de cinco hidrogênios aromáticos, além dos presentes no substituinte isoprenil, três deles constituindo um sistema AMX, formado por dois hidrogênios em posições vicinais (orto), representados por um sinal duplo em δ 7,74 ($^3J = 8,8$ Hz) e um duplo dubleto em δ 6,84 ($^3J = 8,8$ Hz e $^4J = 2,2$ Hz), o terceiro hidrogênio deste sistema está orientado respectivamente nas posições para e meta com relação aos dois primeiros, representado por um sinal duplo em 6,79 ppm ($^4J = 2,2$ Hz). Os outros dois hidrogênios aromáticos constituem um sistema isolado AM, formado por hidrogênios em posições vicinais, representado por dois sinais duplos em δ 7,47 e em 6,82 ppm ($^3J = 8,4$ Hz). Um terceiro sistema de spins integrado para 9 hidrogênios composto por dois sinais duplos integrados para 3 hidrogênios cada, δ 1,82 ($^4J = 1,1$ Hz) e 1,62 ppm ($^4J = 1,1$ Hz) atribuído a duas metilas, um sinal duplo integrado para 2 hidrogênios em δ 3,55 ($^3J = 7,3$ Hz) atribuídos aos hidrogênios em C-1' e um triplosepteto integrado para um hidrogênio em δ 5,29 ($^3J = 7,3$ Hz e $^4J = 1,1$ Hz) atribuído ao hidrogênio em C-2', revelando um substituinte isoprenil.

A biossíntese de cumestanos na grande maioria das vezes resulta em uma função oxigenada (Tahara & Ibrahim 1995, Heller & Forkmann 1988)^{24,46} em C-3 e C-9, este fato em conjunto com a interpretação dos sinais do espectro de RMN de ^1H nos permite postular *a priori* que estas posições apresentam o substituinte hidroxila enquanto que na posição C-4 ou C-10 temos o substituinte prenil, outras duas possibilidades são menos prováveis. As duas hipóteses apresentadas estão descritas na literatura com os nomes isosojagol (O'Neill *et alli* 1984)⁴³ e phaseol (Assada *et alli* 1998)⁴⁹, pelos espectros de RMN de ^1H , que não permitem a comparação direta em função das diferenças de metodologia. A escassez de dados de RMN de ^{13}C e bidimensionais nos motivou a completar a identificação espectroscópica da substância.

Tabela 3.4.2 Dados de RMN de ^{13}C e HSQC (11,0 Tesla, CDCl_3) para o Cumestano III, (E.4.3 e E.4.5.)

Atribuição	$\delta\text{C/ppm}$	Tipo	Hidrogênios Acoplados a 1 ligação $\delta\text{H/ppm}$
1	123,6	CH	7,74
2	115,0	CH	6,84
3	156,6	C_0	-
4	104,2	CH	6,79
4a	162,8	C_0	-
6	161,6	C_0	-
6a	104,0	C_0	-
6b	116,3	C_0	-
7	119,0	CH	7,47
8	114,5	CH	6,82
9	155,7	C_0	-
10	113,9	C_0	-
10a	156,4	C_0	-
11a	160,7	C_0	-
11b	106,2	C_0	-
1'	23,6	CH_2	3,55
2'	122,8	CH	5,29
3'	133,0	C_0	-
Metila A	18,0	CH_3	1,82
Metila B	25,9	CH_3	1,62

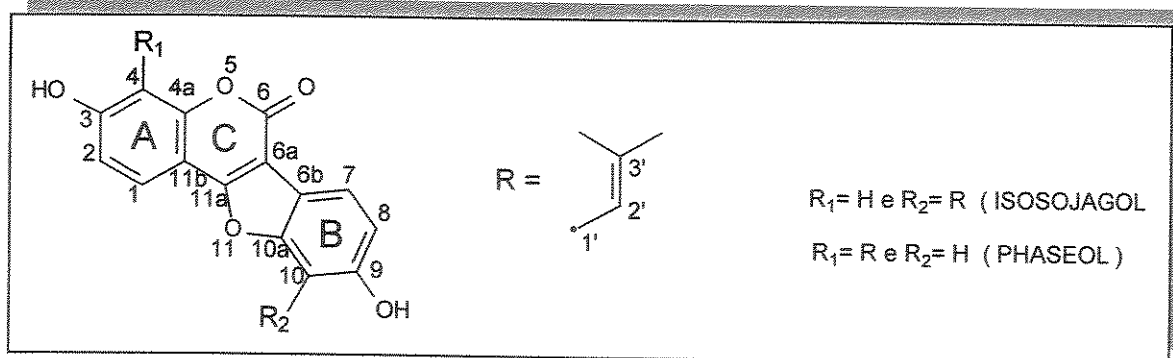


Figura 3.4.1 Propostas baseadas na biossíntese para o cumestano III e sua numeração.

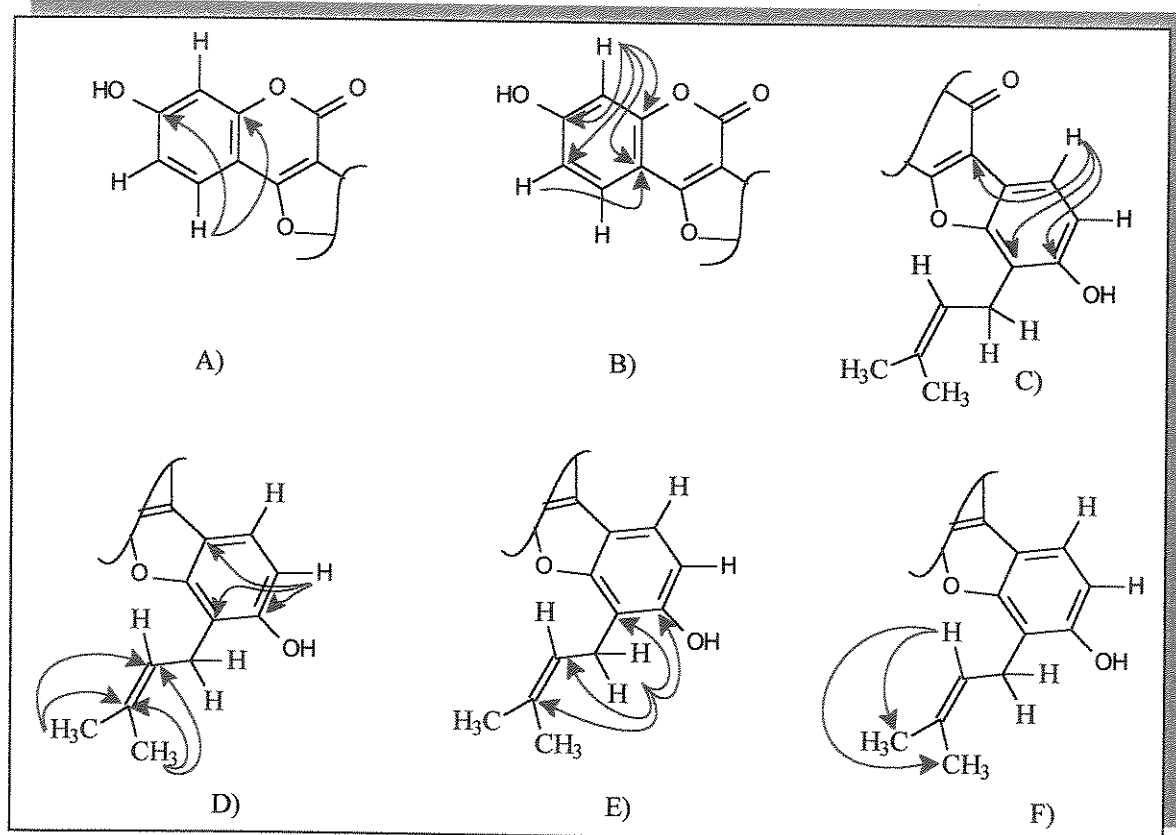


Figura 3.4.2 Interações a longa distância por HMBC (11,0 Tesla, CD_3OD) observadas para o cumestano III: A) H-1; B) H-2 e H-4; C) H-7 ; D) H-8 e H-Metilas; E) H-1' (a e b) e F) H-3', (E.4.6. e T.4.).

A posição dos substituintes foi estabelecida por técnicas bidimensionais de RMN em HSQC e HMBC, que permitiram localizar cada átomo da estrutura, destacando-se a relação à longa distância entre H-2 e C-11b, que confirma a posição da hidroxila em C-3, a relação à longa distância entre H-7 e C-6a, confirma a presença de dois hidrogênios do sistema AM no anel B, restando para a hidroxila e o isoprenil apenas as posições 9 e 10, a questão pode ser encerrada, admitindo o efeito de proteção sobre os carbonos C-8 e C-10 ocasionados pela presença da hidroxila em orto (C-9) visíveis nos deslocamentos destes carbonos no espectro de RMN de ^{13}C confirmando a substância como o cumestano isosojagol (O' Neill *et alli* 1984)⁴³.

Os demais dados espectroscópicos de RMN de ^1H (tabela 3.4.1 e E.4.1.), e de ^{13}C (Tabela 3.4.2. e E.4.3.), COSY de ^1H (E.4.2.), bidimensionais em HMBC (figura 3.4.2., E.4.6 e T.4) e HSQC (tabela 3.4.2. e E.4.5.), e ainda espectroscopia de U.V. (E.4.9) e I.V. (E.4.10) e espectrometria de massas de alta resolução (E.4.8.) são compatíveis com a proposta apresentada.

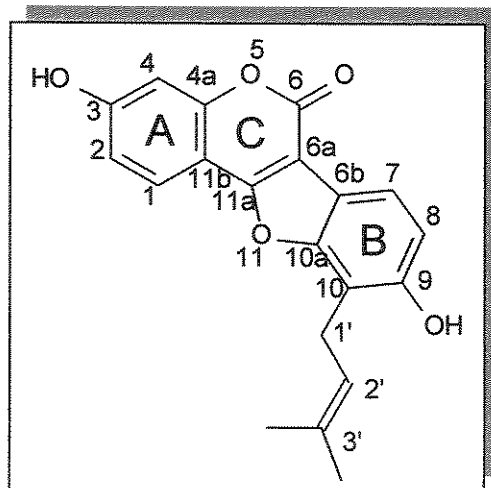


Figura 3.4.3 Proposta para o cumestano III e sua numeração (isosojagol)

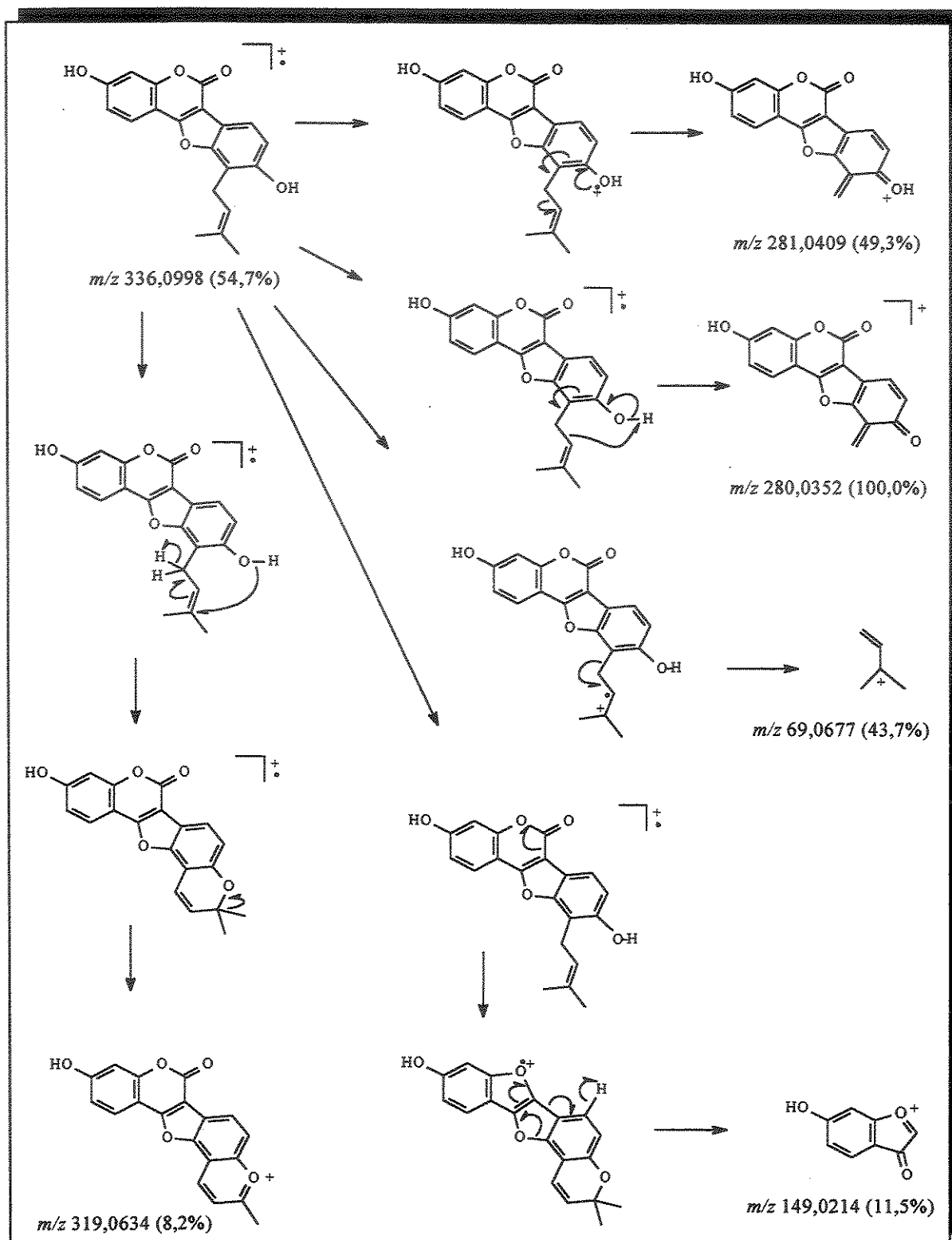


Figura 3.4.4 Proposta de fragmentação (inédita) em espectrometria de massas para o Cumestano III, (E.4.8.).

3.5 PTEROCARPANO I

O espectro de RMN de ^1H para o pterocarpano mostra quatro independentes sistemas de spins, o primeiro e segundo revelam o padrão de substituição do anel A e B, ambos com hidrogênios distribuídos na configuração orto-meta indicando substituintes hidroxila e metoxila nas posições 3 ou 9. O terceiro sistema mostra um característico padrão para o anel C, envolvendo dois hidrogênios da posição 6, um da posição 6a e um da 11a, as constantes de acoplamento foram determinadas e comparadas com dados da literatura (Herath *et alii* 1998)⁴⁴, confirmando a substância como o pterocarpano medicarpina. A medicarpina é o pterocarpano de maior ocorrência, detectado em muitas leguminosas, em particular na subfamília Papilionoideae, a qual é objeto de estudo do grupo de pesquisa de Magalhães, A. F. e Magalhães, E. G., sendo amplamente citado (Firmino 1998, Magalhães *et alii* 2000, Machado 2000, Sannomiya 2001)^{50, 51, 52, 53}.

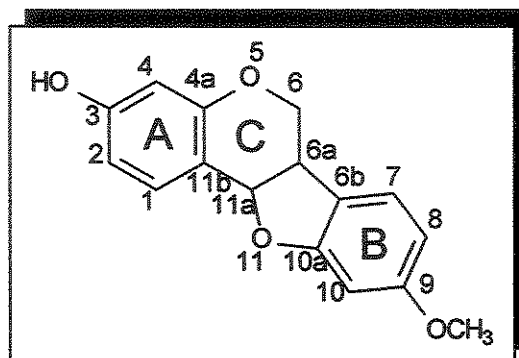


Figura 3.5.1 O pterocarpano I e sua numeração (medicarpina).

Tabela 3.5.1 Dados de RMN de ^1H , (500 MHz, CDCl_3) para o pterocarpano I (medicarpina) (E.5.1.1.) (compatíveis com Herath *et alli* 1998)⁴⁴

	Atribuição de H	$\delta\text{H/ppm}$	Integração/H	Multiplicidade de Sinais	Constantes/Hz
Sistema I	1	7,39	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H1-H2}} = 8,6$
	2	6,56	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H2-H1}} = 8,6$ $^4J_{\text{H2-H4}} = 2,4$
	4	6,41	1	<i>d</i>	$^4J_{\text{H4-H2}} = 2,4$
Sistema II	7	7,13	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H7-H8}} = 9,2$
	8	6,46	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H8-H7}} = 9,2$ $^3J_{\text{H8-H10}} = 2,4$
	10	6,45	1	<i>d</i>	$^4J_{\text{H10-H8}} = 2,4$
Sistema III	11a	5,50	1	<i>d</i>	$^3J_{\text{H11a-H6a}} = 6,7$
	6a	3,53	1	<i>ddd</i>	$^3J_{\text{H6a-H11a}} = 6,7$ $^3J_{\text{H6a-H6ax}} = 11,6$ $^3J_{\text{H6a-H6eq}} = 5,2$
	6 axial	3,61	1	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H6ax-H6a}} = 11,6$ $^2J_{\text{H6ax-H6eq}} = 11,0$
	6equatorial	4,24	1	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H6eq-H6ax}} = 11,0$ $^3J_{\text{Heq-H6a}} = 5,2$
Sistema IV	OCH_3	3,77	3	<i>s</i>	

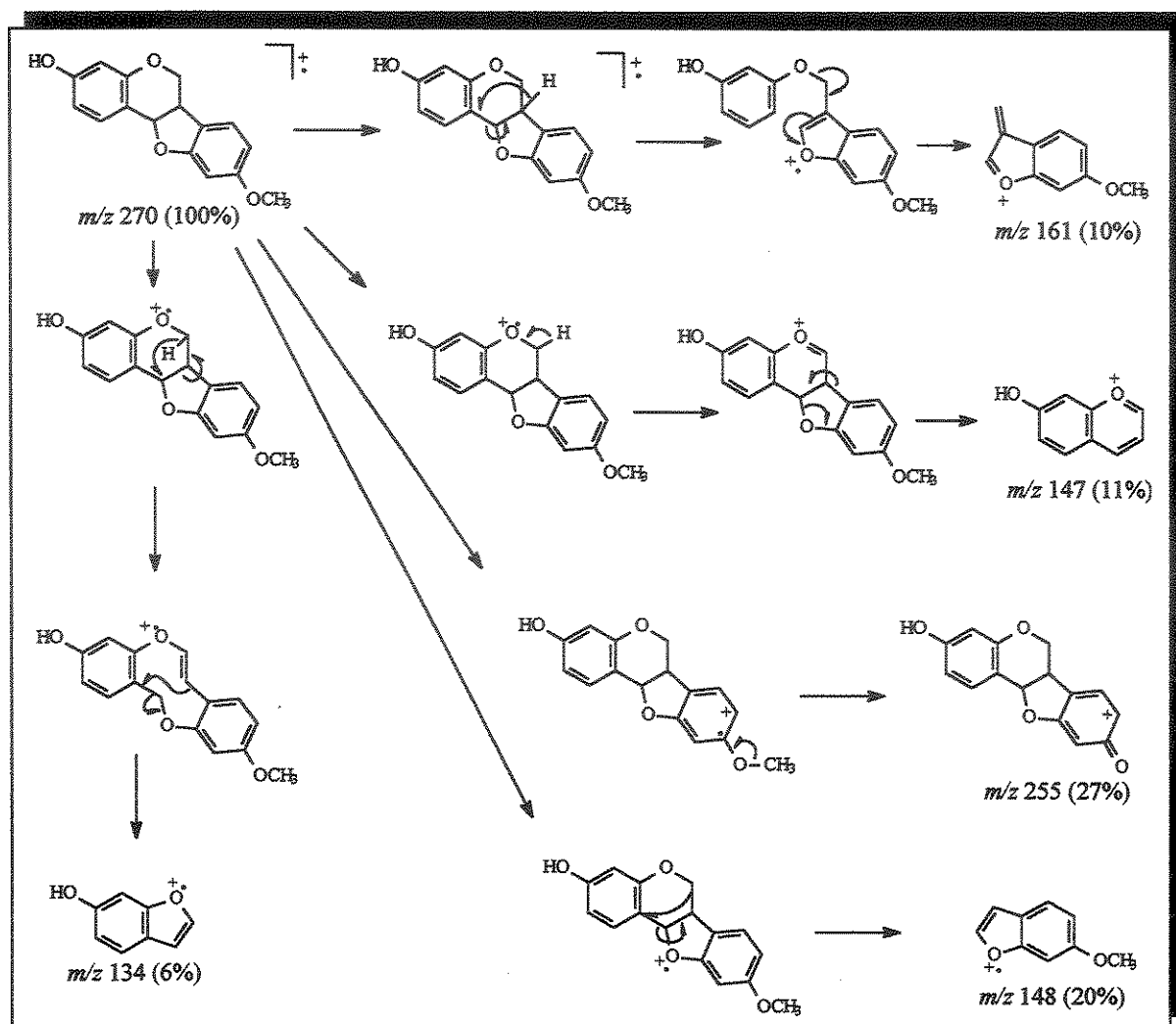


Figura 3.5.2 Proposta de fragmentação em espectrometria de massas para o pterocarpano medicarpina (Firmino 1998, Magalhães *et alli* 2000, Machado 2000, Sannomiya 2001)^{50,51,52,53}, (E.5.8.).

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isoflavonóides encontrados em *Lecointea hatschbachii* Barneby demonstram semelhanças com os encontrados na maioria dos espécimens estudados pertencentes à tribo Swartzia (Polhill 1994)¹, nos quais é comum a presença de esqueletos pterocarpânicos e outros com proximidade biossintética. Avaliando ainda o esqueleto isoflavonoídico quanto à evolução da taxa de oxidação, como proposto por Cagnin & Gottlieb 1978²⁶, observamos coerência com os demais grupos da tribo Swartzia (Gráfico 3.6.1). Quanto à taxa de oxidação/metilação também proposta por Gottlieb 1982¹², os índices atribuídos a cada espécie, descrevem claramente uma tendência (Gráfico 3.6.2.). Estes dados são uma clara demonstração de que a espécie *Lecointea hatschbachii* está adequadamente alocada dentro da tribo Swartzia. Os estudos de Gottlieb et alli (1996)⁴⁷ sugerem que as diferenças nestes parâmetros entre os espécimens dentro de um gênero ou grupo, normalmente é pequena, mas em face da escassez de dados, uma melhor avaliação quimiosistemática do gênero e também do grupo só será possível com a inclusão do estudo fitoquímico de novos espécimens, de espécies relacionadas, em que será possível observar tendências específicas e gerais com maior definição.

Gráfico 3.6.1 Afinidades Evolutivas (Evolução do grau de oxidação X Evolução do esqueleto Isoflavonoídico) para as espécies de composição fitoquímica conhecidas da tribo Swartzia (Cagnin & Gottlieb 1978)²⁶, com a inclusão de *Lecointea hatschbachii*.

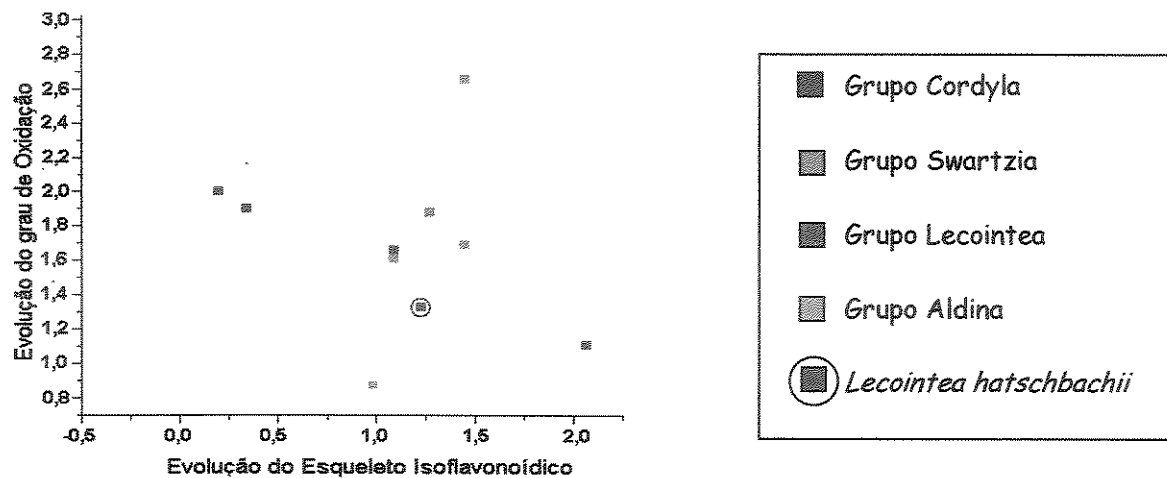
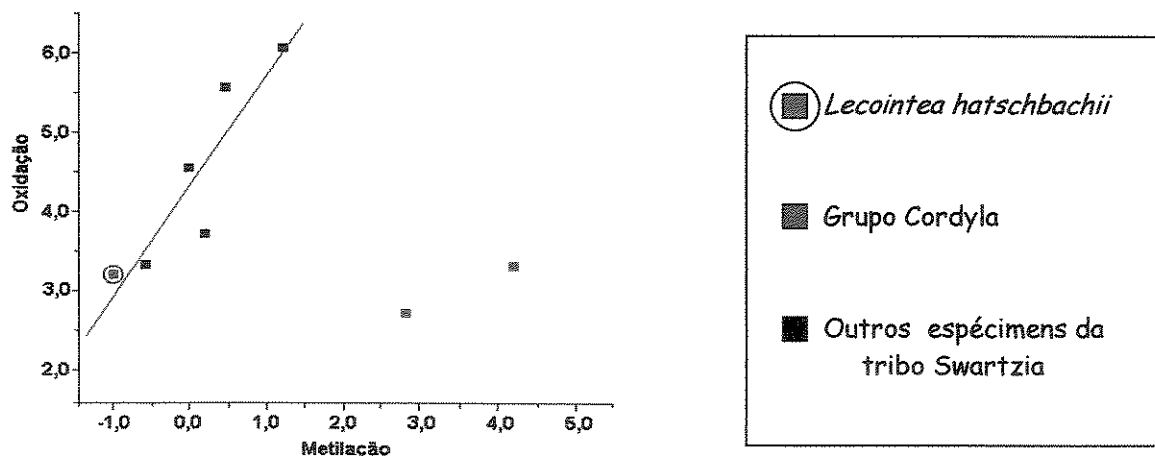


Gráfico 3.6.2. Oxidação X Metilação para a maioria das espécies de composição fitoquímica conhecida da tribo Swartzia (Gottlieb 1982)¹², com a inclusão de *Lecointea hatschbachii*.



4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1 INTRODUÇÃO

A investigação fitoquímica é um passo fundamental na procura de substâncias com atividades biológicas, e no entanto sabe-se que cerca de 350.000 espécies vegetais de todas as que existem sobre a superfície da terra (cerca de 380.000) não tem nenhum estudo desta natureza. A procura de atividades biológicas em plantas geralmente é guiada por informações quimiotaxonômicas, biomonitoramento, informações da medicina popular e outras formas de seleção, mas em face do pequeno número de plantas estudadas é muito provável que novas substâncias ativas também venham a ser descobertas de forma aleatória, pela pesquisa em plantas pouco conhecidas ou de difícil acesso.

A identificação de novas substâncias com atividades biológicas, têm um papel importante na elucidação do mecanismo de ação do princípio ativo, pois o estudo de um conjunto de substâncias diferentes com mecanismo de ação semelhantes revela informações importantes sobre os quimiorreceptores em que atuam, permitindo o desenho de um farmacóforo, sobre o qual inúmeras modificações podem ser propostas, com a finalidade de melhorar suas propriedades biológicas.

Uma planta produz milhares de substâncias diferentes, em que apenas uma ou algumas são responsáveis pela sua atividade biológica. O uso de testes relativamente simples e de baixo custo permite identificar a atividade biológica específica para determinados alvos biológicos. Neste âmbito é interessante salientar a correlação observada por Meyer et alii (1982)⁵⁴ entre a letalidade sobre *Artemia salina* e a citotoxicidade sobre células cancerosas P-388, e também por McLaughlin (1995)⁵⁵ sobre células de carcinoma nasofaríngeo humano 9KB.

Os flavonóides são uma classe de compostos com grande variedade de substâncias com atividades biológicas também diversificadas, entre elas a atuação como barreira química a microorganismos invasores é normalmente esperada, e assim o uso de ensaios de bioautografia, que combinam cromatografia em camada delgada e teste biológico são imprescindíveis à identificação destas substâncias, revelando atividades antifúngicas, e antibacterianas, principalmente em misturas complexas. Os microorganismos empregados geralmente abrangem um largo espectro, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, bactérias resistentes a ácidos e fungos dermatófitos, muitos com características, patogênicas, oportunistas e saprófitas.

Desta forma os extratos e substâncias isoladas neste trabalho foram avaliados quanto ao teste de letalidade à *Artemia salina* e bioautografia.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 LETALIDADE À *Artemia salina*

Este ensaio foi desenvolvido com base no protocolo proposto por McLaughlin & Rogers (1995)⁵⁶, no qual ovos de *Artemia salina* são colocados para eclodir em solução salina 38 g.dm⁻³, em recipiente parcialmente coberto, e sob iluminação artificial, de forma que as larvas ao eclodirem possam ser separadas pela sua atração ao lado iluminado. As larvas são consideradas adequadas ao teste segundo os autores, no período entre 48 e 72 horas após o início do procedimento.

Os extratos foram preparados em triplicatas em frascos de 10 cm³ em porções de 5,0 mg, 0,5 mg, 0,05 mg, enquanto que as substâncias isoladas em

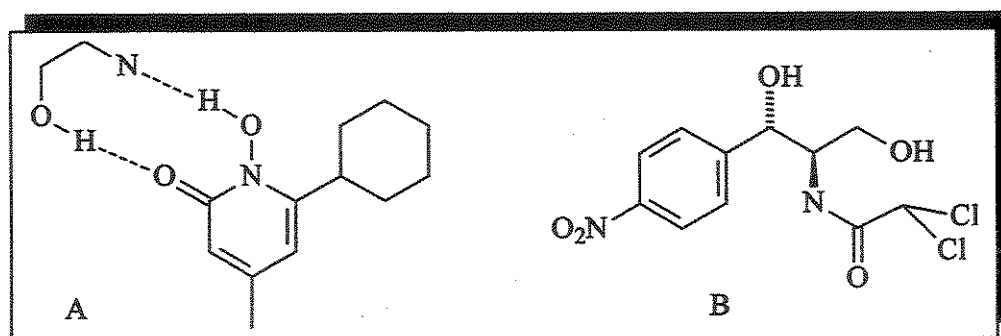
porções de 0,5 mg, 0,05 mg e 0,005 mg. Após eliminação do solvente (clorofórmio-metanol), usado como veículo de transporte para os extratos e substâncias por evaporação, cada frasco recebeu 0,02 cm³ de dimetilsulfóxido (DMSO), 5,0 cm³ de solução salina, e após homogeneização, 10 larvas incubadas por 48 horas, escolhidas pela sua alta mobilidade, e o conjunto colocado em repouso. Após 24 horas de contato procedeu-se a contagem do número de larvas sobreviventes.

Os dados foram processados pelo método χ^2 (qui quadrado) em tabelas de contingência 2x2 avaliando frequências de larvas vivas e mortas dos tratamentos quanto à testemunha e as concentrações letais foram estimadas pelo método probit.

4.2.2 BIOAUTOGRAFIA

O ensaio de bioautografia foi realizado com base no procedimento descrito por Saxena et alli (1995)⁵⁷ e modificado por Magalhães e colaboradores (1998)⁵⁸, o qual consistiu na aplicação de 20 µg do extrato ou 10 µg da substância isolada a ser avaliada sobre uma placa de CCD, que após o desenvolvimento com o eluente adequado (neste experimento hexano : acetato de etila 9:1), foi seca ao ar por 12 horas, colocada em uma placa de petri e revestida com uma fina e homogênea camada de um meio de cultura específico para o microorganismo usado. Após a solidificação do meio de cultura aplicou-se 0,20 cm³ de suspensão de microorganismo contendo cerca de 10⁶ células.cm⁻³ em cada placa. As placas foram encubadas por 24 horas a 37°C no caso das bactérias e por 7 dias a 25°C para os fungos. Ao final observou-se a presença ou ausência de halos de inibição sobre as posições em que as substâncias ou bandas do extrato cromatografado estavam localizadas. As posições das substâncias e bandas do extrato foram

Os meios de cultura empregados foram: Nutriente Agar (peptona 5,0 g.dm⁻³, extrato de carne 3,0 g.dm⁻³, agar 15,0 g.dm⁻³ em água) para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*; YMA (extrato de levedura 3,0 g.dm⁻³, extrato de malte 3,0 g.dm⁻³, peptona 5,0 g.dm⁻³, dextrose 10,0 g.dm⁻³ e agar 20,0 g.dm⁻³ em água) para as leveduras *Candida albicans* e *Cladosporium cladosporioides*; Agar Malte (extrato de malte 20,0 g.dm⁻³ e agar 20,0 g.dm⁻³ em água) para os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium oxysporium*, *Rhizopus orizae*, *Alternaria alternata*, e *Aspergillus fumigatus*. As suspensões de microorganismos foram obtidas da Fundação “André Tosello” – Coleção de Culturas Tropicais.



- 82 -

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 LETALIDADE À *Artemia salina*

No experimento de letalidade à *Artemia salina* os resultados obtidos são classificados como variáveis não paramétricas. Entre as metodologias estatísticas aplicáveis a testes não paramétricos, a de qui-quadrado (χ^2) é sem dúvida a melhor e de uso mais geral, aplicável a inúmeros casos. O método de probit, recomendado por McLaughlin & Rogers (1998)⁵⁶ também trabalha variáveis não paramétricas fundamentado em (χ^2) e permite calcular uma estimativa da CL_{50} , bem como seu intervalo de confiança. Desta forma os dados obtidos foram processados por estes métodos.

As análises dos extratos mostraram significância estatística com relação à testemunha para o extrato clorofórmico, hexânico e metanólico nas concentrações 1000 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$ e também a 100 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$, nenhum extrato mostrou-se significativo à concentração de 10 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$. O extrato hexânico foi considerado o mais ativo pela comparação das estimativas da CL_{50} (73 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$). Apesar das significâncias observadas, apenas para o extrato hexânico, podemos afirmar que a CL_{50} é inferior a 343 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$ a 2,5% de probabilidade, o que é relevante para a condução de experimentos mais elaborados.

Das substâncias isoladas, mostraram significância estatística nas concentrações 100 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$, 10 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$, e 1 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$ o cumestano I, cumestano II, e o pterocarpano I, dos quais o pterocarpano I foi considerado o mais ativo (estimativa da CL_{50} 1 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$). A isoflavona I e o Cumestano III mostraram significância estatística apenas a concentração de 100 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$.

Quadro 4.3.1.1 Resumo das tabelas de contingência para os extratos de *L. hatschbachii*.

	Larvas vivas	Larvas mortas	larvas vivas/ larvas no teste	χ^2 calculado
E. Hexânico 10 mg/dm³	26 (26,67)	04 (3,33)	0,889	0,23
E. Hexânico 100 mg/dm³	11 (21,67)	19 (8,33)	0,722	28,36 **
E. Hexânico 1000 mg/dm³	00 (18,00)	30 (12,00)	0,600	36,00 **
Testemunha	54 (53,33) (43,33) (36,00)	06 (6,67) (16,67) (24,00)		
	Larvas vivas	Larvas mortas	larvas vivas/ larvas no teste	χ^2 calculado
E. Clorofórmico 10 mg/dm³	25 (26,33)	05 (3,67)	0,878	0,83
E. Clorofórmico 100 mg/dm³	21 (25,00)	09 (5,00)	0,833	5,76 *
E. Clorofórmico 1000 mg/dm³	00 (18,00)	30 (12,00)	0,600	67,50 **
Testemunha	54 (52,67) (50,00) (36,00)	06 (7,33) (10,00) (24,00)		
	Larvas vivas	Larvas mortas	larvas vivas/ larvas no teste	χ^2 calculado
E. Metanólico 10 mg/dm³	26 (26,67)	04 (3,33)	0,889	0,23
E. Metanólico 100 mg/dm³	22 (25,33)	08 (4,67)	0,844	4,23 *
E. Metanólico 1000 mg/dm³	00 (18,00)	30 (16,67)	0,600	67,50 **
Testemunha	54 (53,33) (50,67) (36,00)	06 (12,00) (9,33) (24,00)		

() frequências esperadas na hipótese de nulidade respectivamente para os tratamentos. * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de χ^2 , ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de χ^2 .

Quadro 4.3.1.2 – Resumo das tabelas de contingência para as substâncias isoladas de *L. hatschbachii*.

	Larvas vivas	Larvas mortas	larvas vivas/ larvas no teste	χ^2 calculado
Isoflavona I 1,0 mg/dm ³	22 (20,67)	08 (9,33)	0,689	0,41
Isoflavona I 10,0 mg/dm ³	15 (18,33)	15 (11,67)	0,611	2,34
Isoflavona I 100,0 mg/dm ³	07 (15,67)	23 (14,33)	0,522	15,05 **
Testemunha	40 (41,33) (36,67) (31,33)	20 (18,67) (23,33) (28,67)		
	Larvas vivas	Larvas mortas	larvas vivas/ larvas no teste	χ^2 calculado
Cumestano I 1,0 mg/dm ³	13 (17,67)	17 (12,33)	0,589	4,50 *
Cumestano I 10,0 mg/dm ³	03 (14,33)	27 (15,67)	0,478	25,74 **
Cumestano I 100,0 mg/dm ³	00 (13,33)	30 (16,67)	0,444	36,00 **
Testemunha	40 (35,33) (28,67) (26,67)	20 (24,67) (31,33) (33,33)		
	Larvas vivas	Larvas mortas	larvas vivas/ larvas no teste	χ^2 calculado
Cumestano II 1,0 mg/dm ³	13 (17,67)	17 (12,33)	0,589	4,50 *
Cumestano II 10,0 mg/dm ³	06 (15,33)	24 (14,67)	0,511	17,43 **
Cumestano II 100,0 mg/dm ³	00 (13,33)	30 (16,67)	0,444	36,00 **
Testemunha	40 (35,33) (30,67) (26,67)	20 (24,67) (29,33) (33,33)		

() frequências esperadas na hipótese de nulidade respectivas para os tratamentos.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de χ^2 , ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de χ^2 .

Quadro 4.3.1.3 Resumo das tabelas de contingência para as substâncias isoladas de *L. hatschbachii* (Continuação).

	Larvas vivas	Larvas mortas	larvas vivas/ larvas no teste	χ^2 calculado
Cumestano III 1,0 mg/dm ³	18 (19,33)	12 (10,67)	0,644	0,39
Cumestano III 10,0 mg/dm ³	15 (18,33)	15 (11,67)	0,611	2,34
Cumestano III 100,0 mg/dm ³	12 (17,33)	18 (12,67)	0,578	5,83 *
Testemunha	40 (38,67) (36,67) (34,67)	20 (21,33) (23,33) (25,33)		

	Larvas vivas	Larvas mortas	larvas vivas/ larvas no teste	χ^2 calculado
Medicarpina 1,0 mg/dm ³	09 (16,33)	21 (13,67)	0,544	10,84 **
Medicarpina 10,0 mg/dm ³	03 (14,33)	27 (15,67)	0,478	25,74 **
Medicarpina 100,0 mg/dm ³	00 (13,33)	30 (16,67)	0,444	36,00 **
Testemunha	40 (32,67) (28,67) (26,67)	20 (27,33) (31,33) (33,33)		

() freqüências esperadas na hipótese de nulidade respectivas para os tratamentos.
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de χ^2 , ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de χ^2 .

Tabela 4.3.1.1 Estimativa da CL₅₀ e intervalo de confiança pelo método de Probit

Extratos e compostos avaliados	Intervalo de confiança da CL ₅₀ a 5% de Probabilidade	Estimativa da CL ₅₀
E. Hexânico	15,7 mgdm ⁻³ // 343 mgdm ⁻³	73 mgdm ⁻³ *
E. Clorofórmico	0,01 mgdm ⁻³ // -	109 mgdm ⁻³
E. Metanólico	0,01 mgdm ⁻³ // -	170 mgdm ⁻³
Isoflavona I	0,68 mgdm ⁻³ // 2810 mgdm ⁻³	44 mgdm ⁻³
Cumestano I	0,35 mgdm ⁻³ // 10 mgdm ⁻³	2 mgdm ⁻³ *
Cumestano II	0,01 mgdm ⁻³ // 650 mgdm ⁻³	3 mgdm ⁻³ *
Cumestano III	2,61 mgdm ⁻³ // 30000 mgdm ⁻³	280 mgdm ⁻³
Medicarpina	0,01 mgdm ⁻³ // 133 mgdm ⁻³	1 mgdm ⁻³ *

Destas substâncias podemos afirmar estatisticamente pelo método de probit que apenas a medicarpina, cumestano I e cumestano II apresentam CL_{50} inferior a $1000 \mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$ a 2,5% de probabilidade e portanto relevantes à aplicação de experimentos mais elaborados.

A atividade diferenciada do extrato hexânico não está relacionada a presença das substâncias testadas acima, visto que estas estão presentes em quantidades apreciáveis apenas no extrato clorofórmico, que por sinal apresentou menor atividade que o extrato hexânico.

A pequena atividade do extrato clorofórmico frente às substâncias isoladas certamente é uma conseqüência das baixas concentrações das mesmas neste extrato.

4.3.2 BIOAUTOGRAFIA

Os extratos Hexânico, Clorofórmico II e Metanólico não apresentaram nenhuma atividade bactericida ou fungicida contra os microorganismos empregados.

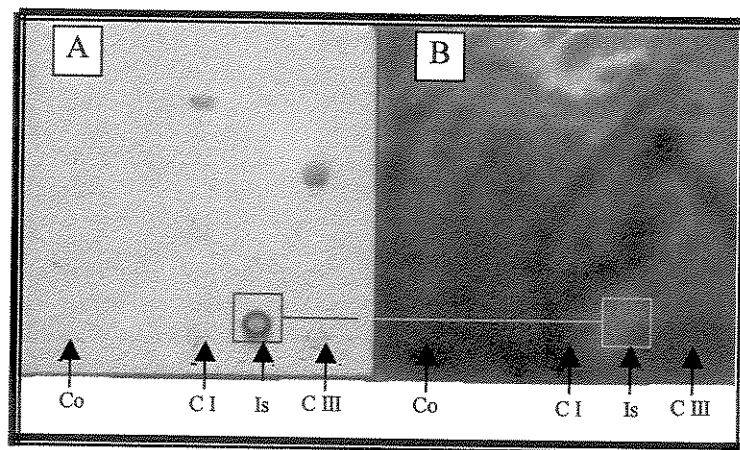
Entre as substâncias testadas, a isoflavona I e o pterocarpano medicarpina apresentaram atividade fungicida respectivamente contra *Penicillium funiculosum* (CCT 0490) e *Aspergillus niger* (CCT 1435). O cumestano II apresentou atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* e fungicida a *Alternaria alternata*.

A falta de atividade do extrato clorofórmico, do qual foram isoladas as substâncias testadas, assim como no teste de letalidade à *Artemia salina* demonstra o grau de diluição destas substâncias no extrato a concentrações abaixo do patamar de detecção destas atividades.

Tabela 4.3.2.1. Resultados obtidos nos testes de bioautografia para os extratos e substâncias isoladas de *Lecointea hatschbachii*.

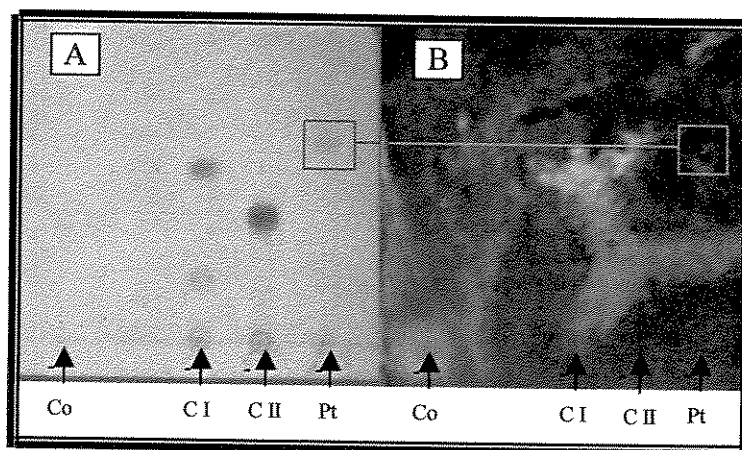
	EH	EC	EM	IS	C1	C2	C3	PT
<i>Sa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Sm</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ec</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bs</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ml</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>St</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cc</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>An</i>	-	-	-	-	NC	NC	-	+
<i>Pf</i>	-	-	-	+	NC	NC	-	-
<i>Fo</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ro</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Af</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Sa – *Staphylococcus aureus* (CCT 4295); *Sm* – *Streptococcus mutans* (CCT 3440); *Ec* – *Escherichia coli* (CCT 5050); *Bs* – *Bacillus subtilis* (CCT 0089); *Ml* – *Micrococcus luteus* (CCT 2720); *St* – *Salmonella typhimurium* (CCT 0528); *Ca* – *Candida albicans* (CCT 0776); *Cc* – *Cladosporium cladosporioides* (CCT 5039); *An* – *Aspergillus niger* (CCT 1435); *Pf* – *Penicillium funiculosum* (CCT 0490); *Fo* – *Fusarium oxysporium* (CCT 3244); *Ro* – *Rhizopus orizae* (CCT 4964); *Aa* – *Alternaria alternata* (CCT 1250); *Af* – *Aspergillus fumigatus* (CCT 01277). EH – Extrato Hexânico; EC – Extrato Clorofórmico; EM – Extrato Metanólico; IS – Isoflavona I; C1 – Cumestano I; C2 – Cumestano II; C3 – Cumestano III; PT – Medicarpina. NC – Não conclusivo; (+) – atividade verificada; (-) – inativo.



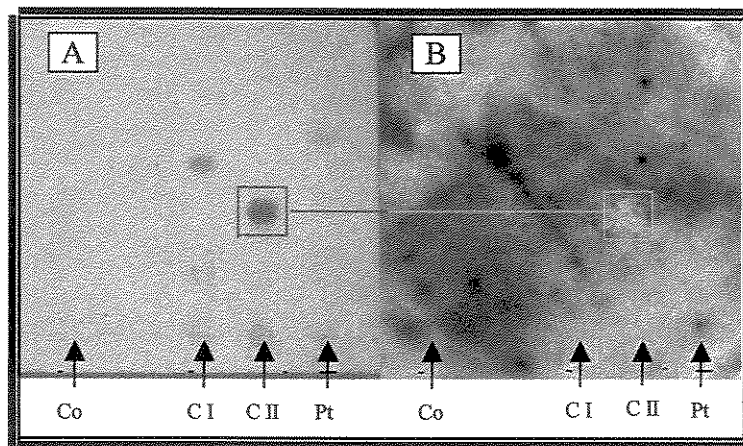
Co – Ciclopirox olamina (controle); C I – Cumestano I; Is – Isoflavona I;
C III – Cumestano III

Figura 4.3.2.1. Localização da Isoflavona I, por revelação em UV 254 nm (A), e sua atividade fungicida à *Penicillium funiculosum* no ensaio de bioautografia (B).



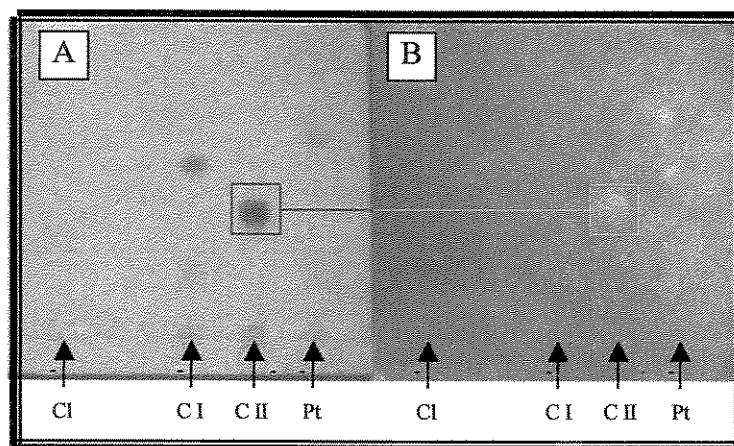
Co – Ciclopirox olamina (controle); C I – Cumestano I; C II – Cumestano II
Pt – Pterocarpano I

Figura 4.3.2.2. Localização do Pterocarpano I (medicarpina), por revelação em UV 254 nm (A), e sua atividade fungicida à *Aspergillus niger* no ensaio de bioautografia (B).



Co – Ciclopirox olamina (controle); C I – Cumestano I; C II – Cumestano II
Pt – Pterocarpano I

Figura 4.3.2.3. Localização do Cumestano II, por revelação em UV 254 nm (A), e sua atividade fungicida à *Alternaria alternata* no ensaio de bioautografia (B).



Cl – Cloranfenicol (controle); C I – Cumestano I; C II – Cumestano II
Pt – Pterocarpano I

Figura 4.3.2.4. Localização do Cumestano II, por revelação em UV 254 nm (A), e sua atividade bactericida à *Staphylococcus aureus* no ensaio de bioautografia (B).

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato clorofórmico das raízes de *Lecointea hatschbachii* Barneby resultou no isolamento e determinação de uma isoflavona, três cumestanos e um pterocarpano, dos quais a isoflavona e dois cumestanos são inéditos e informações fitoquímicas sobre uma espécie do gênero *Lecointea* estão sendo divulgadas pela primeira vez.

Dos extratos obtidos e das substâncias isoladas do extrato clorofórmico mostraram-se significativamente ativas no teste de letalidade à *Artemia salina* o extrato hexânico, o cumestano I, o cumestano II e a medicarpina, justificando a possibilidade de futuros testes de citotoxicidade a células tumorais. A maior atividade do extrato hexânico, com relação aos outros extratos, não está relacionado à presença de nenhuma das substâncias testadas acima, visto que elas estão ausentes do mesmo.

Das substâncias isoladas do extrato clorofórmico, submetidas ao teste de bioautografia, a isoflavona mostrou atividade antifúngica a *Penicillium funiculosum*, a medicarpina a *Aspergillus niger* e o cumestano II a *Alternaria alternata* e bactericida a *Staphylococcus aureus*.

O perfil fitoquímico de *L. hatschbachii* é semelhante à maioria dos espécimens estudados da tribo Swartzia, demonstrando que esta espécie está alocada adequadamente dentro da tribo Swartzia, embora uma melhor avaliação quimiosistemática do gênero *Lecointea* e também do grupo *Lecointea* só será possível com a inclusão do estudo fitoquímico de novos espécimens relacionados.

6. BIBLIOGRAFIA

- ¹POLHILL, R. M.. Complete Synopsis of Legume Genera. In BISBY, F. A.; BUCKINGHAM, J., HARBORNE, J. B. (eds.). **Phytochemical Dictionary of the Leguminosae I**. London, Chapman & Hall, 1994, xxxv-lvii,.
- ²RAVEN, P. H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E.. Diversidade. In: **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. p 157-407.
- ³LORENZI, H.. **Árvores Brasileiras** - vol 01. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 1992.
- ⁴LORENZI, H.. **Árvores Brasileiras** - vol 02. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 1999.
- ⁵TAMBE, I.; TSUJIUCHI, H.; HONDA G.. **Gastric Cytoprotection of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Sesquiterpene, β -Caryophyllene**. *Planta Medica* 62,(5) 469-470, 1996.
- ⁶FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.(organizadores). **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/UFSC, 1999. p 545-570
- ⁷MATOS, F. J. A.. **Farmácias Vivas – Sistemas de Utilização de Plantas Medicinais Projetado para Pequenas Comunidades**. Fortaleza, Ed. U.F.C., 2002.
- ⁸POLHILL, R. M. . Papilionoideae. In POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. (eds.). **Advances in Legume Systematic** - vol I. Kew, Royal Botanic Garden, 1981. p 1-12
- ⁹DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo, Ed. UNESP, 2002.
- ¹⁰LORENZI, H. & MATOS, F. J. A.. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002.

- ¹¹HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. A., **Advances in Flavonoids Research Since 1992.** *Phytochemistry*, **55**, 481- 504, 2000.
- ¹²GOTTLIEB, O.R.. **Micromolecular Evolution Systematic an Ecology.** N.Y., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1982.
- ¹³HARBORNE, J.B.. **Arsenal for Survival: Secondary Plant Products.** *Taxon* **49**, 435-449, 2000.
- ¹⁴FUTUYMA, D.J.. **Determinando a História da Evolução.** In: **Biologia Evolutiva.** Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1992. p 301-334.
- ¹⁵HARBORNE, J.B. & MABRY, T. J.. **The Flavonoids Advances in Research.** London, Chapman and Hall, 1982.
- ¹⁶HEGNAUER, R. & BARKMEIJER, R. J.G.. **Relevance of Seed Polysaccharides an Flavonoids for the Classification of the Leguminosae: A Chemotaxonomic Approach.** *Phytochemistry*, **34**, (1) 3-16, 1993.
- ¹⁷GRAYEY, R. J. & KOKUBUM, T. **Plant Fungal Interations: The Search for Phytoalexins and other Antifungal Compounds from Higher Plants.** *Phytochemistry*, **56**, (3) 253-263, 2001.
- ¹⁸CHANSAKAOW, S.; ISHIKAWA, T.; SEKINE, K.; OKADA, M.; HIGUCHI, Y.; KUDO, M.; CHAICHANTIPYUTH, C.. **Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their Estrogenic Activity.** *Planta Medica* **66**, 572-575, 2000.
- ¹⁹BARREIRO, E. J.. **Desenho de Fármacos a Partir de Produtos Naturais** In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (orgs). **Plantas Medicinais sob a Ótica da Moderna Química Medicinal.** Chapecó, Ed. Argos, 2001.
- ²⁰BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M.. **Planejamento Racional Baseado no Mecanismo de Ação: Fármacos Inteligentes** In: **Química Medicinal, as Bases Moleculares da Ação dos Fármacos.** Porto Alegre, Ed. Artimed, 2001.

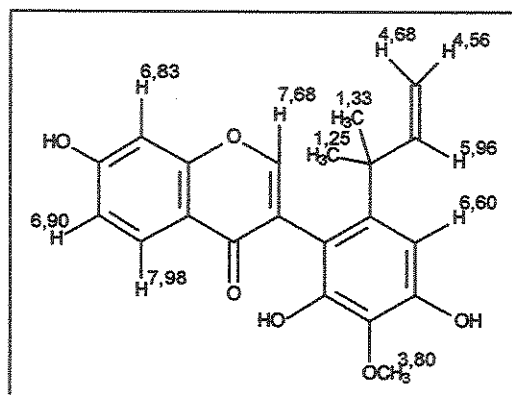
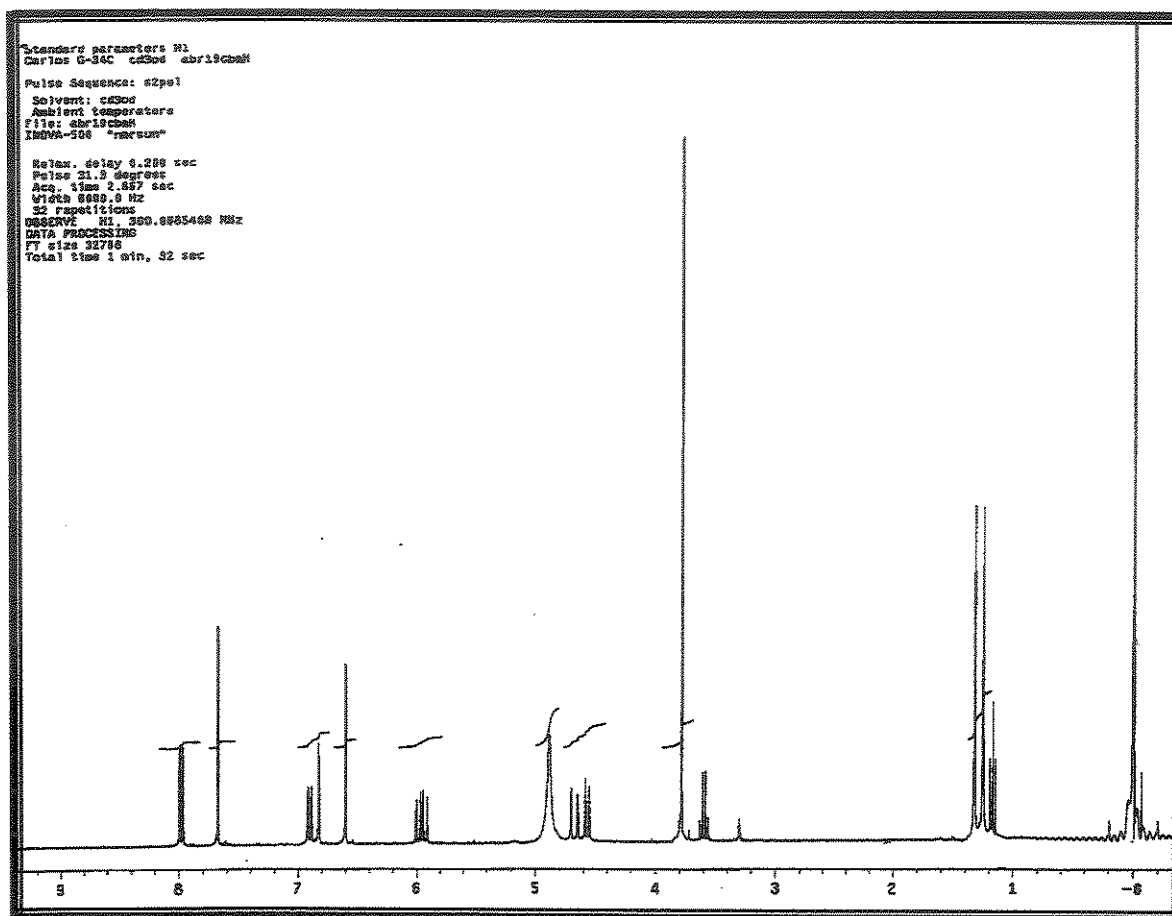
- ²¹KNAGGS, A.R.. **The Biosynthesis of Shikimate Metabolites.** *Nat. Prod. Rep.* **17**, 269-292, 2000.
- ²²DEWICK, P.M.. **The Shikimate Pathway: Aromatic, Amino Acids and Phenylpropanoids.** In **Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach.** N.Y., John Wiley & Sons, 1997. p 109-151.
- ²³CROMBIE, L. & WHITING, D. A.. **Biosynthesis in the Rotenoid Group of Natural Products: Applications of Isotope Methodology.** *Phytochemistry* **49** (6) 1479-1507, 1998.
- ²⁴TAHARA, S. & IBRAHIM, R.K.. **Prenylated Isoflavonoids – an Update.** *Phytochemistry*, **38**, (5) 1073-1094, 1995.
- ²⁵RAMOS-VALDIVIA, A. C., van der HEIJDEN, R., VERPOORTE, R.. **Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function.** *Nat. Prod. Rep.* **14**, 591-603, 1997.
- ²⁶KUSUYAMA, T. & SETO, H.. **Diversity of the biosynthesis of the isoprene units.** *Nat. Prod. Rep.* **20**, 171-183, 2003.
- ²⁷EISENREICH, W., BACHER, A., ARIGONI, D., ROHDICH, F.. **Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway.** *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1401-1426, 2004.
- ²⁸CAGNIN, M. A. H. & GOTTLIEB, O. R.. **Isoflavonoids as Systematic Markers.** *Biochem. System. Ecol.*, **6**, 225-238, 1978.
- ²⁹CRECZYNSKI-PASA, T. B. & PEDROSA, R. C.. **Alvos Moleculares na Pesquisa de Fitofármacos e Fitoterápicos** In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (orgs). **Plantas Medicinais sob a Ótica da Moderna Química Medicinal.** Chapecó, Ed. Argos, 2001.(citações).
- ³⁰SILVA, A. J. M., MELO, P. A., SILVA, N. M. V., BRITO, F. V., BUARQUE, C. D., SOUZA, D. V., RODRIGUES, V. P., POÇAS, E. S. C., NOËL, F., ALBUQUERQUE, E. X. & COSTA, P. R. R.. **Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of Coumestans with Different Patterns of Oxygenation.** *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, **11**, 283-286 , 2001.

- ³¹PACHLER, K. G. R. & UNDERWOOD, W. G. E.. A Proton Magnetic Resonance Study of some Pterocarpan Derivatives (The Conformation of the 6a,11a-Dihidro-6H-Benzofuro[3,2-c][1]-Benzopyran Ring System). *Tetrahedron*, 23, 1817- 1820, 1967.
- ³²INGHAM, J. L.. Systematic Aspects of Phytoalexin Formation within Tribe Phaseoleae of the Leguminosae (Subfamily Papilionoideae). *Biochem. System. Ecol.*, 18, 329-343, 1990.
- ³³BARNEBY, R. C.. A Review of *Lecointea* (Fabaceae: Swartzieae) in South America. *Brittonia*, 41, (4) 351-355, 1989.
- ³⁴BARNEBY, R. C.. Centenial Beans: a Miscellany of American Fabales. *Brittonia*, 44,(2) 224-239, 1992.
- ³⁵KIRKBRIDE, J. H. JR. & WIERSEMA, J. H.. *Bobgunnia*, a New African Genus of the Tribe Swartzieae (Fabaceae, Faboideae). *Brittonia*, 49, 1-23, 1997.
- ³⁶SANTOS, C. C.. Estudo Fitoquímico das Raízes e dos Frutos de *Swartzia Langsdorffii*. Determinação Estrutural de Metabólitos e Aplicações. Detecção de Alcalóides Poliidroxilados nas raízes de *Lonchocarpus* spp por CG/MS. Tese de Doutorado, Instituto de Química – Unicamp - Campinas, 2002.
- ³⁷FERGUSON, I.K. & SCHRIRE B.D.. A cladistic analysis of the pollen morphology of the tribe Swartzieae (Leguminosae). *Acta Botanica Gallica*, 141, (2) 207-215, 1994.
- ³⁸PENNINGTON, R. T.; LAVIN, M.; IRELAND, H.; KLITGAARD, B.; PRESTON, J.; HU, J.. Phylogenetic Relationships of the Basal Papilionoid Legumes Based Upon Sequences of Chloroplast trnI intron. *Systematic Botany* 26, 537-556, 2001
- ³⁹MANSANO, V. F.. Revisão Taxonômica do Gênero *Zollernia* (Leguminosae, Papilionoideae, Swartzieae) e estudos de ontogenia floral e Filogenia do ramo *Lecointea*. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas, 2002.

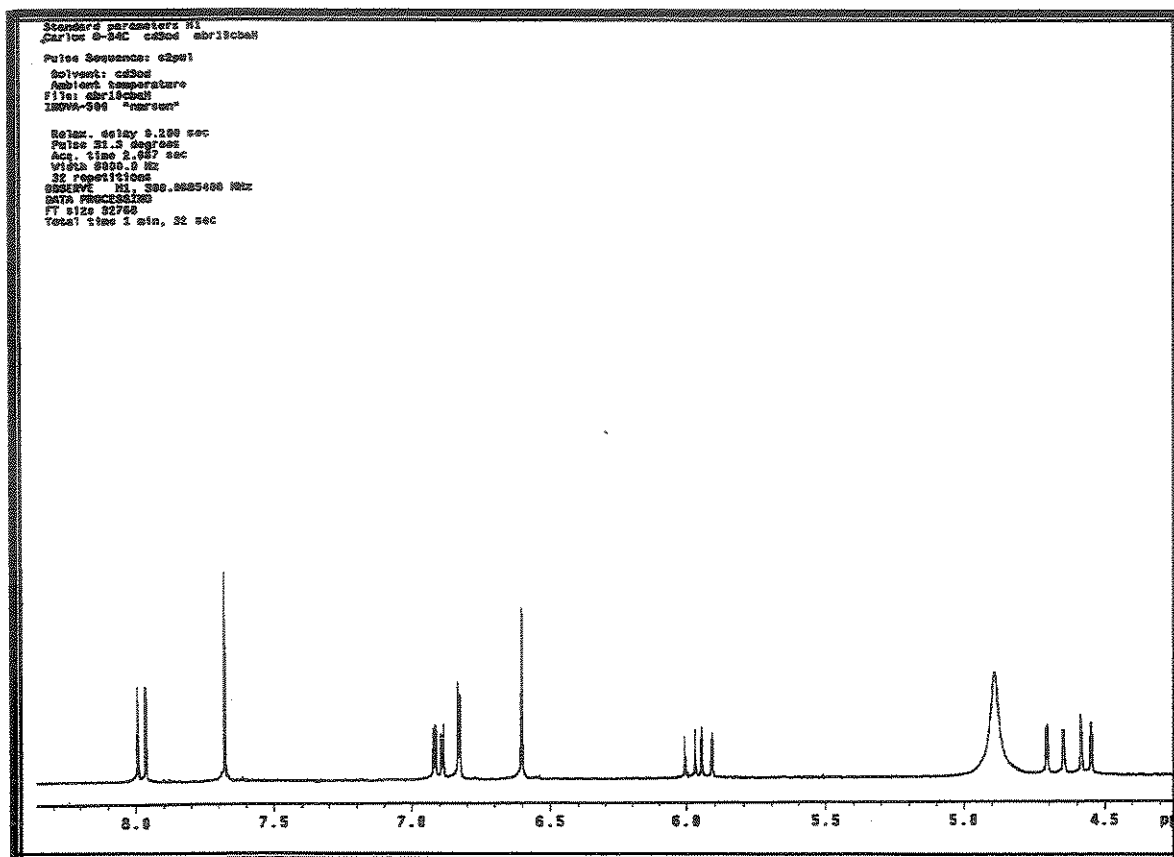
- ⁴⁰BARNEBY, C. B.. A Review of *Lecointea* (Fabaceae: Swartzieae) in South America. *Brittonia*, **41**, (4) 351-355, 1989.
- ⁴¹BARNEBY, C. B.. Centennial Beans: a Miscellany of American Fabales. *Brittonia*, **44**, (2) 224-236, 1992.
- ⁴²STILL, C.W., KAHN, M. & MITRA, A.. Chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, **43**, (14) 2923-2925, 1978.
- ⁴³O'NEILL, M. J., ADESANYA, S. A. & ROBERTS, M. F.. Isosojagol, a coumestan from *Phaseolus coccineus*. *Phytochemistry*, **23**, (11) 2704-2705, 1984.
- ⁴⁴HERATH, H. M. T. B., DASSANAYAKE, R. S., PRIYADARSHANI, A. M. A., SUSILA, S., WANNIGAMA, G. P. & JOANNE, J.. Isoflavonoids and a pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*, **47**, 117-117, 1998.
- ⁴⁵AGRAWAL, P.K.. Carbon-13 NMR of flavonoids. N.Y., Elsevier Science Pub. Comp., 1989.
- ⁴⁶HELLER, W. & FORKMANN, G.. Biosynthesis In: HARBORNE, J. B.. **The Flavonoids: Advances in research since 1980**. London, Chapman and Hall, 1988.
- ⁴⁷GOTTLIEB, O. R. ; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B.. **Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico**. Rio de Janeiro, Ed. UFRJ, 1996.
- ⁴⁸HEDIN, P. A. & PHILLIPS, V. A.. Electron impact mass spectral analysis of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 607-611, 1992.
- ⁴⁹ASSADA, Y.; LI, W.; YOSHIKAWA, T.. The First Prenylated Biaurone, Licoagrone from Hairy Root Cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry*, **50**, 1015-1019, 1999.
- ⁵⁰FIRMINO, C. A.. **Estudo Fitoquímico das Raízes de *Lonchocarpus campestris* Tozzi**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química – Unicamp -Campinas, 1998.

- ⁵¹MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; QUEIROZ, S. C. N.; NOGUEIRA, M. A.; MAGALHÃES, E. G.. **Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots.** *Phytochemistry*, **55**, 7, 787-792, 2000.
- ⁵²MACHADO, L. M. V.. **Estudo Fitoquímico de *Platycyamus regnellii*.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Química – Unicamp -Campinas, 2000.
- ⁵³SANNOMIYA, M.. **Análise Fitoquímica de *Platymiscium floribundum* var. *Latifolium* e *Lonchocarpus montanus*. Isolamento, Determinação estrutural e Atividade Biológica.** Tese de Doutorado, Instituto de Química – Unicamp – Campinas, 2001.
- ⁵⁴MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; Putnam J. E., JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L.. **Brine shrimp: A Convenient General Bioassay For Active Plant Constituents.** *Planta Medica*. **45**, 31-34, 1982.
- ⁵⁵MCLAUGHLIN, J. L.. **Tres Bioensayos simples para Químicos de Productos Naturales.** *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, **18**, 13-18, 1995.
- ⁵⁶MCLAUGHLIN, J. L. & ROGERS, L.L.. **The use of biological assays to evaluate botanicals.** *Drug Information Journal*, **32**, 513-524, 1998.
- ⁵⁷SAXENA, G., FARNER, S., TOWERS, G. H. N., HANCOCK, R. E. W.. **Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts a thin layer chromatography agar overlay technique.** *Phytochemical Analysis*, **6**, (3) 125-129, 1995.
- ⁵⁸MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M.A.; TOZZI, A. M. G. A.; RONCANCIO, V. J. F.. **Ensayos Biológicos con Extractos Obtenidos de Raíces de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) D.C.Y de Un Nuevo Dibenzoilmetano Aislado.** *Ceres* **45**,(260) 351-358, 1998.

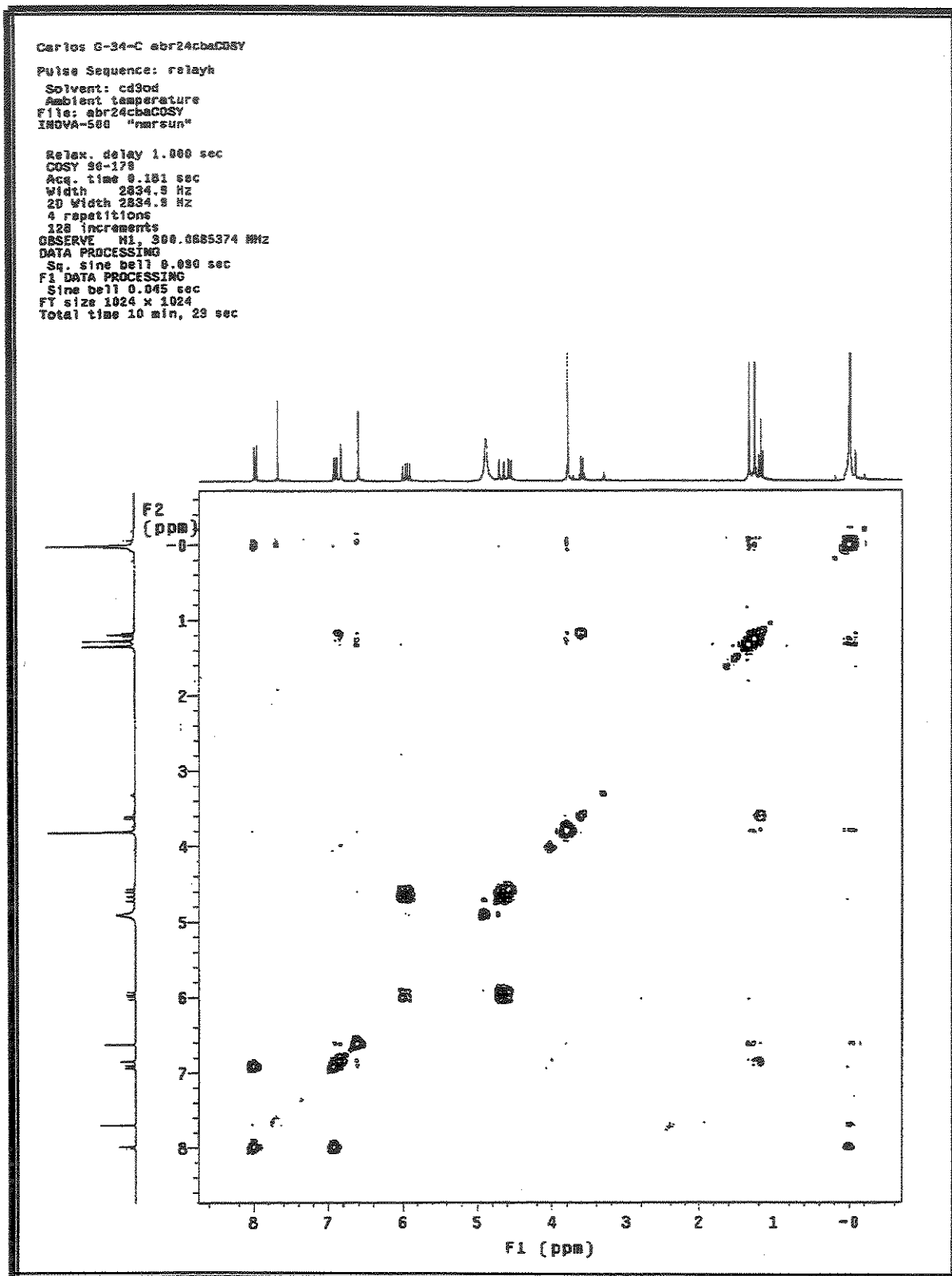
E.1.1.1 Espectro de RMN de ^1H da Isoflavona I em CD_3OD 11,0 Tesla.



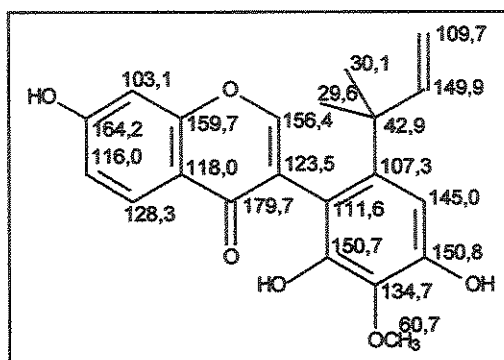
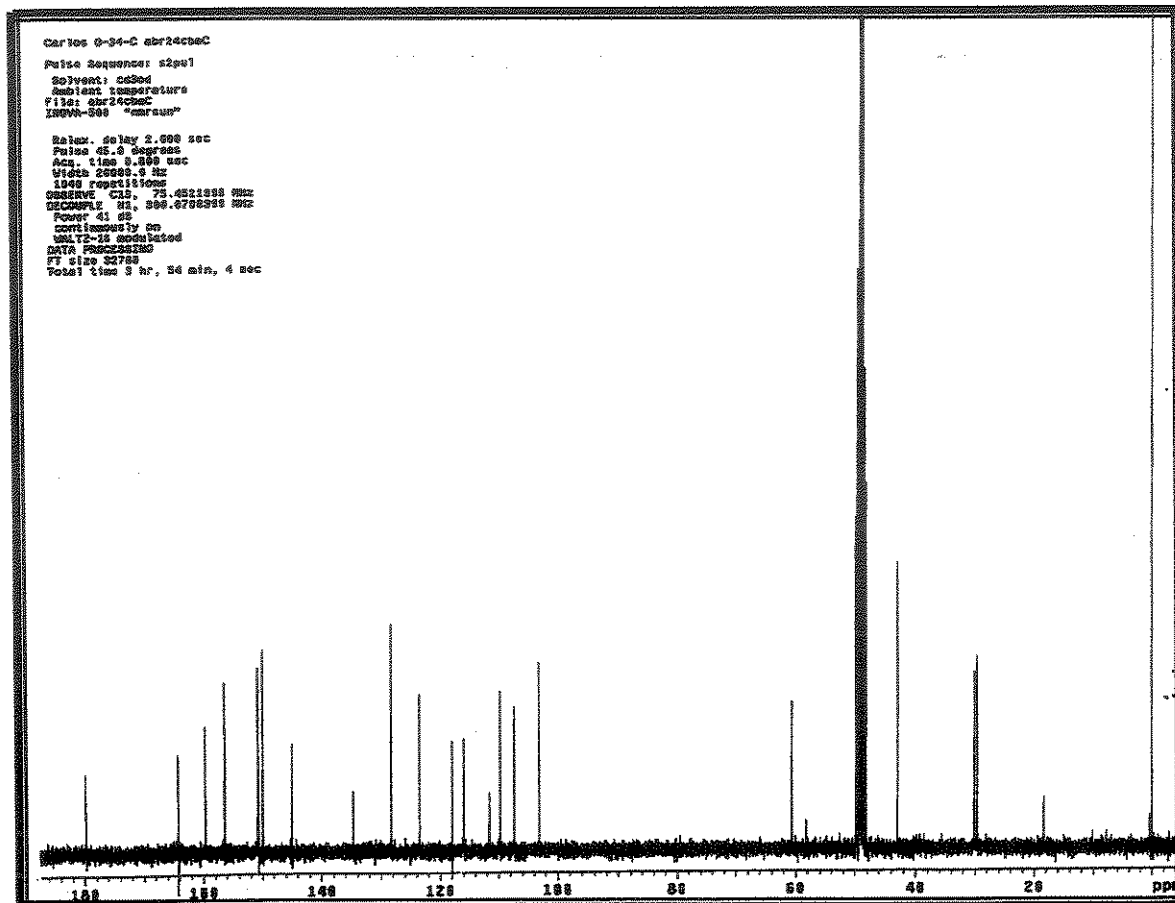
E.1.1.2. Expansão do espectro de RMN de ^1H da Isoflavona I em CD_3OD 11,0 Tesla.



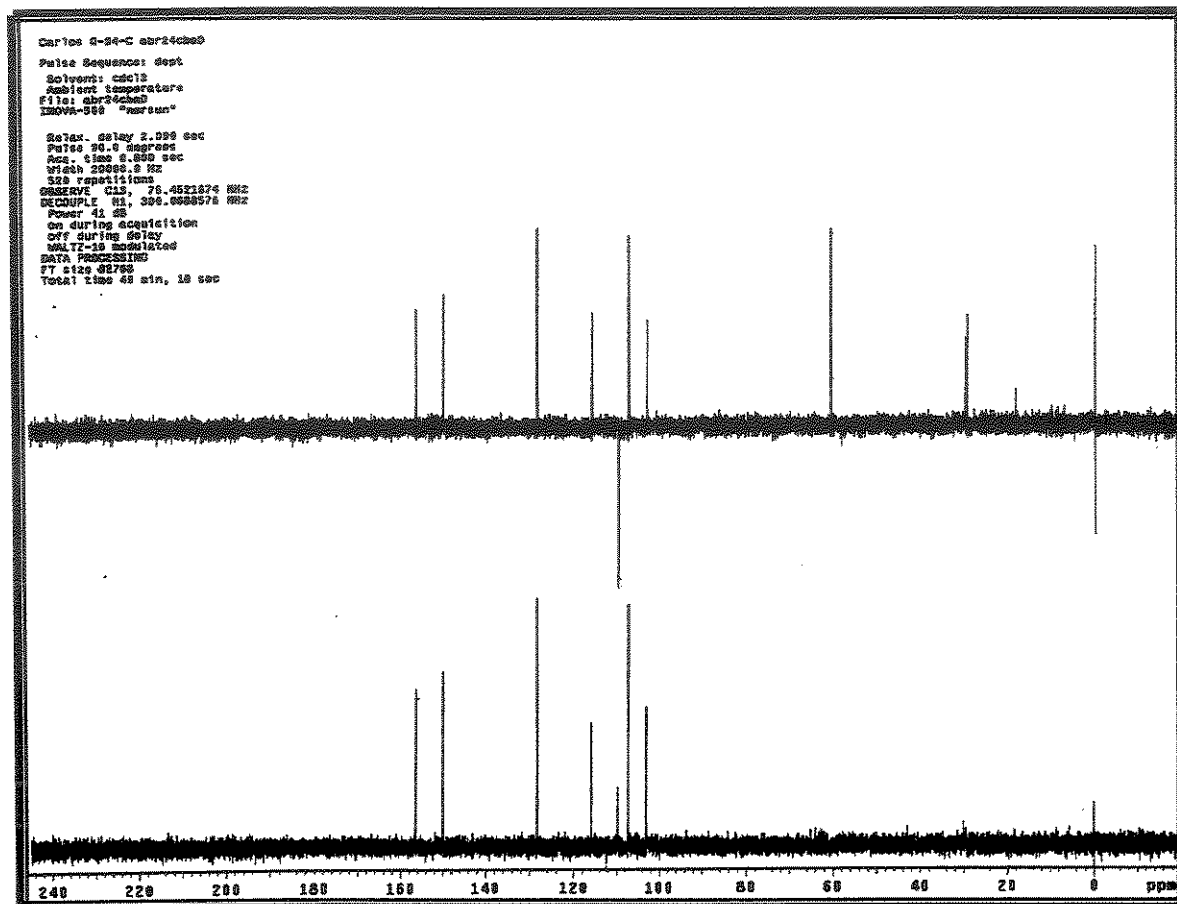
E.1.2. Espectro de RMN COSY de ^1H da Isoflavona I em CD_3OD 7,0 Tesla.



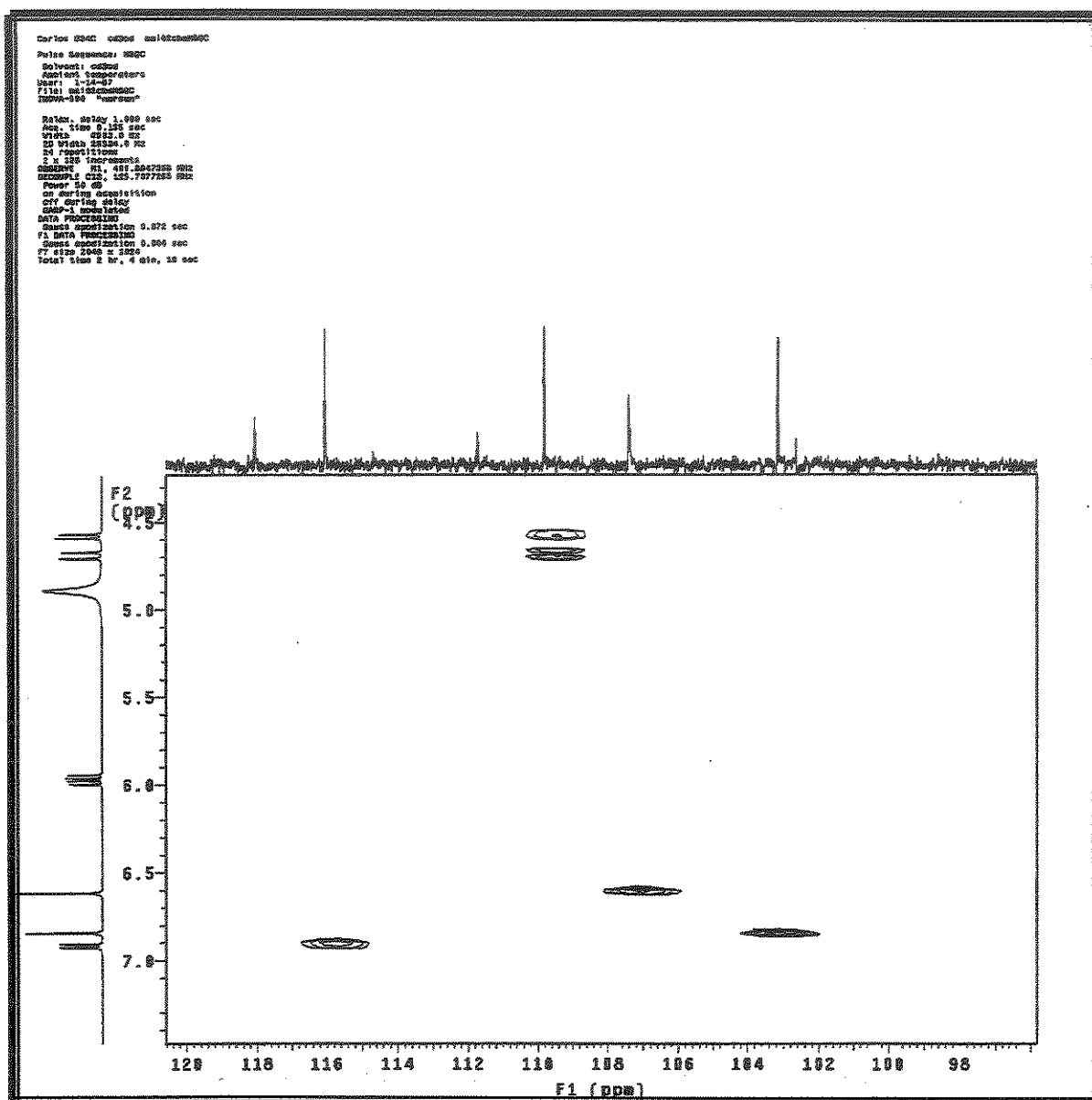
E.1.3. Espectro de RMN de ^{13}C da Isoflavona I em CD_3OD 7,0 Tesla.



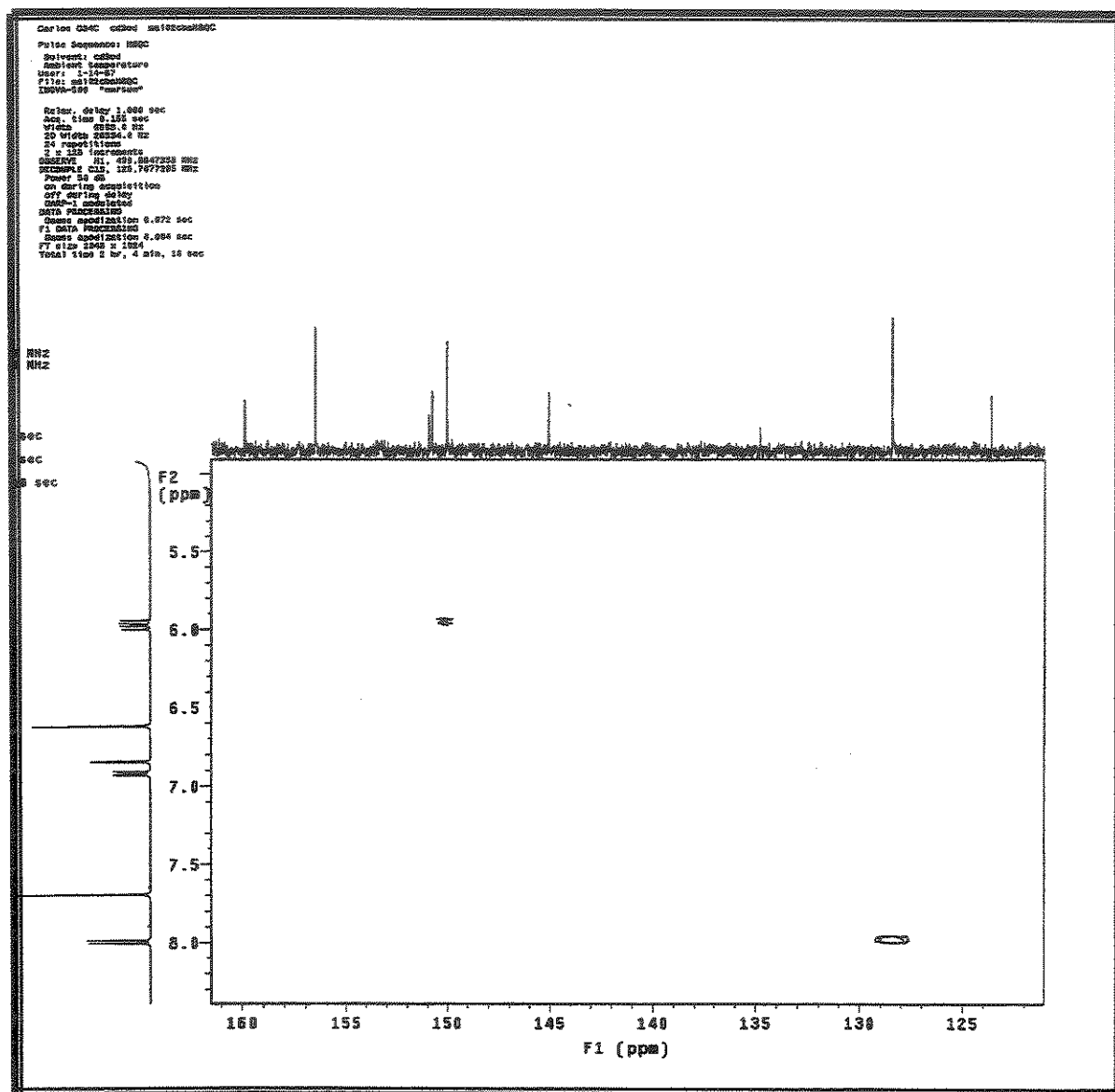
E.1.4. Espectro DEPT (90° e 135°) da Isoflavona I em CD₃OD 7,0 Tesla.



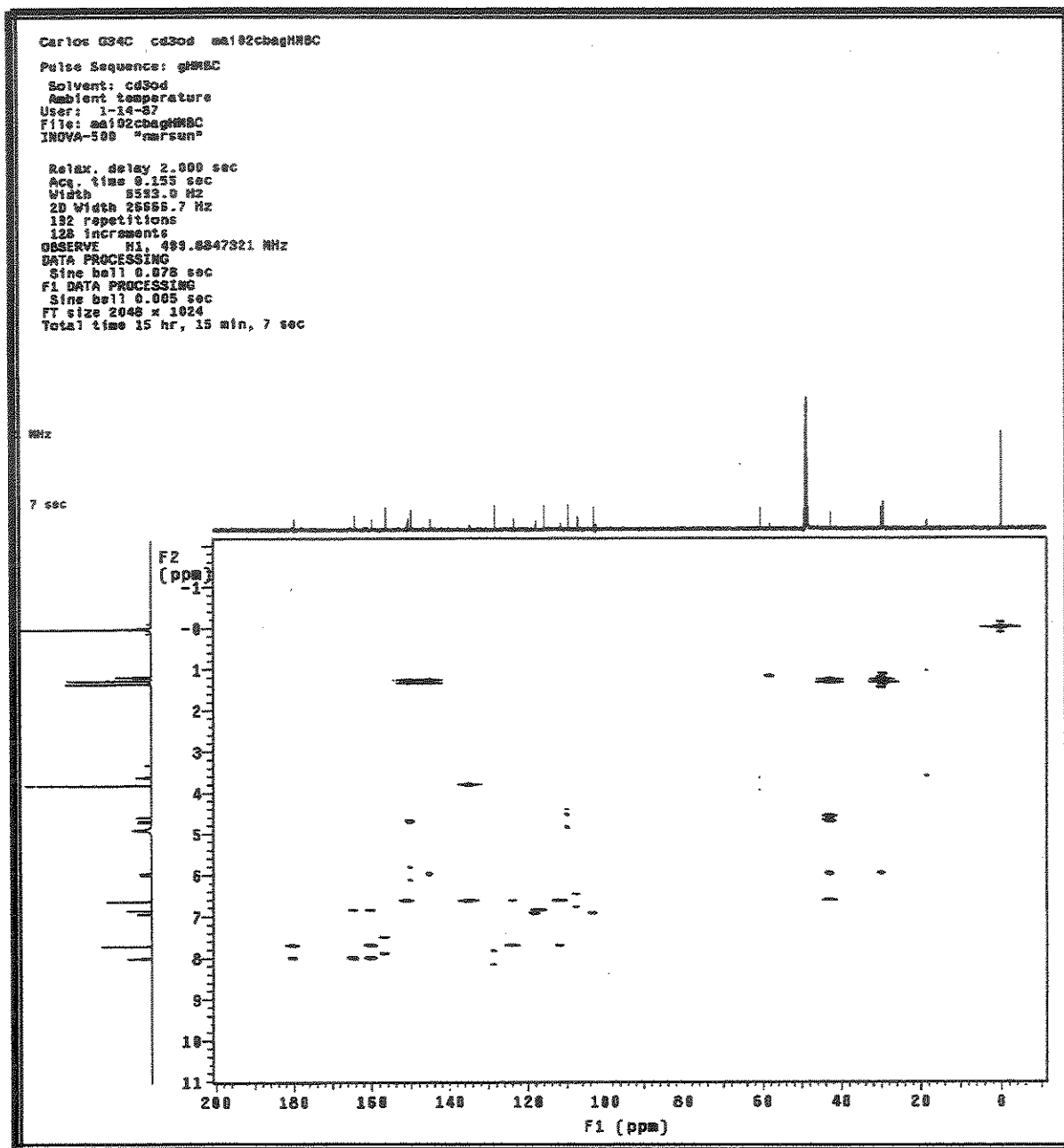
E.1.5.1 Expansão I do espectro de RMN em HSQC da Isoflavona I em CD₃OD 11,0 Tesla.



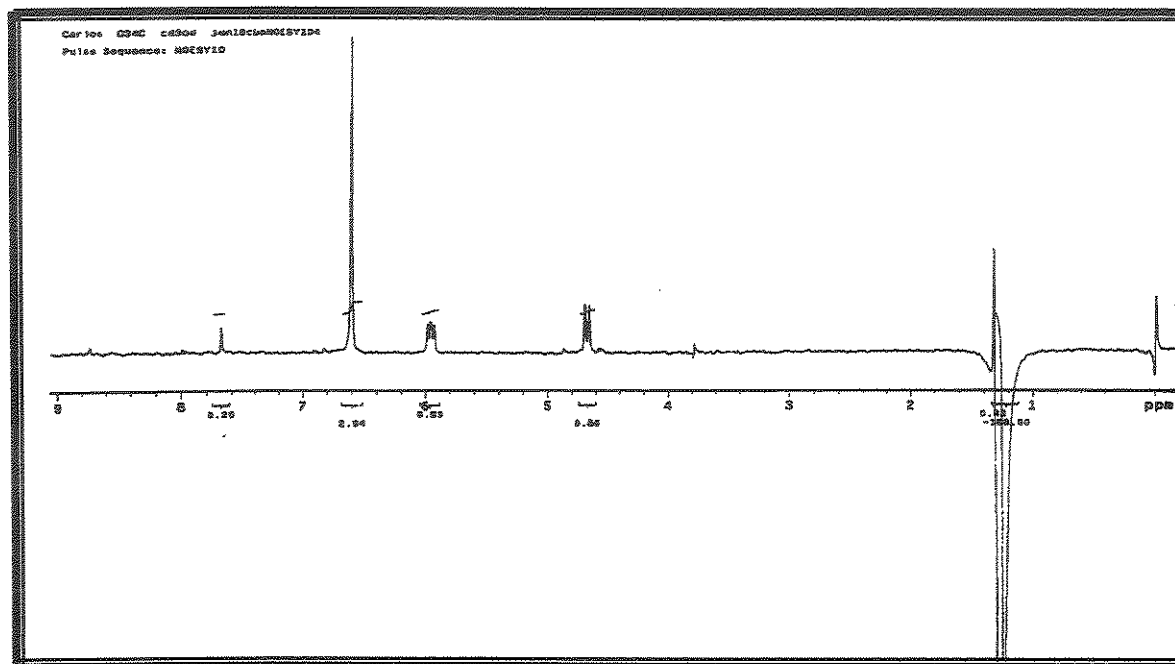
E.1.5.2 Expansão II do espectro de RMN em HSQC da Isoflavona I em CD₃OD 11,0 Tesla.



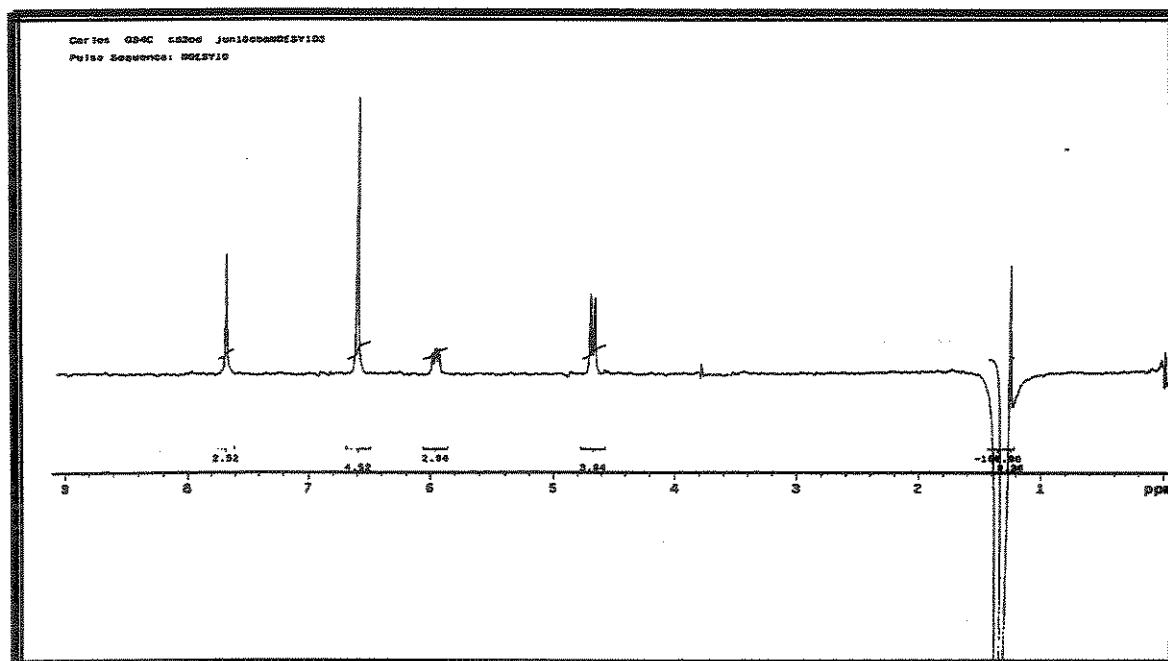
E.1.6. Espectro de RMN em HMBC da Isoflavona I em CD₃OD 11,0 Tesla.



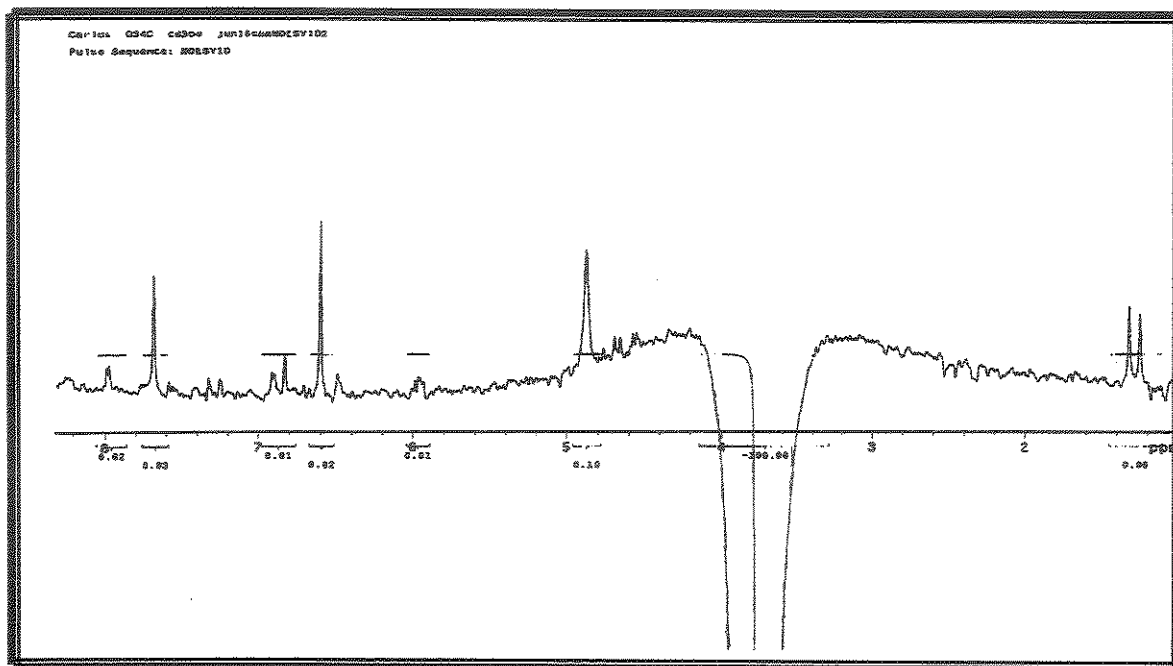
E.1.7.1. Espectro NOESY1D da Isoflavona I em CD₃OD 11,0 Tesla (irradiando H δ 1,2).



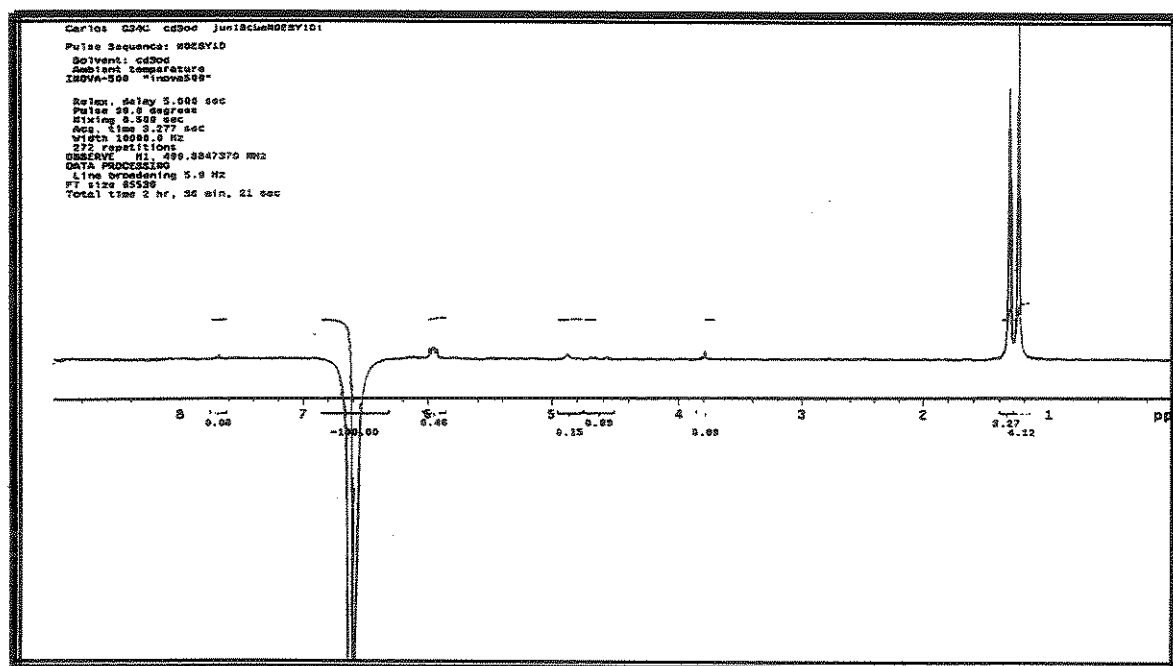
E.1.7.2. Espectro NOESY1D da Isoflavona I em CD₃OD 11,0 Tesla (irradiando H δ 1,3).



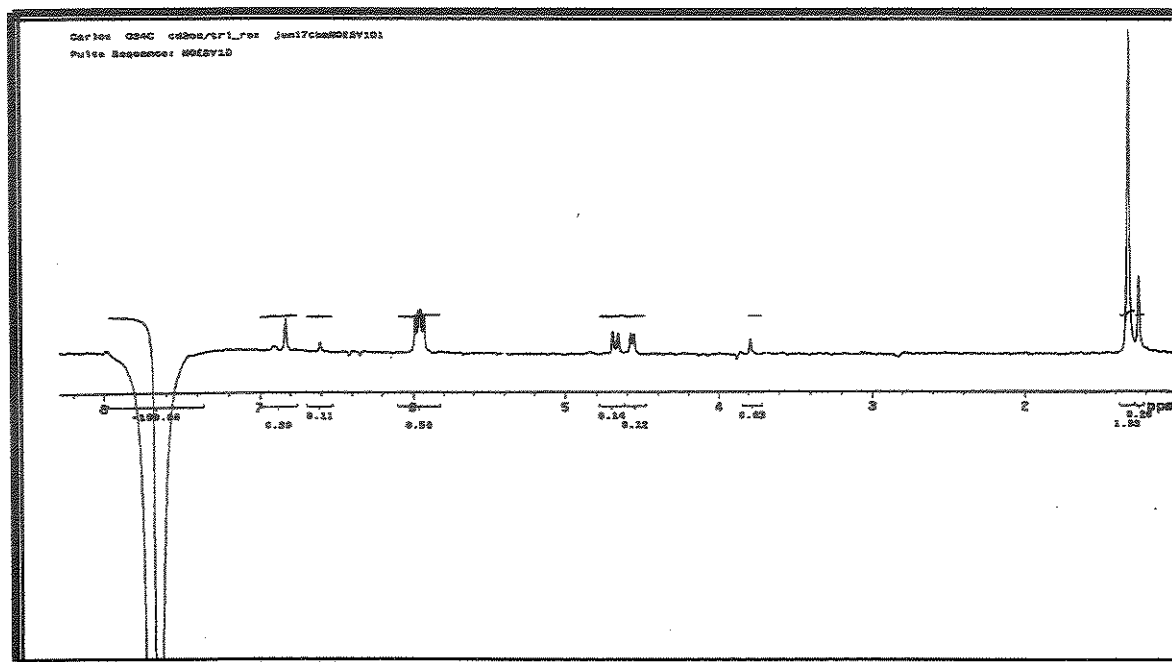
E.1.7.3. Espectro NOESY1D da Isoflavona I em CD₃OD 11,0 Tesla (irradiando H δ 3,7).



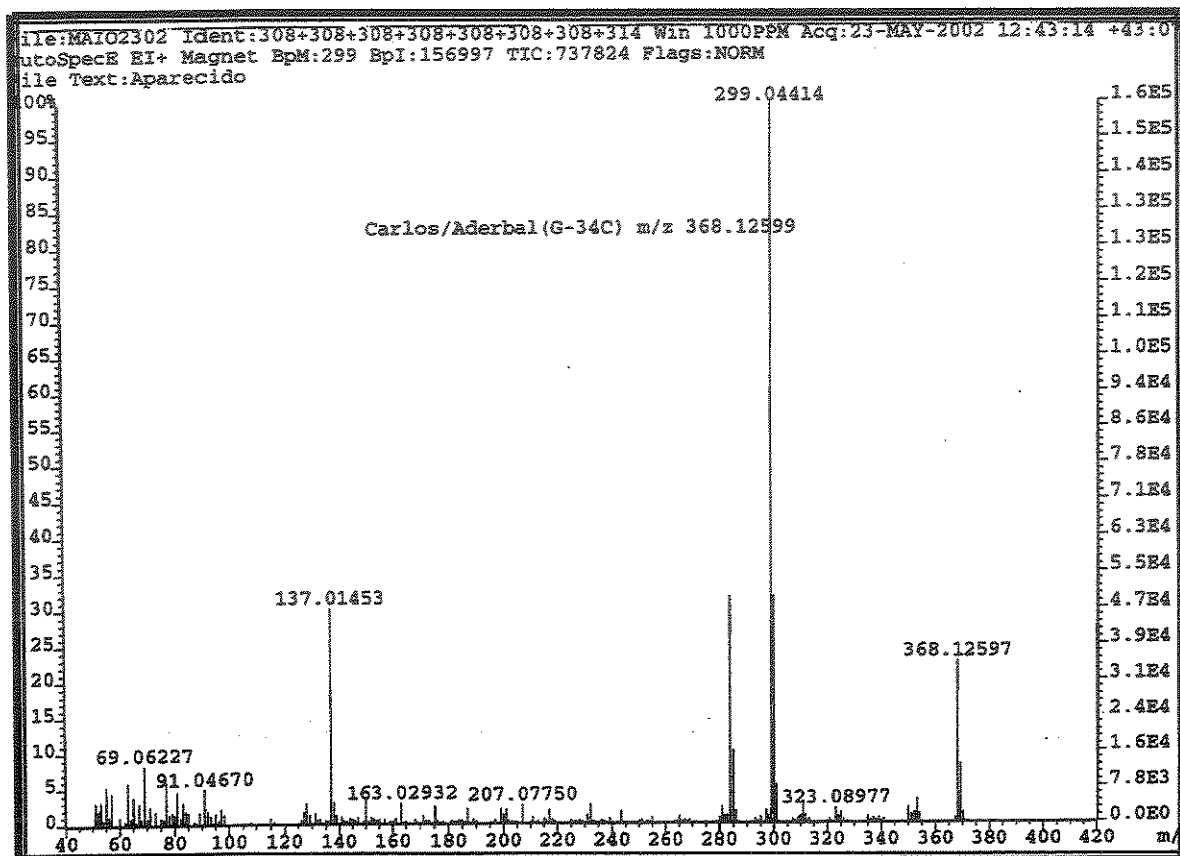
E.1.7.4. Espectro NOESY1D da Isoflavona I em CD₃OD 11,0 Tesla (irradiando H δ 6,8).



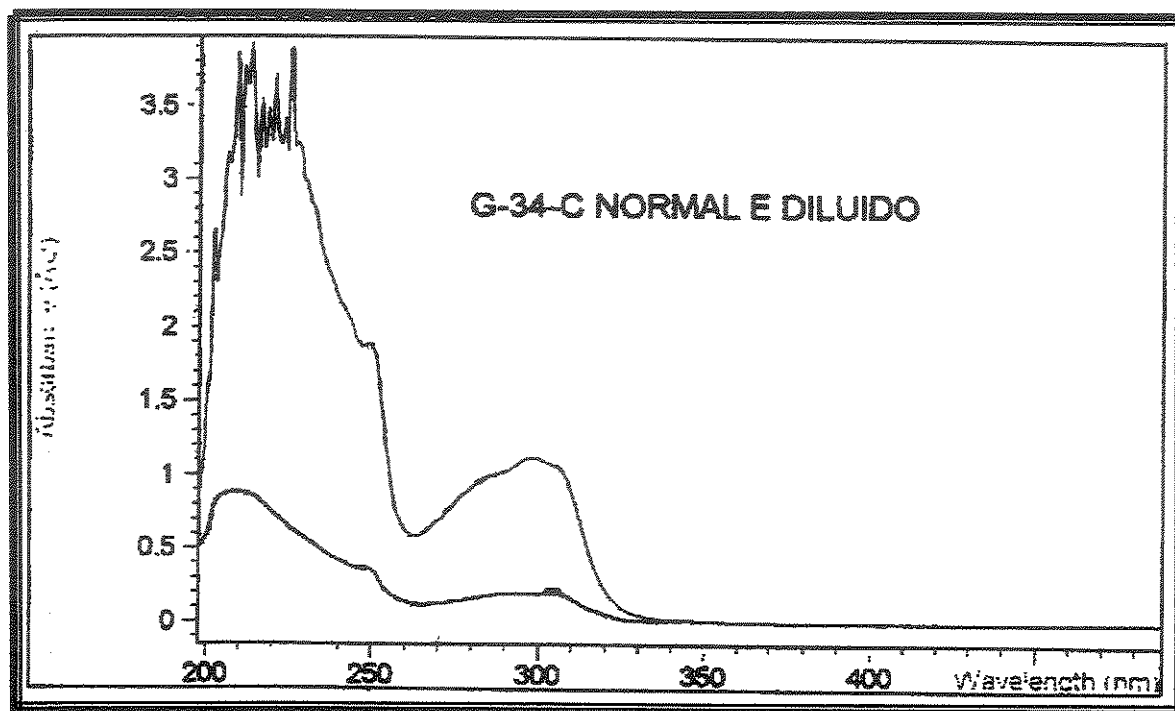
E.1.7.5. Espectro NOESY1D da Isoflavona I em CD₃OD 11,0 Tesla (irradiando H δ 7,7).



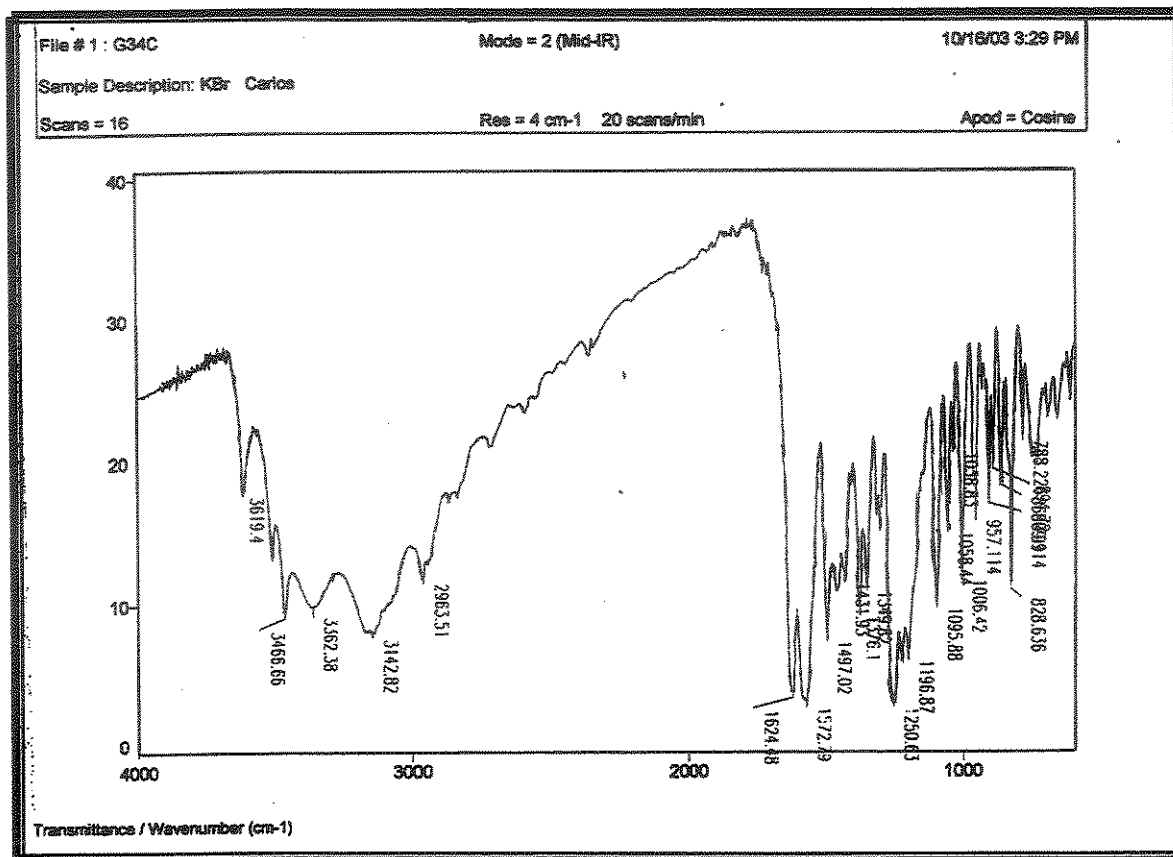
E.1.8. Espectro de massas de alta resolução da Isoflavona I



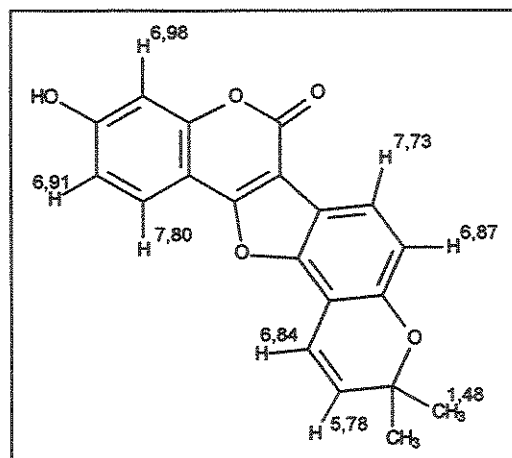
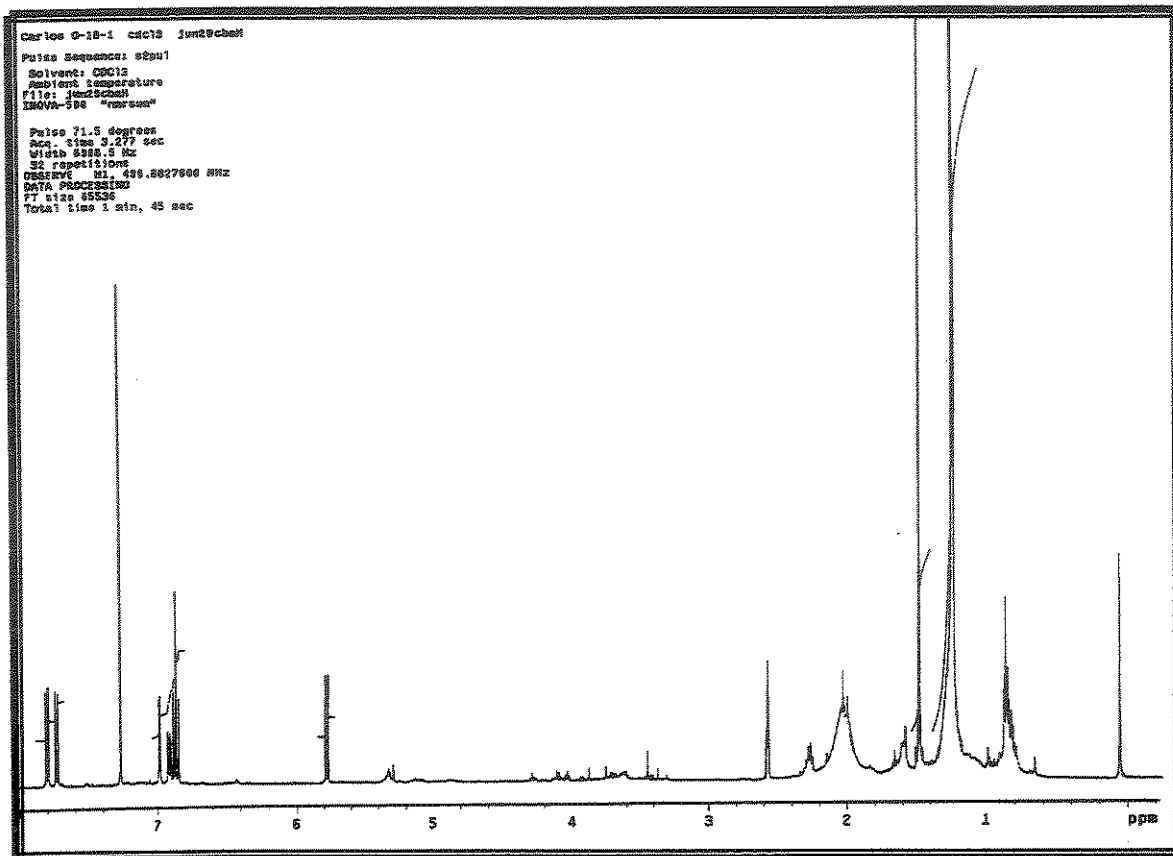
E.1.9. Espectro de U.V. para a Isoflavona I em metanol.



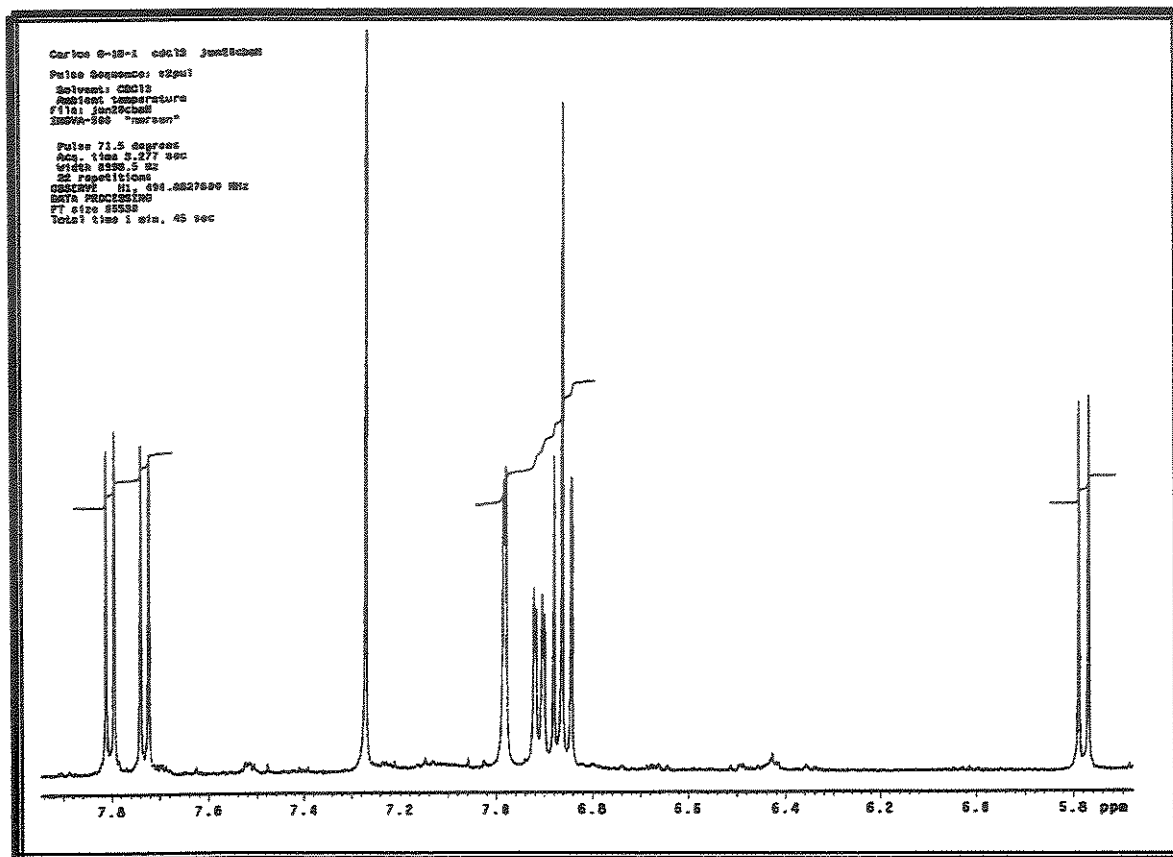
E.1.10 Espectro de I.V. da Isoflavona I em KBr.



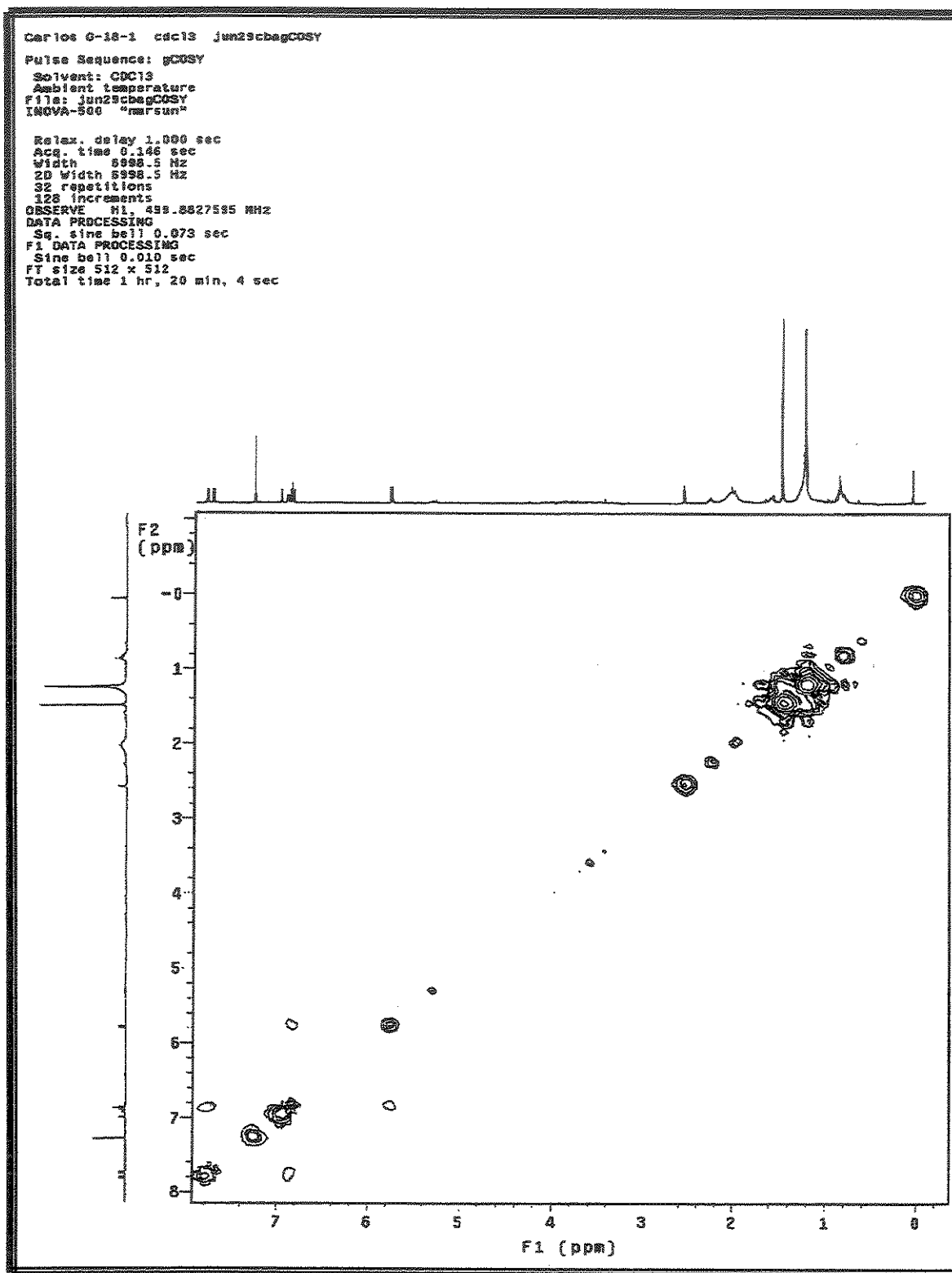
E.2.1.1. Espectro de RMN de ^1H do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ 11,0 Tesla.



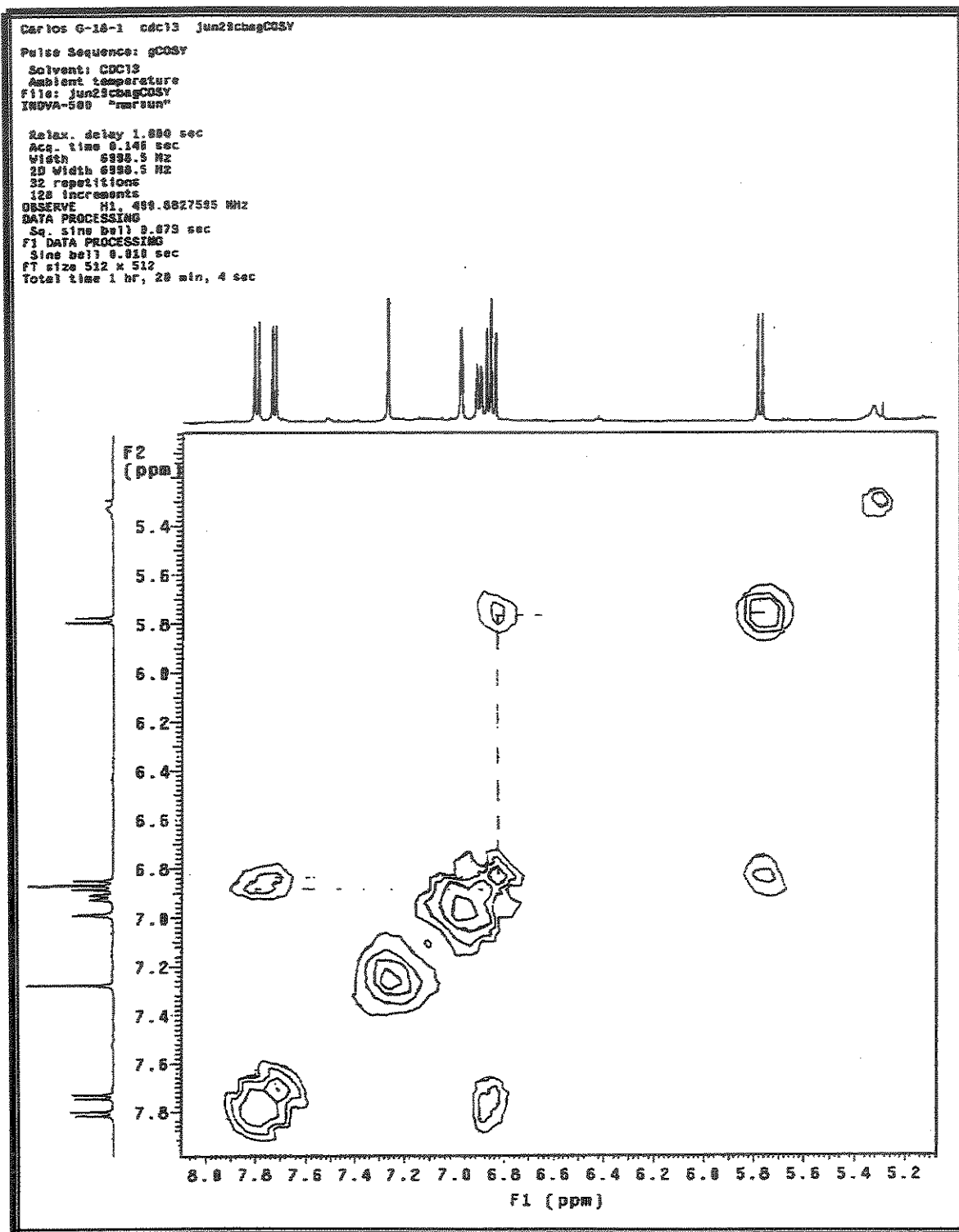
E.2.1.2. Expansão do espectro de RMN de ^1H do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$
11,0 Tesla.



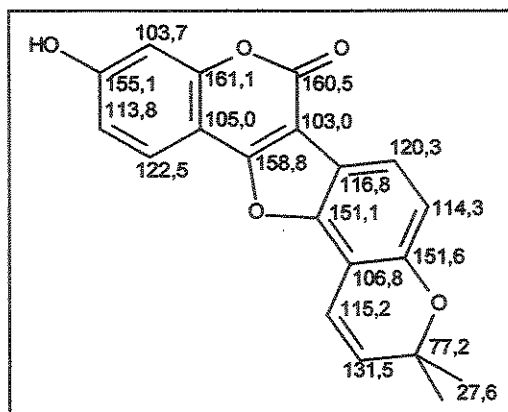
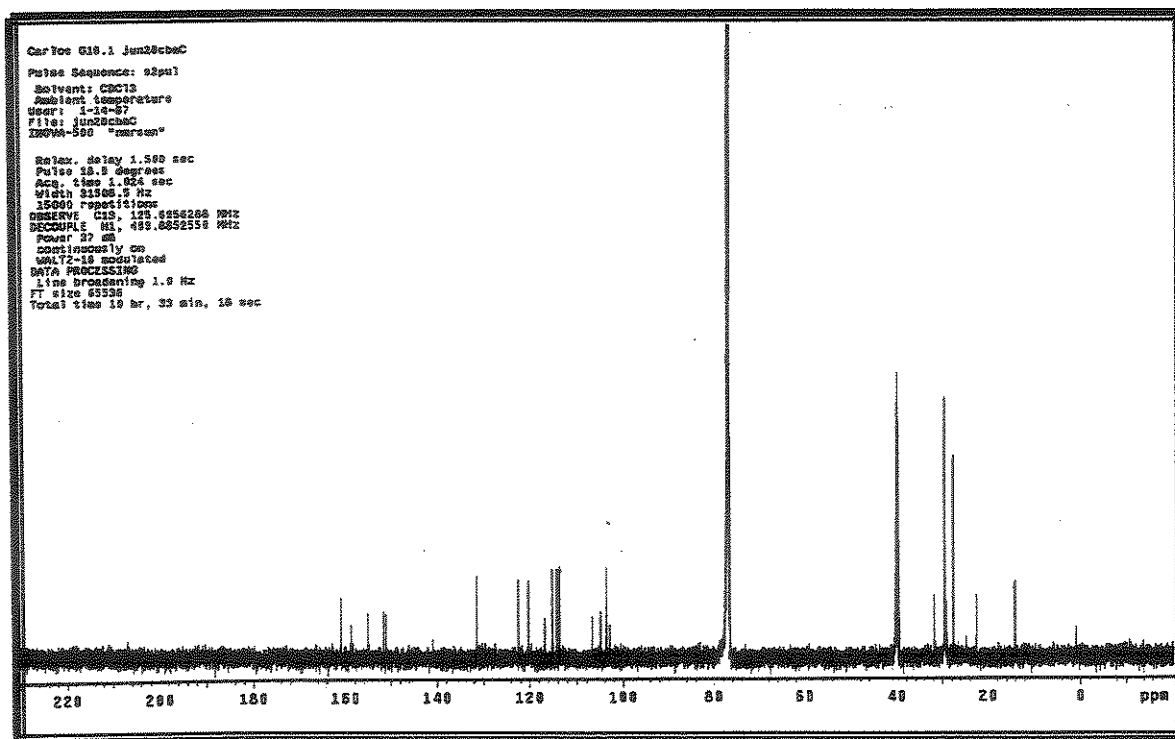
E.2.2.1. Espectro de RMN COSY de ^1H do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ 11,0 Tesla.



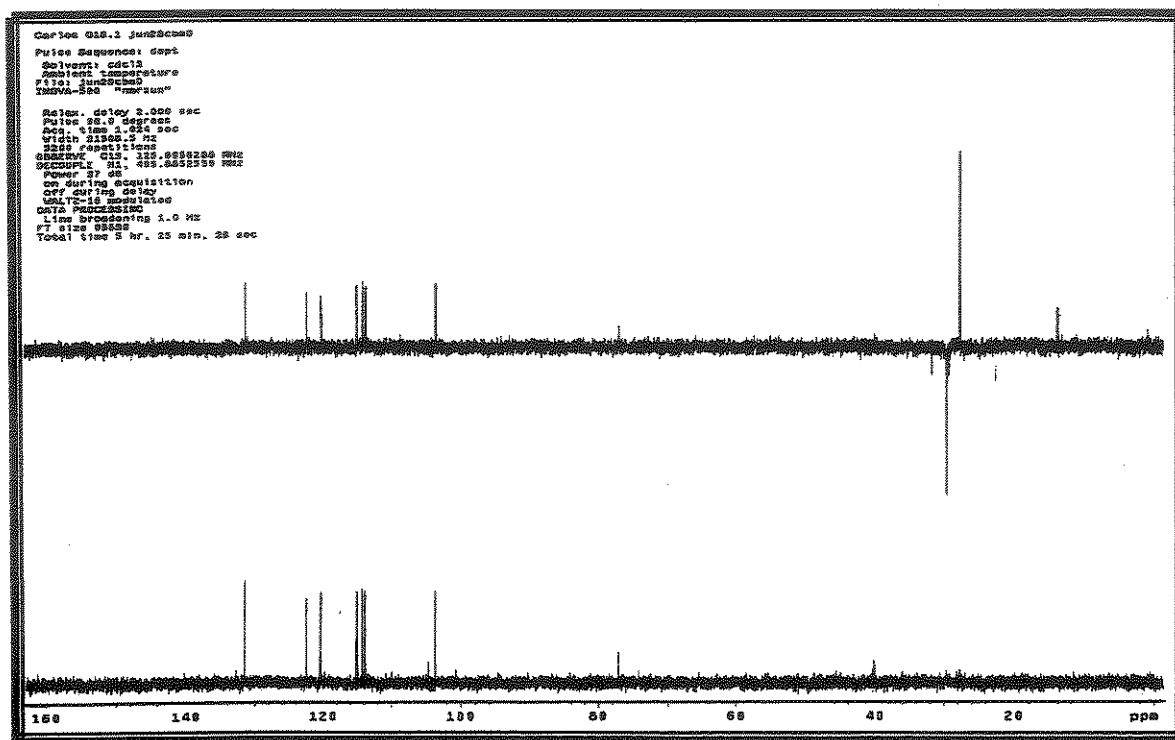
E.2.2.2. Expansão do espectro de RMN COSY de ^1H do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ 11,0 Tesla.



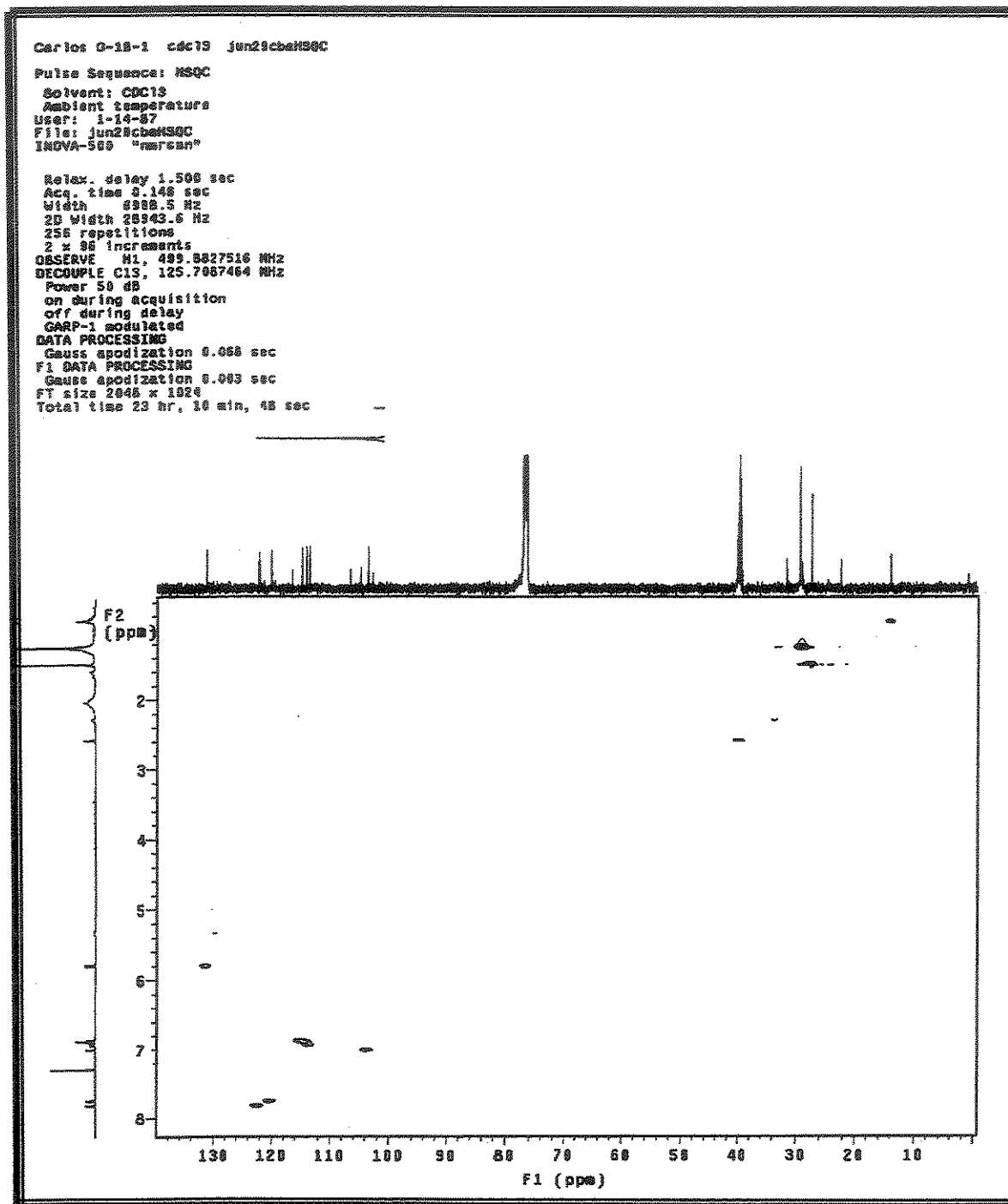
E.2.3. Espectro de RMN de ^{13}C do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ 11,0 Tesla.



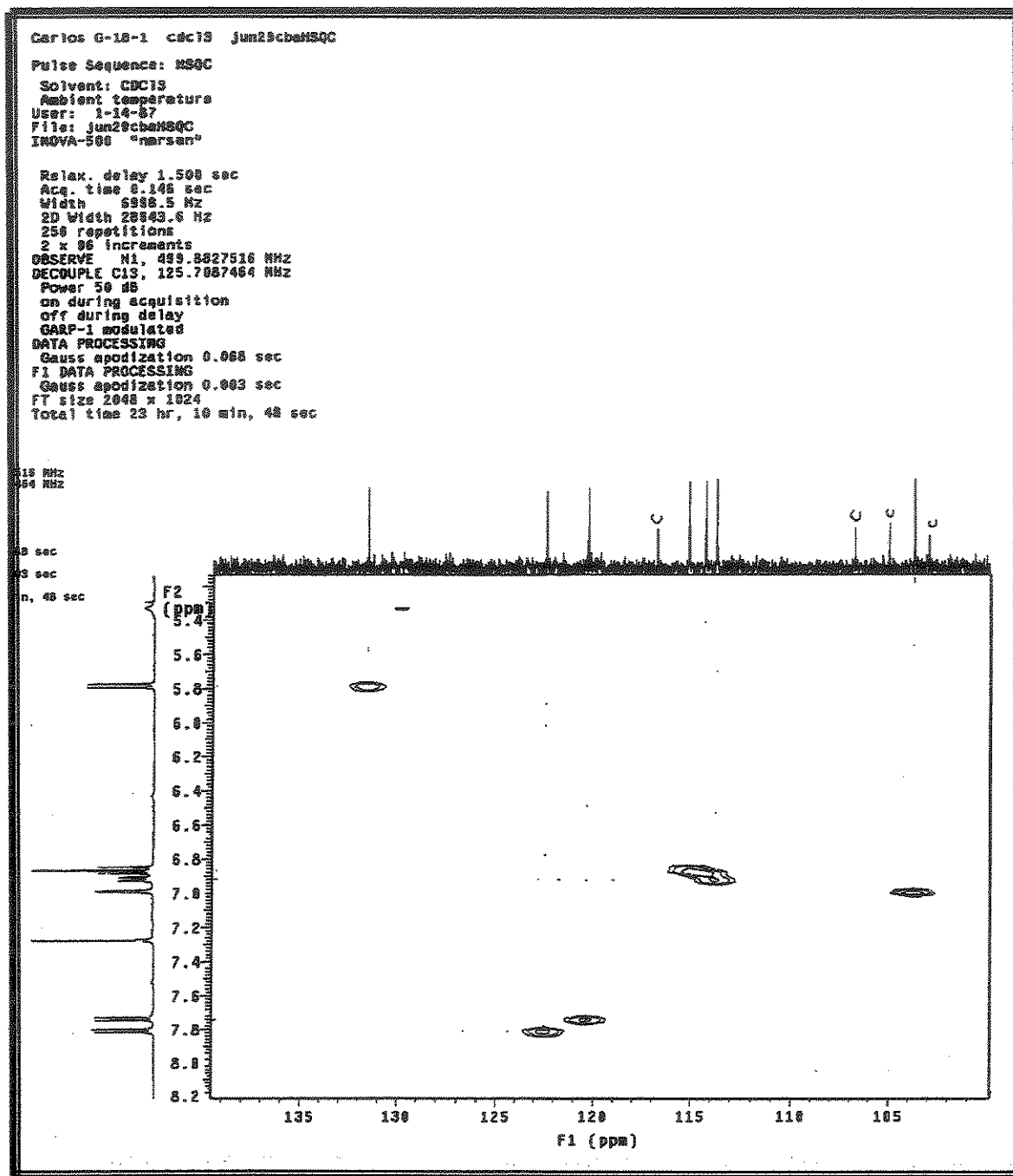
E.2.4. Espectro de DEPT (90° e 135°) do Cumestano I em CDCl₃/DMSO 11,0 Tesla.



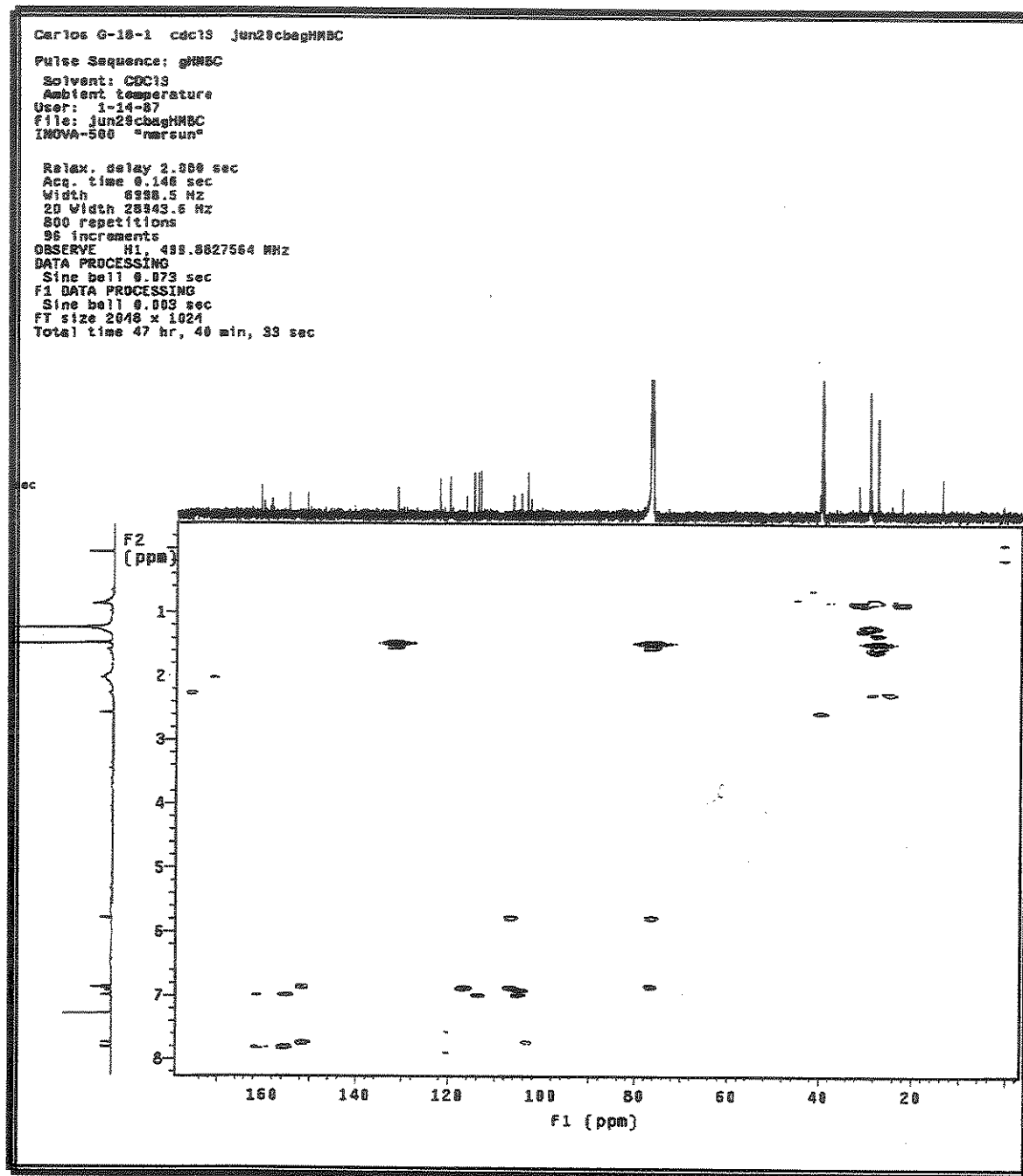
E.2.5.1. Espectro de RMN em HSQC do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ 11,0 Tesla.



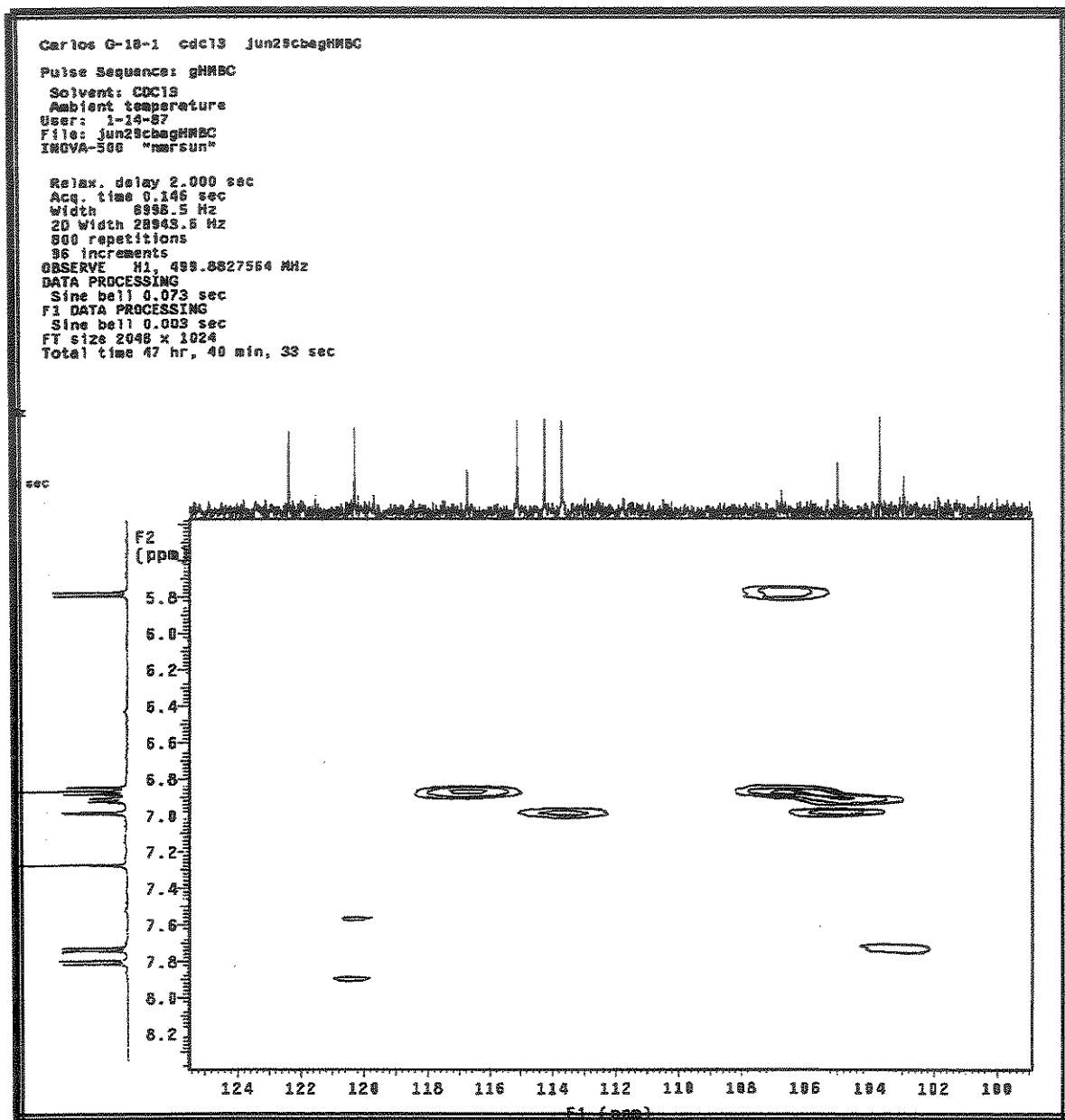
E.2.5.2. Expansão do espectro de RMN em HSQC do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ 11,0 Tesla.



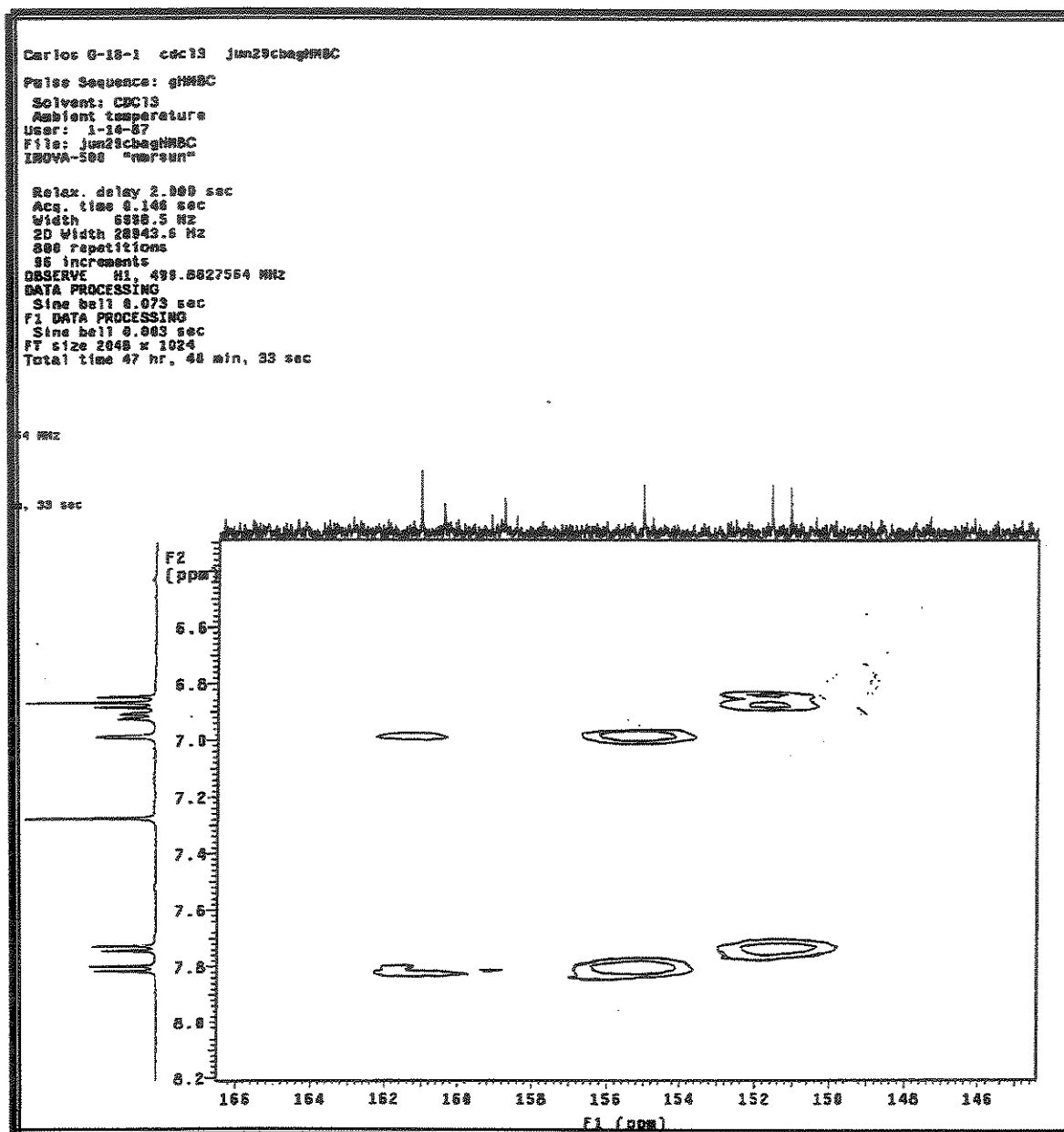
E.2.6.1. Espectro de RMN em HMBC do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ 11,0 Tesla.



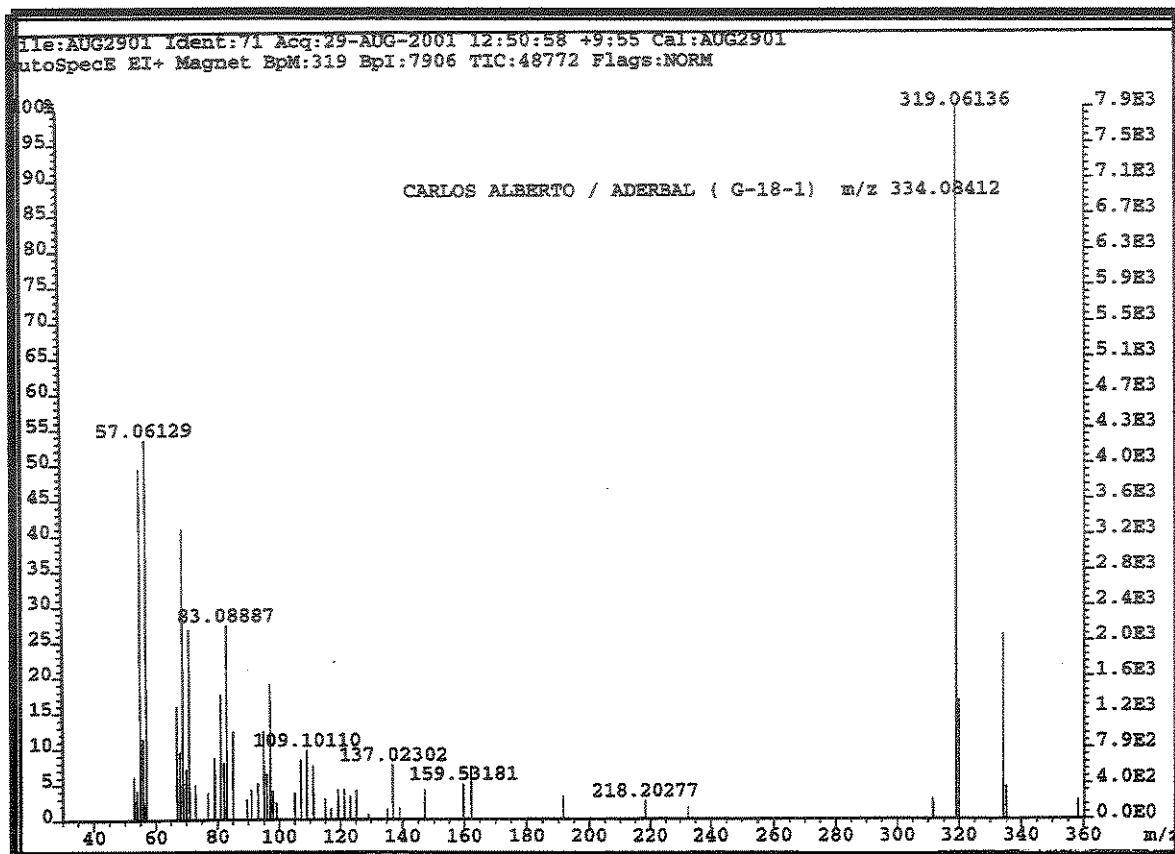
E.2.6.2. Expansão I do espectro de RMN em HMBC do Cumestano I em $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ 11,0 Tesla.



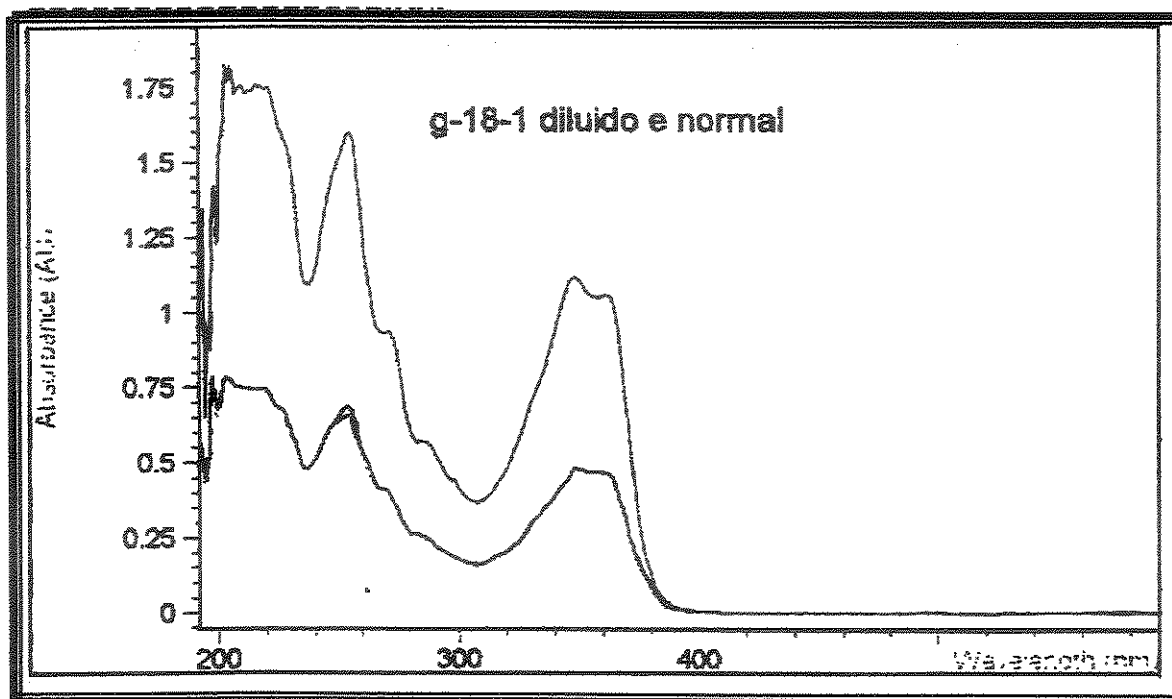
E.2.6.3. Expansão II do espectro de RMN em HMBC do Cumestano I em CDCl_3 /DMSO 11,0 Tesla.



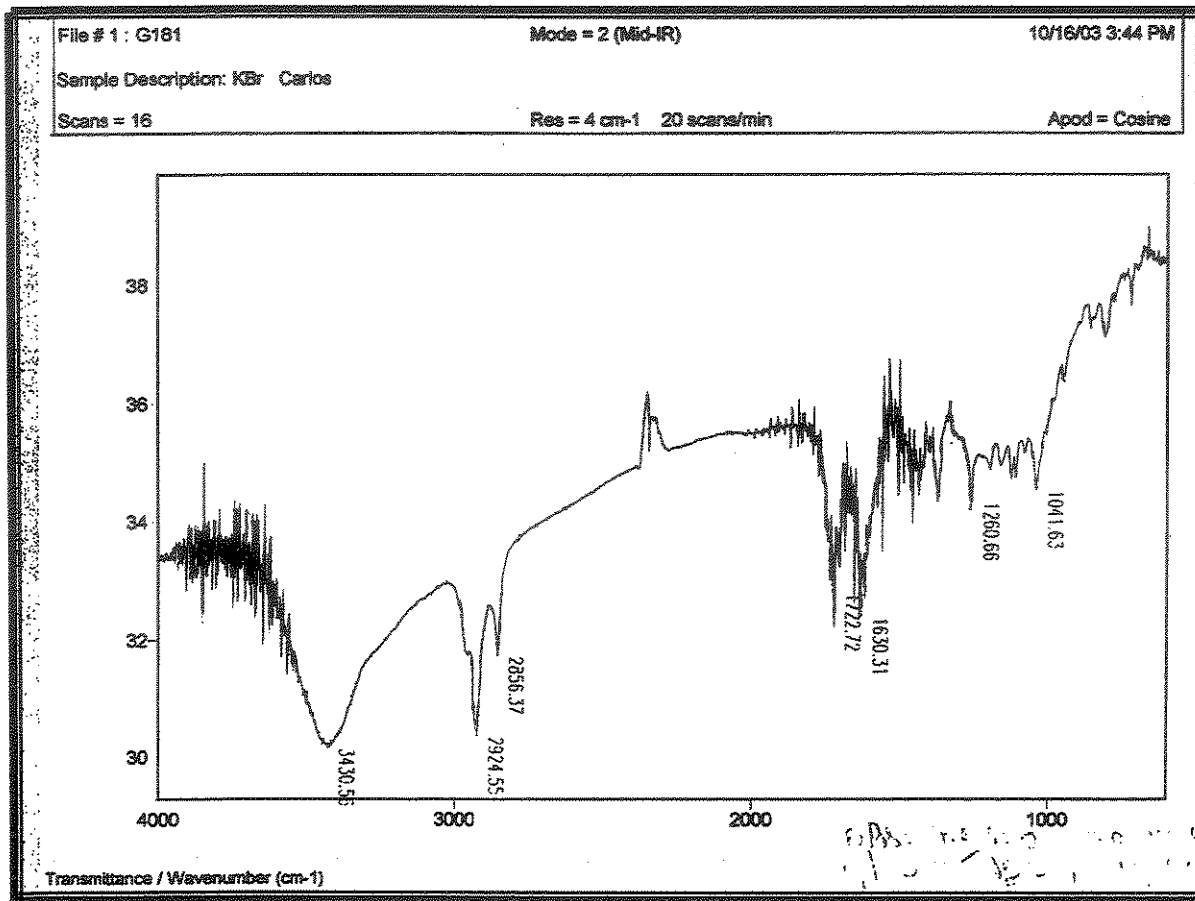
E.2.8. Espectro de massas de alta resolução do Cumestano I.



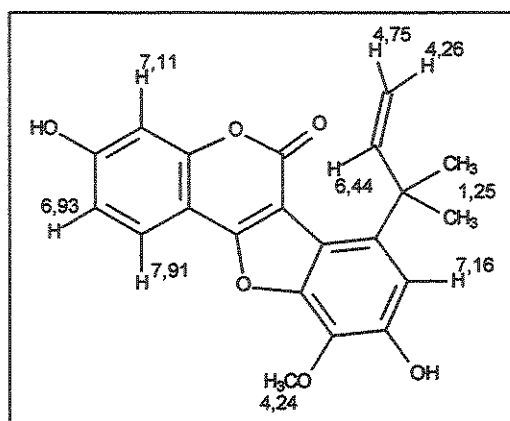
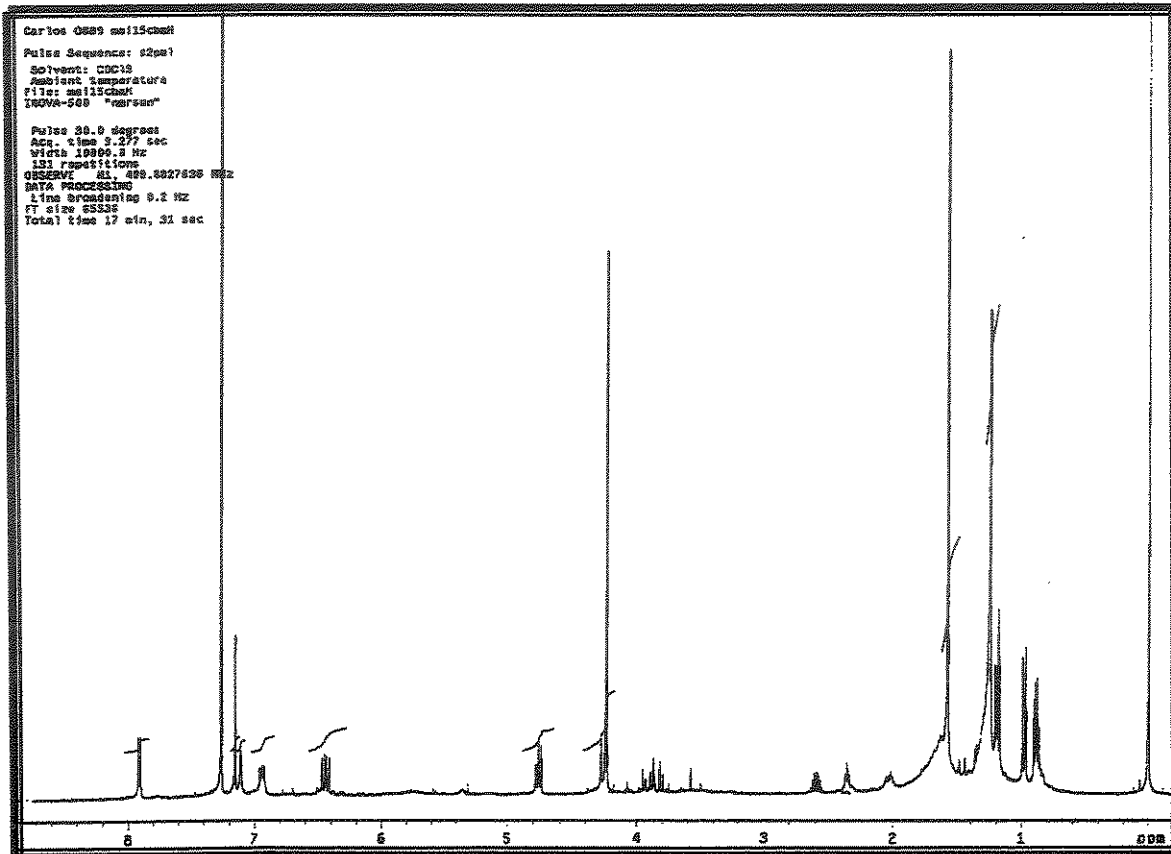
E.2.9. Espectro de U.V. do Cumestano I em metanol.



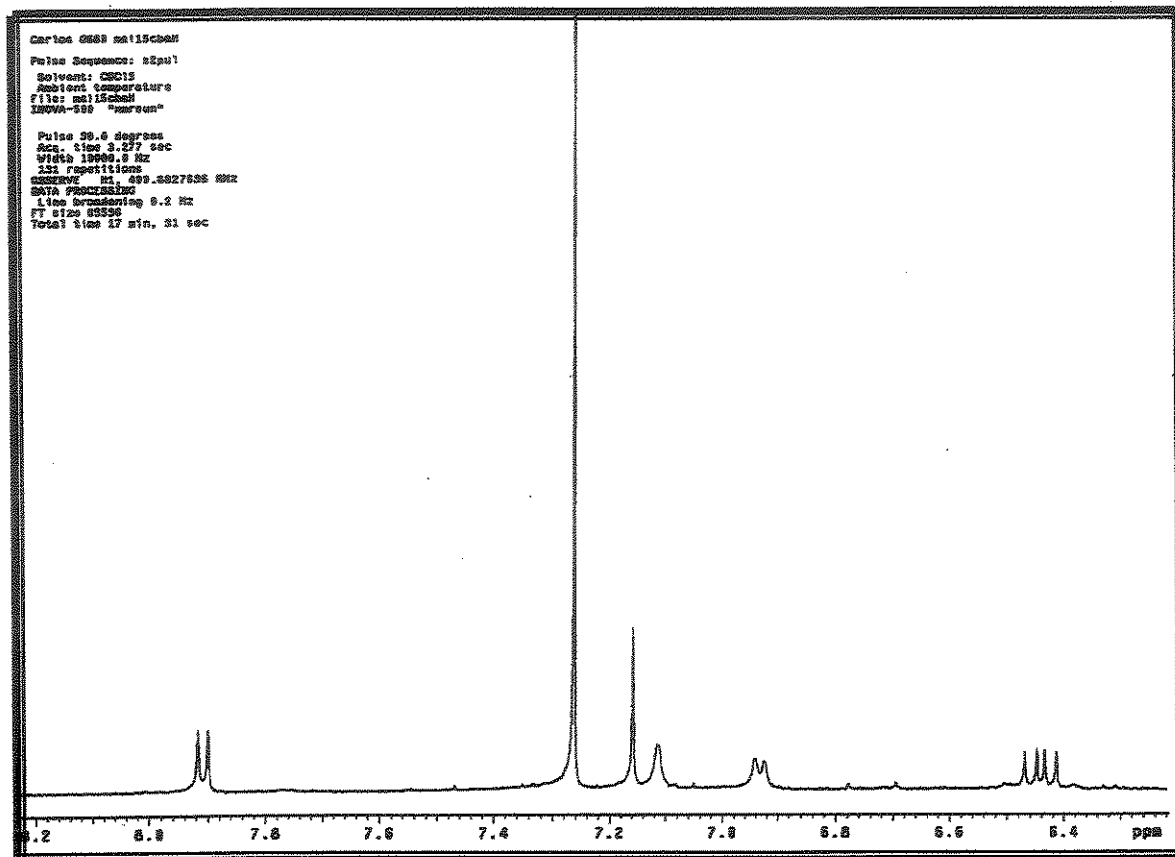
E.2.10 Espectro de I. V. do Cumestano I em KBr.



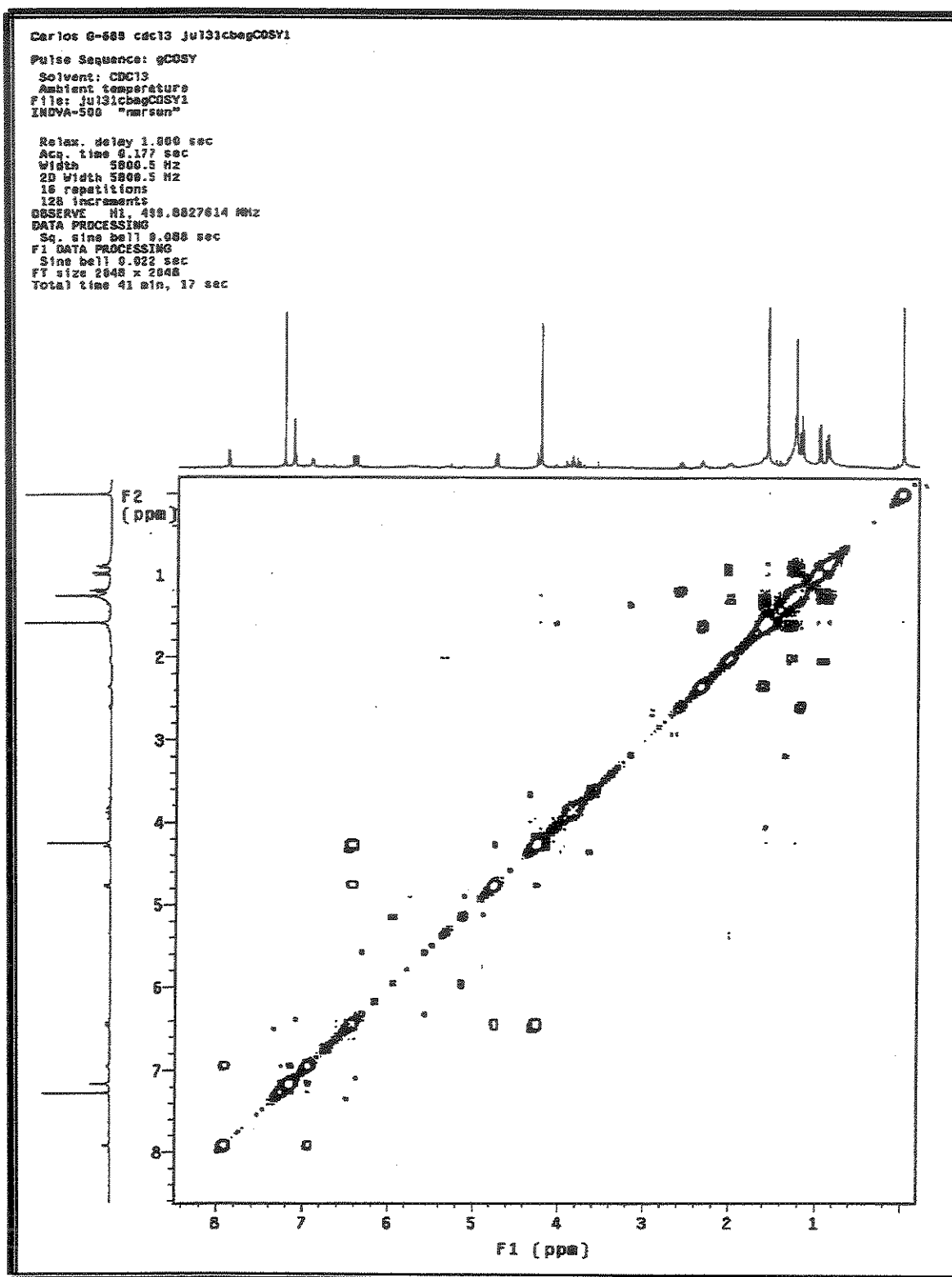
E.3.1.1. Espectro de RMN de ^1H do Cumestano II, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



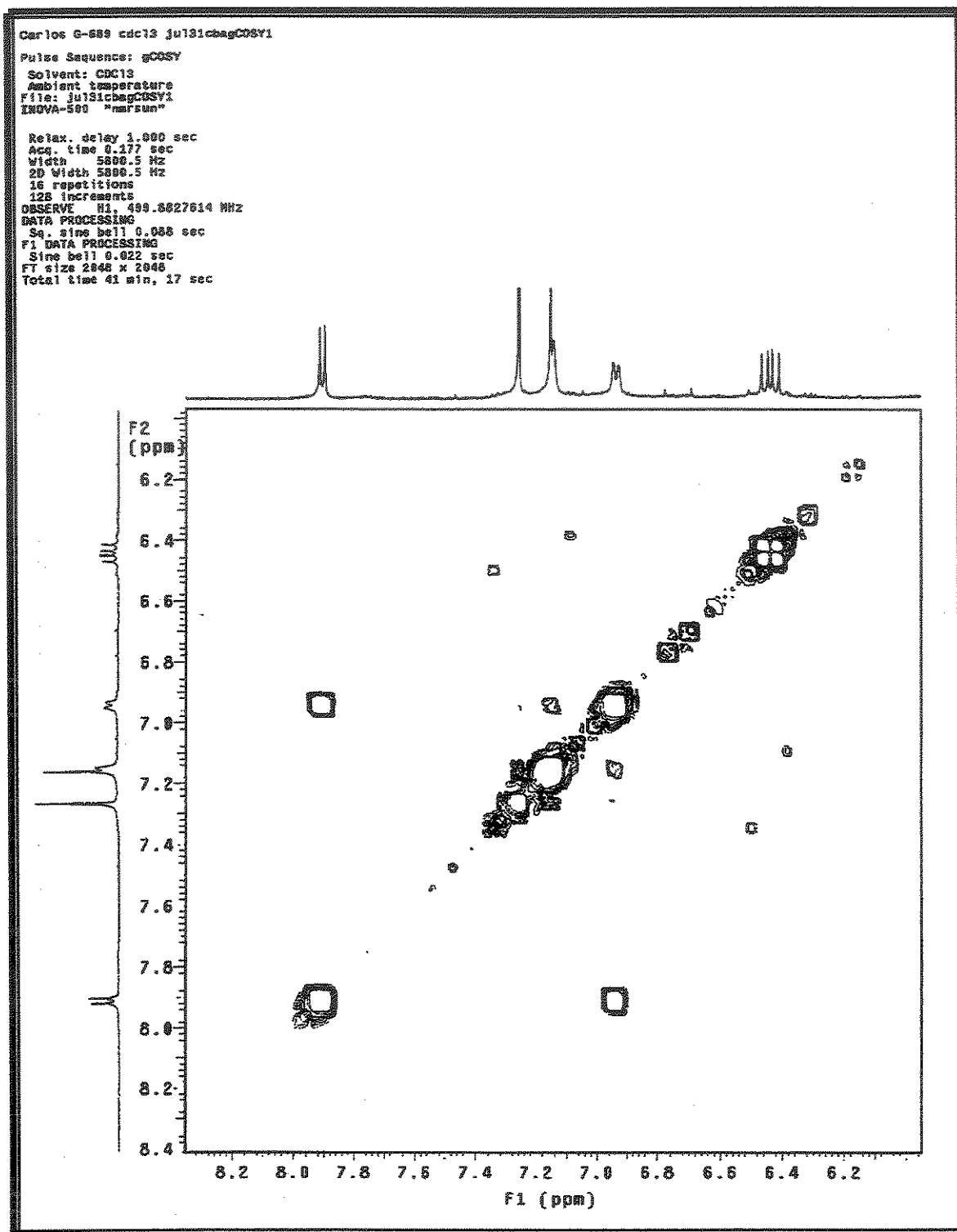
E.3.1.2. Expansão do espectro de RMN de ^1H do Cumestano II, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



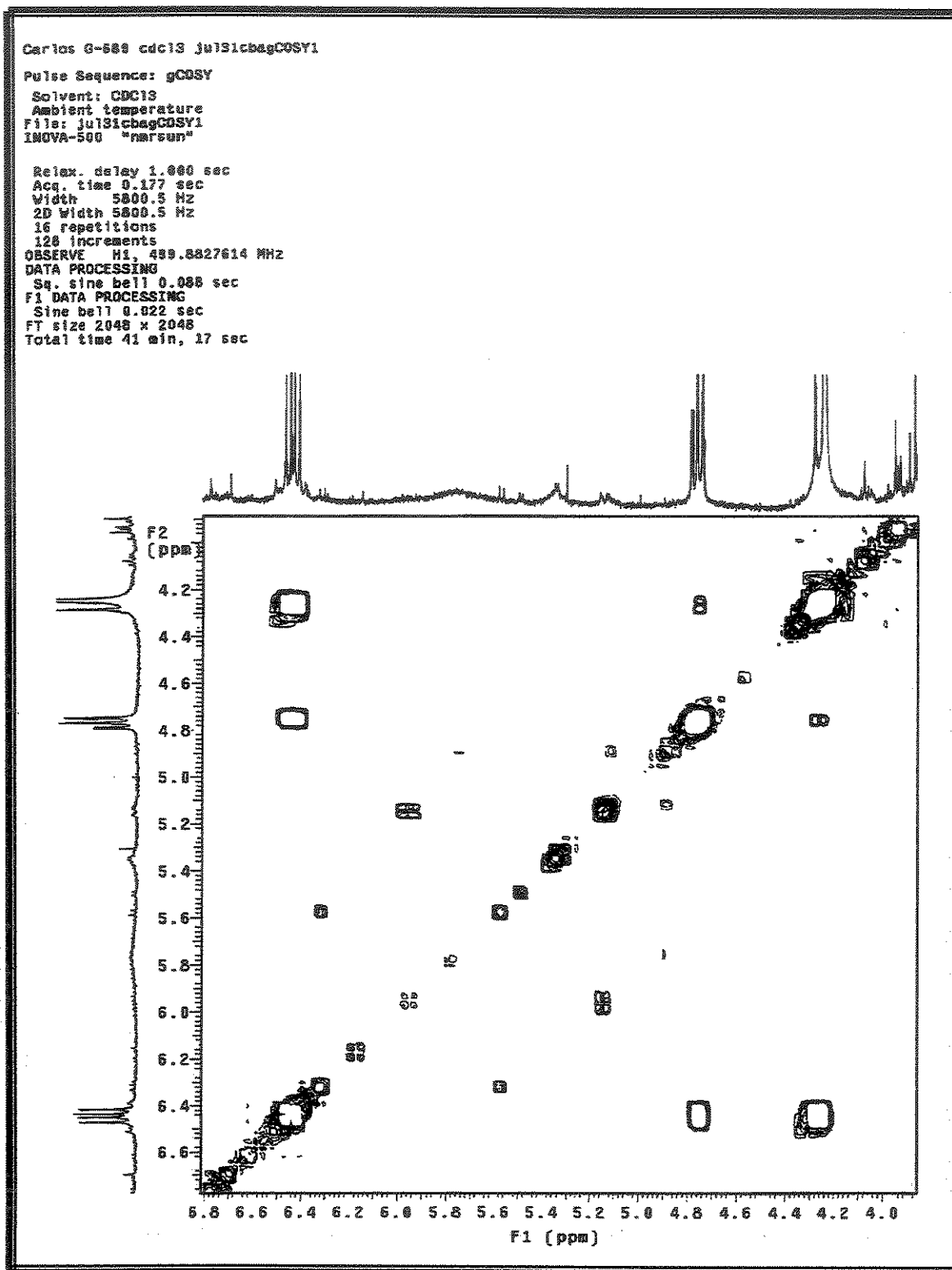
E.3.2.1. Espectro de RMN COSY de ^1H do Cumestano II, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



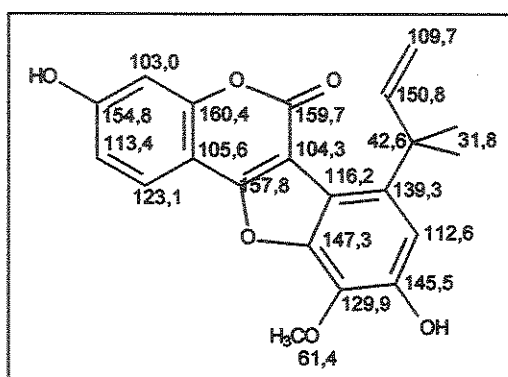
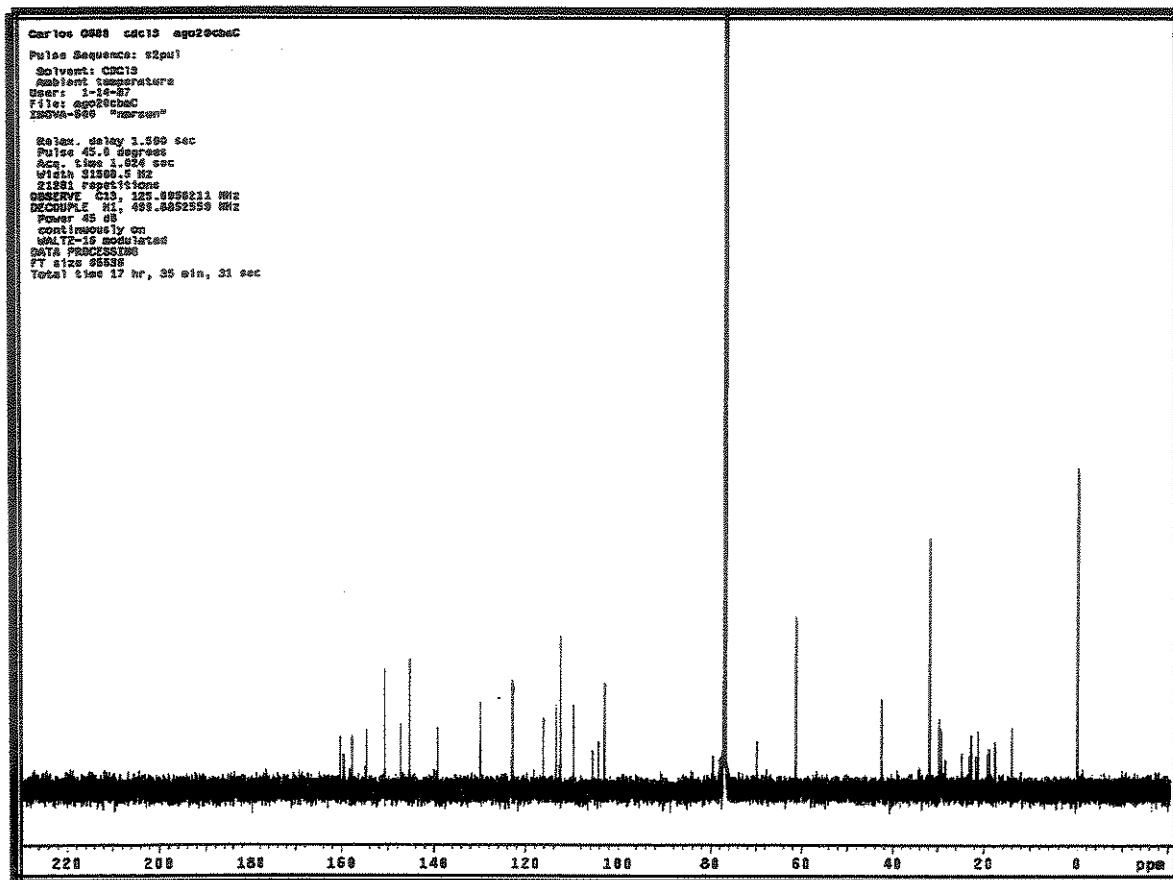
E.3.2.2. Expansão I do espectro de RMN COSY de ^1H do Cumestano II, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



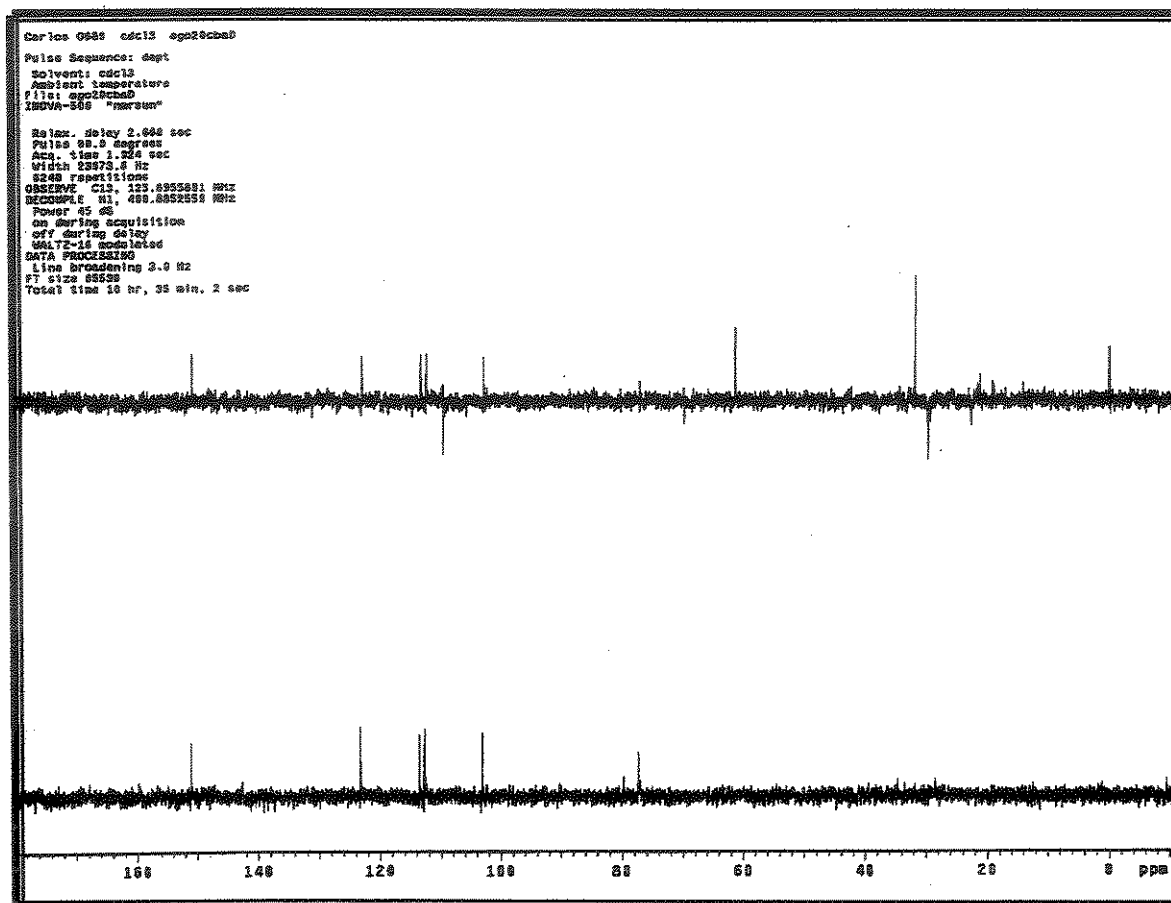
E.3.2.3. Expansão II do espectro de RMN COSY de ^1H do Cumestano II, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



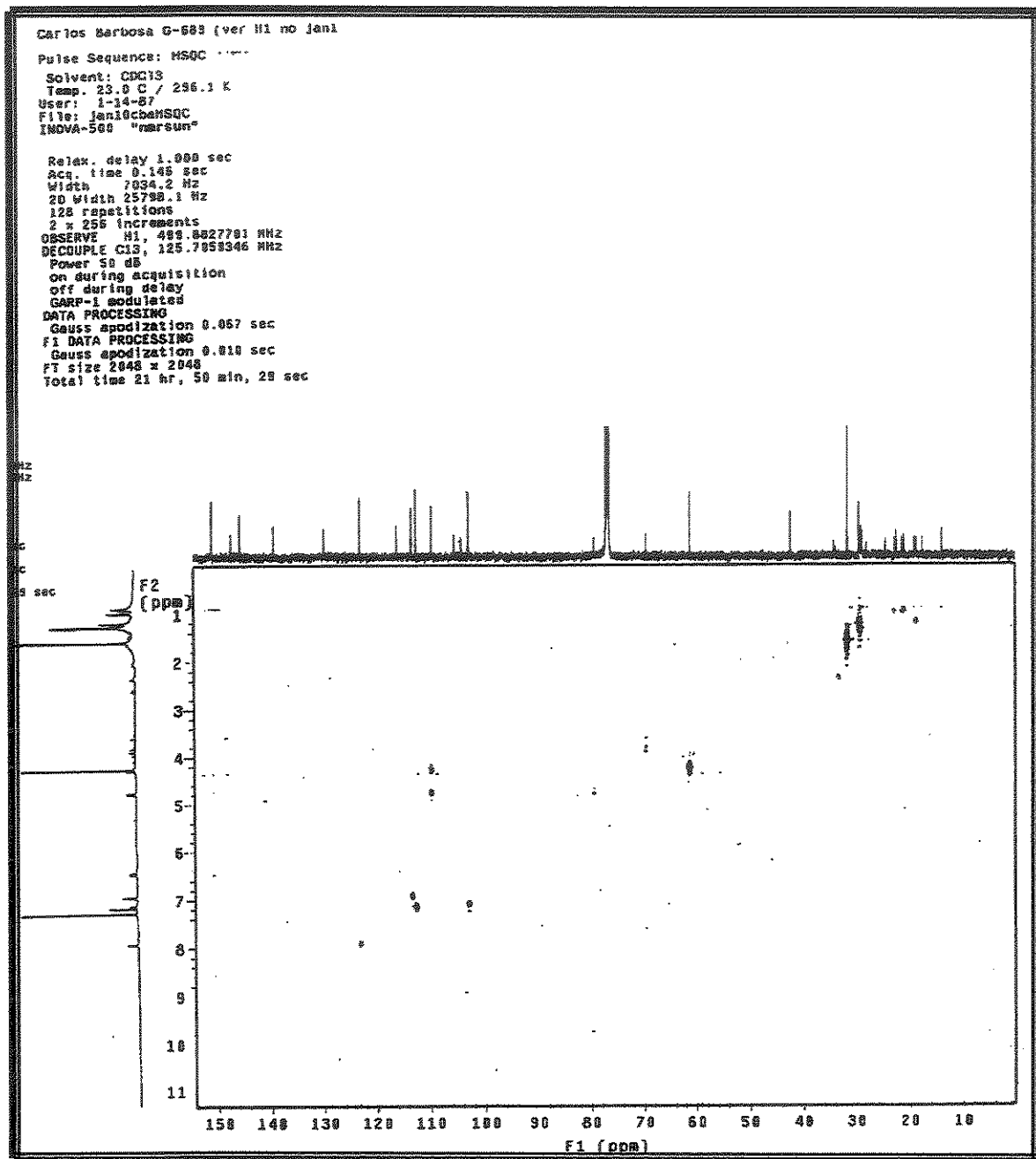
E.3.3. Espectro de RMN de ^{13}C do Cumestano II, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



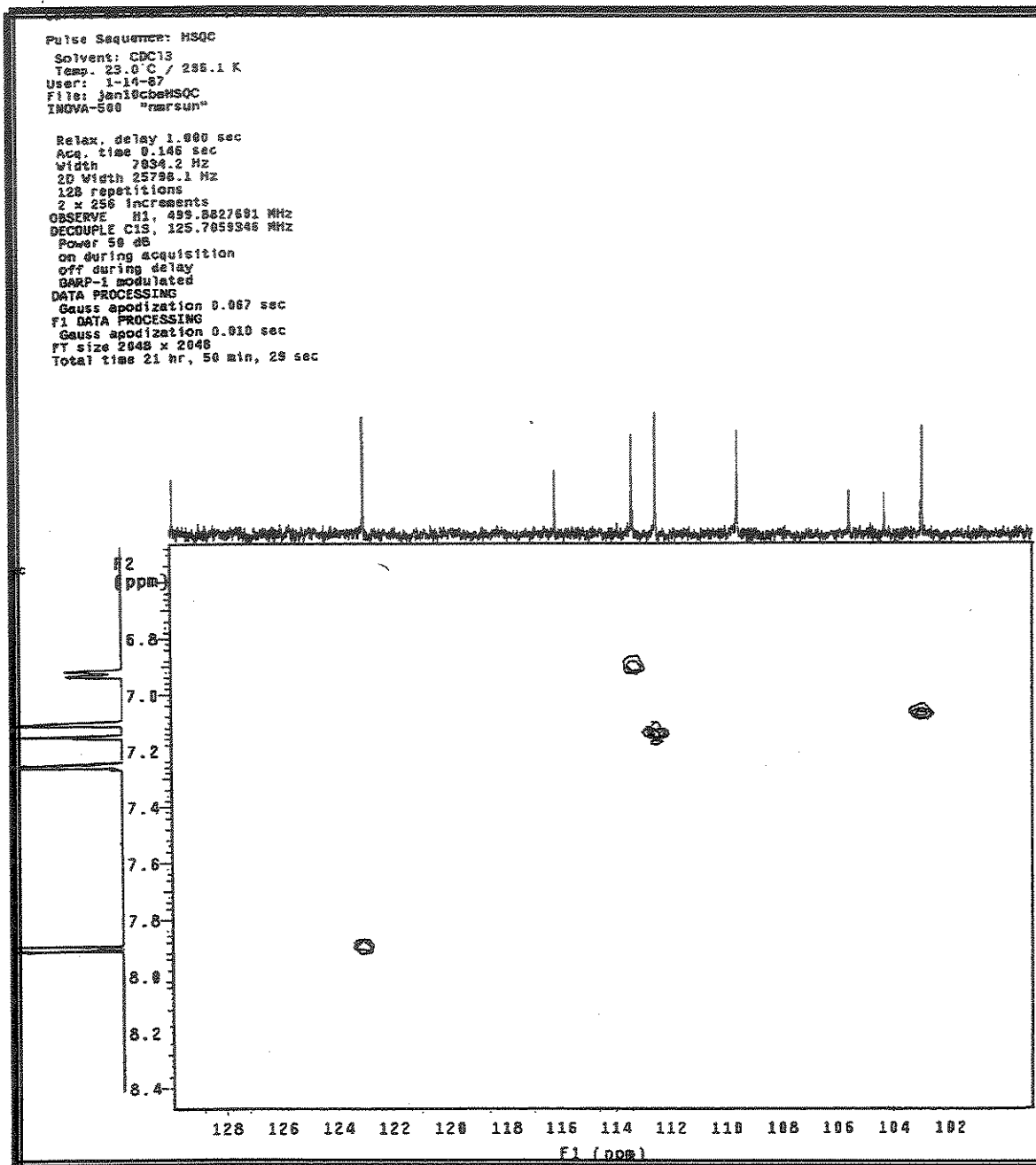
E.3.4. Espectro de DEPT (90° e 135°) do Cumestano II em CDCl₃ 11,0 Tesla.



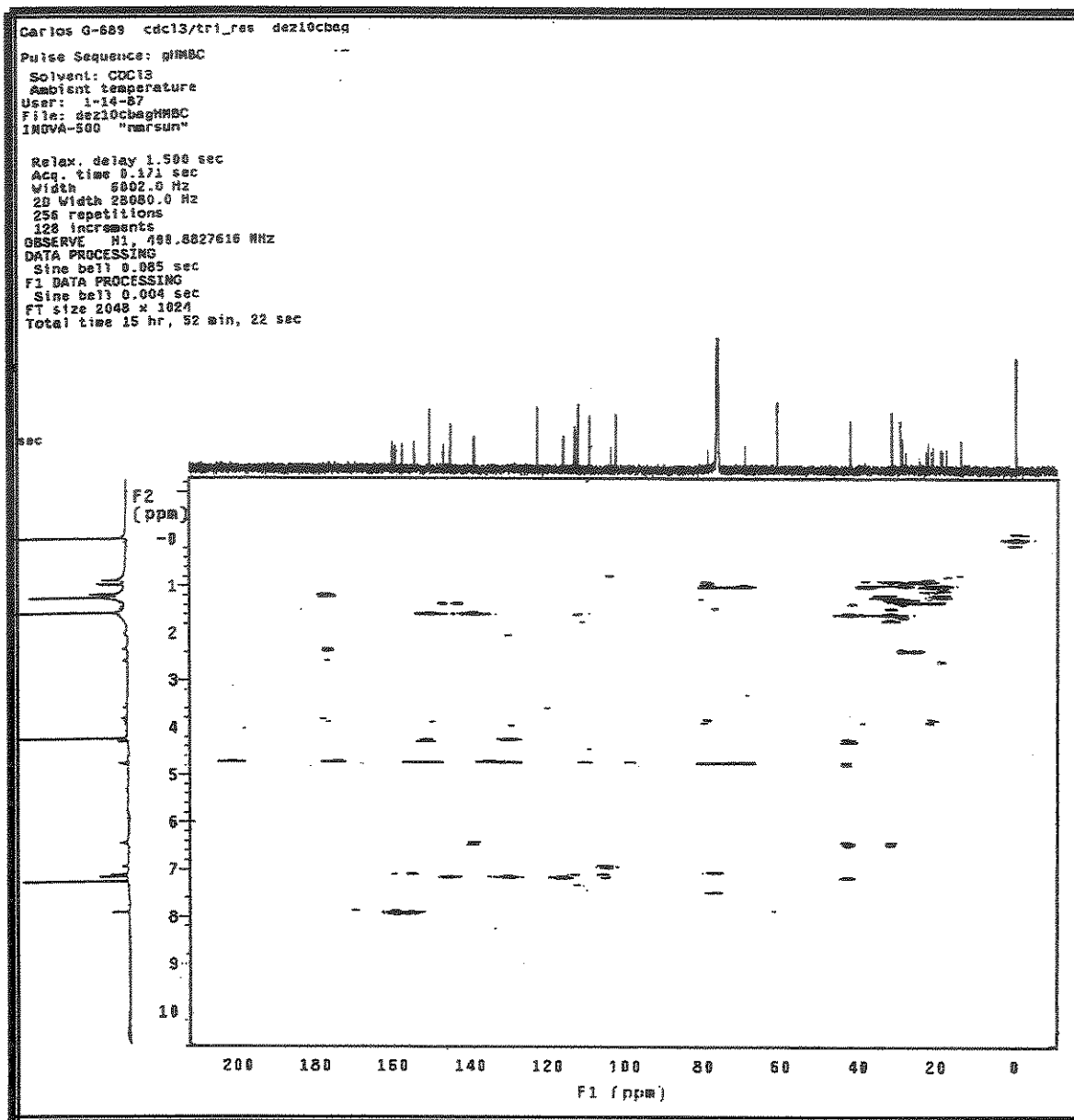
E.3.5.1. Espectro de RMN em HSQC do Cumestano II em CDCl_3 , 11,0 Tesla.



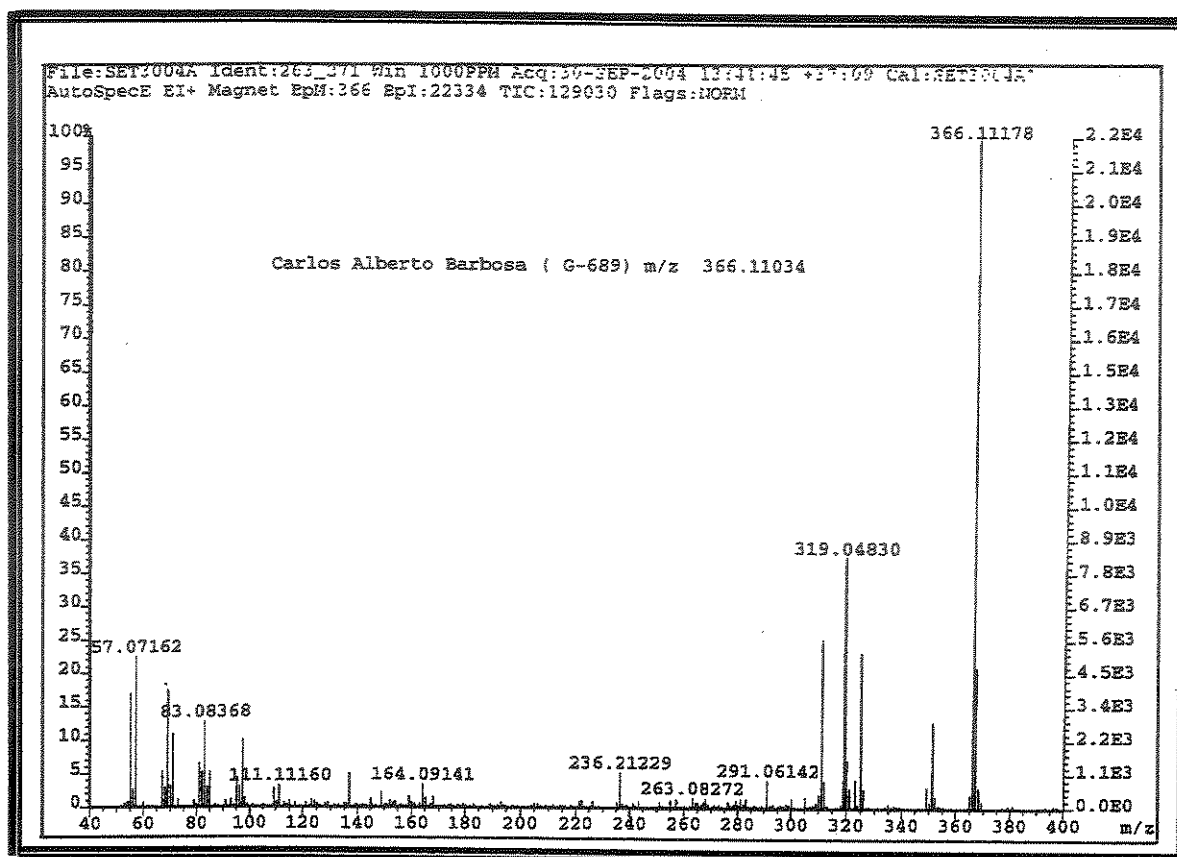
E.3.5.2. Expansão do espectro de RMN em HSQC do Cumestano II em CDCl_3 , 11,0 Tesla.



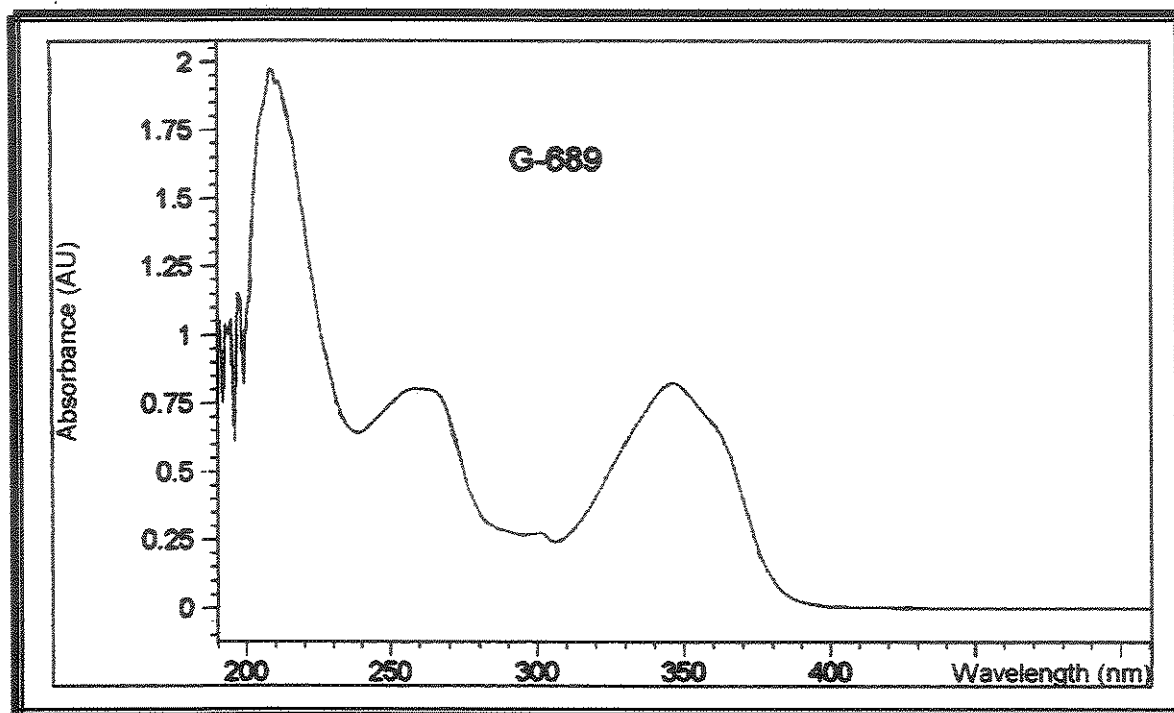
E.3.6.1. Espectro de RMN em HMBC do Cumestano II em CDCl_3 , 11,0 Tesla.



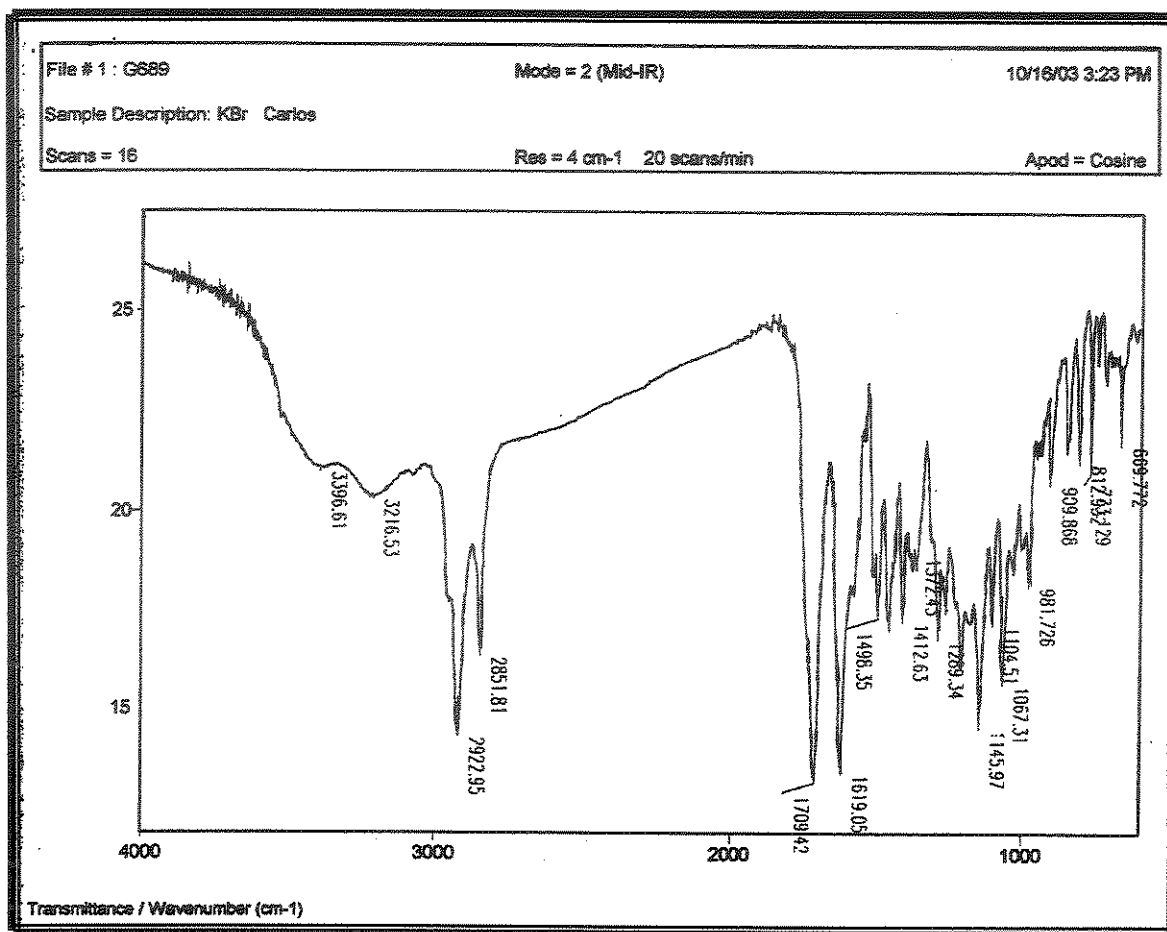
E.3.8. Espectro de massas de alta resolução do Cumestano II em CDCl_3 .



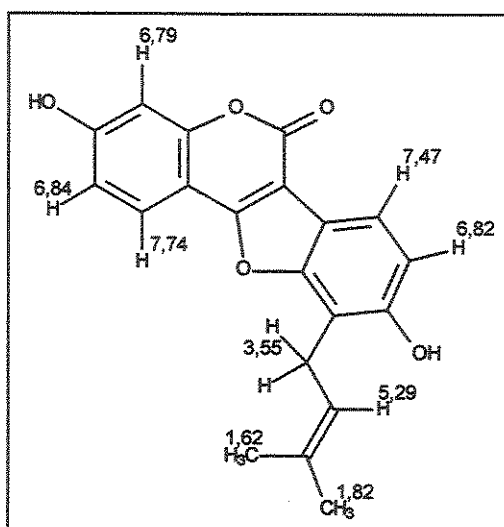
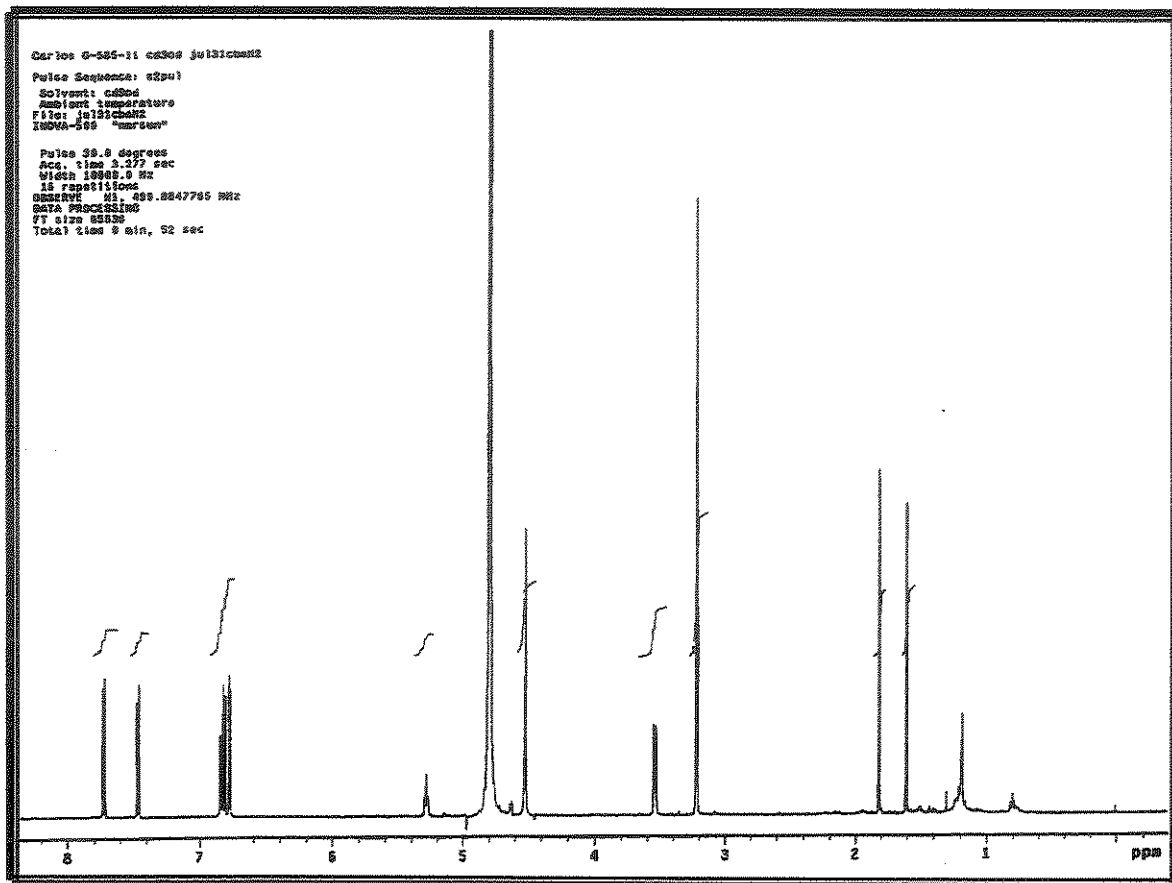
E.3.9. Espectro de U.V. do Cumestano II em metanol.



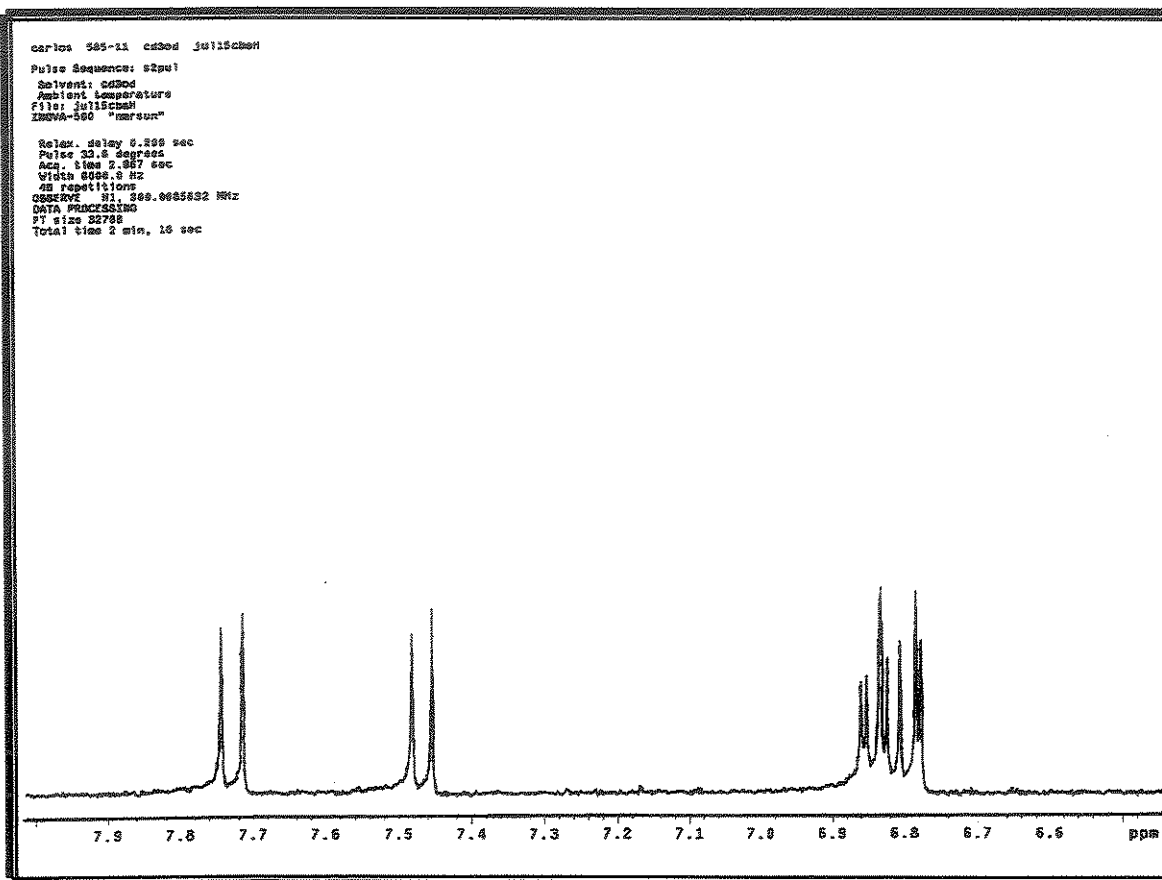
E.3.10 Espectro de I. V. do Cumestano II em KBr



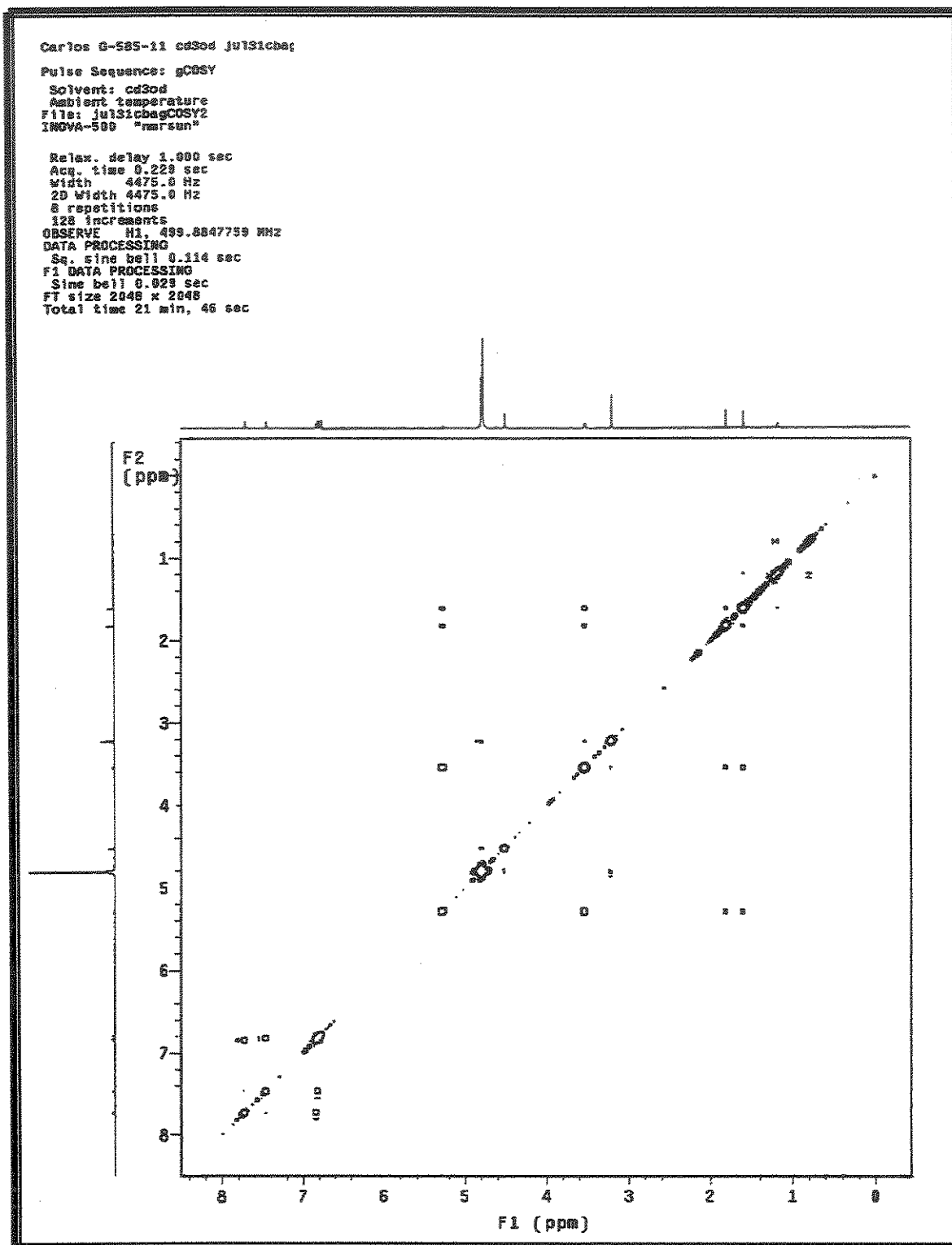
E.4.1.1. Espectro de RMN de ^1H do Cumestano III, CD_3OD , 11,0 Tesla.



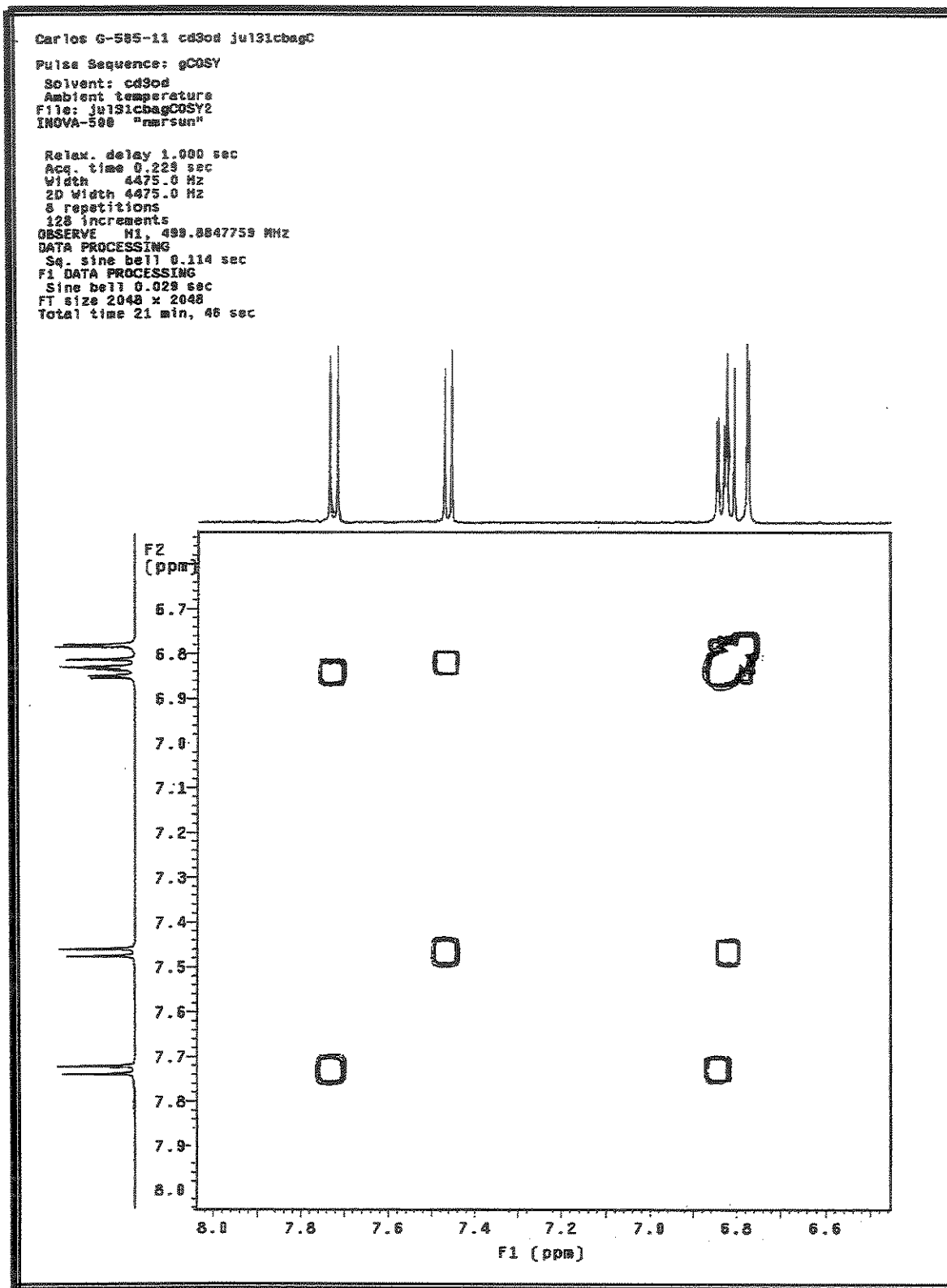
E.4.1.2. Expansão do espectro de RMN de ^1H do Cumestano III, CD_3OD , 11,0 Tesla.



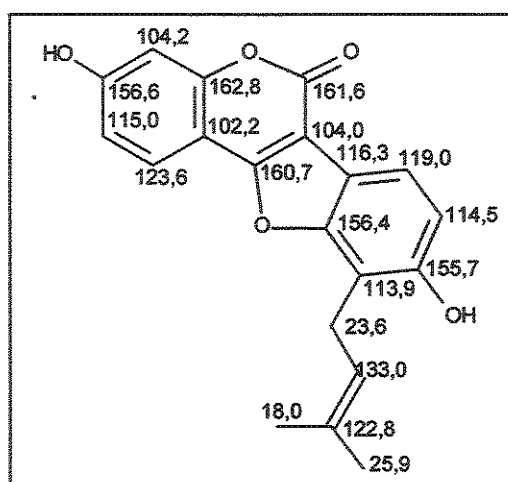
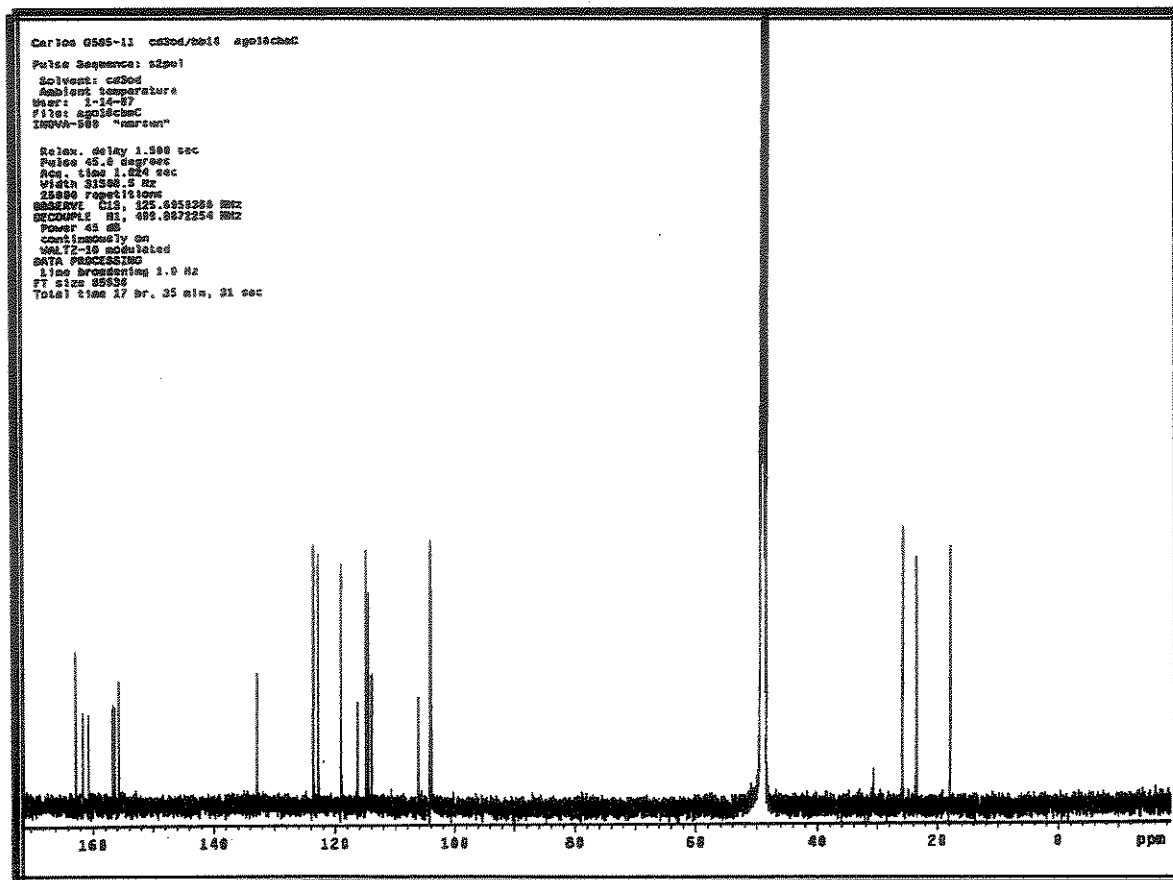
E.4.2.1. Espectro de RMN COSY de ^1H do Cumestano III, CD_3OD , 11,0 Tesla.



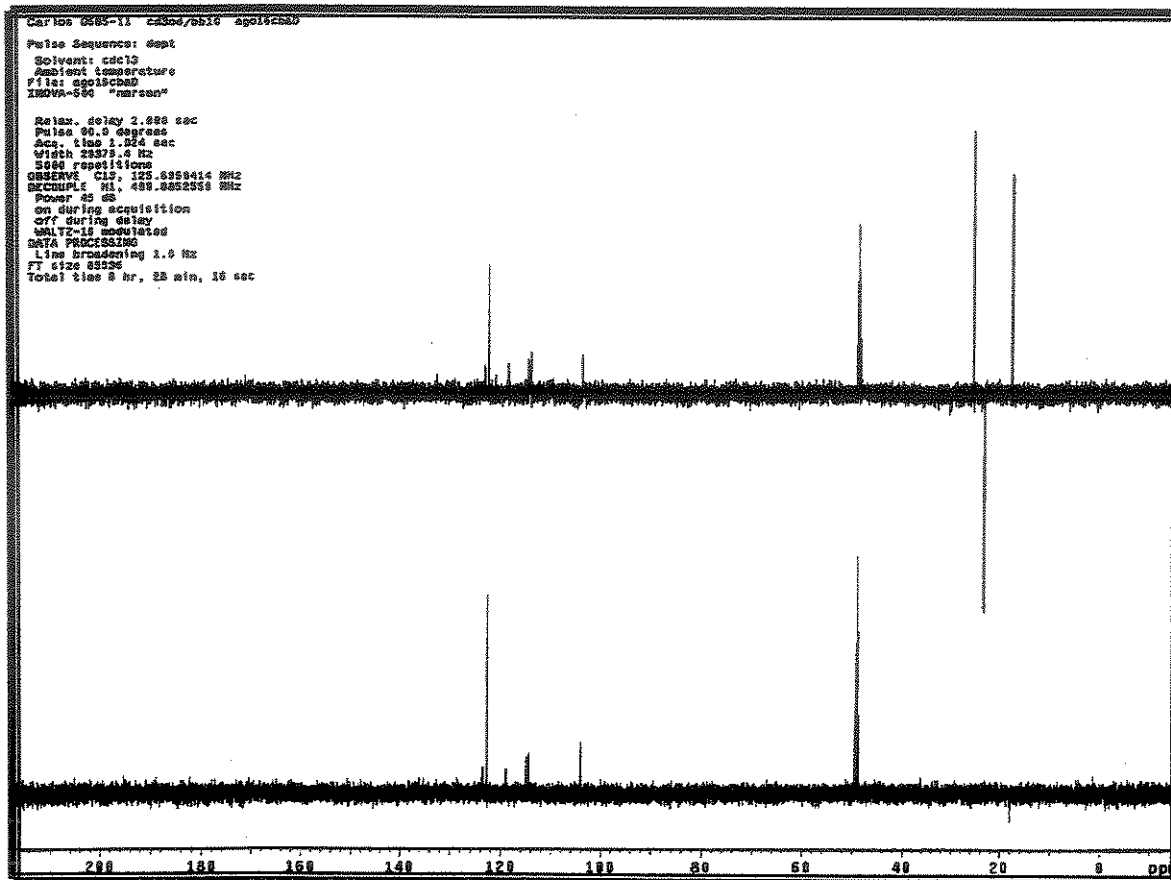
E.4.2.2. Expansão I do espectro de RMN COSY de ^1H do Cumestano III, CD_3OD , 11,0 Tesla.



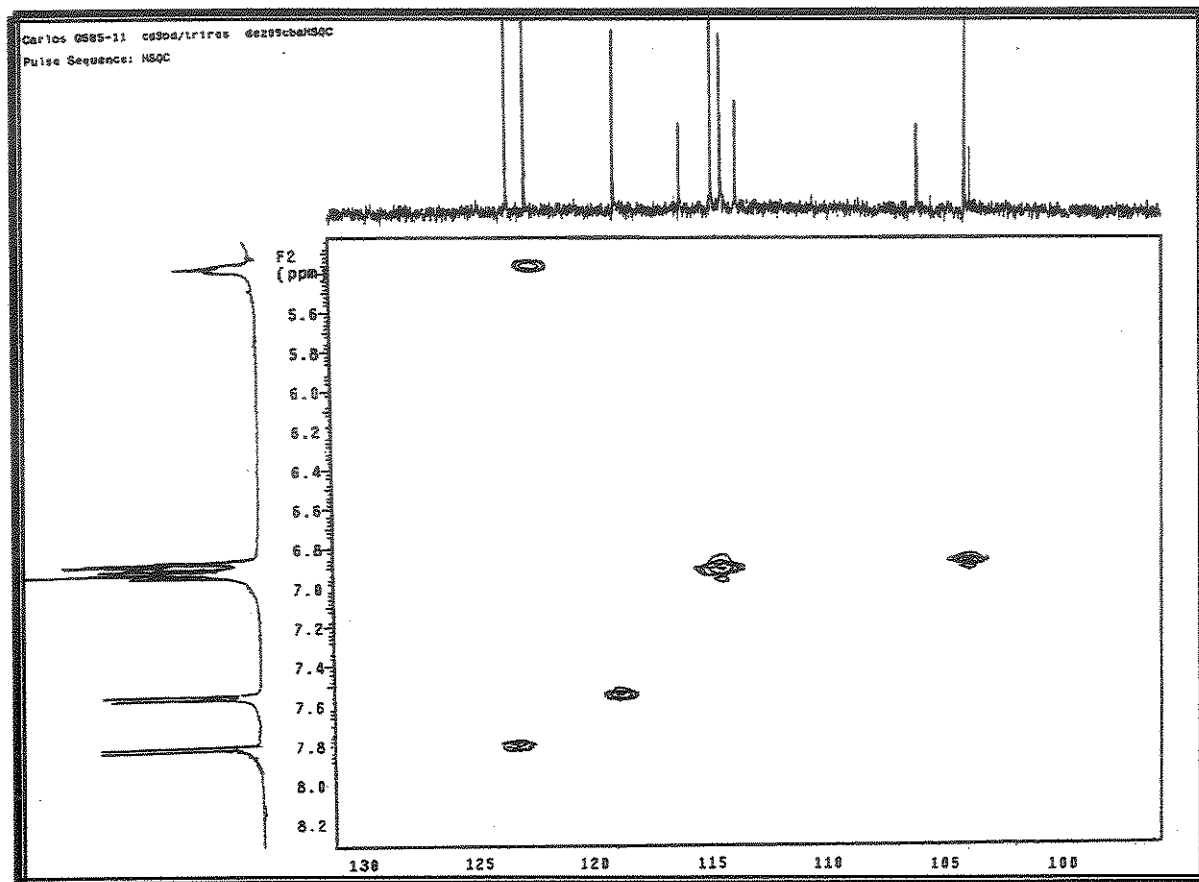
E.4.3. Espectro de RMN de ^{13}C do Cúestano III, CD_3OD , 11,0 Tesla.



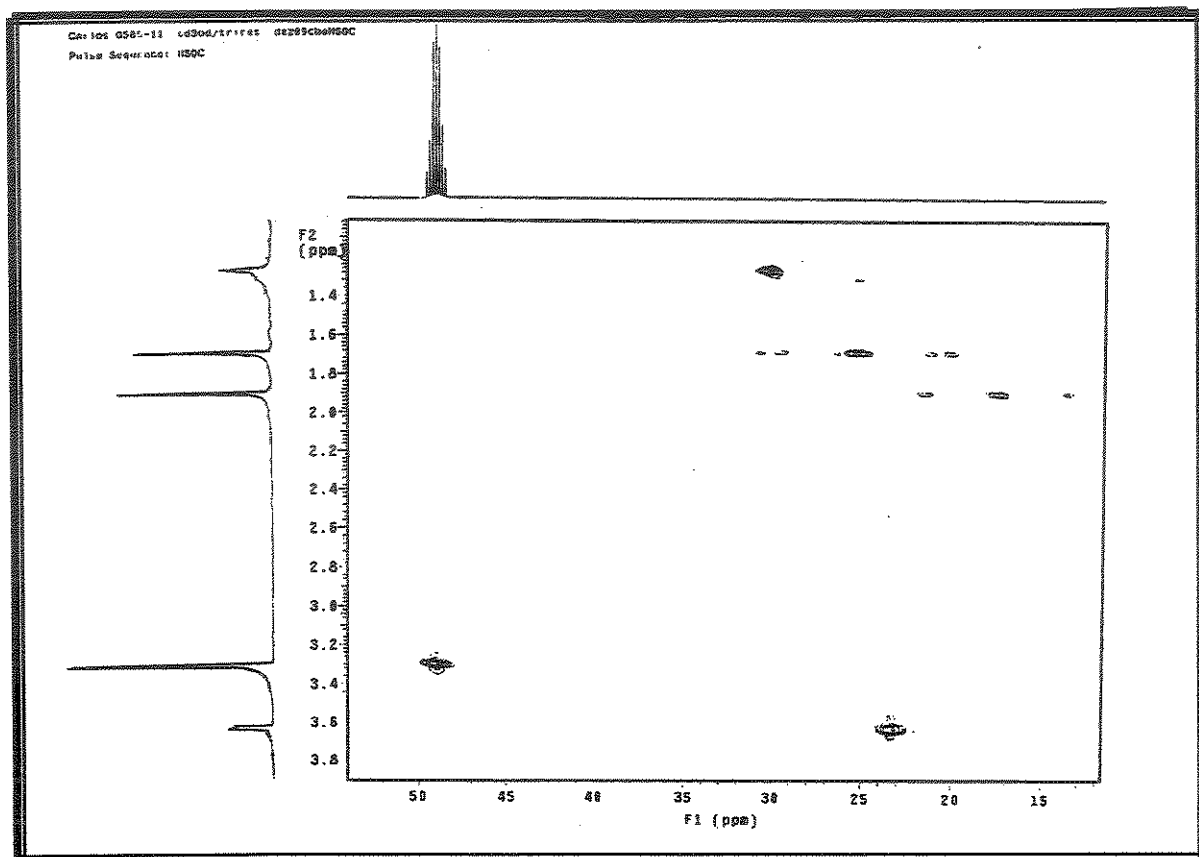
E.4.4. Espectro de DEPT (90° e 135°) do Cumestano III em CD₃OD
11,0 Tesla.



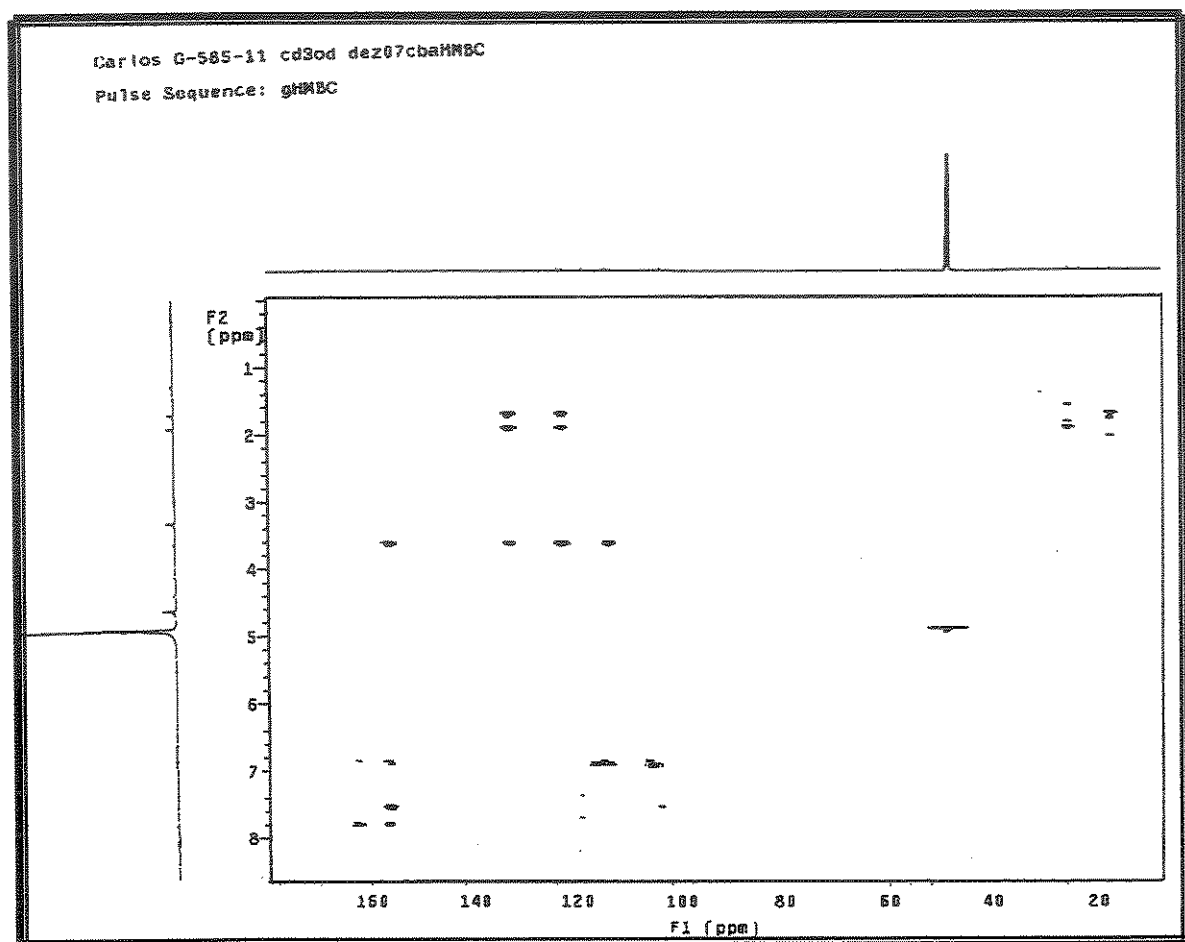
E.4.5.1 Expansão I do espectro de RMN em HSQC do Cumestano III em CD₃OD
11,0 Tesla.



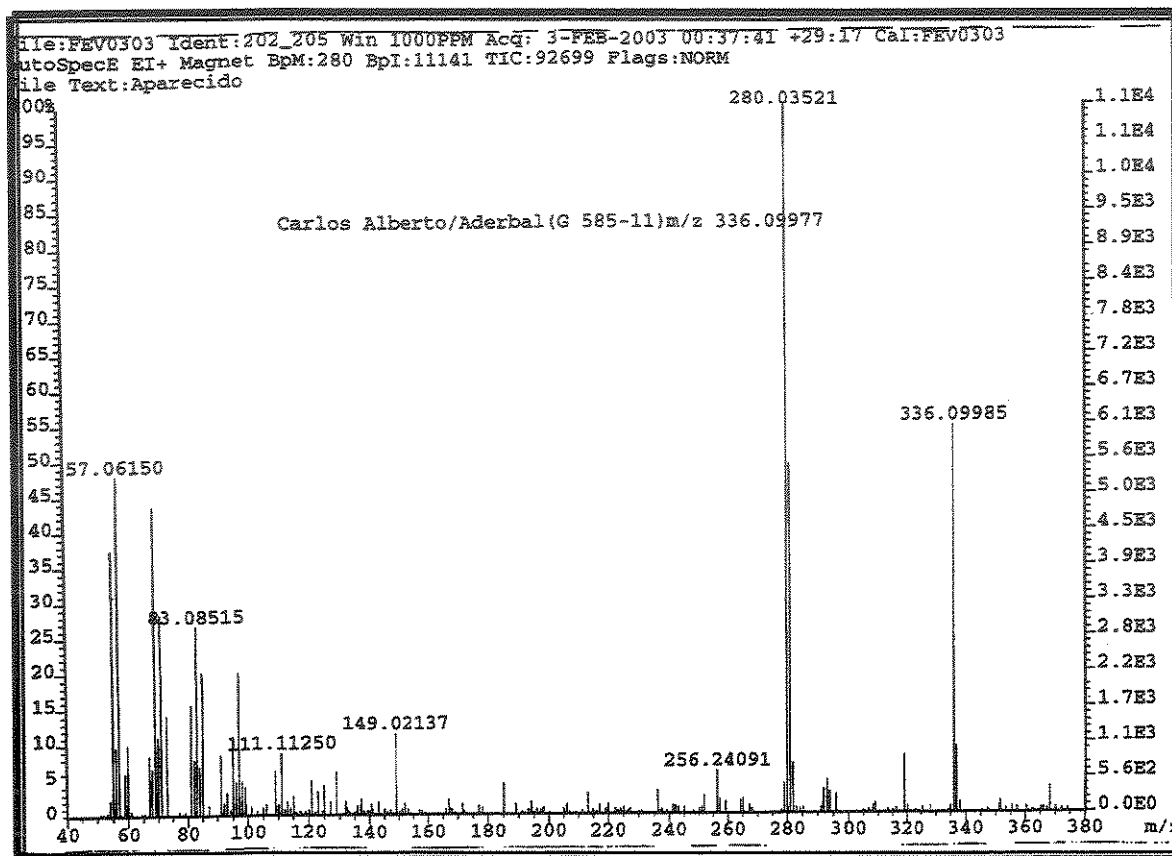
E.4.5.2 Expansão II do espectro de RMN em HSQC do Cumestano III em CD₃OD
11,0 Tesla.



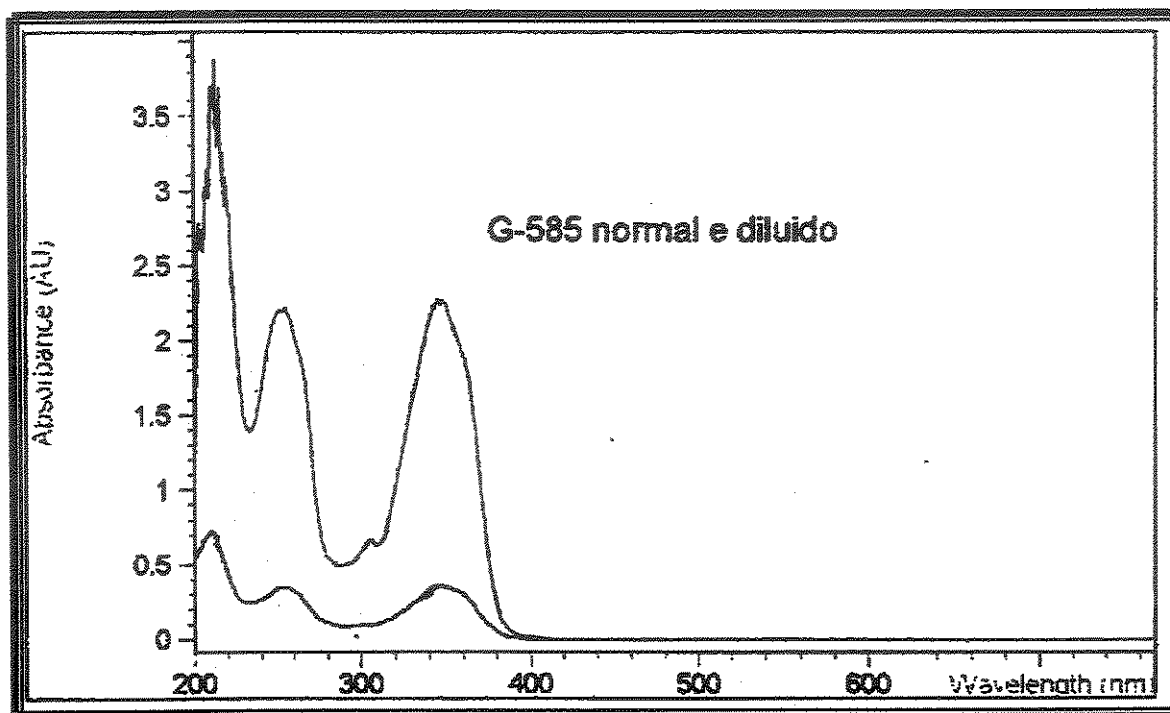
E.4.6. Espectro de RMN em HMBC do Cumestano III em CD_3OD , 11,0 Tesla.



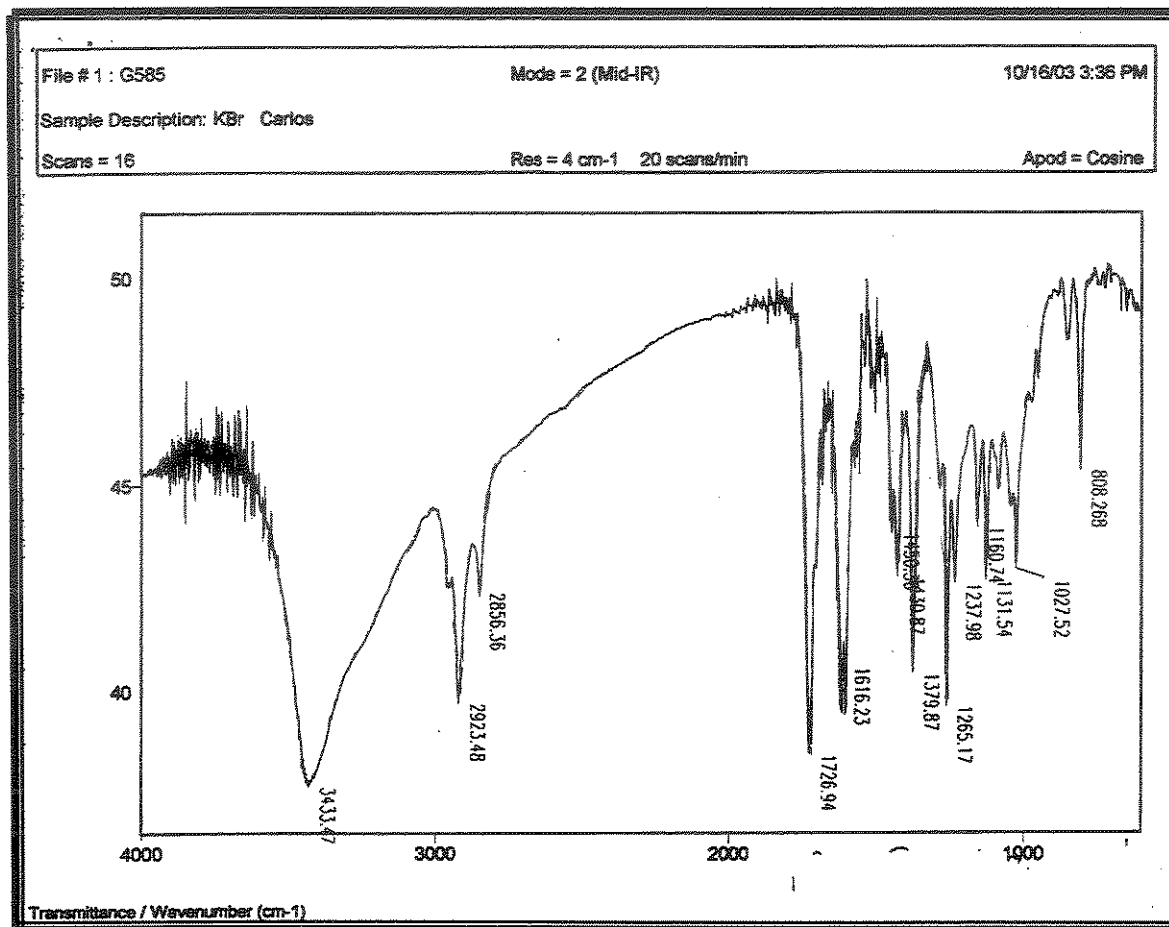
E.4.8. Espectro de massas de alta resolução do Cumestano III.



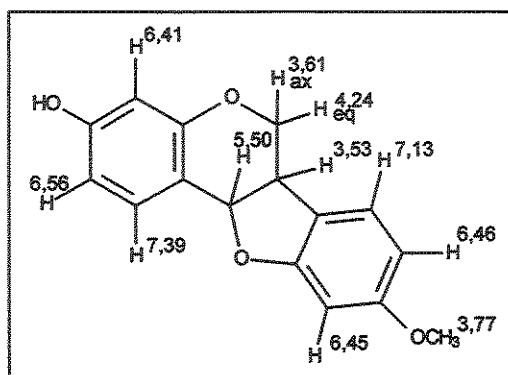
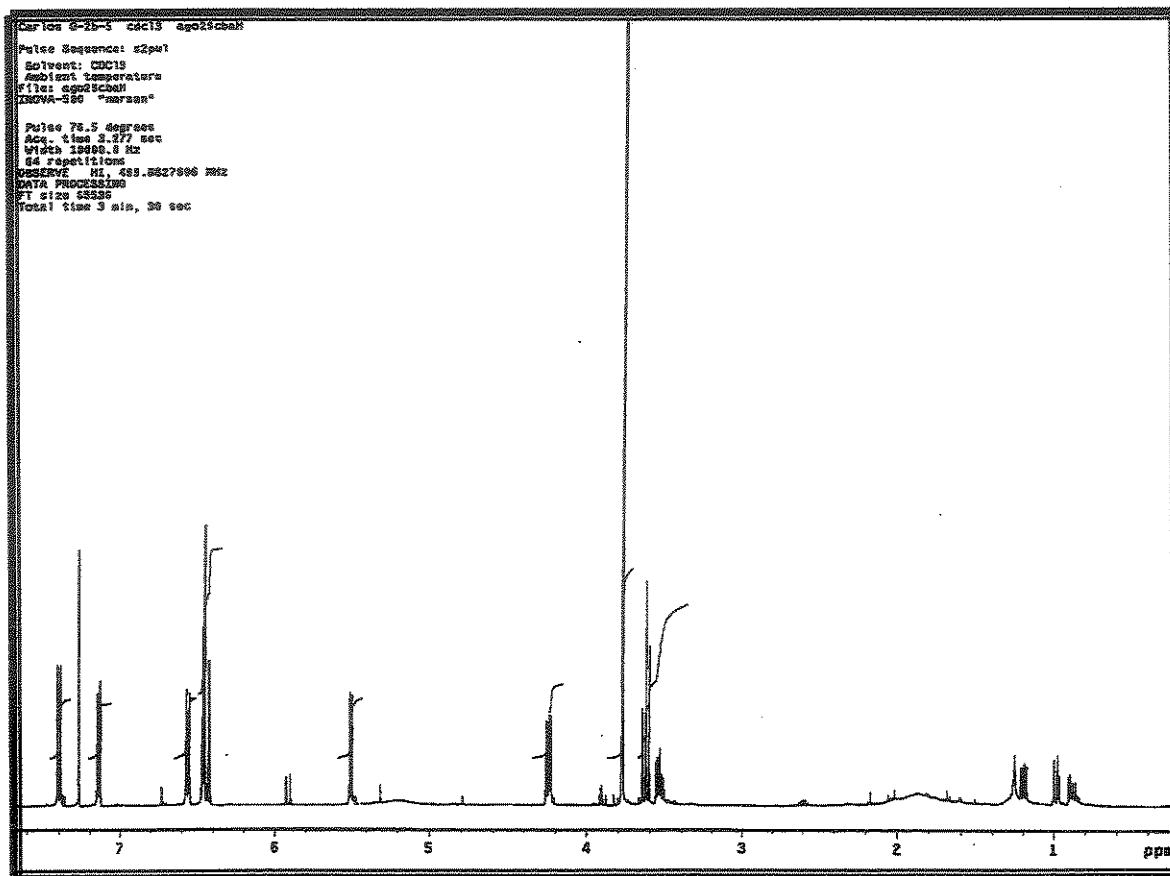
E.4.9. Espectro de U.V. do Cumestano III em metanol.



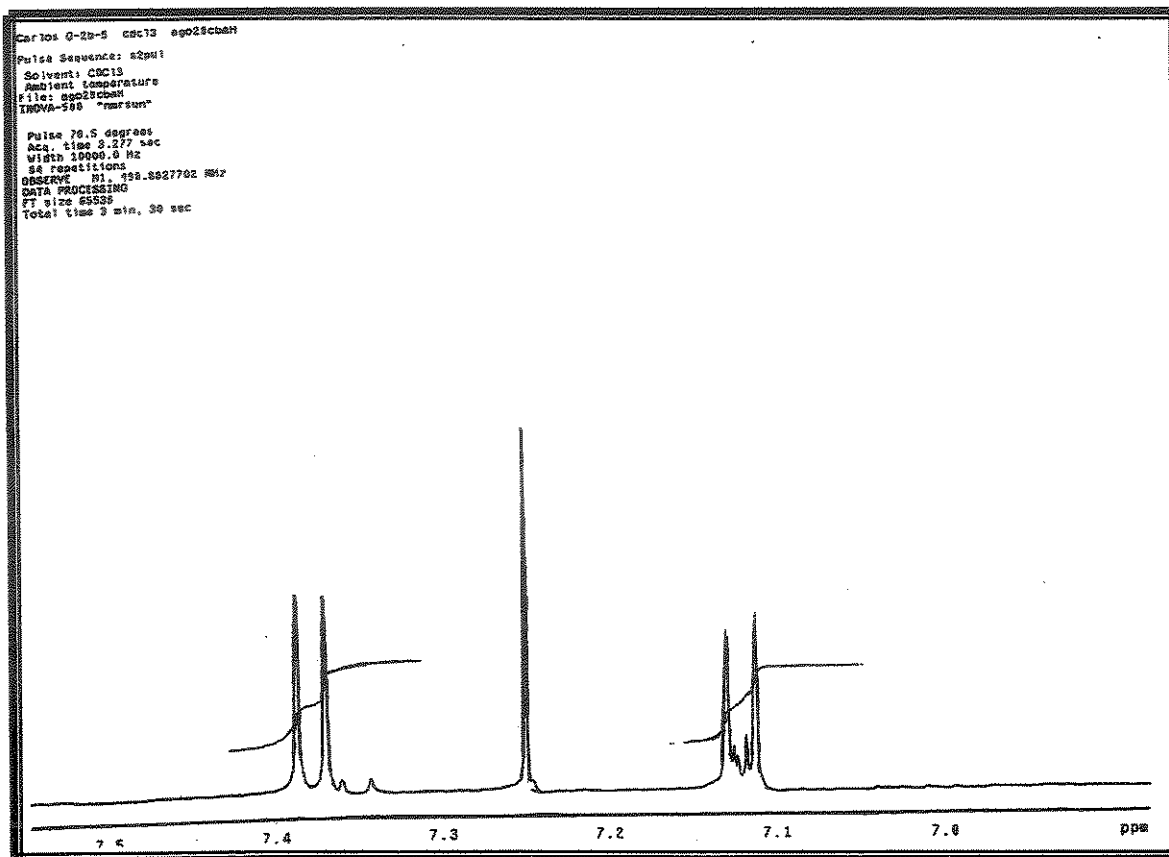
E.4.10 Espectro de I. V. do Cumestano III em KBr.



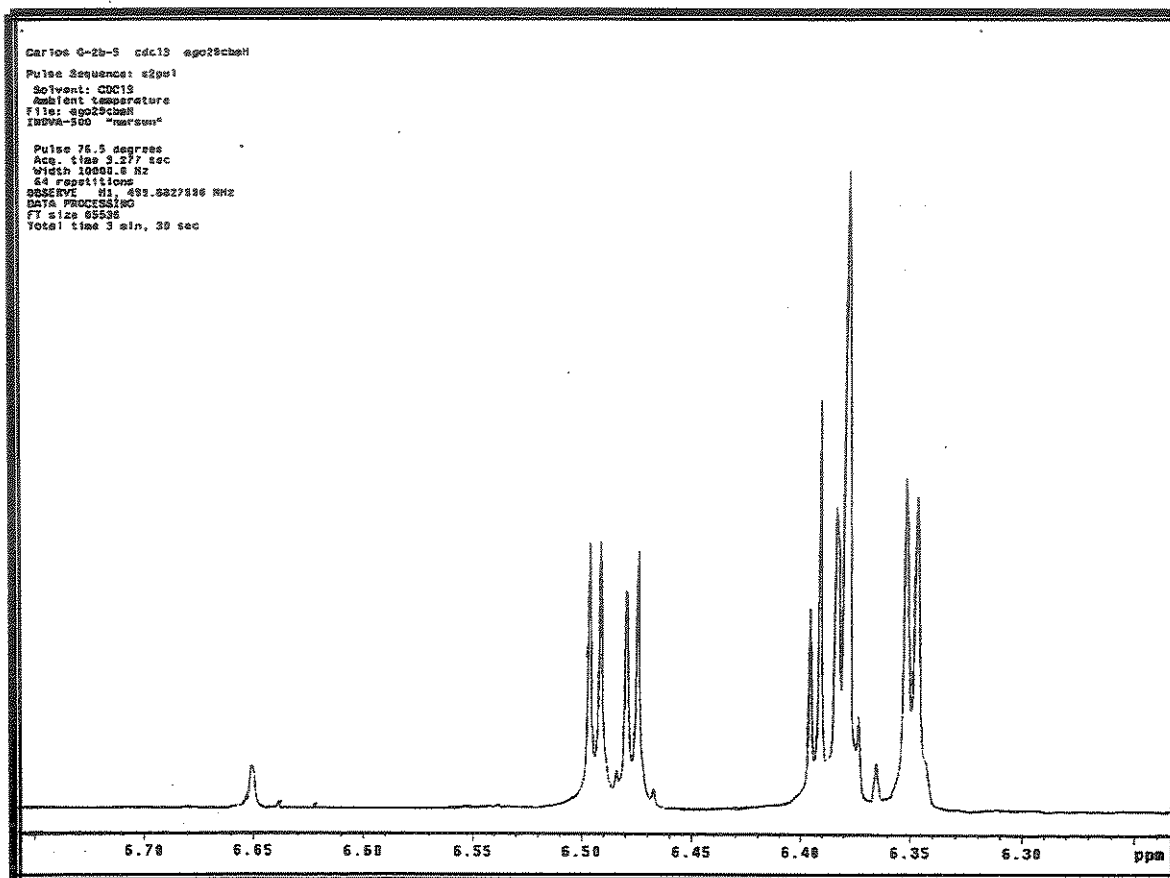
E.5.1.1. Espectro de RMN de ^1H do Pterocarpano I, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



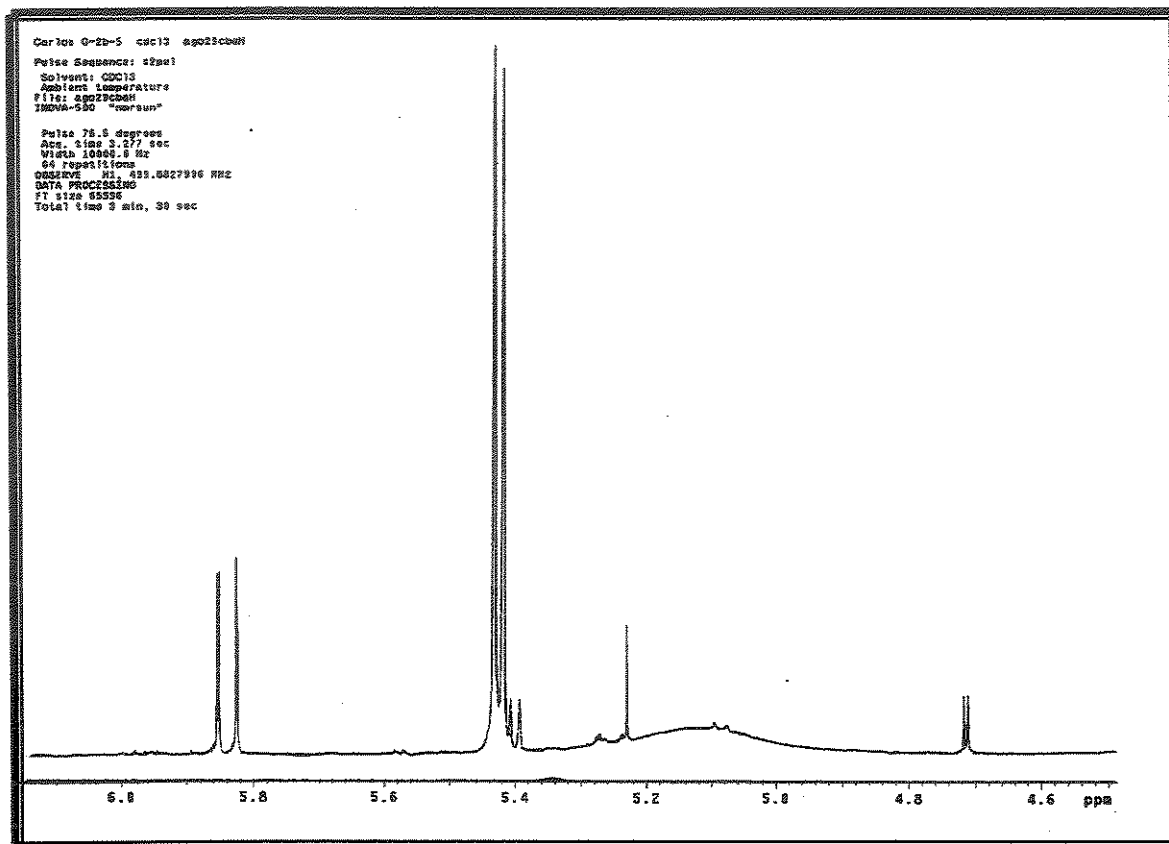
E.5.1.2. Expansão I do espectro de RMN de ^1H do Pterocarpano I, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



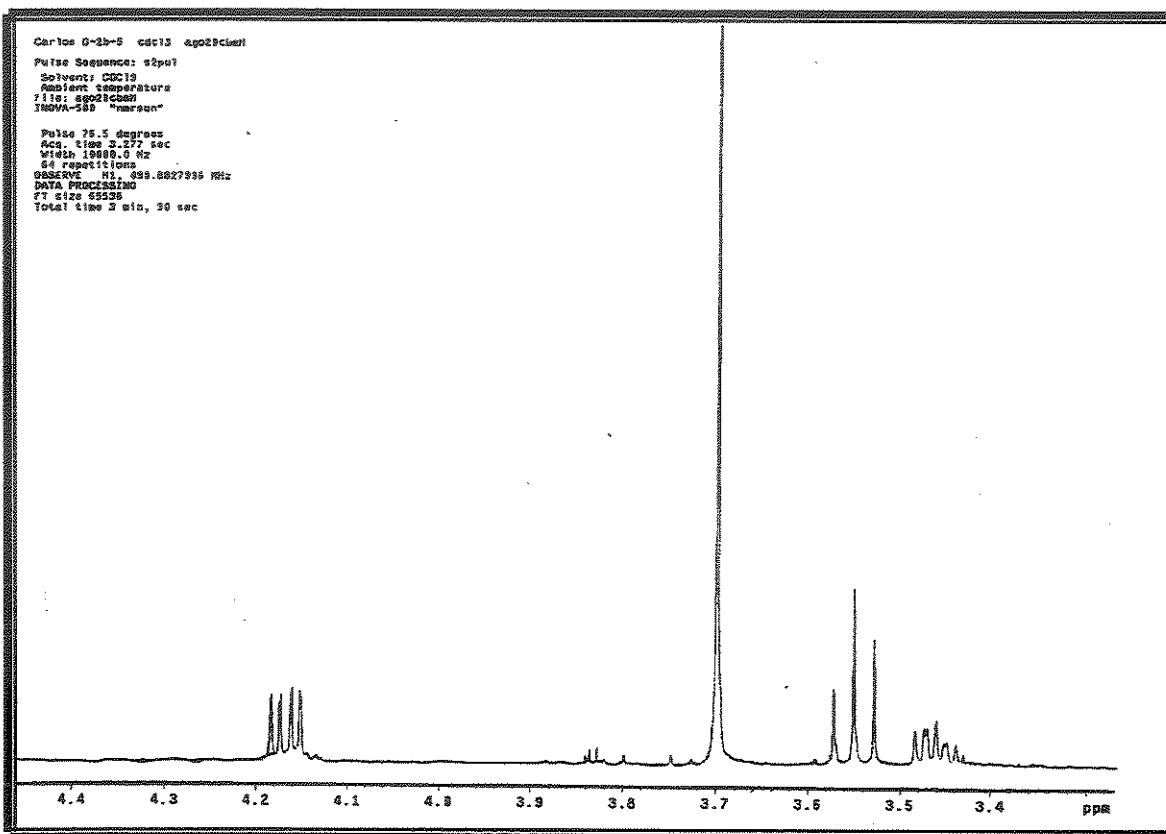
E.5.1.3. Expansão II do espectro de RMN de ^1H do Pterocarpano I, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



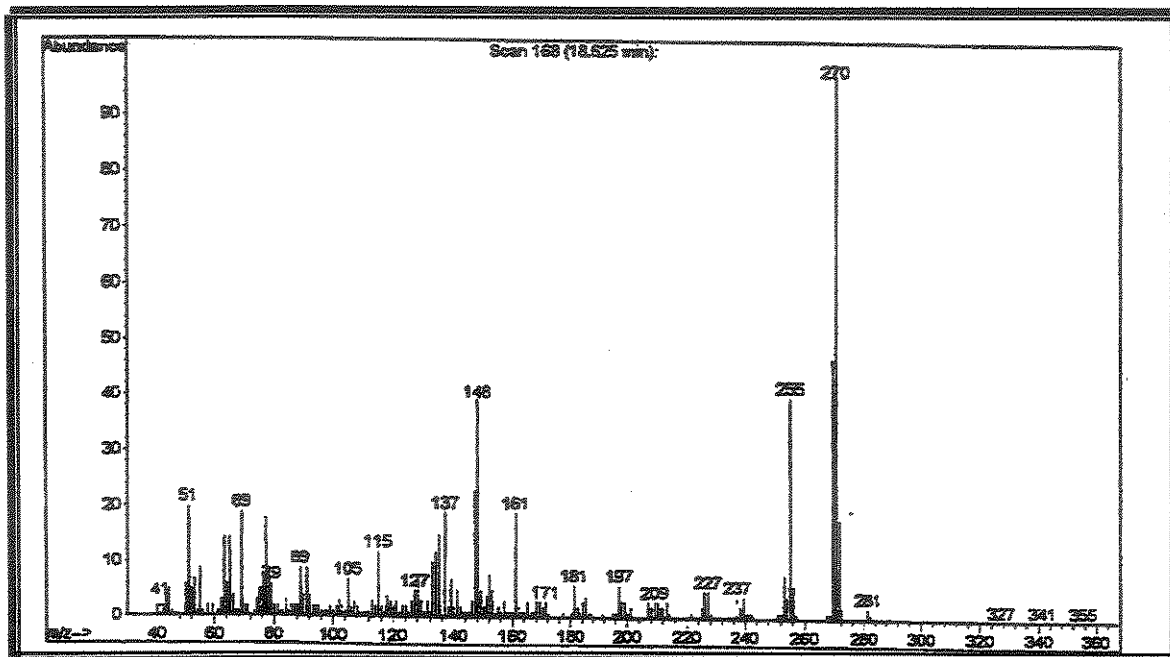
E.5.1.4. Expansão III do espectro de RMN de ^1H do Pterocarpano I, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



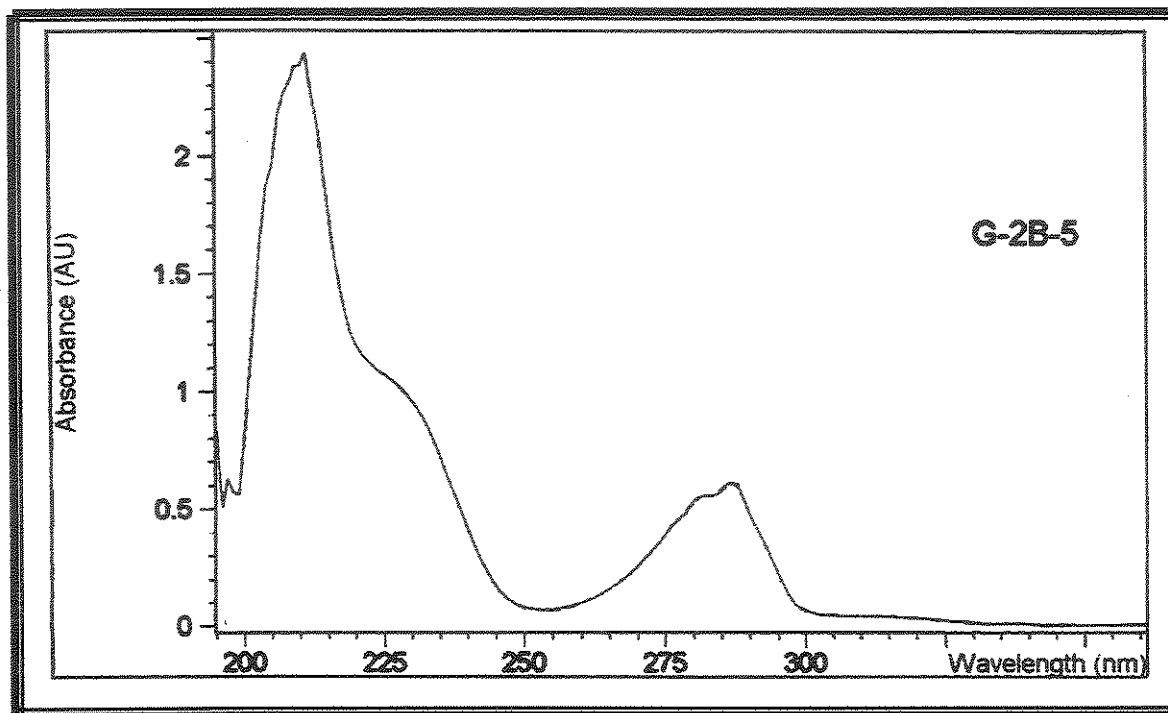
E.5.1.5. Expansão IV do espectro de RMN de ^1H do Pterocarpano I, CDCl_3 , 11,0 Tesla.



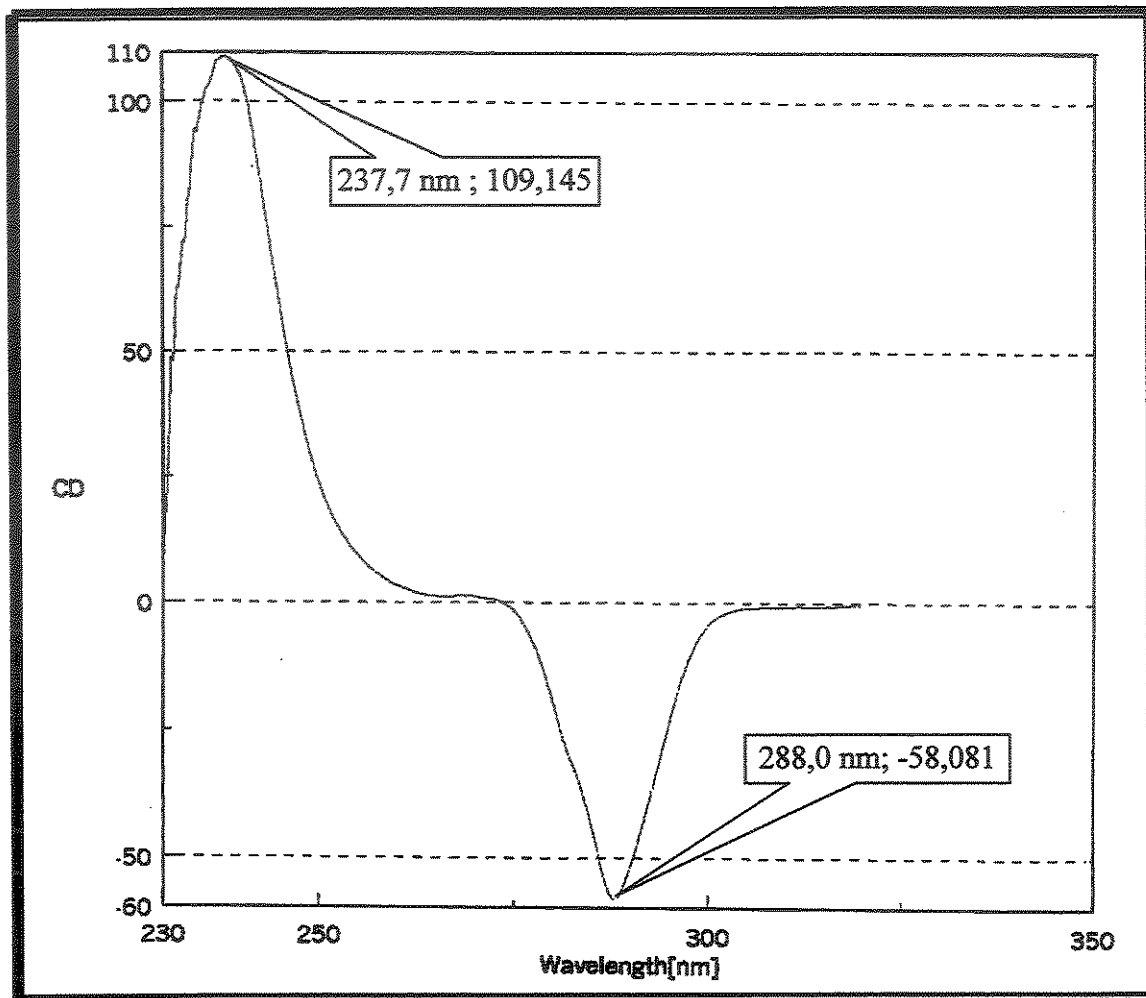
E.5.8 Espectro de massas (CG/EM) do Pterocarpano I.



E.5.9. Espectro de U.V. do Pterocarpano I em metanol.



C.5.1. Curva de ORD para o pterocarpano I (medicarpina) (em CHCl_3).



Amostra :	pterocarpano I (medicarpina).
Comprimento de cela :	0,1cm.
Concentração :	0,01 M.
Solvente :	Clorofórmio.
Temperatura:	22°C
Sensibilidade:	100 mdeg.
Resolução:	0,1 nm.
Acumulo:	9
Resposta:	1 s.
Velocidade	100 nm/min.

T.1 Dados de RMN de ^{13}C e HMBC (11,0 Tesla, CD_3OD) para a Isoflavona I.

Atribuição	$\delta\text{C/ppm}$	Tipo	Prótons Acoplados $\delta\text{H/ppm}$
2	156,4	CH	-
3	123,5	C_0	7,68(2J), 6,60(4J)
4	179,7	C_0	7,98(3J), 7,68(3J)
5	128,3	CH	-
6	116,0	CH	6,83(3J)
7	164,2	C_0	7,98(3J), 6,83(2J)
8	103,1	CH	6,90(3J)
9	159,7	C_0	7,98(3J), 6,83(2J)
10	118,0	C_0	6,90(3J)
1'	111,6	C_0	7,68(2J), 6,60(3J)
2'	150,7	C_0	-
3'	134,7	C_0	6,60(3J), 3,80(3J)
4'	150,8	C_0	6,60(2J)
5'	107,3	CH	-
6'	145,0	C_0	5,96(3J), 1,33(3J), 1,25(3J)
1''	42,9	C_0	6,60(3J), 5,96(2J), 4,68(3J), 4,56(3J), 1,33(2J), 1,25(2J)
2''	149,9	CH	4,68(2J), 4,56(2J), 1,33(3J), 1,25(3J)
3''	109,7	CH_2	-
Metilas	30,1	CH_3	5,96(3J)
	29,6	CH_3	5,96(3J)
Metoxila	60,7	$-\text{OCH}_3$	-

T.2 Dados de RMN de ^{13}C e HMBC (11,0 Tesla, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$) para o Cumestano I.

Atribuição	$\delta\text{C/ppm}$	Tipo	Prótons Acoplados $\delta\text{H/ppm}$
1	122,5	CH	-
2	113,8	CH	6,98(3J)
3	155,1	C_0	6,98(3J), 6,91(2J)
4	103,7	CH	-
4a	161,1	C_0	6,98(3J), 6,91(2J)
6	160,5	C_0	-
6a	103,0	C_0	7,73(3J)
6b	116,8	C_0	6,87(3J)
7	120,3	CH	-
8	114,3	CH	-
9	151,6	C_0	7,73(3J)
10	106,8	C_0	6,87(3J), 5,78(3J)
10a	151,1	C_0	7,73(3J), 6,84(3J)
11a	158,8	C_0	7,80(3J)
11b	105,0	C_0	6,98(2J), 6,91(3J)
2'	77,2	C_0	6,84(3J), 5,78(2J), 1,48(2J)
3'	131,5	CH	1,48(3J)
4'	115,2	CH	-
Metilas	27,6	CH_3	-

T.3 Dados de RMN de ^{13}C e HMBC (11,0 Tesla, CDCl_3) para o Cumestano II.

Atribuição	$\delta\text{C/ppm}$	Tipo	Prótons Acoplados $\delta\text{H/ppm}$
1	123,1	CH	-
2	113,4	CH	7,11(3J)
3	154,8	C_0	7,91(3J), 7,11(2J)
4	103,0	CH	-
4a	160,4	C_0	7,91(3J), 7,11(2J)
6	159,7	C_0	-
6a	104,3	C_0	7,16(4J)
6b	116,2	C_0	7,16(3J)
7	139,3	C_0	6,44(3J), 1,25(3J)
8	112,6	CH	1,25(4J)
9	145,5	C_0	7,16(2J)
10	129,9	C_0	7,16(3J), 4,24(3J)
10a	147,3	C_0	-
11a	157,8	C_0	-
11b	105,6	C_0	6,93(3J)
1'	42,6	C_0	7,16(3J), 6,44(2J), 4,75(3J), 4,26(3J), 1,25(2J)
2'	150,8	CH	4,75(2J), 4,26(2J), 1,25(3J)
3'	109,7	CH_2	1,25(4J)
Metilas	31,8	CH_3	6,44(3J)
Metoxila	61,4	OCH_3	-

T.4 Dados de RMN de ^{13}C e HMBC (11,0 Tesla, CD_3OD) para o Cumestano III.

Atribuição	$\delta\text{C/ppm}$	Tipo	Prótons Acoplados $\delta\text{H/ppm}$
1	123,6	CH	-
2	115,0	CH	6,79(3J)
3	156,6	C_0	6,84(3J), 6,79(2J)
4	104,2	CH	-
4a	162,8	C_0	6,79(2J)
6	161,6	C_0	-
6a	104,0	C_0	7,47(3J)
6b	116,3	C_0	6,82(3J)
7	119,0	CH	-
8	114,5	CH	-
9	155,7	C_0	6,82(2J), 3,55(3J)
10	113,9	C_0	6,82(3J), 3,55(2J)
10a	156,4	C_0	-
11a	160,7	C_0	-
11b	106,2	C_0	6,84(3J), 6,79(3J)
1'	23,6	CH_2	-
2'	122,8	CH	3,55(2J), 1,82(3J), 1,62(3J)
3'	133,0	C_0	3,55(3J), 1,82(2J), 1,62(2J)
Metila A	18,0	CH_3	5,29(3J)
Metila B	25,9	CH_3	5,29(3J)