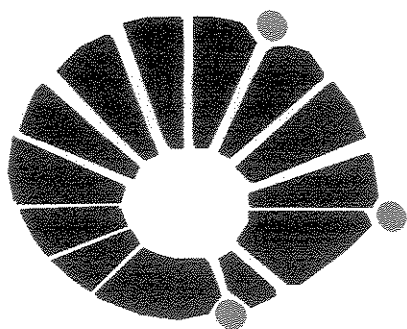




Universidade Estadual de Campinas – Unicamp
Instituto de Química – IQ
Departamento de Química Orgânica - DQO

Estudo Fitoquímico de Leguminosas:
Harleyodendron unifoliolatum e *Holocalyx balansae*.
Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica.

André Camargo de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada como pa
das exigências para conclusão do Doutora
em Química – Área de concentração: Quím
Orgânica.

Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães
Orientador

12 de Agosto de 2005
Campinas, São Paulo – Brasil.

BIBLIOTECA CENT
DESENVOLVIMET
COLEÇÃO
UNICAMP

IDADE	BC
CHAMADA	
	1/UNIVATP
	OL4e
EX	
ABO BCI	65761
IC.	6-86-05
C	☐
D	☒
CO	11.00
TA	30/9/05
PD	

21D - 365773

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

OL4e

Oliveira, André Camargo de.

Estudo Fitoquímico de Leguminosas: *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae*. Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica / André Camargo de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Aderbal Farias Magalhães.

Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Leguminosas. 2. Fitoquímica. 3. Atividade biológica. I. Magalhães, Aderbal Farias. II. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Phytochemical analysis of leguminosas: *Harleyodendron Unifoliolatum* Cowan e *Holocalyx Balansae* Micheli: isolation, structural elucidation and biological activities

Palavras-chaves em inglês: Phytochemical, Leguminosas, Biological activity

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Maria Renata de Mello Bonfati Borin, Dr. Nivaldo Boralle, Profa. Dra. Luzia Koike, Prof. Dr. Sebastião Ferreira Fonseca e Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães

Data de defesa: 12/08/2005

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

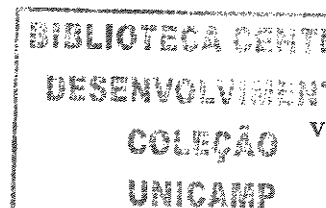
A Deus pela vida

*A minha esposa, Josimara, grande amor de minha vida
pelo amor, carinho e dedicação em todas as horas.*

*A meus pais, Lauro e Ana Lúcia,
pelo amor, carinho e constante presença.*

*A meu sogro Gabriel (in memoriam) e minha sogra Angelina,
minhas irmãs Maria Isabel (in memoriam) e Luciana,
minhas cunhadas Irene, Maria Aparecida e Nilza,
meus cunhados Antônio, José Marcelo, Paulo e Sebastião,
à todos os meus sobrinhos,
pela amizade, alegria e amor em todos os momentos.*

Eu dedico esta tese.



*“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que se gosta, mas em gostar daquilo
que se faz ”.*

Leonardo da Vinci.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães, pela excelente orientação, carinho confiança e, sobretudo, pela grande amizade e incentivo.

À Profa. Dra. Eva G. Magalhães, pelo apoio, incentivo e grande amizade.

À Profa. Dra. Ana Maria Goulart Azevedo Tozzi e aos Drs. André Amorim e Vidal de Freitas Mansano pelas valiosas informações, discussões botânicas e pela atenção sempre carinhosa.

À Profa. Dra. Anita Joceline Marsaioli, sua doutoranda Sra. Suzan Pantarotc e sua estagiária Andréa Bacci pela colaboração na realização dos ensaios de bioautografia, concentração inibitória mínima e pelo carinho dispensado.

Aos Profs. Drs. Luzia Koike, Paulo Mitsuo Imamura e Sebastião Ferreira Fonseca pelos vários auxílios prestados e pela grande amizade.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial às técnicas do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Sonia Crisóstomo e Sonia Fanelli, pelo excelente trabalho técnico e à Maria Lopez, anjo da guarda do laboratório, pela amizade e apoio técnico.

Aos amigos de grupo Ana Lúcia, Carlos Barbosa, Camila, Celira, Flávia, Lourdes, Maria del Pilar, Mary Ângela, Miriam e Valéria que acompanharam e incentivaram este trabalho.

Aos colegas de laboratório Adriana, Armando, Beatriz, Bira, Cláudio, Eduardo, Ísis, Laverde, Lucimar, Lu Chen, Luis Antônio, Marisa, Ricardo, Samísia, Sérgio, Susan e aos amigos Araceli, Carlos Queiroz, Jozelito, Madson, Marinaldo e Sidney pela convivência agradável.

A todos, que direta ou indiretamente, colaboraram para a elaboração deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

- **Ensino Médio (1988-1991):** Colégio XII de Outubro, São Paulo, SP.
- **Graduação: Química (1992-1996):** Instituto de Química-Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP.
- **Mestre em Química (1997-1999):** Dissertação: Triterpenos e Flavonóides isolados das folhas de *Chiococca brachiata* (Rubiaceae). Orientadora: Profa. Dra. Márcia Nasser Lopes. Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP.
- **Cursos Extracurriculares**
 1. “Bioensaios de bancada”. Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e Profa. Dra. Maria Cláudia Marx Young. Centro de Convenções de Salvador, maio/junho de 2004 (18h de duração).
- **Artigos:**
 1. Lopes M.N., Oliveira A.C., Bolzani V.S., Young M.C.M. 2004. Flavonoids of *Chiococca braquiata* (Rubiaceae). *Journal Brazilian Chemistry Society* **15** (4): p 468-471.
- **Participação em congressos:**
 1. XXIII RESEM, Apresentação de pôster, 2001.
 2. 26ª RASBQ, Apresentação de pôster: PN-222, 2003.
 3. XII SILAE, Apresentação de pôster, 2003.
 4. XXV RESEM, Apresentação de pôster, 2003.
 5. 27ª RASBQ, Apresentação de pôster: PN-163, 2004.
 6. XXVI Congresso Latinoamericano de Química, Apresentação de pôster: PN-163, 2004.

• **Resumos publicados em congressos:**

1. Magalhães A.F., Oliveira A.C., Magalhães E.G., Tozzi A.M.G.A. "Pterocarpanos isolados das raízes de *H. unifoliolatum* Cowan". *Instituto de Biologia-USP*, SP 2001.
2. Magalhães A.F., Oliveira A.C., Magalhães E.G., Tozzi A.M.G.A. "Novas isoflavanas isoladas do extrato clorofórmico das raízes de *H. unifoliolatum*". 26ª Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas-MG, 2003.
3. Magalhães A.F., Oliveira A.C., Magalhães E.G., Tozzi A.M.G.A. "Pterocarpanos e isoflavanas isoladas de *H. unifoliolatum* Cowan-avaliação da atividade citotóxica frente a *Artemia salina*"-XII SILAE-Faculdades Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.
4. Magalhães A.F., Oliveira A.C., Magalhães E.G., Barbosa C.A., Mansano V.F., Tozzi A.M.G.A. "Fitoquímica de *Harleyodendron* e *Lecointea* e sua contribuição à taxonomia"-XXV RESEM, Campos do Jordão, SP 2003.
5. Magalhães A.F., Oliveira A.C., Magalhães E.G., Tozzi A.M.G.A. "Bioautografia dos extratos e substâncias isoladas de *Harleyodendron unifoliolatum* Cowan"-27ª Reunião Anual da SBQ e XXVI Congresso Latinoamericano de Química- Salvador, BA 2004.

Estudo Fitoquímico de Leguminosas:

Harleyodendron unifoliolatum Cowan e *Holocalyx balansae* Micheli

Isolamento, Elucidação Estrutural e Atividade Biológica.

Resumo:

O estudo fitoquímico dos extratos das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* e de *Holocalyx balansae*, ambas pertencentes à família Leguminosae, resultou no isolamento de 9 isoflavonóides (4 pterocarpanos, 2 isoflavanos e 3 isoflavanonas) e um fitoesteróide sendo que 7 isoflavonóides são descritos pela primeira vez. As estruturas moleculares foram elucidadas através de análises espectrais (UV, IV, RMN e EMAR) na qual a espectroscopia RMN foi explorada através de RMN ^1H , RMN ^{13}C (incluindo DEPT 90° e 135°), RMN-2D (gCOSY, HSQC, gHMBC) e experimentos NOESY-1D. A atividade antimicrobiana dos isoflavonóides (1-9) foi examinada através de bioautografia contra oito espécies de fungos (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium funiculosum* e *Rhizopus oryzae*) e seis espécies de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*), em que encontrou-se que 1 foi ativo contra os fungos *Alternaria alternata* e *Penicillium funiculosum*; 2 foi ativo contra a bactéria *Escherichia coli* e contra o fungo *Aspergillus niger*; 3 e 6 foram ativos contra a bactéria *Bacillus subtilis* e os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Rizophus orizae*; 5 e 7 foram ativos contra as bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e o fungo *Penicillium funiculosum*. O perfil flavonoídico fornecido pelas espécies analisadas neste trabalho corrobora com sua alocação na tribo Swartzieae, como foi recentemente proposto por A.M.G.A. Tozzi baseado em morfologia.

Phytochemical analysis of Leguminosae:

Harleyodendron unifoliolatum Cowan e *Holocalyx balansae* Micheli

Isolation, Structural Elucidation and Biological Activities.

Abstract:

The phytochemical study of roots extracts from *Harleyodendron unifoliolatum* and *Holocalyx balansae*, both belonging to the family Leguminosae, resulted in the isolation of nine isoflavonoids (four pterocarpanes, two isoflavans and three isoflavanones) and one phytosteroid being that seven isoflavonoids are now described for the first time. The molecular structures were elucidated through spectra analysis (UV, IR, NMR and HREIMS) when NMR spectroscopy was explored through ^1H NMR, ^{13}C NMR (including DEPT 90° and 135°), 2D-NMR (gCOSY, HSQC, gHMBC) and NOESY-1D experiments. The antimicrobial activity of the isoflavonoids (1-9) was screened through bioautography against eight species of fungi (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium funiculosum* and *Rhizopus orizae*) and six species of bacteria (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*), when it was found that 1 was active against fungi *Alternaria alternata* and *Penicillium funiculosum*; 2 was active against bacteria *Escherichia coli* and fungus *Aspergillus niger*; 3 and 6 were active against bacteria *Bacillus subtilis* and fungi *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus orizae*, 5 and 7 was active against bacteria *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* and fungus *Penicillium funiculosum*. The flavonoid profile furnished by the plant species analysed in this work corroborate with their allocation in the tribe Swartzieae as it has been recently proposed by A.M.G.A. Tozzi based on morphology.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxvi
LISTA DE ESQUEMAS	xxviii
LISTA DE FLUXOGRAMAS	xxviii
LISTA DE QUADROS	xxix
LISTA DE ESPECTROS	xxx
 <u>INTRODUÇÃO</u>	 1
1. Introdução.....	3
1.1. A tribo Swartzieae	5
1.2. O gênero <i>Harleyodendron</i>	10
1.3. O gênero <i>Holocalyx</i>	13
2. Objetivos.....	16
 <u>CAPÍTULO I. ESTUDO FITOQUÍMICO</u>	 19
I.1. Introdução	21
I.2. Materiais e Métodos	22
I.2.1. Generalidades metodológicas	22
I.2.2. Obtenção dos Extratos	23
I.3. Estudo do extrato clorofórmico de <i>Harleyodendron</i> <i>unifoliolatum</i>	26
I.3.1. Isolamento da medicarpina (1)	29
I.3.2. Isolamento do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2)	31
I.3.3. Isolamento da 7,8-diidroxi-2'-metoxi-[(4',5':5'',6'')-2'',2''- dimetilpirano] isoflavana (3).....	33

I.3.4.	Isolamento da 5,2'-diidroxi-[(6,7:5'',6'')-2'',2'' dimetilpirano]-4'-metoxi isoflavanona (4)	35
I.3.5.	Preparação da isoflavanona acetilada (4a)	37
I.3.6.	Isolamento do 4,9-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2'' dimetilpirano] pterocarpano (5)	39
I.3.7.	Isolamento da 7,2'-diidroxi-8,5'-dimetoxi isoflavana (6)	41
I.4.	Estudo do extrato hexânico de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	42
I.4.1.	Isolamento do 9,10-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2'' dimetilpirano] pterocarpano (7)	45
I.5.	Estudo do extrato hexânico de <i>Holocalyx balansae</i>	47
I.5.1.	Isolamento da 5,7-diidroxi-2',4'-dimetoxi-6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (8)	48
I.5.2.	Isolamento da 5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (9)	50
I.5.3.	Isolamento do estigmasterol (10)	52
II.	Resultados e discussão	53
II.1.	Isolamento dos metabólitos secundários	53
II.1.1.	Identificação estrutural das substâncias conhecidas na literatura	55
II.1.1.1.	Identificação estrutural dos pterocarpanos medicarpina (1), 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2) e do esteróide estigmasterol (10)	55
APÊNDICE A		60
II.1.2.	Identificação estrutural das substâncias inéditas 3-9.....	67
II.1.2.1.	Determinação estrutural da 7,8-diidroxi-2'-metoxi-[(4',5':5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] isoflavana (3)	67

II.1.2.2. Determinação estrutural da 5,2'-diidroxi-[(6,7:5'',6'')- 2'',2''dimetilpirano]-4'-metoxi isoflavanona (4)	71
II.1.2.3. Determinação estrutural 4,9-diidroxi-[(2,3:5'',6'')- 2'',2'' dimetilpirano] pterocarpano (5)	73
II.1.2.4. Determinação estrutural da 7,2'-diidroxi-8,5'-dimetoxi isoflavona (6)	76
II.1.2.5. Determinação estrutural do 9,10-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] pterocarpano (7)	79
II.1.2.6. Determinação estrutural da 5,7-diidroxi-2',4'-dimetoxi-6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (8)	81
II.1.2.7. Determinação estrutural da 5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi- 6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (9)	84
APÊNDICE B	87
 <u>CAPÍTULO II. ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA</u>	99
II.1. Os Flavonóides	102
II.2. Os Isoflavonóides	104
II.2.1. As Isoflavanas	107
II.2.2. As Isoflavanonas	108
II.2.3. Os Pterocarpanos	109
II.2.4. As Isoflavonas	111
II.3. Metabólitos Especiais & Evolução Vegetal	114
II.3.1. Disparidade (substituição de vias metabólicas)	114
II.3.2. Diversidade causada pelo incremento no nível oxidativo	

dos produtos de cada categoria metabólica (Teoria Redox)	115
II.3.3. Utilidade e Cálculo de Índices Químicos	116
II.4. Análise Quimiotaxonômica do Ramo <i>Lecointea</i> por Marcadores Químicos	117
II.4.1. Cálculos de índice de oxidação para os isoflavonóides	119
II.4.2. Cálculos de índice de metilação para os isoflavonóides	119
<u>CAPÍTULO III. ENSAIOS BIOLÓGICOS</u>	121
III.1. Introdução	123
III.2. Materiais e métodos	125
III.2.1. Letalidade com <i>Artemia salina</i>	125
III.2.2. Bioautografia	128
III.2.3. Concentração inibitória mínima (CIM)	130
III.3. Resultados e discussão	131
III.3.1. Letalidade com <i>Artemia salina</i>	131
III.3.2. Bioautografia	132
III.3.3. Concentração inibitória mínima (CIM)	136
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	139
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	143
ESPECTROS	153

ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

BST	Brine Shrimp Letality Test
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CCT	Culture Collection Tropical
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CL₅₀	Concentração Letal
CIM	Concentração Inibitória Mínima
gCOSY	Correlated Spectroscopy
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
<i>ddd</i>	Duplo-duplo-dubleto
DEPT	Distortionsless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
δ	Deslocamento químico em partes por milhão do hidrogênio e carbon
E.	Espectro
EM	Espectro de massas
EMAR	Espectro de massas de alta resolução

Et₂O	Éter dietílico
gHMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipeto
M⁺·	Íon molecular
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
n.O.e.	Nuclear Overhauser effect
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
V_F	Volume final

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I. ESTUDO FITOQUÍMICO

Tabela 1 -	Tratamento cromatográfico do extrato clorofórmico das raízes de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	27
Tabela 2 -	Tratamento cromatográfico do extrato hexânico das raízes de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	43
Tabela 3 -	Tratamento cromatográfico dos grupos 5 e 6 do extrato hexânico das raízes de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	44
Tabela 4 -	Tratamento cromatográfico do extrato hexânico de <i>Holocalyx balansae</i>	47
Tabela 5 -	Dados de RMN ^1H (7,0 T, CDCl_3) da medicarpina (1).....	60
Tabela 6 -	Dados de RMN ^{13}C (7,0 T, CDCl_3) da medicarpina (1).....	61
Tabela 7 -	Dados de RMN ^1H (11,0 T, CDCl_3) do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2).....	62
Tabela 8 -	Dados de RMN ^{13}C (11,0 T, CDCl_3) do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2).....	63
Tabela 9 -	Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC (11,0 T, CDCl_3) do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2)	64
Tabela 10 -	Dados de RMN ^1H (7,0 T, CDCl_3) do estigmasterol (10).....	65
Tabela 11 -	Dados de RMN ^{13}C (11,0 T, CDCl_3) do estigmasterol (10)....	66
Tabela 12 -	Dados de RMN ^1H (11,0 T, CDCl_3) da isoflavana (3).....	87
Tabela 13 -	Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC (11,0 T, CDCl_3) da isoflavana (3).....	88
Tabela 14 -	Dados de RMN ^1H (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona (4).....	89
Tabela 15 -	Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC	

(11,0 T, CDCl ₃) da isoflavanona (4).....	89
Tabela 16 - Dados de RMN ¹ H (11,0 T, CDCl ₃) da isoflavanona acetilada (4a).....	90
Tabela 17 - Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC (11,0 T, CDCl ₃) da isoflavanona acetilada (4a).....	90
Tabela 18 - Dados de RMN ¹ H (11,0 T, CDCl ₃) do pterocarpano (5).....	91
Tabela 19 - Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC (11,0 T, CDCl ₃) do pterocarpano (5).....	91
Tabela 20 - Dados de RMN ¹ H (11,0 T, CDCl ₃) da isoflavana (6).....	92
Tabela 21 - Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC (11,0 T, CDCl ₃) da isoflavana (6).....	92
Tabela 22 - Dados de RMN ¹³ C (11,0 T, CDCl ₃) das isoflavanos (3) e (6)	93
Tabela 23 - Dados de RMN ¹ H (11,0 T, CDCl ₃) do pterocarpano (7).....	94
Tabela 24 - Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC (11,0 T, CDCl ₃) do pterocarpano (7).....	94
Tabela 25 - Dados de RMN ¹³ C (11,0 T, CDCl ₃) dos pterocarpanos (5) e (7).....	95
Tabela 26 - Dados de RMN ¹ H (11,0 T, CDCl ₃) da isoflavanona (8).....	96
Tabela 27 - Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC (11,0 T, CDCl ₃) da isoflavanona (8).....	96
Tabela 28 - Dados de RMN ¹ H (11,0 T, CDCl ₃) da isoflavanona (9).....	97
Tabela 29 - Correlações observadas nos espectros de HSQC e gHMBC (11,0 T, CDCl ₃) da isoflavanona (9).....	97
Tabela 30 - Dados de RMN ¹³ C (11,0 T, CDCl ₃) das isoflavanonas (4), (4a), (8) e (9).....	98

CAPÍTULO II. ANÁLISE QUIMIOTAXONOMICA

Tabela 31 - Principais classes de compostos fenólicos	105
Tabela 32 - Isoflavonóides encontrados em plantas terrestres: em plantas Leguminosas	107
Tabela 33 - Isoflavonóides encontrados em plantas terrestres: em plantas não Leguminosas	108

CAPÍTULO III. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Tabela 34 - Resultados do ensaio com <i>Artemia salina</i> com os extratos das raízes de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i> e <i>Holocalyx balansae</i>	131
Tabela 35 - Resultados do ensaio com <i>Artemia salina</i> com as substâncias isoladas de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i> e <i>Holocalyx balansae</i>	132
Tabela 36 - Ensaios de bioautografia realizados com os extratos de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i> e <i>Holocalyx balansae</i>	133
Tabela 37- Ensaios de bioautografia realizados com as substâncias isoladas de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i> e <i>Holocalyx balansae</i>	134
Tabela 38- Concentração inibitória mínima (CIM) realizados com as substâncias 1 e 2 isoladas de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	136

LISTA DE FIGURAS

	Página
<u>INTRODUÇÃO</u>	
Figura 1 - Detalhe da folha de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	11
Figura 2 - Detalhes das flores de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	12
Figura 3 - Detalhes da espécie <i>Holocalyx balansae</i>	15
Figura 4 - Detalhes das folhas de <i>Holocalyx balansae</i>	16
 <u>CAPÍTULO I. ESTUDO FITOQUÍMICO</u>	
Figura 5 - CCDC (Hexano:AcOEt:CH ₂ Cl ₂ 1:1:2, v/v) de alguns grupos de frações reunidas da CC do extrato clorofórmico.	28
Figura 6 - CCDC (Hexano:CH ₂ Cl ₂ 1:1, v/v) dos grupos finais de frações reunidas da CC do extrato clorofórmico.....	28
Figura 7 - CCDC (Ciclohexano/AcOEt 20%, v/v , 2x eluído) de alguns grupos de fração reunidas da CC do extrato hexânico.....	45
Figura 8 - Substâncias isoladas de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i> e <i>Holocalyx balansae</i>	53
Figura 9 - Propostas estruturais para a substância 2.....	58
Figura 10 - Incrementos de n.O.e. observados para o pterocarpano 2.....	59
Figura 11 - Incrementos de n.O.e. observados para a isoflavana 3.....	69
Figura 12 - Estruturas das substâncias faseolinaisoflavana (IV) e erythbidina A (V).....	69
Figura 13 - Incrementos de n.O.e. observados para o pterocarpano 5.....	75
Figura 14 - Incrementos de n.O.e. observados para a isoflavana 6.....	77
Figura 15 - Algumas correlações do espectro de gHMBC (H-C, ³ J)	

	para a substância 8.....	82
Figura 16-	Algumas correlações do espectro de gHMBC ($H,C, {}^3J$) para a substância 9.....	85

CAPÍTULO II. ANÁLISE QUIMIOTAXONOMICA

Figura 17 -	Origem biossintética dos flavonóides 5-hidróxi e 5-desóxi .	103
Figura 18 -	Mecanismo de migração 1-2 do anel aromático	105
Figura 19 -	Derivados biossintéticos das isoflavonas	106
Figura 20 -	Estrutura da isoflavana arizonicanol A	107
Figura 21 -	Estrutura básica das isoflavanonas	109
Figura 22 -	Principais classes de pterocarpanos	110
Figura 23 -	As principais isoflavonas encontradas na soja	113
Figura 24 -	Substâncias isoladas de <i>Zollernia paraensis</i> (VII-XV) e <i>Lecointea hatschbachii</i> (XVI-XIX)	118
Figura 25 -	Precursor utilizado neste trabalho para os cálculos apresentados	119

CAPÍTULO III. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Figura 26 -	Antibióticos padrões empregados.....	129
Figura 27 -	Bioautografia – Substâncias isoladas Bactéria: <i>Bacillus subtilis</i>	135
Figura 28 -	Bioautografia – Extratos de <i>Harleyodendron unifoliolatum</i> Fungo: <i>Aspergillus fumigatus</i>	135
Figura 29 -	CIM – <i>Aspergillus niger</i> CCT 1435.....	137
Figura 30 -	CIM – <i>Staphilococcus aureus</i> CCT 4295.....	137

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
<u>INTRODUÇÃO</u>	
Esquema 1 - Classificação botânica das sub-famílias de Leguminosae....	4
Esquema 2 - Organização da tribo Swartzieae segundo Cowan.....	7
Esquema 3- Organização da tribo Swartzieae segundo Polhill.....	8
Esquema 4- Organização das tribos Swartzieae e Sophoreae segundo Pennington.....	9
<u>CAPÍTULO III-ENSAIOS BIOLÓGICOS</u>	
Esquema 5- Procedimento para diluição da amostra no teste contra <i>Artemia salina</i>	127
Esquema 6- Procedimento do teste contra <i>Artemia salina</i>	127

LISTA DE FLUXOGRAMAS

CAPÍTULO I-ESTUDO FITOQUÍMICO

Fluxograma 1 - Obtenção dos extratos das raízes de <i>Harleyodendron</i> <i>unifoliolatum</i> Cowan	25
Fluxograma 2 - Obtenção dos extratos das raízes de <i>Holocalyx</i> <i>balansae</i> Micheli	25
Fluxograma 3 - Fluxograma de isolamento da medicarpina (1).....	29
Fluxograma 4 - Fluxograma de isolamento do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi- pterocarpano (2).....	31
Fluxograma 5 - Fluxograma de isolamento da isoflavana (3).....	33
Fluxograma 6 - Fluxograma de isolamento da isoflavanona (4).....	35
Fluxograma 7 - Fluxograma de preparação e purificação da	

isoflavanona acetilada (4a).....	37
Fluxograma 8 - Fluxograma de isolamento do pterocarpano (5).....	39
Fluxograma 9 - Fluxograma de isolamento da isoflavana (6).....	41
Fluxograma 10 - Fluxograma de isolamento do pterocarpano (7).....	45
Fluxograma 11 - Fluxograma de isolamento da isoflavanona (8).....	48
Fluxograma 12- Fluxograma de isolamento da isoflavanona (9).....	50
Fluxograma 13- Fluxograma de isolamento do estigmasterol (10).....	52

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I-ESTUDO FITOQUÍMICO

Quadro 1 - Substâncias isoladas das folhas de <i>Holocalyx balansae</i>	21
Quadro 2 - Proposta de fragmentação para o pterocarpano medicarpina	56
Quadro 3 - Proposta de fragmentação para o pterocarpano 2.....	58
Quadro 4 - Proposta de fragmentação para a substância 3.....	70
Quadro 5 - Proposta de fragmentação para a substância 4.....	73
Quadro 6 - Proposta de fragmentação para a substância 5.....	75
Quadro 7 - Proposta de fragmentação para a substância 6.....	78
Quadro 8 - Proposta de fragmentação para a substância 7.....	80
Quadro 9 - Proposta de fragmentação para a substância 8.....	83
Quadro 10 - Propostas de fragmentação para a substância 9.....	86

LISTA DE ESPECTROS

CAPÍTULO I-ESTUDO FITOQUÍMICO

E.1.	Espectro na região do UV para o pterocarpano 1.....	155
E.2.	Espectro na região do IV para o pterocarpano 1.....	155
E.3.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) para o pterocarpano 1.....	156
E.4.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 7,0 T) para o pterocarpano 1.....	156
E.5.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 7,0 T) para o pterocarpano 1.....	157
E.6.	Espectro de massas de baixa resolução para o pterocarpano 1.....	157
E.7.	Espectro na região do UV para o pterocarpano 2.....	158
E.8.	Espectro na região do IV para o pterocarpano 2.....	158
E.9.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.....	159
E.10.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.....	159
E.11.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.....	160
E.12.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.....	160
E.13.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.....	161
E.14.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.....	161
E.15.	Experimento NOESY-1D (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.....	162
E.16.	Espectro de massas de alta resolução para o pterocarpano 2.....	162
E.17.	Espectro na região do UV para a isoflavana 3.....	163

E.18.	Espectro na região do IV para a isoflavana 3.....	163
E.19.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.....	164
E.20.	Expansão do espectro anterior.....	164
E.21.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.....	165
E.22.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.....	165
E.23.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.....	166
E.24.	Expansão do espectro anterior.....	166
E.25.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.....	167
E.26.	Expansão do espectro anterior.....	167
E.27.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.....	168
E.28a.	Experimento NOESY-1D (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.....	168
E.28b.	Experimento NOESY-1D (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.....	169
E.29.	Espectro de massas de alta resolução para a isoflavana 3.....	169
E.30.	Espectro na região do UV para a isoflavanona 4.....	170
E.31.	Espectro na região do IV para a isoflavanona 4.....	170
E.32.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 4.....	171
E.33.	Expansão do espectro anterior.....	171
E.34.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 4.....	172
E.35.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 4.....	172

E.36.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4	173
E.37.	Expansão do espectro anterior	173
E.38.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4	174
E.39.	Expansão do espectro anterior.....	174
E.40.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4	175
E.41.	Espectro de massas de alta resolução para a isoflavanona 4	175
E.42.	Espectro na região do UV para a isoflavanona 4a	176
E.43.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4a	176
E.44.	Expansão do espectro anterior.....	177
E.45.	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4a	177
E.46.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4a	178
E.47.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4a	178
E.48.	Expansão do espectro anterior.....	179
E.49.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4a	179
E.50.	Expansão do espectro anterior.....	180
E.51.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 4a	180
E.52.	Espectro na região do UV para o pterocarpano 5	181
E.53.	Espectro na região do IV para o pterocarpano 5	181
E.54.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 11,0 T) para o pterocarpano 5	182

E.55.	Expansão do espectro anterior.....	182
E.56.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.....	183
E.57.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.....	183
E.58.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.....	184
E.59.	Expansão do espectro anterior	184
E.60.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.....	185
E.61.	Expansão do espectro anterior.....	185
E.62.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.....	186
E.63.	Experimento NOESY-1D (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.....	186
E.64.	Espectro de massas de alta resolução para o pterocarpano 5.....	187
E.65.	Espectro na região do UV para a isoflavana 6.....	187
E.66.	Espectro na região do IV para a isoflavana 6.....	188
E.67.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 6.....	188
E.68.	Expansão do espectro anterior.....	189
E.69.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 6.....	189
E.70.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 6.....	190
E.71.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 6.....	190
E.72.	Expansão do espectro anterior	191

E.73.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavana 6.....	191
E.74.	Expansão do espectro anterior.....	192
E.75.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavana 6.....	192
E.76a.	Experimento NOESY-1D (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavana 6.....	193
E.76b.	Experimento NOESY-1D (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavana 6.....	193
E.77.	Espectro de massas de alta resolução para a isoflavana 6.....	194
E.78.	Espectro na região do UV para o pterocarpano 7.....	194
E.79.	Espectro na região do IV para o pterocarpano 7.....	195
E.80.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 11,0 T) para o pterocarpano 7.....	195
E.81.	Expansão do espectro anterior.....	196
E.82.	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 11,0 T) para o pterocarpano 7.....	196
E.83.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl ₃ , 11,0 T) para o pterocarpano 7.....	197
E.84.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl ₃ , 11,0 T) para o pterocarpano 7.....	197
E.85.	Expansão do espectro anterior.....	198
E.86.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para o pterocarpano 7.....	198
E.87.	Expansão do espectro anterior.....	199
E.88.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para o pterocarpano 7.....	199

E.89.	Espectro de massas de alta resolução para o pterocarpano 7.....	200
E.90.	Espectro na região do UV para a isoflavanona 8.....	200
E.91.	Espectro na região do IV para a isoflavanona 8.....	201
E.92.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 8.....	201
E.93.	Expansão do espectro anterior	202
E.94.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 8.....	202
E.95.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 8.....	203
E.96.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 8.....	203
E.97.	Expansão do espectro anterior	204
E.98.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 8.....	204
E.99.	Expansão do espectro anterior.....	205
E.100.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 8.....	205
E.101.	Espectro de massas de alta resolução para a isoflavana 8.....	206
E.102.	Espectro ms/ms para o íon 164.....	206
E.103.	Espectro na região do UV para a isoflavanona 9.....	207
E.104.	Espectro na região do IV para a isoflavanona 9.....	207
E.105.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 9.....	208
E.106.	Expansão do espectro anterior.....	208
E.107.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 9.....	209
E.108.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 9.....	209

E.109.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, H-gCOSY) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 9.....	210
E.110.	Expansão do espectro anterior	210
E.111.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-HSQC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 9.....	211
E.112.	Expansão do espectro anterior.....	211
E.113.	Mapa de contorno de RMN 2D (H, C-gHMBC) (CDCl ₃ , 11,0 T) para a isoflavanona 9.....	212
E.114.	Espectro de massas de alta resolução para a isoflavana 9.....	212
E.115.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 7,0 T) para o estigmasterol 10.....	213
E.116.	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 7,0 T) para o estigmasterol 10.....	213
E.117.	Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl ₃ , 7,0 T) para o estigmasterol 10	214
E.118.	Espectro de massas de baixa resolução para o estigmasterol 10....	214

INTRODUÇÃO

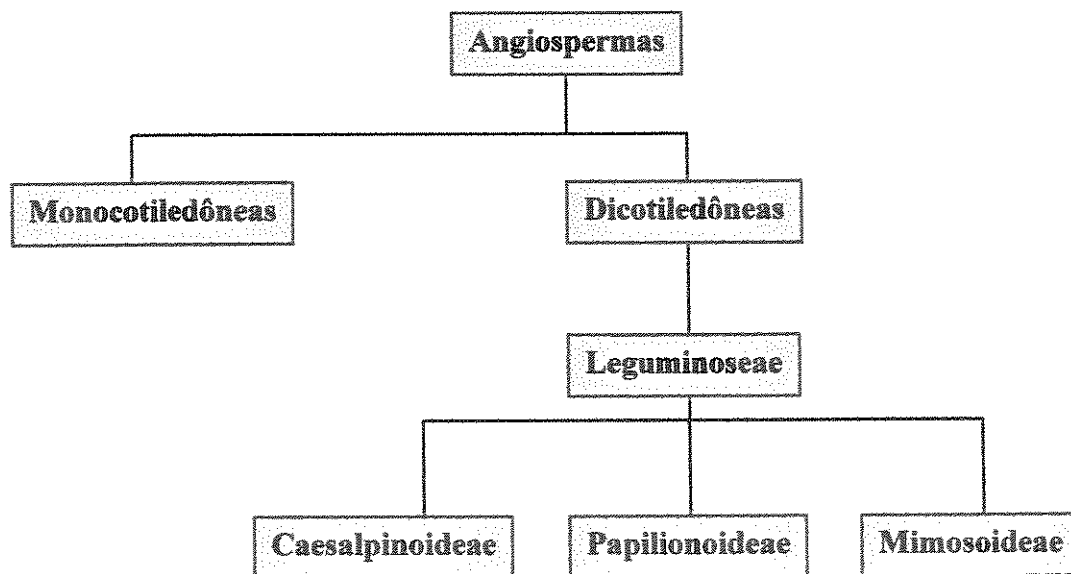
1. Introdução

A família de plantas Leguminosae (ou Fabaceae) é a terceira maior família dentre as Angiospermas, compreendendo aproximadamente 730 gêneros e mais 19.000 espécies, segundo Lewis¹. De hábito muito variado, que vai desde árvores gigantes até diminutas ervas e encontra-se predominantemente nas zonas tropicais sub-tropicais². Seus membros se destacam pela significância na natureza representando quase 10% de todas as espécies de plantas floríferas, só comparáveis em número de Angiospermas, às famílias Orchidaceae e Asteraceae³.

A importância econômica das Leguminosae é bastante destacada, sendo família mais importante no âmbito das dicotiledôneas, comparando-se às gramíneas (fonte de cereais) dentre as monocotiledôneas. Além das espécies que fornecem grãos consumidos pelo homem, como *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha), *Glycine max* (soja), *Arachis hypogaea* (amendoim), é uma importante fonte de madeiras-de-lei, tais como *Caesalpinia echinata* (Pau Brasil), *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (Jacarandá da Bahia) entre várias outras espécies⁴.

Uma outra característica importante da família Leguminosae é a capacidade que muitas espécies têm, em converter o nitrogênio da atmosfera em compostos nitrogenados utilizados pelas plantas, graças à uma relação de simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*⁵. Por sua vez, os flavonóides, o mais comum dos metabólitos secundários desta família, além de ser um dos grupos de metabólitos de plantas mais importantes e diversificados dentre as substâncias naturais desempenham um papel importante no desenvolvimento e crescimento da planta que os produzem, defendendo-as contra ataques de insetos e outros microorganismos⁶. Harborne *et al*^{5,8}. descrevem uma verdadeira panacéia e relação a esses metabólitos.

A família Leguminosae está subdividida em três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae (esquema 1, página 3), as quais são consideradas famílias independentes por alguns taxonomistas, dentre eles Hutchinson⁷. Por outro lado, a classificação que reconhece Leguminosae subdividida em 3 subfamílias, se baseia no fato de suas espécies formarem um grupo homogêneo e monofilético, sendo a subfamília Papilionoideae, a mais importante e é constituída por 440 gêneros, portanto ca. 2/3 de todos os gêneros de Leguminosae. Por sua vez, estes 440 gêneros, englobam por volta de 12000 espécies e formam 30 tribos, de acordo com a mais recente revisão por Polhill (1994) e Kirkbride e Wiersema (1997). Seus membros se distribuem amplamente desde florestas pluviais até bordas dos desertos. Deve-se ressaltar que os gêneros lenhosos considerados mais primitivos, ocorrem principalmente no hemisfério sul e nos trópicos. Segundo o sistema de Bentham (1859-1862) e reapresentado por Polhill e Raven (1981), 19 de todas as tribos referidas acima, ocorrem no Brasil; dentre elas se encontra a tribo Swartzieae.



Esquema 1: Classificação botânica das sub-famílias de Leguminosae.

1.1 A tribo Swartzieae

A tribo Swartzieae, pertencente à família Leguminosae (ou Fabaceae; subfamília Papilionoideae) foi estabelecida pelo botânico suíço, Augustin P. de Candolle, em 1825 e, desde então tem sido objeto de pesquisa e controvérsia.

Segundo Pennington e colaboradores (2001)⁸, o sistema de Bentham (1865)⁹ permaneceu praticamente reconhecido até 1981 quando teve seus membros reagrupados por Polhill e Raven¹⁰ e novamente levemente modificado por Polhill em 1994¹¹. Neste trabalho, Pennington e colaboradores não mencionam a revisão realizada por Cowan¹² em 1961, nem por Yakovlev¹³ em 1976, os quais foram mencionados por Mansano e Tozzi¹⁴ em 1999. Posteriormente, Mansano e colaboradores¹⁵ (2004) expõem toda a controvérsia a respeito das sucessivas revisões sobre a tribo.

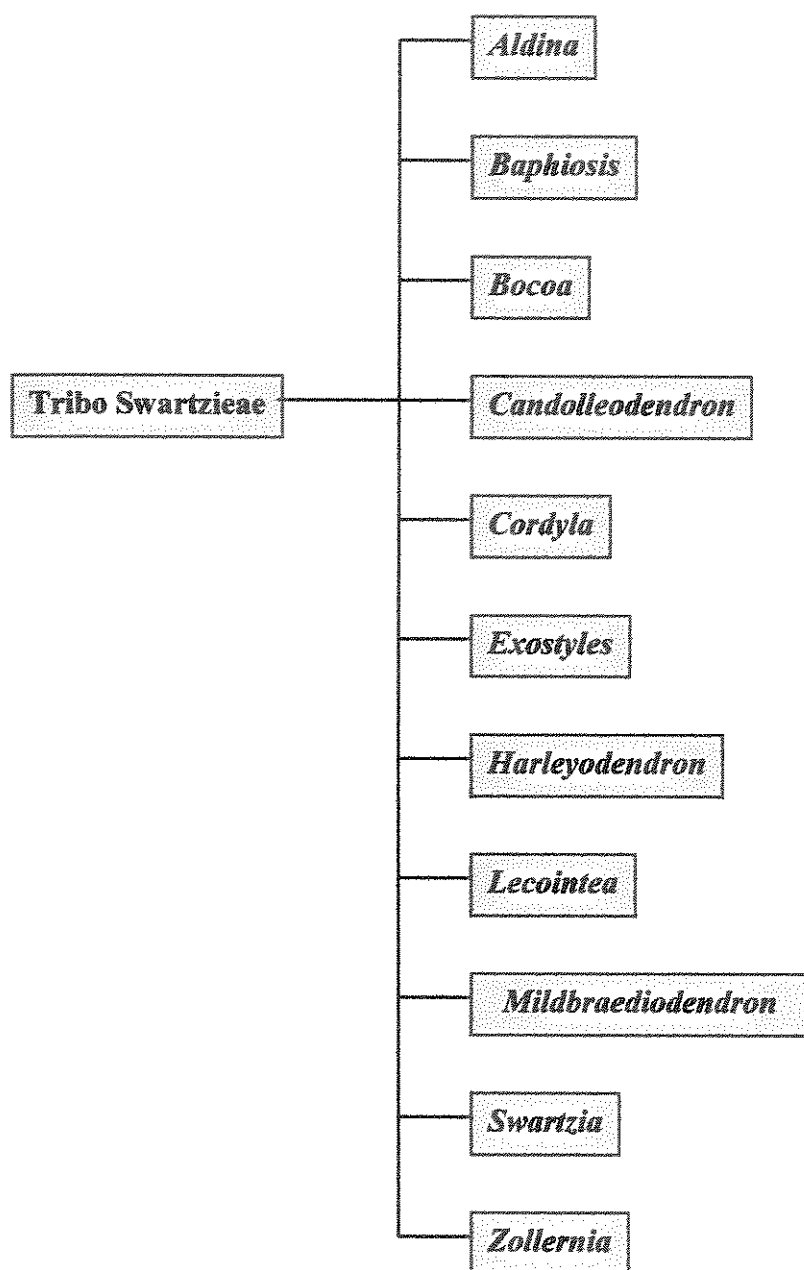
Note-se que historicamente e considerando-se a metodologia aplicada pelos diversos taxonomistas, seja baseados nos caracteres morfológicos diversos, seja pelas análises de seqüenciamento de DNA, a partir do sistema de Bentham referido acima e tendo como marco de revisões, o trabalho de Cowan¹², teríamos inicialmente a tribo Swartzieae constituída por 11 gêneros: *Aldina*, *Bocoa*, *Baphiopsis*, *Candolleodendron*, *Cordyla*, *Exostyles*, *Harleyodendron*, *Mildbraediodendron*, *Lecointea*, *Swartzia* e *Zollernia*. Mas em 1994, Polhill¹¹ alocou 15 gêneros, acrescentando os gêneros *Amburana*, *Ateleia*, *Cyathostegia* e *Holocalyx* e estabelecendo quatro grupos: *Aldina*, *Ateleia*, *Lecointea* e *Swartzia*. Dentro do grupo *Aldina* ficaram os gêneros *Aldina*, *Baphiopsis*, *Cordyla* e *Mildbraediodendron*. No grupo *Ateleia* alocou-se os gêneros *Ateleia*, *Amburana* e *Cyathostegia*. No grupo *Lecointea* ficaram os gêneros *Exostyles*, *Harleyodendron*, *Holocalyx*, *Lecointea* e *Zollernia*. Finalmente no grupo *Swartzia* alocou-se os

gêneros *Bocoa*, *Candolleodendron* e *Swartzia*. Estudos recentes também modificaram a estrutura da tribo, com base na análise cladística da morfologia do pólen, Fergusson e Schire¹⁶ 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.

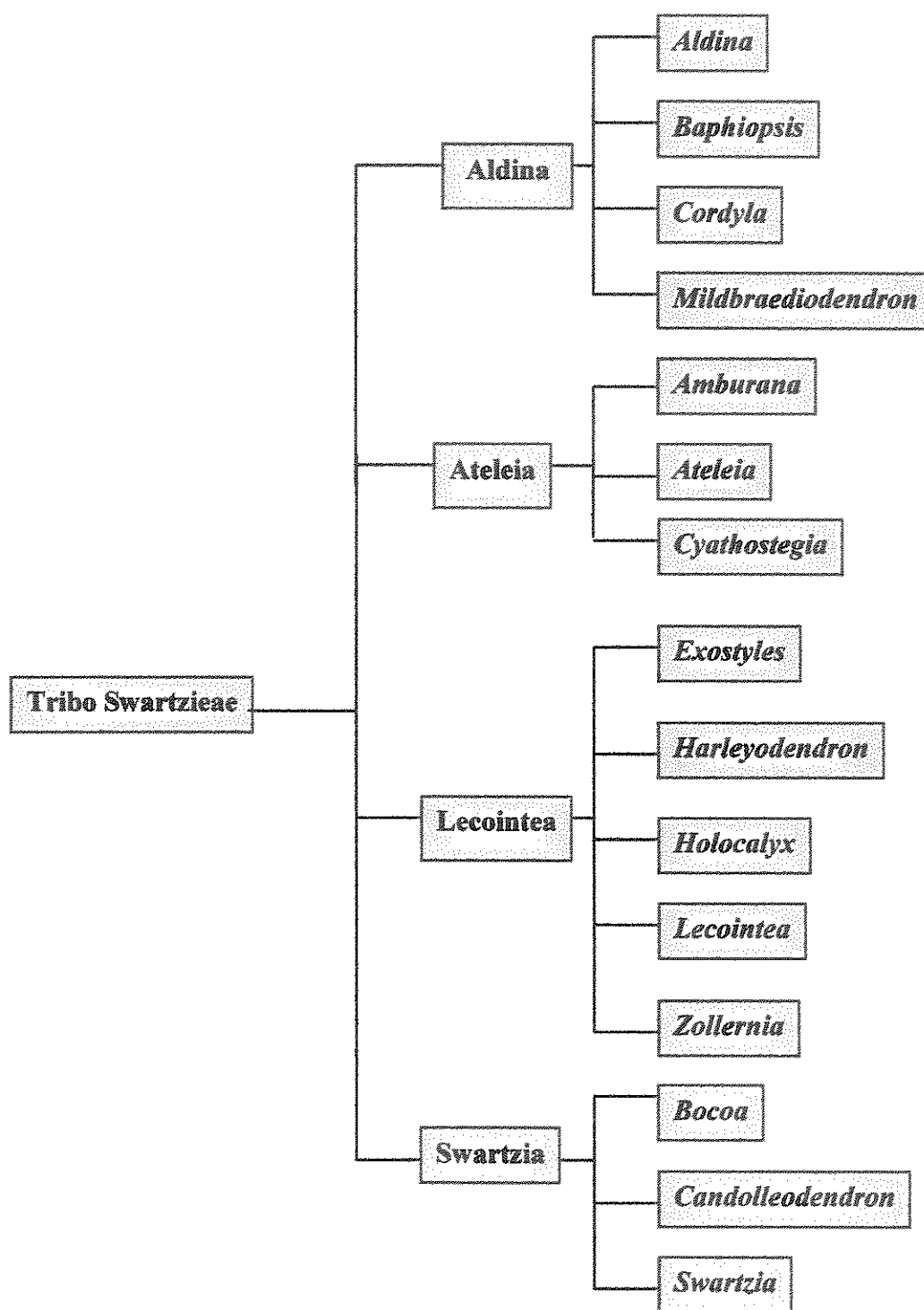
Ireland *et alii*¹⁷ estudando a sistemática da tribo Swartzieae através de seqüências de DNA, observou que as tribos Dalbergieae, Sophoreae e Swartzieae são polifiléticas, isto é, não se originam de um único tronco.

Em 2002, em sua tese de doutorado, apresentada no Instituto de Biologia da Unicamp e orientada pela Dra. Ana Maria Tozzi, Mansano¹⁸ analisou dados morfológicos combinando com dados de sequenciamento de DNA de cloroplasto de membros das tribos Swartzieae e Sophoreae e propôs transferência de gêneros no âmbito das duas tribos e a inclusão do gênero *Uribea* perfazendo 16 os gêneros na composição da tribo Swartzieae.

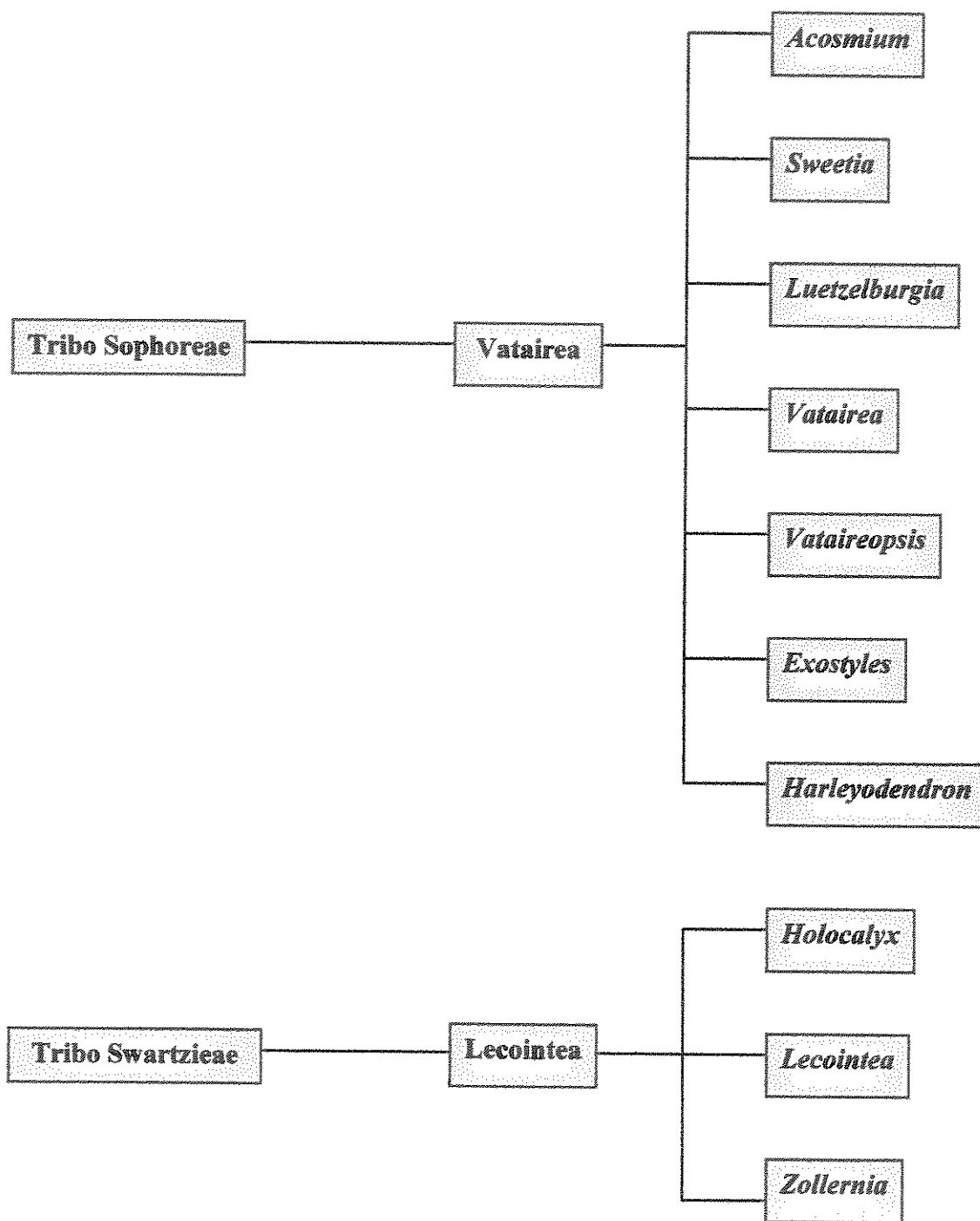
Neste contexto, se insere o nosso trabalho fitoquímico, que há mais de 15 anos se desenvolve a nível interdisciplinar, do nosso grupo juntamente com o grupo do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp, liderado pela Dra. Ana Maria G. de Azevedo Tozzi. Até porque, o trabalho fitoquímico, como descrito nesta tese, atende a pelo menos duas das razões preconizadas por Harborne, em seu eminente artigo de 2000: “Arsenal for survival: secondary plant products”¹⁹. Continuar investigando o metabolismo secundário, no sentido de fornecer subsídio para a compreensão da classificação sistemática dos vegetais (taxonomia), pelo menos nos níveis mais baixos (tribo, grupos, etc). A outra razão, que ele considera a mais atraente de todas, é a contínua expansão da descoberta de novos metabólitos secundários de plantas, para aplicação como drogas medicinais.



Esquema 2: Organização da tribo Swartzieae segundo Cowan¹².



Esquema 3: Organização da tribo Swartzieae segundo Polhill¹¹.



Esquema 4: Organização das tribos Swartzieae e Sophoreae segundo Pennington¹

1.2 O gênero *Harleyodendron*

Harleyodendron é um gênero neotropical, ocorrendo principalmente na Mata Atlântica brasileira, onde é facilmente encontrado em áreas de cacau-cabruca e margens de estrada, região do Estado da Bahia²⁰. Possui como principais dados morfológicos: é uma árvore de aproximadamente 10 metros de altura com diâmetro do tronco de aproximadamente 60 cm, madeira uniforme, dura, resistente, ramos pendentes, folhas verde-brilhantes de forma simples, unifolioladas, discolores com a face adaxial mais escura (figura 1, página 11). Estípulas presentes, persistentes de comprimento aproximado de 1,5 mm. Botões cremes. Flores com corola creme, fragrantes, hermafrodita, corola presente, actinomórfica, estames castanhos, bastante perfumadas (figura 2, página 12). Frutos com duas sementes, com radículas inflexíveis²¹.

O gênero *Harleyodendron* é constituído por apenas uma espécie, *Harleyodendron unifoliolatum*. Não possui sinonímia botânica. R.S. Cowan foi seu primeiro relator, em 1979²² e classificado da seguinte forma:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Rosopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae ou Leguminosae

Sub-família: Faboideae ou Papilionoideae

Tribo: Swartzieae

Gênero: *Harleyodendron*

Espécie: *Harleyodendron unifoliolatum* R.S. Cowan

Um amplo levantamento bibliográfico realizado no *Chemical Abstracts* (1907-2004) e no *Web of Science* (1945-2004), usando como palavras-chave *Harleyodendron*, fitoquímica, Leguminosae, Una e *unifoliolatum* revelou que gênero *Harleyodendron* não apresenta qualquer relato de estudo fitoquímico.

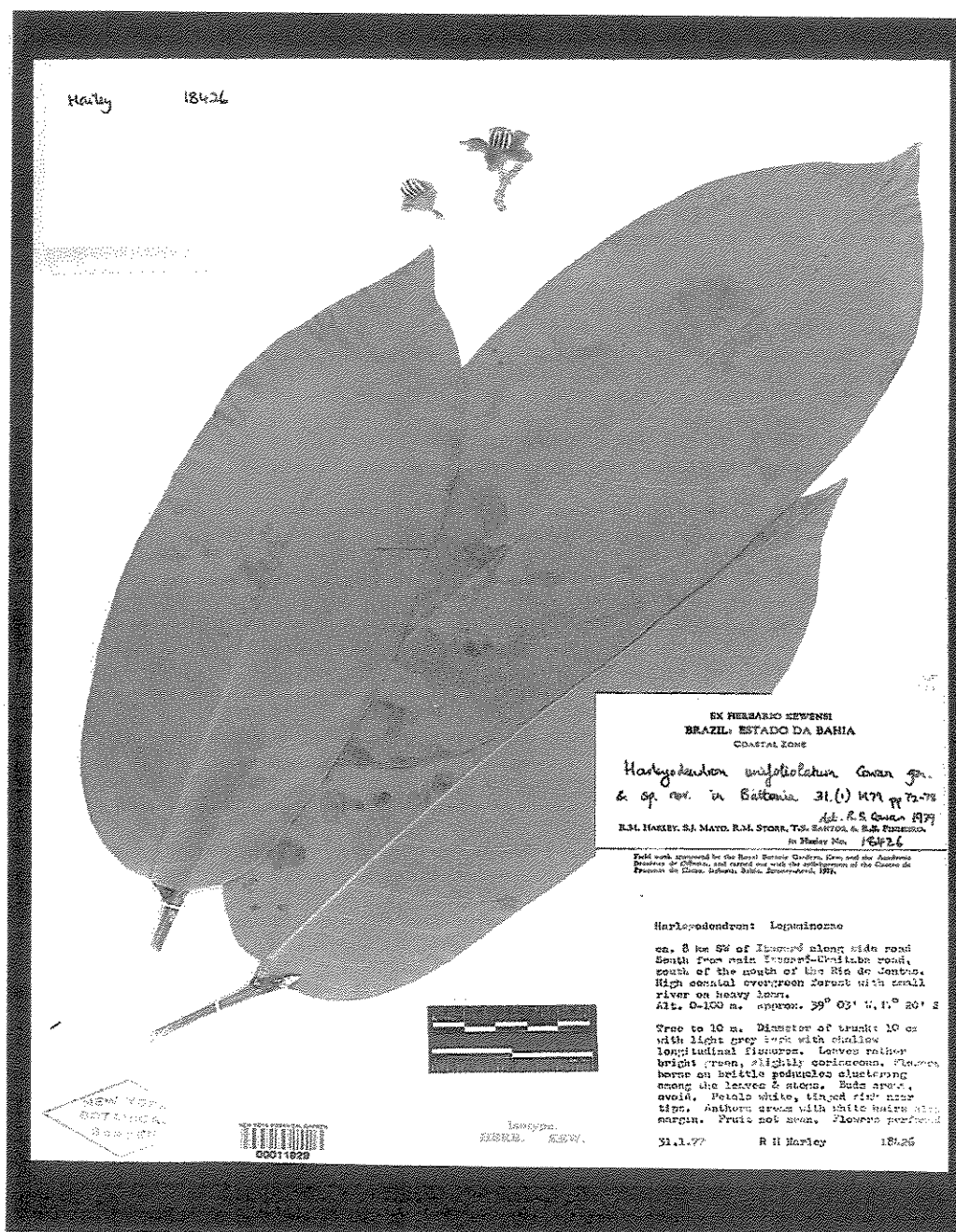
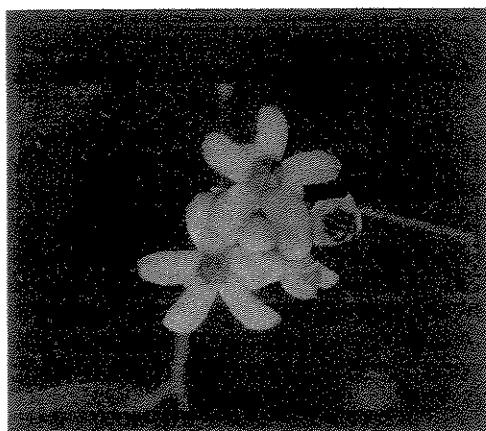
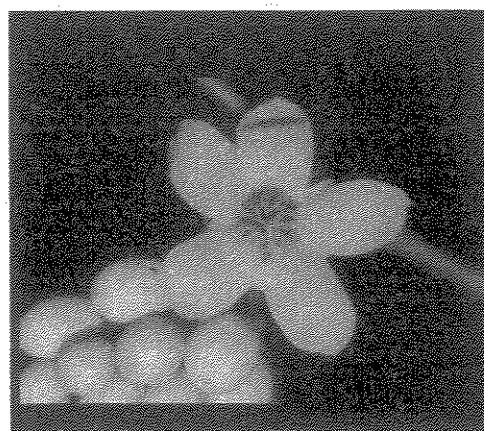


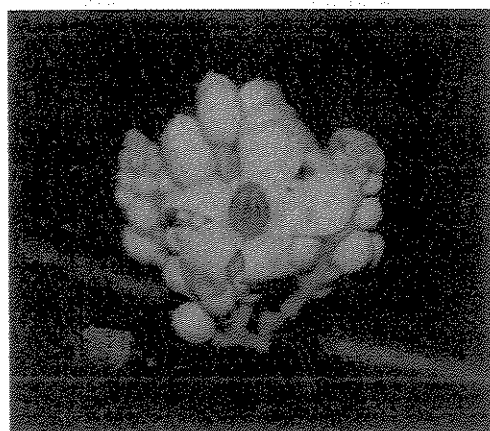
Figura 1: Detalhe da folha de *Harleyodendron unifoliolatum*.



A



B



C



D

Figura 2: Detalhes das flores de *Harleyodendron unifoliolatum*.

1.3 O gênero *Holocalyx*

O gênero *Holocalyx* também é inteiramente neotropical, sendo muito abundante nos estados brasileiros. Ocorre de Goiás até o Rio Grande do Sul, nas formações florestais do interior e do litoral. Possui como principais dados morfológicos: árvore de aspecto frondoso, variando entre 10m até 25m de altura e cerca de 50 a 80 cm de diâmetro de tronco, sendo muito empregada como paisagismo em ruas, parques e praças das cidades brasileiras por ter copa densa e perene que proporciona ótimo sombreamento (figuras 3 e 4, páginas 15 e 16).

O gênero *Holocalyx* é constituído por apenas uma espécie, *Holocalyx balansae*. Possui sinonímia botânica com *Holocalyx glaziovii* Taub. M. Micheli foi seu primeiro relator em 1883²³ e classificado da seguinte forma:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Rosopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae ou Leguminosae

Sub-família: Faboideae ou Papilionoideae

Tribo: Swartzieae

Gênero: *Holocalyx*

Espécie: *Holocalyx balansae* M. Micheli

Esta espécie é conhecida como alecrim, ibirapepê, uirapepê, alecrim-de-campinas, pau-alecrim. Seu tronco possui coloração vermelha-amarelada, pesada, dura, de grande resistência e de longa durabilidade. Devido à sua dureza foi muito usada pelos índios para a fabricação de flechas e tacapes. Usada na construção civil como vigas e caibros; na confecção de móveis de luxo, peças torneadas, bengalas e

carrocerias²⁴. Também usada, no paisagismo de parques e até de ruas, mas imprópria devido à toxicidade de seus brotos, que contém ácido cianídrico. Sob este aspecto, muitos estudos tem sido realizados sobre a avaliação da toxicidade da holocalina, em camundongos²⁵ e coelhos²⁶. Possui como principais características botânicas: espécie secundária tardia, prefere solos rochosos, frescos e de boa fertilidade.

Um amplo levantamento bibliográfico realizado no *Chemical Abstracts* (1907-2004) e no *Web of Science* (1945-2004), usando como palavras-chave *Holocalyx*, alecrim, ibirapepê, uirapepê, alecrim-de-campinas, pau-alecrim revelou que apenas as folhas foram estudadas fitoquimicamente^{27,28} (quadro 1, capítulo 1, página 21) donde foram isolados glicosídeos cianogênicos e carboidratos²⁹.

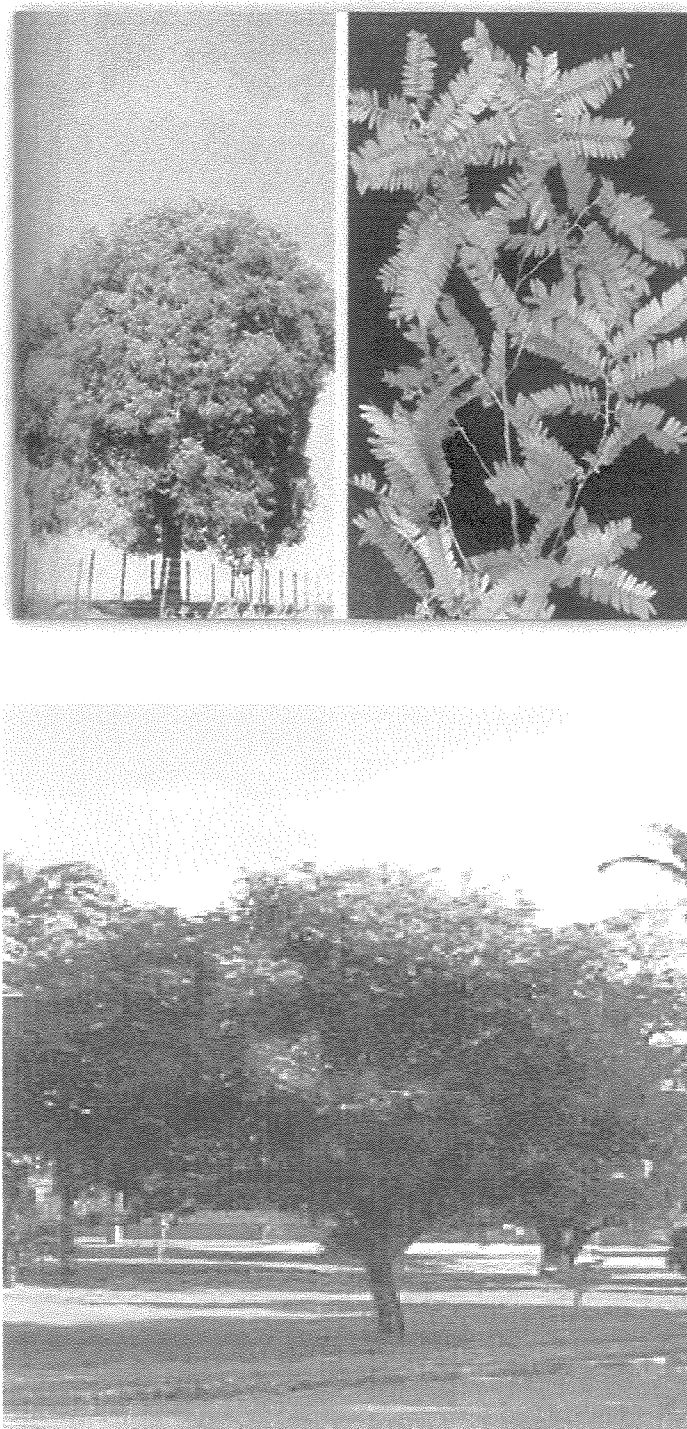


Figura 3: Detalhes da espécie *Holocalyx balansae*.



Figura 4: Detalhes das folhas de *Holocalyx balansae*.

2. Objetivos:

O presente trabalho teve por objetivos:

♣ Isolamento e determinação estrutural dos metabólitos presentes nos extratos das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae* através do emprego de técnicas cromatográficas (CC, CCDC, CCDP, Cromatografia Circular Acelerada por Centrifugação) e da análise dos respectivos espectros de UV, IV, RMN e EM, com ênfase nos estudos dos espectros de RMN, incluindo os dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C , experimentos tipo DEPT (90° e 135°) e a utilização de técnicas bidimensionais (gCOSY, HSQC e gHMBC), além do experimento NOESY-1D;

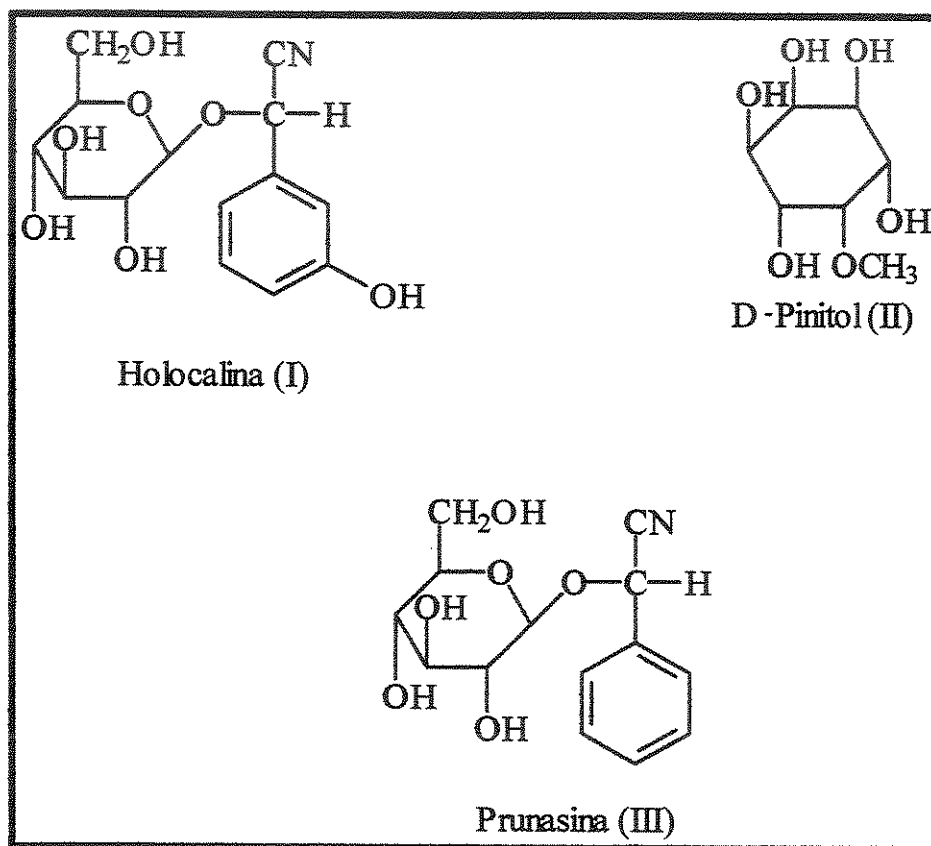
♣ Com ênfase nos metabólitos isolados propor uma avaliação quimiotaxonômica ao nível de tribo para os gêneros *Harleyodendron* e *Holocalyx*, comparando com dados botânicos obtidos pela Profa. Dra. Ana Maria Goulart Azevedo Tozzi e colaboradores em seu trabalho de revisão com vários gêneros da tribo Swartzieae;

♣ Avaliar a atividade biológica dos extratos obtidos através de ensaios biológicos preliminares tais como os ensaios de letalidade com *Artemia salina* (citotoxicidade), bioautografia (atividade antimicrobiana) e concentração inibitória mínima (CIM).

CAPÍTULO I – ESTUDO FITOQUÍMICO

I.1. Introdução

Como já relatado na Introdução, o gênero *Harleyodendron*, constituído pela única espécie *Harleyodendron unifoliolatum* não possui qualquer relato de estudo fitoquímico. Já o gênero *Holocalyx*, no qual figura a espécie *Holocalyx balansae*, somente as folhas foram estudadas fitoquimicamente, donde foram isolados glicosídeos cianogênicos²⁷ e carboidrato²⁸.



Quadro 1- Substâncias isoladas das folhas de *Holocalyx balansae*

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais empregados para o isolamento dos compostos presentes nos extratos obtidos das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae* e a determinação das respectivas estruturas moleculares.

I.2. Materiais e Métodos

I.2.1. Generalidades metodológicas

A análise dos extratos foi realizada por técnicas de cromatografia em coluna (CC) empregando-se sílica gel 60 (70-230 mesh, Aldrich Chemical Company, Inc) ou sílica “flash”³⁰ (230-400 mesh, Aldrich Chemical Company, Inc), cromatografia em camada delgada analítica e preparativa, CCDC e CCDP com placas (Merck sílica gel G e GF₂₅₄, sobre vidro) e cromatofolhas de alumínio (sílica gel GF₂₅₄ 20 x 20 cm, Art. 1.05554, Merck). As placas foram reveladas sob luz UV utilizando-se para detecção os comprimentos de onda em 254 e 366 nm e, após, nebulizadas com solução de anisaldeído preparada em etanol, ácido sulfúrico, aldeído anísico e ácido acético nas proporções de 90:5:5:1, (v/v) e então sendo submetida a cromatoplaça ao aquecimento em chapa de aquecimento.

A técnica de cromatografia em camada delgada circular acelerada por centrifugação foi empregada para auxiliar na separação das frações obtidas. Utilizou-se placas de vidro com espessura de 1,0 e 2,0 mm de sílica gel PF₂₅₄ (Art. 7734, Merck) com o auxílio do Chromatotron®^{31,32}.

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C, experimentos tipo DEPT (90° e 135°), experimentos NOESY-1D, RMN 2D gCOSY (H-H, ³J); HSQC (H-C, ¹J) e gHMBC (H-C, ³J) foram registrados no espectrômetro INOVA-500 (11,0 Tesla) e/ou Varian Gemini 2000 (7,0 Tesla), em CDCl₃ e/ou acetona-d₆ tendo o TMS como padrão interno de referência.

Os espectros de massas de alta resolução foram registrados em espectrômetro VG AutoSpec-Fisons Instruments (70 eV), utilizando-se a técnica de impacto eletrônico para a fragmentação das substâncias isoladas.

Os espectros de absorção no ultravioleta (UV) foram obtidos em um espectrômetro HP-AGILENT 8453, empregando-se metanol (grau HPLC) como solvente em cela de quartzo de percurso óptico de 10mm, já os de Infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer (Modelo 1600 com transformada de Fourier) em pastilha de brometo de potássio, utilizando como referência à absorção em 1601 cm^{-1} de um filme de poliestireno.

As medidas de rotação óptica foram realizadas em espectropolarímetro modelo JASCO J-720.

Os solventes utilizados nas análises de CC, CCDC, CCDP foram todos de grau analítico destilados. Já nas medidas de rotação óptica os solventes empregados foram de grau HPLC.

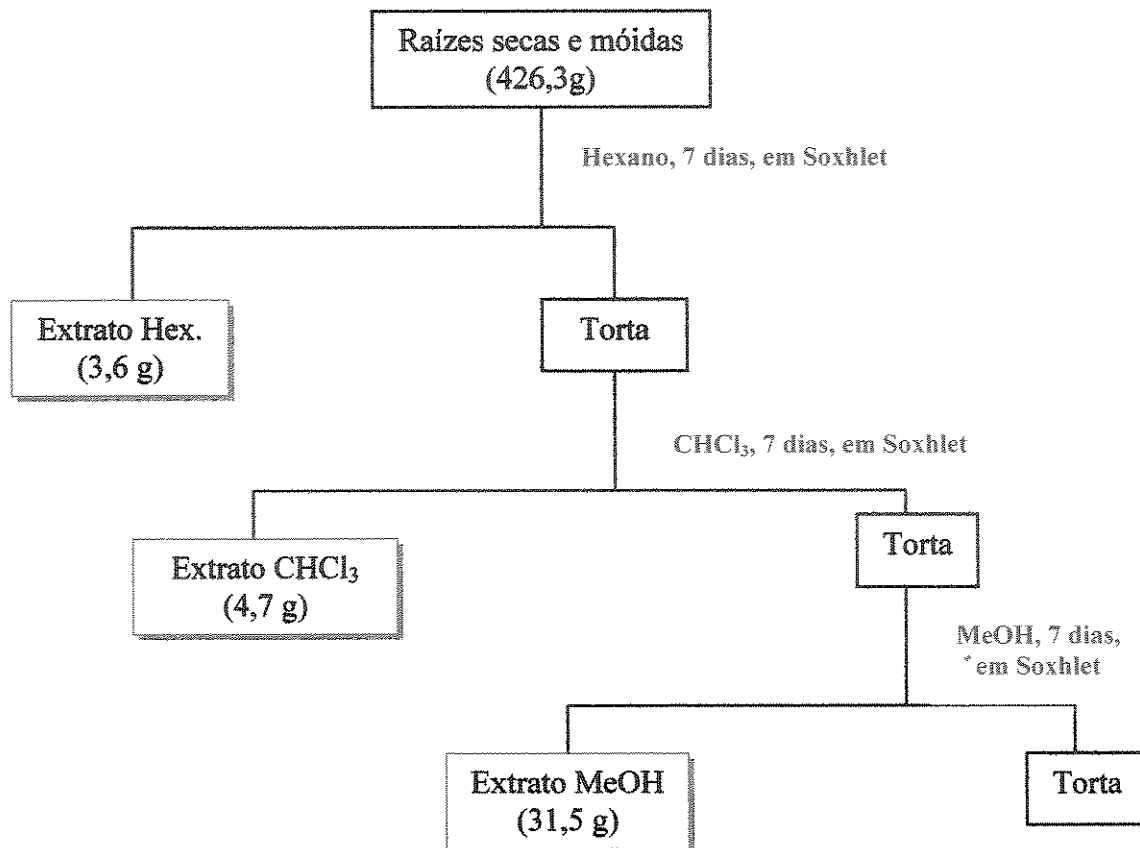
I.2.2. Obtenção dos extratos

As espécies *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae* estudadas neste trabalho foram fornecidas pela Profa. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi (Departamento de Botânica - Instituto de Biologia, UNICAMP), sendo que a espécie *Harleyodendron unifoliolatum* foi coletada na reserva biológica de Una, Entrada no km 46 da Rodovia BA-001 Ilhéus/Una, localizada a $15^{\circ} 17' 24''\text{S}$ $39^{\circ} 4' 12''\text{W}$, Estado da Bahia, Brasil, enquanto que a espécie *Holocalyx balansae* foi coletada no campus da Universidade Estadual de Campinas, localizada a $22^{\circ} 59' 24''\text{S}$ $51^{\circ} 11' 24''\text{W}$, Estado de São Paulo, Brasil. Excicatas encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia,

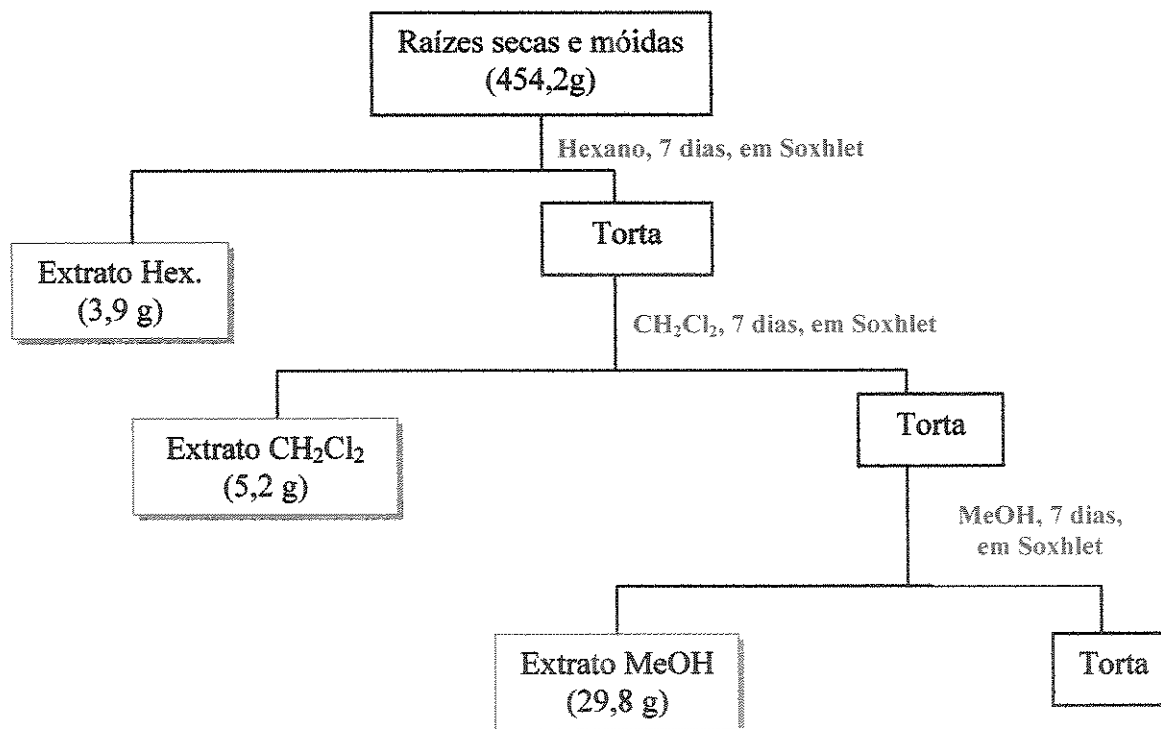
UNICAMP (UEC), sob os números Mansano, V.F. UEC 151 e 164, respectivamente.

As raízes frescas de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae* após cuidadosa lavagem com água corrente foram secas em estufa a 40°C por circulação de ar forçada por 96 horas e logo após trituradas em moinho de facas tipo Wiley, onde obteve-se 426,3 g e 454,2 g de material, respectivamente. Em seguida, realizou-se as extrações por Soxhlet com hexano, clorofórmio e metanol com as raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* por sete dias cada consecutivamente onde, após a secura do solvente, foram obtidos os respectivos extratos (Fluxograma 1, página 25) e com hexano, diclorometano e metanol com as raízes de *Holocalyx balansae* por sete dias cada consecutivamente onde, após a secura do solvente, foram obtidos os respectivos extratos (fluxograma 2, página 25).

Fluxograma 1: Obtenção dos extratos das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* Cowan.



Fluxograma 2: Obtenção dos extratos das raízes de *Holocalyx balansae* Micheli.



I.3. Estudo do extrato clorofórmico de *Harleyodendron unifoliolatum*

Após análise da cromatografia em camada delgada comparativa CCDC feita com os extratos hexânico e clorofórmico obtidos conforme descrição anterior, optou-se por iniciar o estudo fitoquímico pelo extrato clorofórmico por apresentar manchas menos complexas com maior facilidade de separação, sendo que ambos os extratos apresentaram perfil fitoquímico muito semelhantes.

Uma alíquota de 3,0 g do extrato clorofórmico foi cromatografada em coluna de sílica “flash”³⁰ (230-400 Mesh, Merck) com diâmetro interno de 6,5 cm, altura da coluna de 54 cm e altura de sílica 15 cm, sob pressão de 7 libras/polegada utilizando uma razão sílica/extrato acima de 50:1. Eluiu-se em uma mistura de solventes cuja polaridade foi gradativamente aumentada (CHCl₃, CHCl₃/MeOH, MeOH). Desta coluna coletou-se 79 frações de 60,0 mL cada que após monitoramento em cromatografia de camada delgada comparativa foram reunidas em 20 grupos. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 1, página 24.

Estas frações foram subsequenteiramente analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa e preparativa, sempre priorizando aquelas que continham maior quantidade de material e menor complexidade.

Tabela 1: Tratamento cromatográfico do extrato clorofórmico (3,0 g).

Frações	Grupo	Massa (mg)	Eluente	Substância isolada (massa mg)
1	1	39,3		
2	2	56,7		
3	3	43,1		
4	4	31,4		
5-8	5	131,9		
9-11	6	120,7	Ciclohexano/AcOEt 10%	1 (84,3) e 2 (15,9)
12-14	7	280,7	Ciclohexano/AcOEt 10%, cristalização com Et ₂ O	1 (197,4) e 2 (36,7)
15-18	8	230,4	Ciclohexano/AcOEt 15%	1 (171,4); 2 (8,7) e 3 (11,9)
19-24	9	160,9	Hex/CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 2:2:1	1 (97,8); 2 (34,2) e 3 (7,8)
25-28	10	97,4		
29	11	22,9		
30-32	12	45,7		
33-39	13	63,4	Hex/CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 2:2:1	4 (8,5)
40-49	14	29,4	Ciclohexano/AcOEt 20% 3x	5 (4,5)
50-59	15	23,1	Ciclohexano/AcOEt 20% 3x	6 (5,9)
60-70	16	11,4		
71-74	17	23,4		
75	18	341,0		
76-77	19	586,4		
78-79	20	637,2		

A análise de alguns grupos por sucessivas CCDP levou ao isolamento de dois pterocarpanos que após um levantamento bibliográfico detalhado (*Chemical Abstracts* e *Web of Science*) verificou-se que eram conhecidas na literatura medicarpina (1)^{33,34,35} e 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2)^{36,37}, sendo que este último apenas havia sido sintetizado, além de duas isoflavanos (3) e (6), uma isoflavanona (4) e mais um pterocarpano (5) (tabela 1, página 24); estes quatro últimos metabólitos inéditos. A CCDC de alguns grupos desta CC é mostrada nas figuras 5 e 6, página 28.

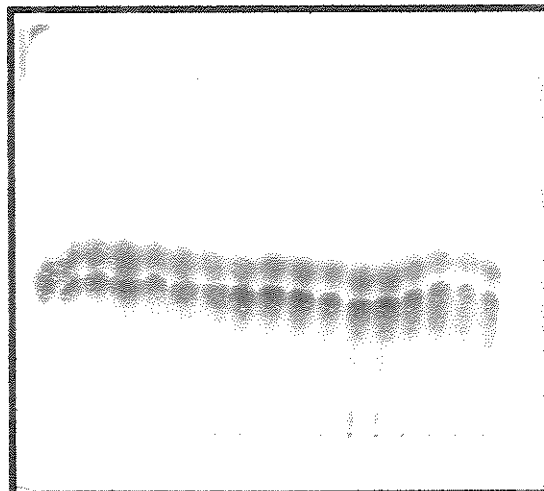


Figura 5 – CCDC (Hexano:AcOEt:CH₂Cl₂ 1:1:2, v/v) de alguns grupos de frações reunidas da CC do extrato clorofórmico.

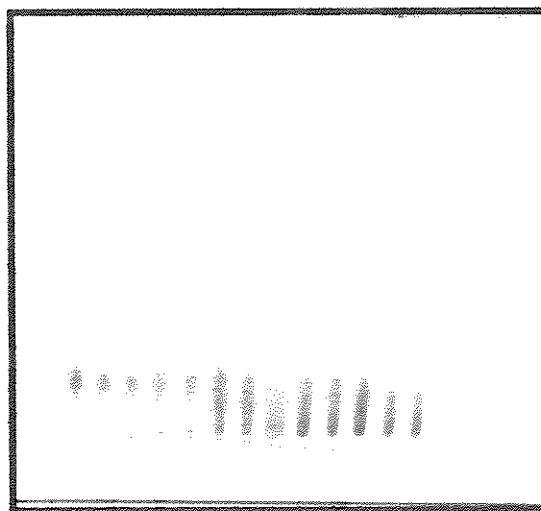
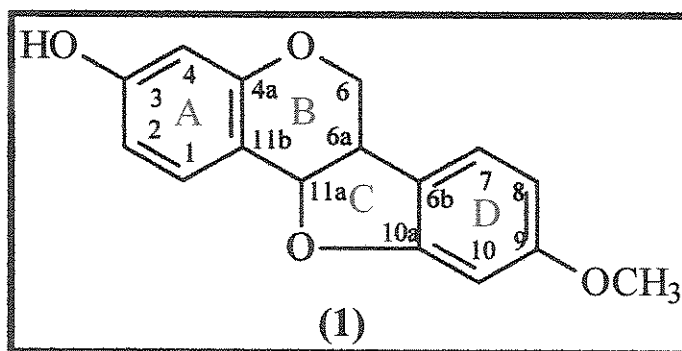
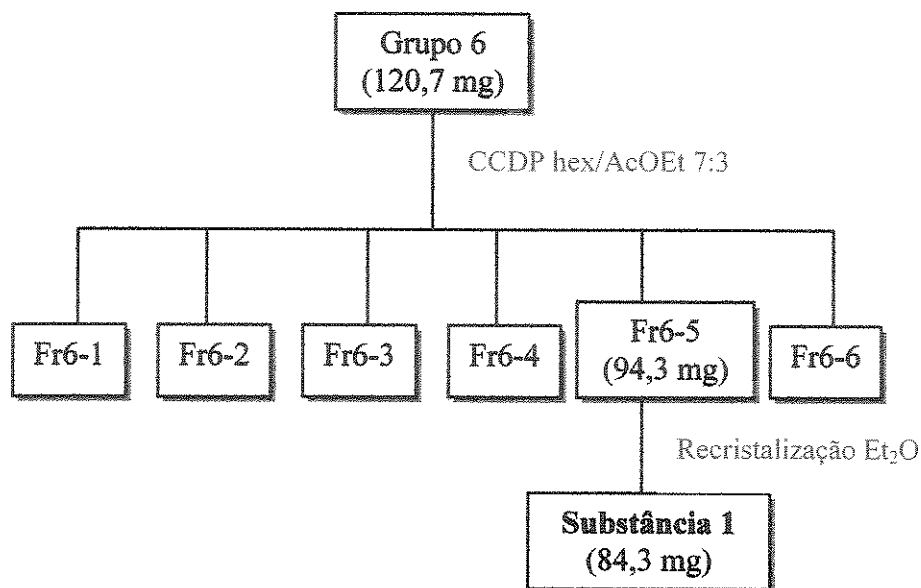


Figura 6 – CCDC (Hexano:CH₂Cl₂ 1:1, v/v) dos grupos finais de frações reunidas da CC do extrato clorofórmico.

I.3.1. Isolamento da medicarpina (1)

Fluxograma 3: Fluxograma de isolamento da medicarpina (1)



Caracterização de 1:

Aspecto físico: Sólido cristalino incolor

Fórmula molecular: C₁₆H₁₄O₄.

Ponto de Fusão: 196°C (cristais em hexano/acetato de etila)^{38,39,40}.

[α]_D²⁰ = +149,9° (MeOH; c 0,035 g/mL) (experimental); Lit⁴¹. -202,2°.

UV λ_{máx.} (nm, log ε): 286 (3,78); 224 (4,03); 211 (4,39) [MeOH; c 0,004 mg/mL]

E.1 (Anexo)^{54,58}.

IV ν_{máx} (pastilha de KBr, cm⁻¹): 3388; 1616; 1494; 1290; 1145 **E.2 (Anexo).**

RMN de ¹H (7,0 T, CDCl₃): Tabela 5 (Apêndice A) e **E.3 (Anexo).**

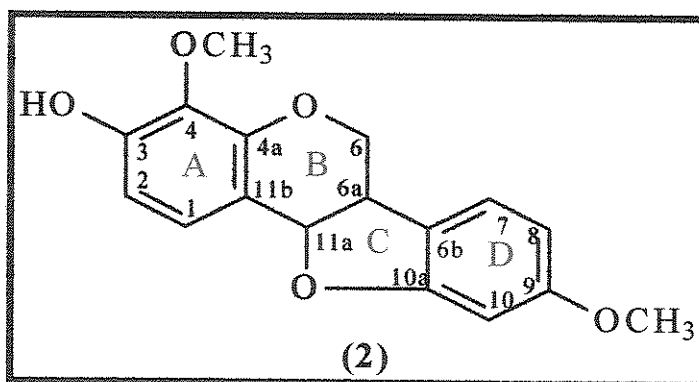
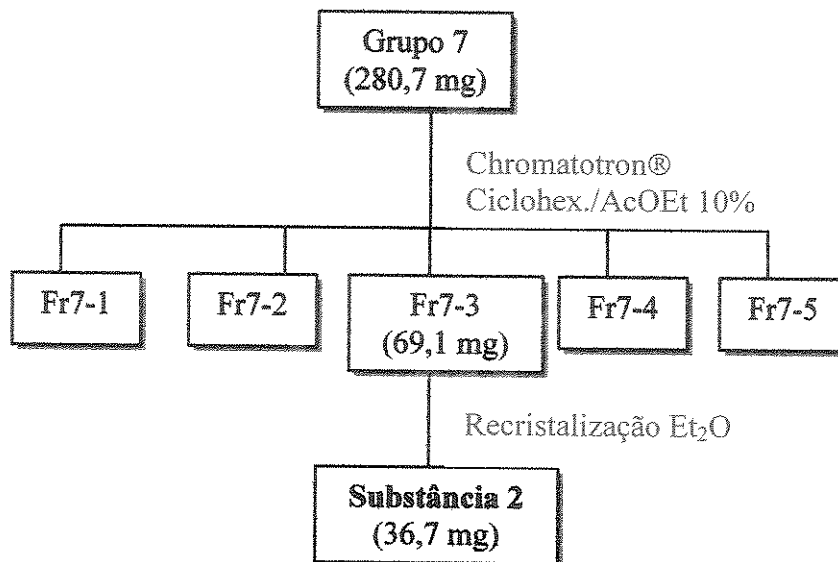
RMN de ¹³C (7,0 T, CDCl₃): Tabela 6 (Apêndice A) e **E.4 (Anexo).**

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

EM [m/z (%)] de 1: 270 [M]⁺ (100), 269 (47), 255 (40), 161 (21), 148 (28), 147 (26) **E.6 (Anexo).**

I.3.2. Isolamento do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2)

Fluxograma 4: Fluxograma de isolamento do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2).



Caracterização de 2:

Aspecto físico: Cristais pontiagudos brancos

Fórmula molecular: $C_{17}H_{16}O_5$.

Ponto de Fusão: 161°C (cristais em hexano/acetato de etila)⁴⁴.

$[\alpha]_D^{20} = +173,5^\circ$ (MeOH; c 0,031 g/mL) (experimental); Lit.³⁷ -110,0°.

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm, log ϵ): 286 (3,78); 224 (4,03); 211 (4,39) [MeOH; c 0,004 mg/mL]

E.7 (Anexo)^{54,58}.

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm^{-1}): 3422; 2963; 1615; 1492; 1379 **E.8 (Anexo).**

RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3): Tabela 7 (Apêndice A) e **E.9 (Anexo).**

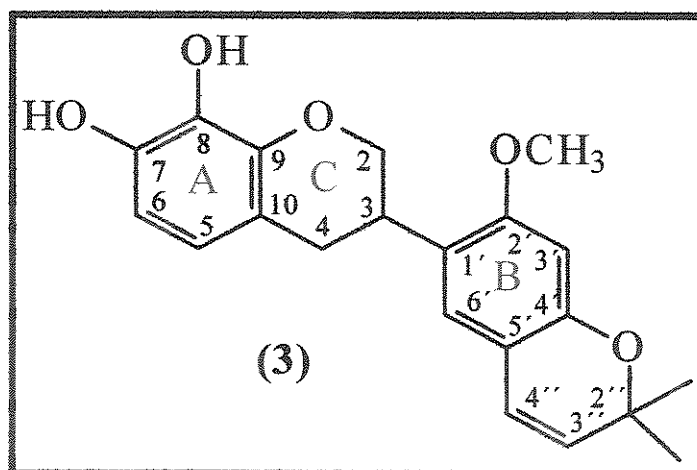
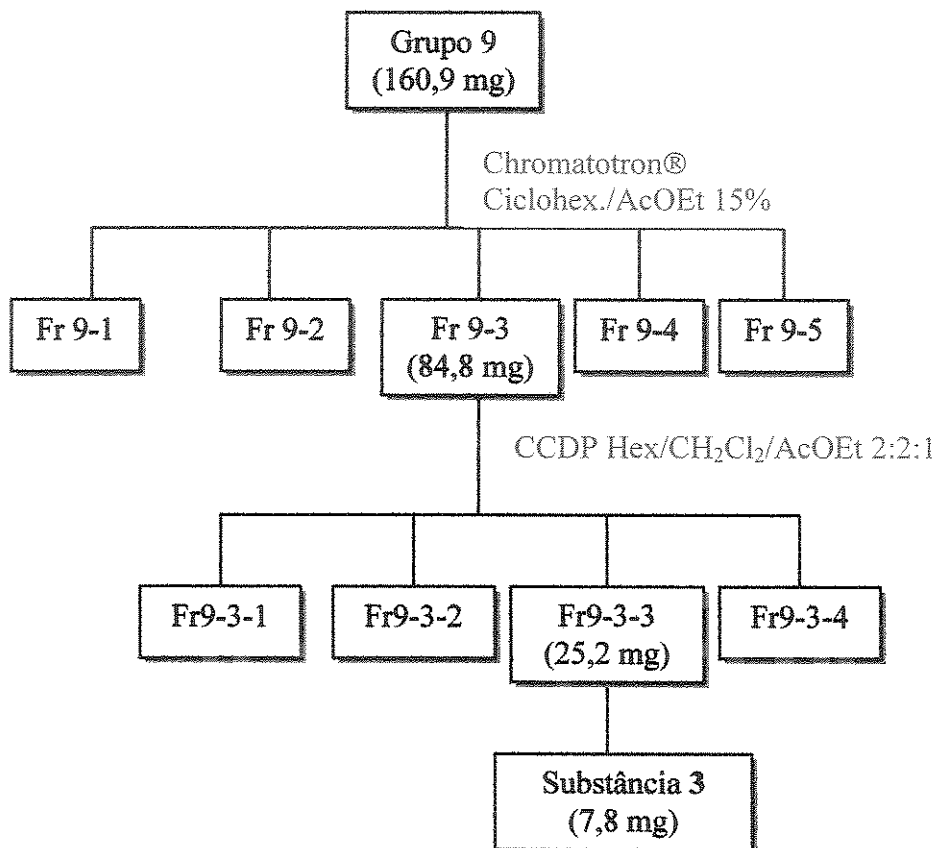
RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3): Tabela 8 (Apêndice A) e **E.10 (Anexo).**

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 300,1054 Da

EMAR [m/z (%)] de 2: 300,0998 [$\text{M}]^+$ (100); 285,0672 (20); 177,0508 (2); 161,0581 (6); 148,0847 (7) **E.16 (Anexo).**

I.3.3. Isolamento da 7,8-diidroxi-2'-metoxi-[(4',5:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] isoflavana (3)

Fluxograma 5: Fluxograma de isolamento da 7,8-diidroxi-2'-metoxi-[(4',5:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] isoflavana (3).



Caracterização de 3:

Aspecto físico: óleo amarelado

Fórmula molecular: $C_{21}H_{22}O_5$.

$[\alpha]_D^{20} = -16,0^\circ$ (Et₂O; c 0,031 g/mL) (experimental); Lit.⁵⁹ $-13,0^\circ$.

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ) (M): 315 (3,2); 275 (4,1); 215 (4,4) [MeOH; c 0,004 mg/mL]
E.17 (Anexo)^{54,58}.

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm^{-1}): 3449; 2923; 1618; 1509; 1359 **E.18** (Anexo).

RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3): Tabela 12 (Apêndice B) e **E.19** (Anexo).

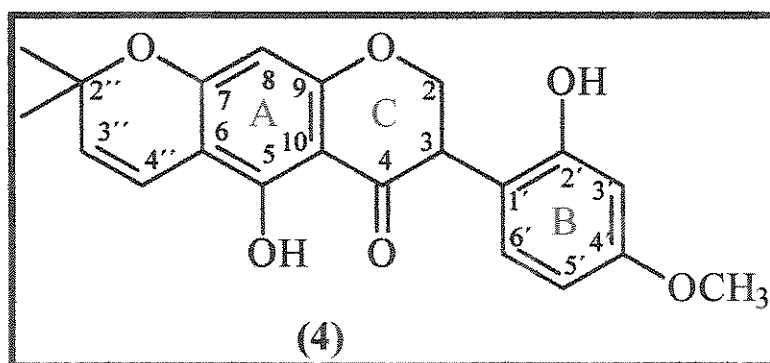
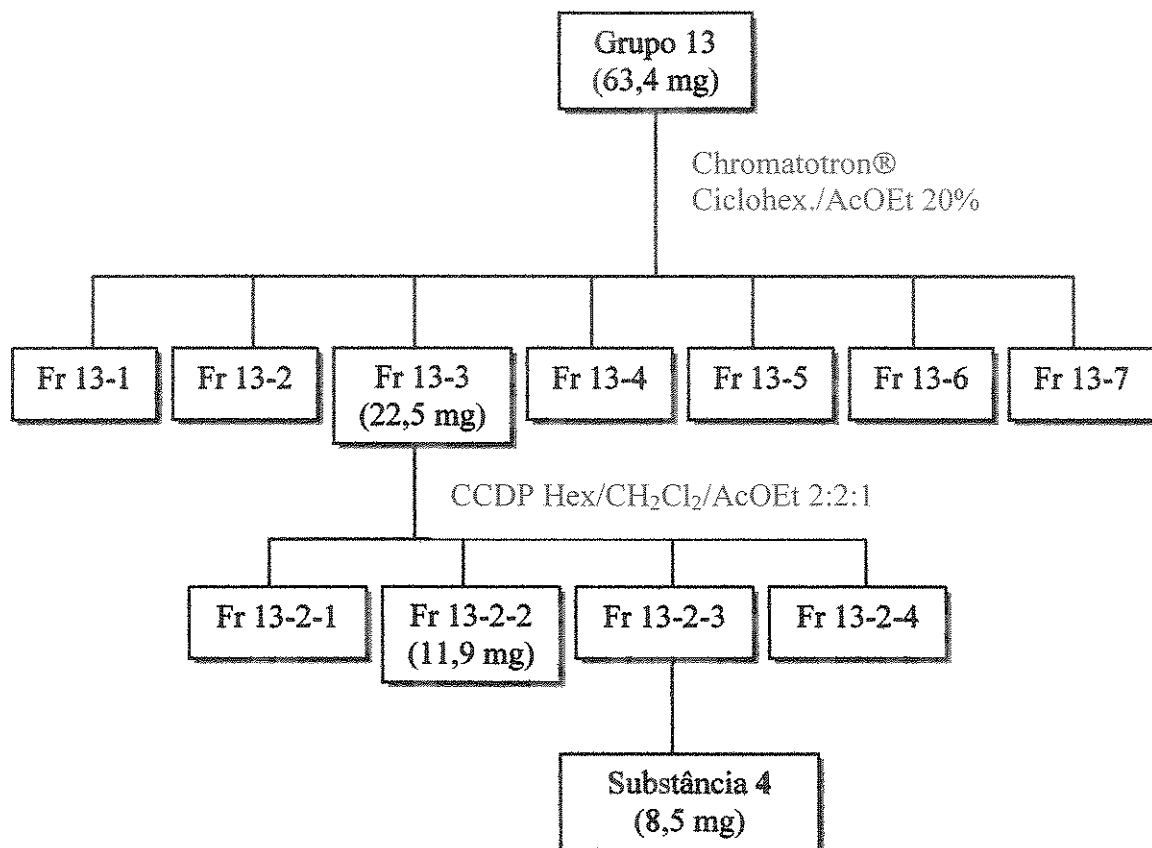
RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3): Tabela 22 (Apêndice B) e **E.21** (Anexo).

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 354,1507 Da

EMAR [m/z (%)] de 3: 354,1490 $[\text{M}]^+$ (32); 339,1216 (100); 201,0922 (37); 149,0256 (7) **E.29** (Anexo).

I.3.4. Isolamento da 5,2'-diidroxil-[(6,7:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] 4'-metoxi isoflavanona (4)

Fluxograma 6: Fluxograma de isolamento da 5,2'-diidroxil-[(6,7:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] 4'-metoxi isoflavanona (4).



Caracterização de 4:

Aspecto físico: óleo amarelado

Fórmula molecular: C₂₁H₂₀O₆.

$[\alpha]_D^{20} = +12,0^\circ$ (MeOH; c 0,036 g/mL).

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm, log ϵ) (M): 339 (4,4); 276 (4,5) [MeOH; c 0,004 mg/mL] **E.30** (Anexo)^{54,58}.

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm⁻¹): 3389; 2924; 1644; 1619 **E.31** (Anexo).

RMN de ¹H (11,0 T, CDCl₃): Tabela 14 (Apêndice B) e **E.32** (Anexo).

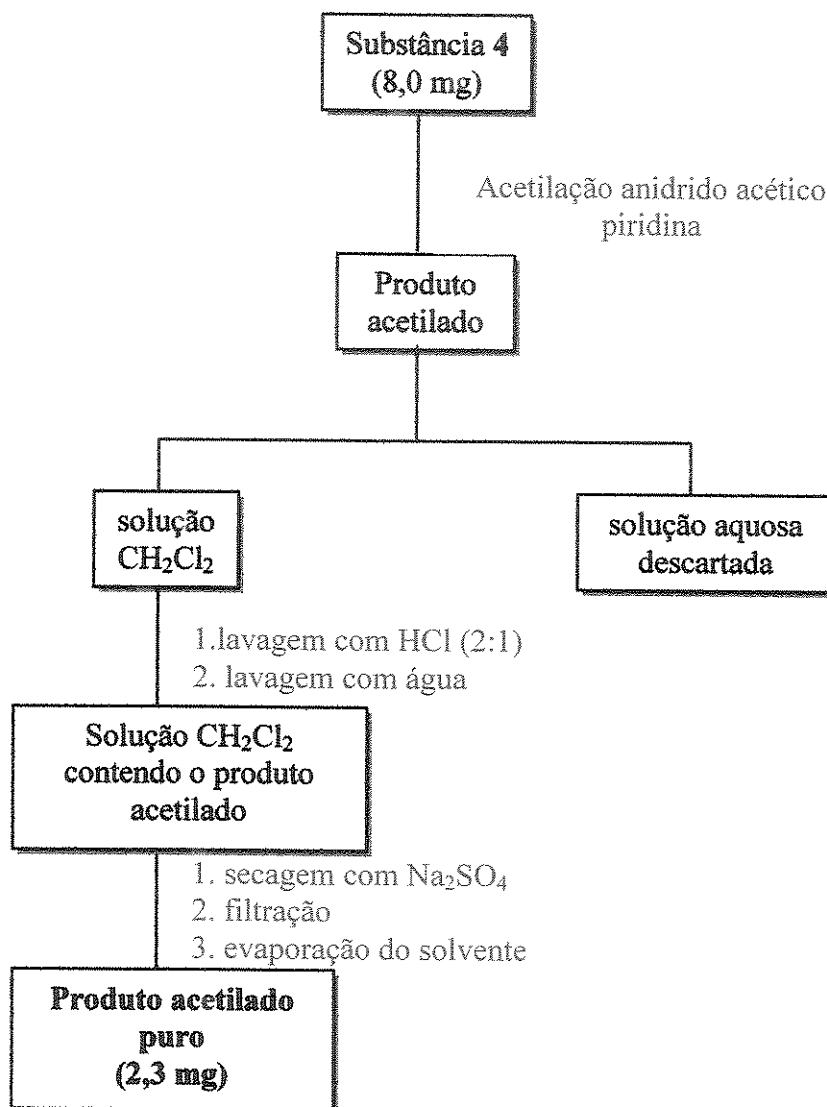
RMN de ¹³C (11,0 T, CDCl₃): Tabela 30 (Apêndice B) e **E.34** (Anexo).

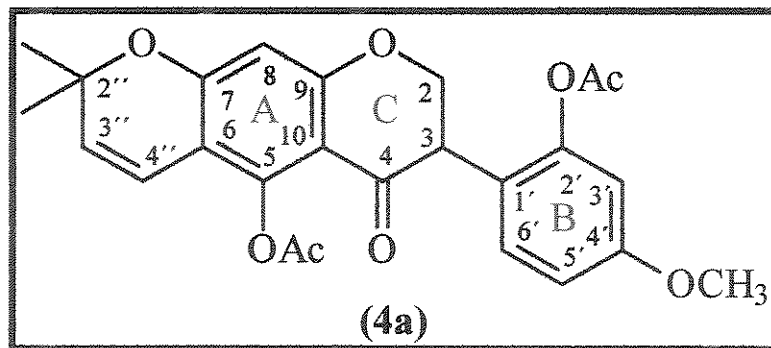
Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 368,1289 Da

EMAR [m/z (%)] de 4: 368,1260 [M]⁺ (5); 353,0976 (100); 335,0865 (27); 323,1132 (7); 287,1229 (5) e 217,0431 (22) **E.41** (Anexo).

I.3.5. Preparação da isoflavanona acetilada (4a)

Fluxograma 7: Fluxograma de preparação e purificação da isoflavanona acetilada (4a).





Caracterização de 4a:

Aspecto físico: óleo amarelado

Fórmula molecular: $C_{25}H_{26}O_{10}$.

$[\alpha]_D^{20} = +12,0^\circ$ (MeOH; c 0,035 g/mL).

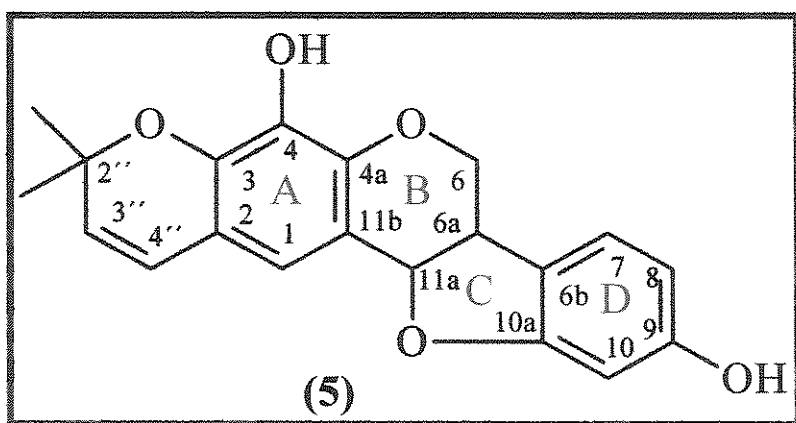
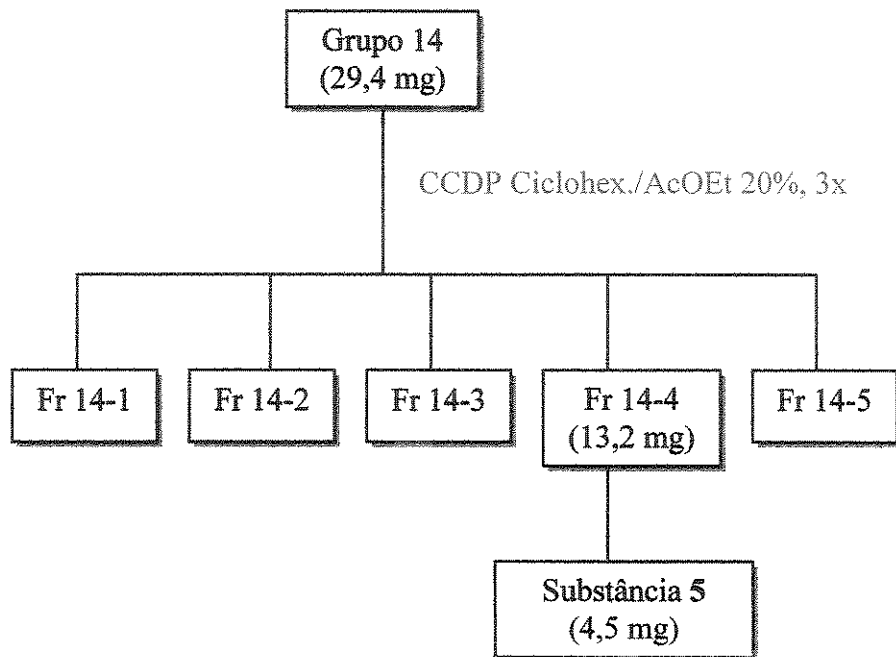
UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm, log ϵ) (M): 233 (4,9), 276 (4,5), 339 [MeOH; c 0,004 mg/mL] E.42 (Anexo)^{54,58}.

RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3): Tabela 16 (Apêndice B) e E.43 (Anexo).

RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3): Tabela 30 (Apêndice B) e E.45 (Anexo).

I.3.6. Isolamento do 4,9-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]-pterocarpano (5)

Fluxograma 8: Fluxograma de isolamento do 4,9-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]-pterocarpano (5).



Caracterização de 5:

Aspecto físico: óleo amarelado

Fórmula molecular: C₂₀H₁₈O₅.

$[\alpha]_D^{20} = +19,5^\circ$ (MeOH; c 0,030 g/mL).

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm, log ϵ) (M): 285 (3,77); 220 (4,01); 211 (4,39) [MeOH; c 0,004 mg/mL] **E.52** (Anexo)^{54,58}.

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm⁻¹): 3423; 1625; 1499; 1135 **E.53** (Anexo).

RMN de ¹H (11,0 T, CDCl₃): Tabela 19 (Apêndice B) e **E.54** (Anexo).

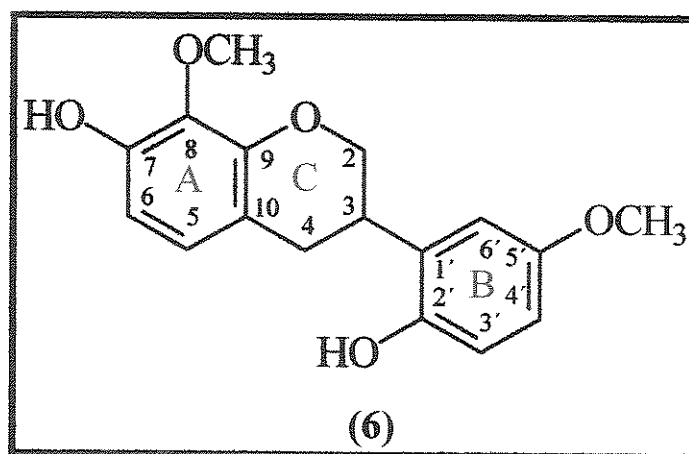
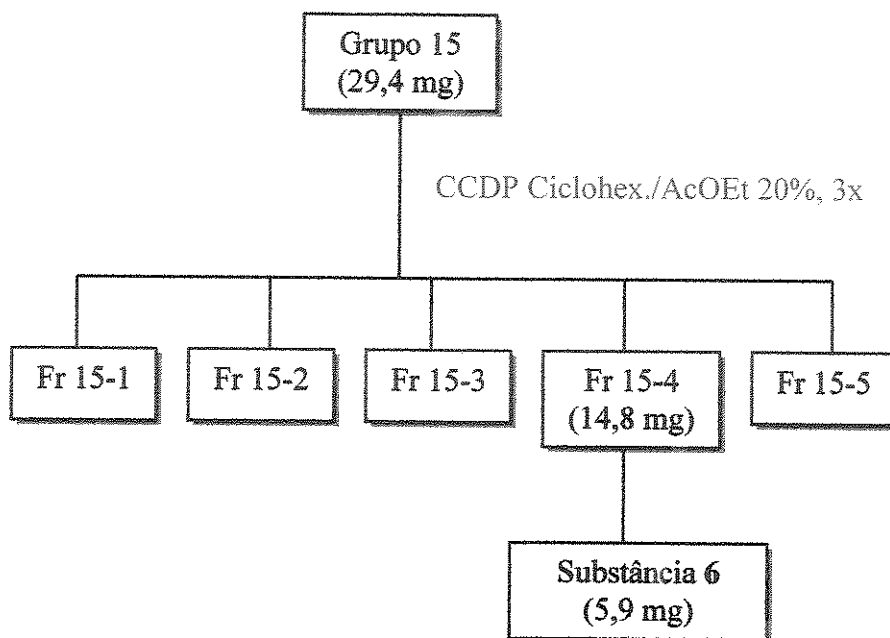
RMN de ¹³C (11,0 T, CDCl₃): Tabela 25 (Apêndice B) e **E.56** (Anexo).

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 338,1162 Da

EMAR [m/z (%)] de 5: 338,1154 [M]⁺ (5); 323,0965 (100); 203,0023 (4); 158,9566 (1) e 133,3473 (2) **E.64** (Anexo).

I.3.7. Isolamento da 7,2'-diidroxi-8,5'-dimetoxi isoflavana (6)

Fluxograma 9: Fluxograma de isolamento da 7,2'-diidroxi-8,5'-dimetoxi isoflavana (6).



Caracterização de 6:

Aspecto físico: óleo amarelado

Fórmula molecular: $C_{17}H_{18}O_5$.

$[\alpha]_D^{20} = -7,5^\circ$ (Et₂O; c 0,035 g/mL).

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm, log ϵ) (M): 286 (3,78); 224 (4,03); 211 (4,39) [MeOH; c 0,004 mg/mL] E.65 (Anexo)^{54,58}.

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm⁻¹): 3370; 1618; 1498; 1160 E.66 (Anexo).

RMN de ¹H (11,0 T, CDCl₃): Tabela 20 (Apêndice B) e E.67 (Anexo).

RMN de ¹³C (11,0 T, CDCl₃): Tabela 22 (Apêndice B) e E.69 (Anexo).

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 302,1167 Da

EMAR [m/z (%)] de 6: 302,1152 [M]⁺ (85); 152,0546 (18); 150,0707 (100); 137,0629 (52) e 77,0415 (5) E.77 (Anexo).

I.4. Estudo do extrato hexânico de *Harleyodendron unifoliolatum*

Uma alíquota de 3,0 g do extrato hexânico obtido das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* (fluxograma 1, página 22) foi cromatografado em coluna de sílica gel (70-230 Mesh, Merck) com diâmetro interno de 4,5 cm, altura da coluna de 55 cm e altura de sílica 15 cm. Eluiu-se a coluna com a mistura de solventes ciclohexano/acetato de etila 20%, com volume suficiente para o eluente atingir o final da coluna. Assim que o mesmo chegou ao final, fechou-se a coluna e cortou-se a mesma em seis faixas, que depois foram extraídas com clorofórmio, filtradas e concentradas. A tabela 2, página 43 descreve os resultados obtidos.

Tabela 2: Tratamento cromatográfico do extrato hexano (3,0 g).

Grupos (mg)	Eluente (CC)	Frações	Fase móvel (CCDP)	Composto
1 (133,6)	Ciclohexano/AcOEt 20%	1		Fração com aspecto oleoso
2 (118,3)		2		Fração com aspecto oleoso
3 (943,0)		3		Fração com aspecto oleoso
4 (390,6)		4	Ciclohexano/ACOEt 15%	Fração com aspecto oleoso
5 (1066,3)		5		
6 (328,7)		6		

Os grupos 5 e 6 foram reunidos e submetidos a uma nova separação por CC, sendo cromatografados em coluna de sílica “flash”³⁰ (230–400 Mesh, Merck) com diâmetro interno de 3,5 cm, altura da coluna de 54 cm e altura de sílica 15 cm. Eluiu-se a coluna com a mistura de solventes ciclohexano/acetato de etila 20%, em gradiente. Este fracionamento resultou em 87 frações. A tabela 3, página 44 expressa os resultados obtidos.

Tabela 3: Tratamento cromatográfico com os grupos 5 e 6 do extrato hexânico (1,40 g).

Frações	Grupo	Massa (mg)	Eluente	Substância isolada (massa mg)
1	1	15,7	Ciclohexano/AcOEt 10%	
2-9	2	6,6		
10-12	3	12,9		
13-14	4	15,4		
15-19	5	195,6		
20-24	6	286,6	Ciclohexano/AcOEt 15%	1 (212,5)
25-27	7	95,7		1 (68,1) e 2 (8,9)
28-36	8	100,5		1 (87,5)
37-45	9	86,1		1 (59,4)
46-56	10	87,3		1 (66,9)
57-58	11	16,2	Ciclohexano/AcOEt 30%	
59-66	12	28,4		5 (5,9)
67-72	13	17,5		7 (3,8)
73	14	9,2		4 (3,8)
74-76	15	15,8		
77-78	16	30,2	MeOH 100%	
79-80	17	79,9		
81-83	18	98,8		
84-86	19	90,4		
87	20	64,6		

Além dos pterocarpanos **1**, **2** e **5** isolados previamente dos extratos hexânico e clorofórmico de *Harleyodendron unifoliolatum* isolamos um novo pterocarpano **7** o qual também se confirmou ser inédito. A figura 7, página 45 ilustra uma placa de CCDC obtida após o tratamento cromatográfico do extrato hexânico de *Holocalyx balansae*.

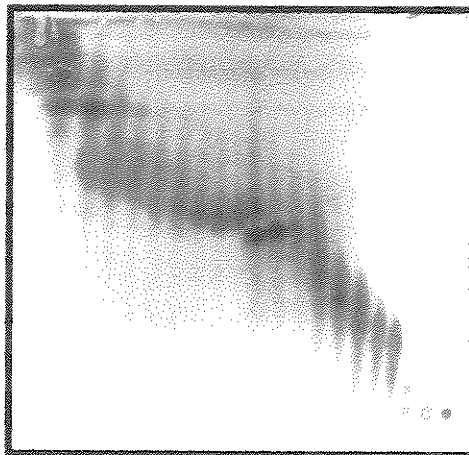
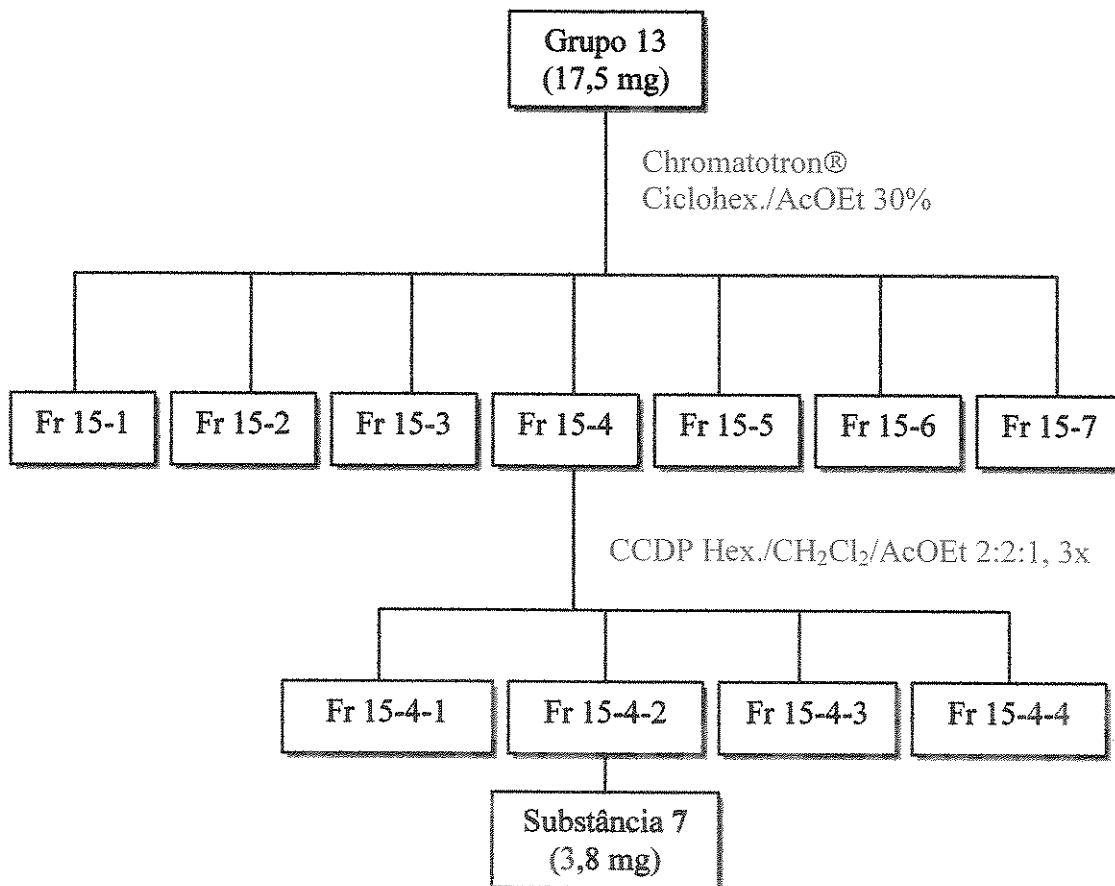
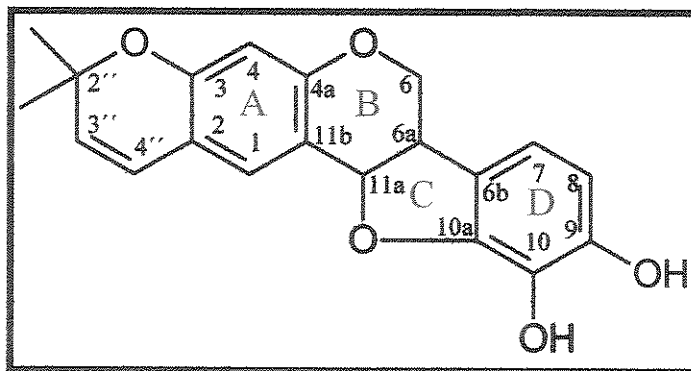


Figura 7 – CCDC (Ciclohexano/AcOEt 20%, v/v , 2x eluído) de alguns grupos de fração reunidas da C do extrato hexânico.

I.4.1. Isolamento do 9,10-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]pterocarpano (7)

Fluxograma 10: Fluxograma de isolamento do 9,10-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]pterocarpano (7).





Caracterização de 7:

Aspecto físico: óleo amarelado

Fórmula molecular: $C_{20}H_{18}O_5$.

$[\alpha]_D^{20} = +13,5^\circ$ (MeOH; c 0,033 g/mL).

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm, log ϵ) (M): 320 (4,4); 205 (5,2) [MeOH; c 0,004 mg/mL] E.78 (Anexo)^{54,58}.

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm^{-1}): 3448; 2924; 1624; 1482, 1119 E.79 (Anexo).

RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3): Tabela 23 (Apêndice B) e E.80 (Anexo).

RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3): Tabela 25 (Apêndice B) e E.82 (Anexo).

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 338,1162 Da

EMAR [m/z (%)] de 7: 338,1154 $[\text{M}]^+$ (31); 323,0837 (100); 201,0501 (10); 161,5404 (8); 82,8816 (12) e 56,8158 (17) E.89 (Anexo).

I.5. Estudo do extrato hexânico de *Holocalyx balansae*

Uma alíquota de 3,0 g do extrato hexânico foi cromatografada em coluna de sílica gel (70-230 Mesh, Merck) com diâmetro interno de 6,5 cm, altura da coluna de 54 cm e altura de sílica 18 cm.

Eluiu-se em uma mistura de solventes cuja polaridade foi gradativamente aumentada (CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, MeOH). Desta coluna coletou-se 145 frações de 60,0 mL cada que após monitoramento em cromatografia de camada delgada comparativa foram reunidas em 21 grupos. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 4.

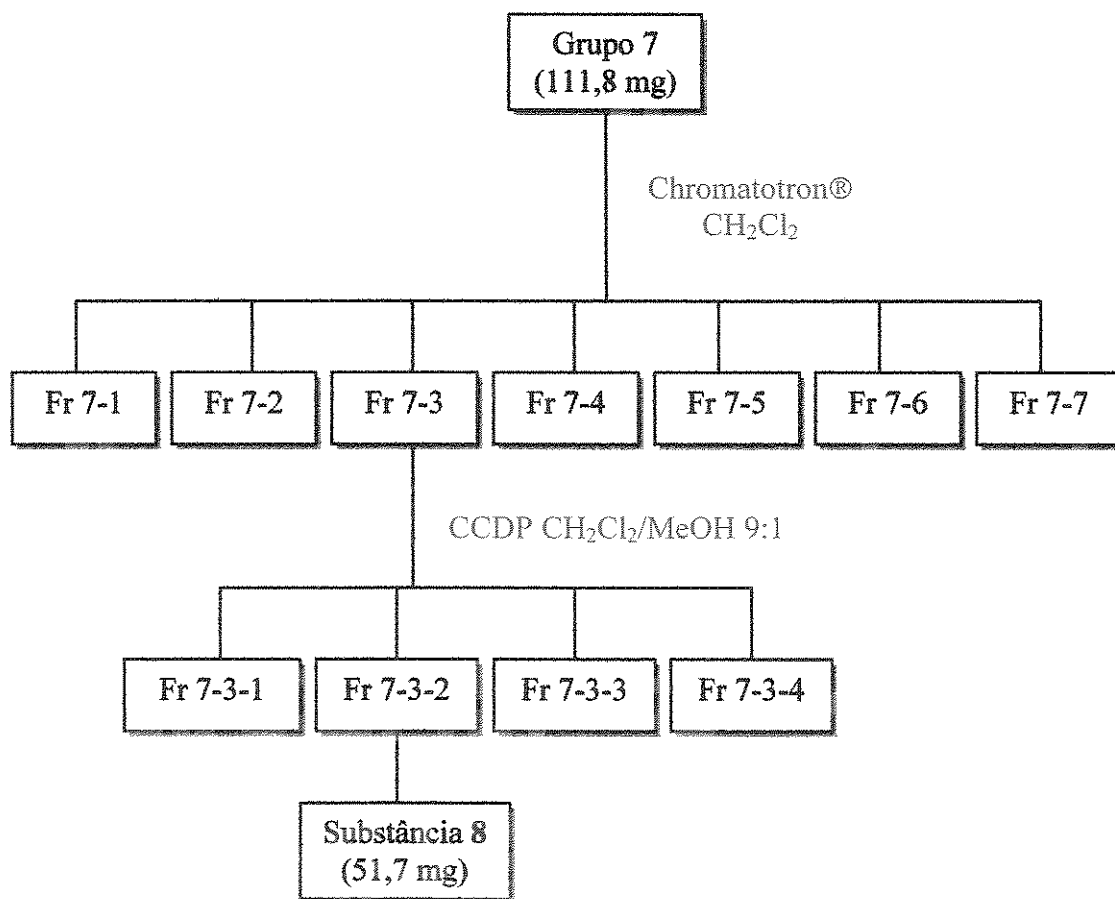
Tabela 4: Tratamento cromatográfico com o extrato hexânico (3,0 g).

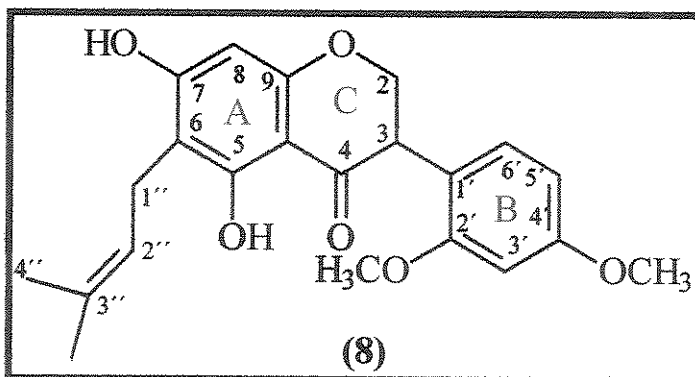
Frações	Grupo	Massa (mg)	Eluente	Substância isolada (massa mg)
1	1	26,8	CH_2Cl_2	
2-10	2	96,7		
11-16	3	53,1		
17-20	4	62,4		
21-28	5	151,9		
			$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1	
29-31	6	40,7		4 (34,3)
32-38	7	111,8		8 (51,7)
39-48	8	103,3		9 (11,4)
49-58	9	94,9	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1	
59-67	10	86,0		10 (23,4)
68-69	11	17,9		
70-73	12	18,4		
74-76	13	24,4		
77-78	14	27,2		
79	15	9,6		
80-94	16	87,8	MeOH 100%	
95-104	17	83,9		
105-114	18	88,6		
115-124	19	76,5		
125-135	20	77,2		
136-145	21	79,4		

Os grupos 6, 7, 8 e 9 foram subsequêntemente analisadas por cromatografia circular acelerada por centrifugação com o auxílio do Chromatotron®, além de cromatografia em camada delgada (comparativa e preparativa), conduzindo ao isolamento de outras duas isoflavanonas (8) e (9) que após um levantamento bibliográfico detalhado verificou-se que tratava-se de mais duas substâncias inéditas, além da isoflavanona (4) anteriormente isolada de *Harleyodendron unifoliolatum*, também foi isolada de *Holocalyx balansae* e de um fitoesteróide identificado como sendo o estigmasterol (10).

I.5.1. Isolamento da 5,7-diidroxi-2',4'-dimetoxi-6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (8)

Fluxograma 11: Fluxograma de isolamento da 5,7-diidroxi-2',4'-dimetoxi-6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (8).





Caracterização de 8:

Aspecto físico: óleo amarelado

Fórmula molecular: $C_{22}H_{24}O_6$.

$[\alpha]_D^{20} = +21,0^\circ$ (MeOH; c 0,034 g/mL).

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ) (M): 276 (4,5); 233 (4,9) [MeOH; c 0,004 mg/mL] E.9 (Anexo)^{54,58}.

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm^{-1}): 3423; 1638; 1509; 1443 E.91 (Anexo).

RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3): Tabela 26 (Apêndice B) e E.92 (Anexo).

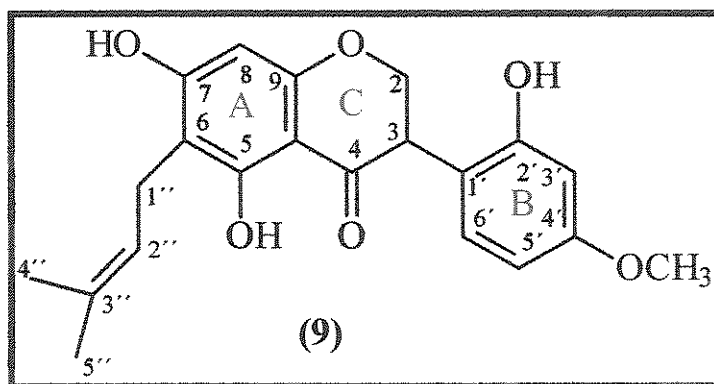
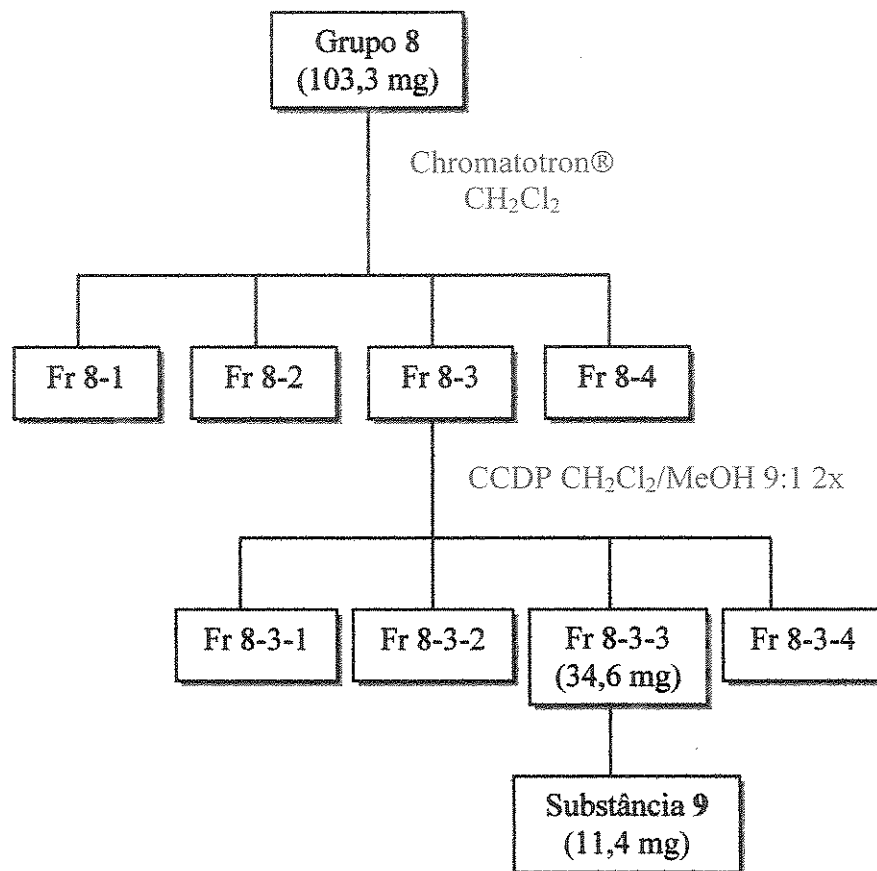
RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3): Tabela 30 (Apêndice B) e E.94 (Anexo).

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 384,1554 Da

EMAR [m/z (%)] de 8: 384,1526 [$\text{M}]^+$ (1); 329,1058 (22); 165,0833 (6); 164,084 (67); 149,0595 (15); 137,0669 (4); 121,0656 (23) E.101 (Anexo).

I.5.2. Isolamento da 5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (9)

Fluxograma 12: Fluxograma de isolamento da 5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (9).



Caracterização de 9:

Aspecto físico: óleo amarelado

Fórmula molecular: C₂₁H₂₂O₆.

[α]_D²⁰ = +9,0° (MeOH; c 0,038 g/mL).

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm, log ϵ) (M): 276 (4,5); 234 (4,9) [MeOH; c 0,004 mg/mL] **E.10** (Anexo)^{54,58}.

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm⁻¹): 3370; 2923; 1637; 1445 **E.104** (Anexo).

RMN de ¹H (11,0 T, CDCl₃): Tabela 28 (Apêndice B) e **E.105** (Anexo).

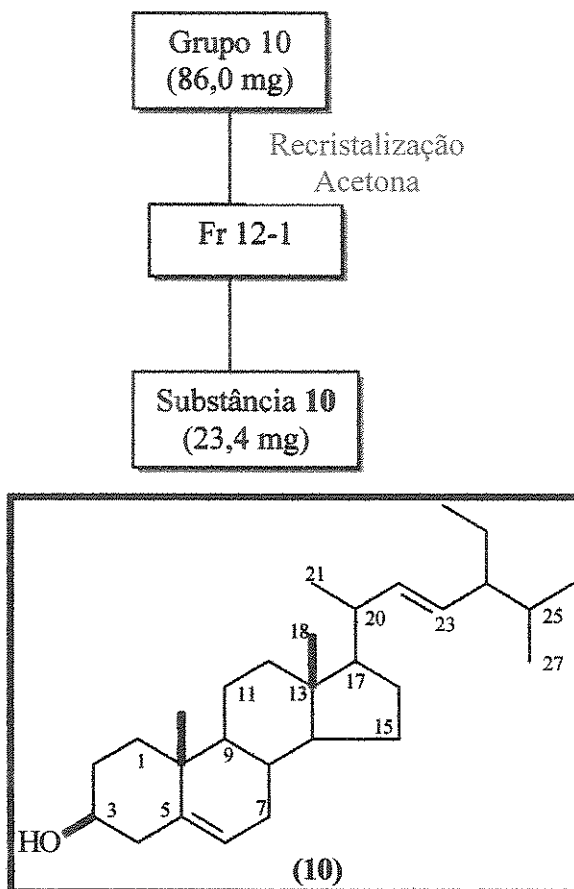
RMN de ¹³C (11,0 T, CDCl₃): Tabela 30 (Apêndice B) e **E.107** (Anexo).

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 370,1464 Da

EMAR [m/z (%)] de 9: 370,1426 [M]⁺ (3); 315,0954 (44); 165,0240 (57); 150,0746 (61); 137,0665 (100), 135,0503 (7), 107,0551 (5) **E.114** (Anexo).

I.5.3. Isolamento do estigmasterol (10)

Fluxograma 13: Fluxograma de isolamento do estigmasterol (10).



Caracterização de 10:

Aspecto físico: Cristais agulhados brancos

Fórmula molecular: C₂₉H₄₈O.

Ponto de Fusão: 128°C

RMN de ¹H (7,0 T, CDCl₃): Tabela 10 (Apêndice A) e E.115 (Anexo).

RMN de ¹³C (7,0 T, CDCl₃): Tabela 11 (Apêndice A) e E.116 (Anexo).

Massa molecular calculada (Isótopos mais estáveis): 412,2812 Da

EM [*m/z* (%)] de 10: 412 [*M*]⁺ (87); 351 (23); 315 (8); 300 (37); 271 (43); 255 (60); 229 (12); 159 (45); 133 (45); 69 (67); 55 (100) E.118 (Anexo).

II. Resultados e discussão

II.1. Isolamento dos Metabólitos Secundários

O estudo fitoquímico de *Harleyodendron unifoliolatum* Cowan e *Holocalyx balansae* Micheli resultou no isolamento de 10 substâncias (1-10), sendo as substâncias 1, 2 e 10 conhecidas na literatura e as substâncias 3-9 inéditas (destacadas em cor azul). A figura 8 retrata a estrutura das substâncias isoladas.

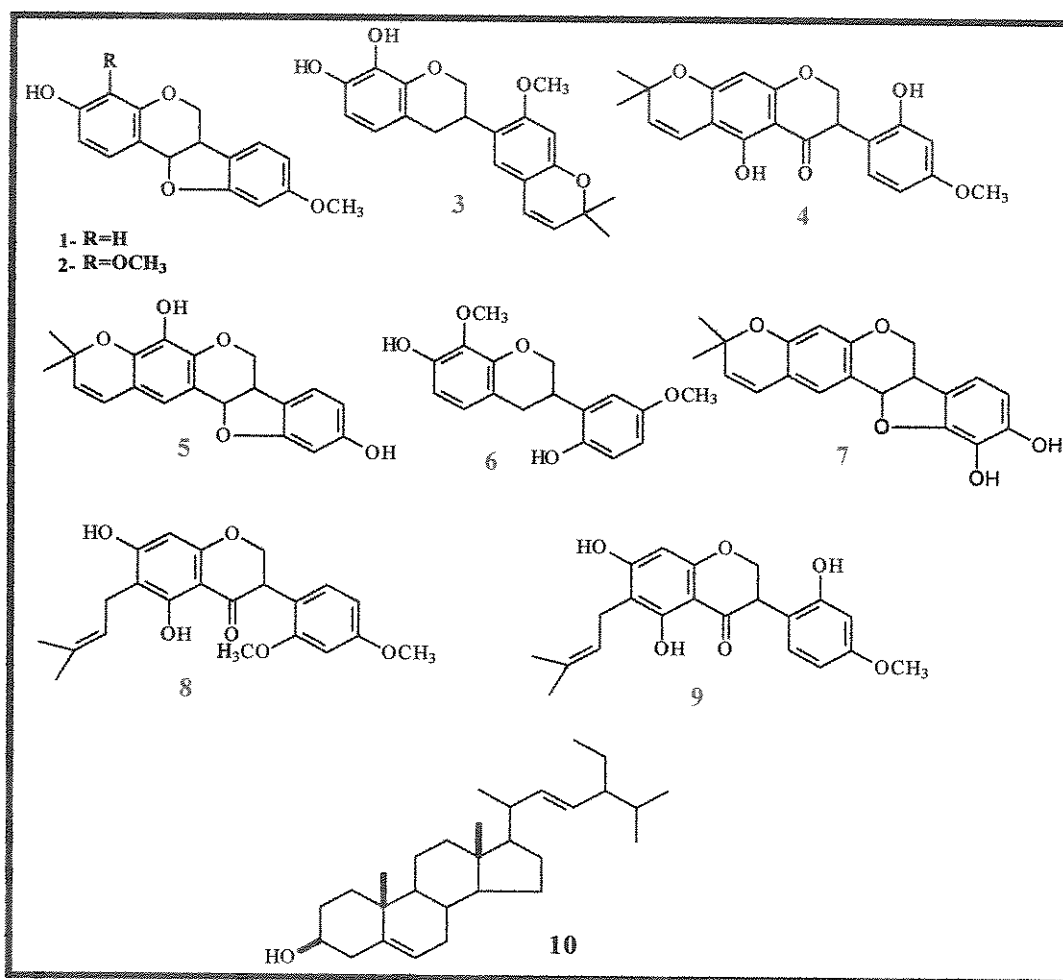


Figura 8-Substâncias isoladas de *Harleyodendron unifoliolatum* Cowan e *Holocalyx balansae* Micheli.

No estudo fitoquímico realizado com os extratos hexânico e clorofórmico das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* (vide itens I.3 página 26 e I.4 página 42) observou-se que a substância 1 (medicarpina) encontrava-se presente em grande quantidade em ambos os extratos (tabela 1, página 27 e tabela 3, página 44); o que causou grande dificuldade em isolar outros metabólitos presentes nestes extratos. Nas primeiras avaliações cromatográficas feitas com os extratos hexânico e clorofórmico em cromatoplasas e reveladas com anisaldeído observou-se a presença, em grande quantidade, de manchas que apresentaram a coloração “salmão”. Pela experiência adquirida com isolamento e detecção de flavonóides em extrato de planta, suspeitou-se que se tratavam de pterocarpanóides. De fato; análises de IV não apresentaram bandas de grupos carbonila, assim como o espectro de UV não revelou bandas clássicas de flavonas; isoflavanos e seus derivados 1,2 saturados^{54,58}. Já no extrato hexânico de *Holocalyx balansae* verificou-se a presença, em grande quantidade, de frações com aspecto oleoso, as quais revelaram ser constituídas principalmente por substâncias alifáticas.

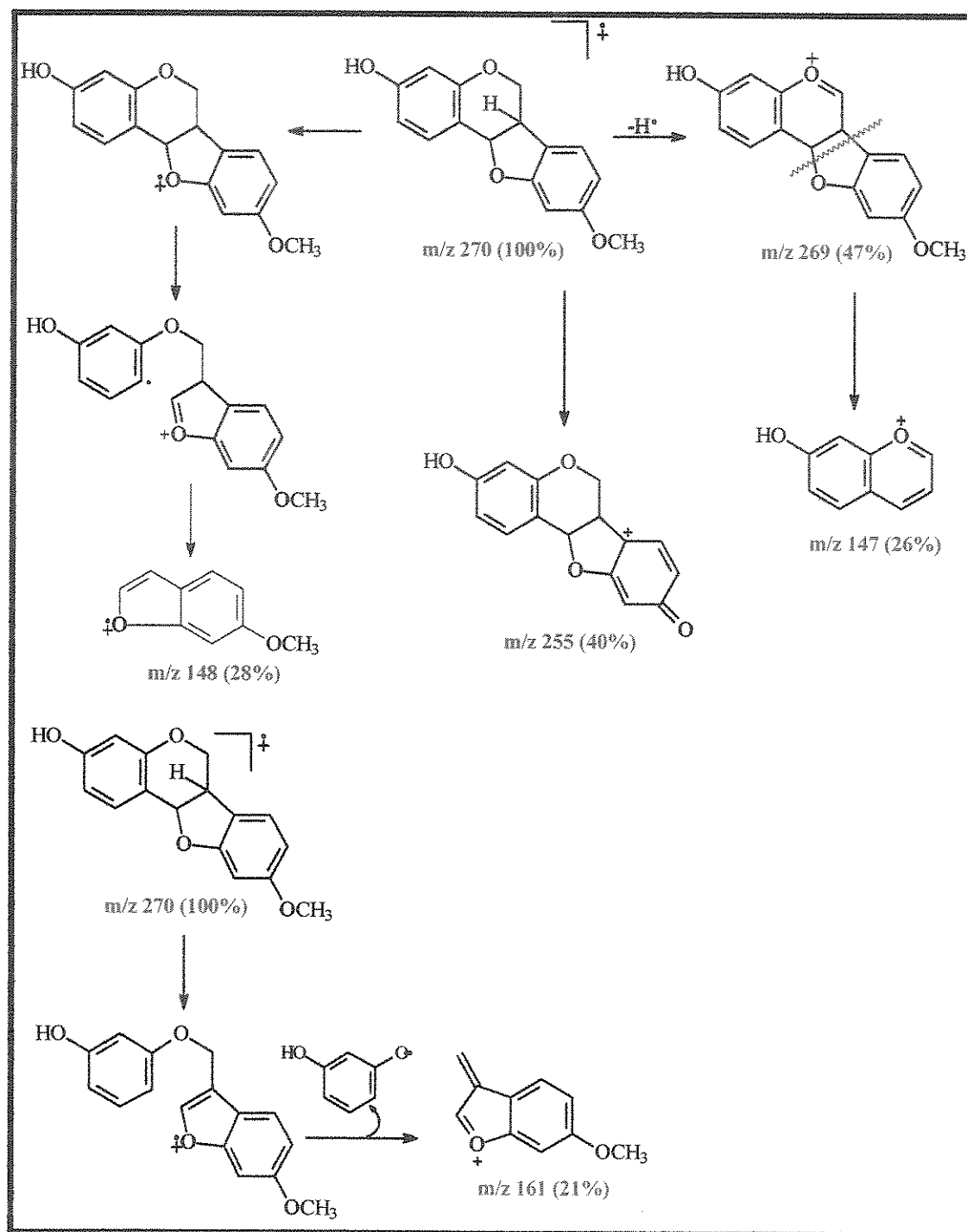
II.1.1. Identificação estrutural das substâncias conhecidas na literatura

II.1.1.1. Identificação estrutural dos pterocarpanos medicarpina (1), 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2) e do esteróide estigmasterol (10)

O espectro de RMN ^1H da substância 1 (Tabela 5, apêndice A; E.3 anexo) mostrou um complexo conjunto de sinais, integrando para quatro hidrogênios em δ 5,47 (1H, *d*, $J = 7$ Hz, H_{11a}); 4,20 (1H, *dd*, $J = 5$ e 11 Hz, H_{6eq}); 3,60 (1H, *t*, $J = 1$ Hz, H_{6ax}) e em δ 3,50 (1H, *m*, H_{6a}) característicos do anel heterocíclico dos pterocarpanos^{42,43,54}. Observou-se também a presença de apenas um grupo metoxi em δ 3,74 (3H, *s*, OCH_3) e de um grupo hidroxila em δ 6,69 (1H, *s*, OH).

Sinais referentes aos prótons aromáticos foram observados em δ 6,43 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H_{10}); 6,44 (1H, *dd*, $J = 2$ e 8 Hz, H_8); 6,51 (1H, *dd*, $J = 2$ e 8 Hz, H_2); 7,1 (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H_7) e 7,34 (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H_1).

Após a análise dos dados de RMN ^1H , ^{13}C e experimentos de DEPT 90° 135° (E.3, E.4 e E.5 anexo) e do espectro de massas de baixa resolução (E.6 anexo); onde o fragmento em m/z 161 (quadro 2) indica que os substituintes estão em anéis distintos e comparação com a literatura^{35,41} concluiu-se que a substância tratava-se do pterocarpano medicarpina. De fato, os espectros de UV e IV (E.1 E.2, anexo) e o dado de ponto de fusão mostraram-se de acordo com a estrutura proposta.



Quadro 2- proposta de fragmentação para o pterocarpano medicarpina.

A outra substância **2** apresentou um comportamento analítico em CCD análogo ao da medicarpina **1** e seu espectro de RMN ^1H (Tabela 7, apêndice A E.9, anexo) mostrou a presença dos prótons característicos do esqueleto pterocarpânico^{55,56} em δ 3,55 (1H, *m*, H_{6a}); 3,65 (1H, *t*, *J* = 11 Hz, H_{6ax}); 4,35 (1H, *dd*, *J* = 5 e 11 Hz, H_{6eq}) e 5,50 (1H, *d*, *J* = 7 Hz, H_{11a}). Observou-se também presença de dois grupos metoxilas em δ 3,78 (3H, *s*, OCH₃) e 3,91 (3H, *s*, OCH₃) além de um grupo hidroxila em δ 5,90 (1H, *s*, OH).

Sinais referentes aos prótons aromáticos foram observados em δ 6,47 (1H, *dd*, *J* = 2 e 8 Hz, H₈); 6,48 (1H, *d*, *J* = 2 Hz, H₁₀); 6,71 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, H₂); 7,1 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, H₇) e 7,19 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, H₁).

Através do experimento NOESY-1D (figura 10, página 59; E.15, anexo) realizado irradiando-se nos prótons da metoxila que absorve em δ 3,91 observou-se interação com o sinal em δ 5,90 o que sugere esta estar em posição vizinha ao grupo hidroxila.

A fórmula molecular da substância **2** foi determinada como sendo C₁₇H₁₆O₄ (M⁺ 300,07191) por espectrometria de massas de alta resolução (E.16, anexo). O espectro de massas do composto apresentou alguns fragmentos característicos conforme ilustra o quadro 3, página 58.

O espectro de RMN ^{13}C (tabela 8, apêndice A; E.10, anexo) mostrou sinais característicos em δ 39,3 (C_{6a}); 66,6 (C₆) e 78,5 (C_{11a}) confirmando-se tratar de um pterocarpano. Os espectros bidimensionais gCOSY, HSQC e gHMBC (tabela 9, apêndice A; E.12, E.13 e E.14, anexo) permitiu atribuir as demais correlações da estrutura. Com este conjunto de dados poder-se-ia propor duas estruturas alternativas:

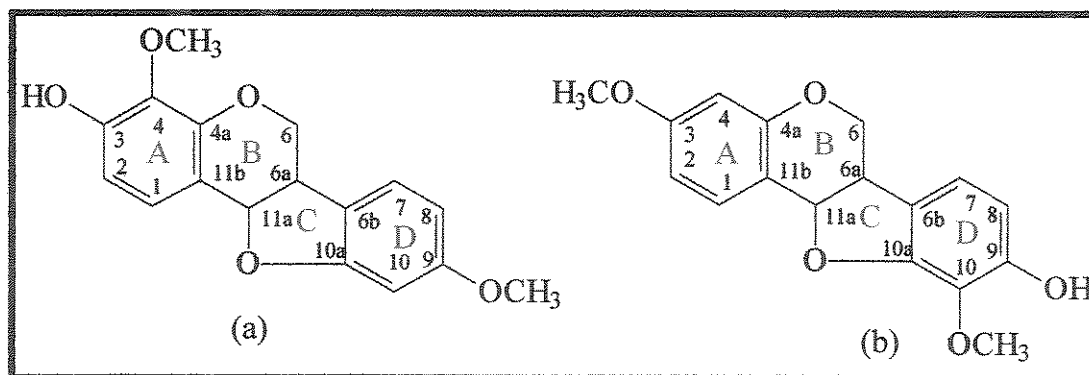
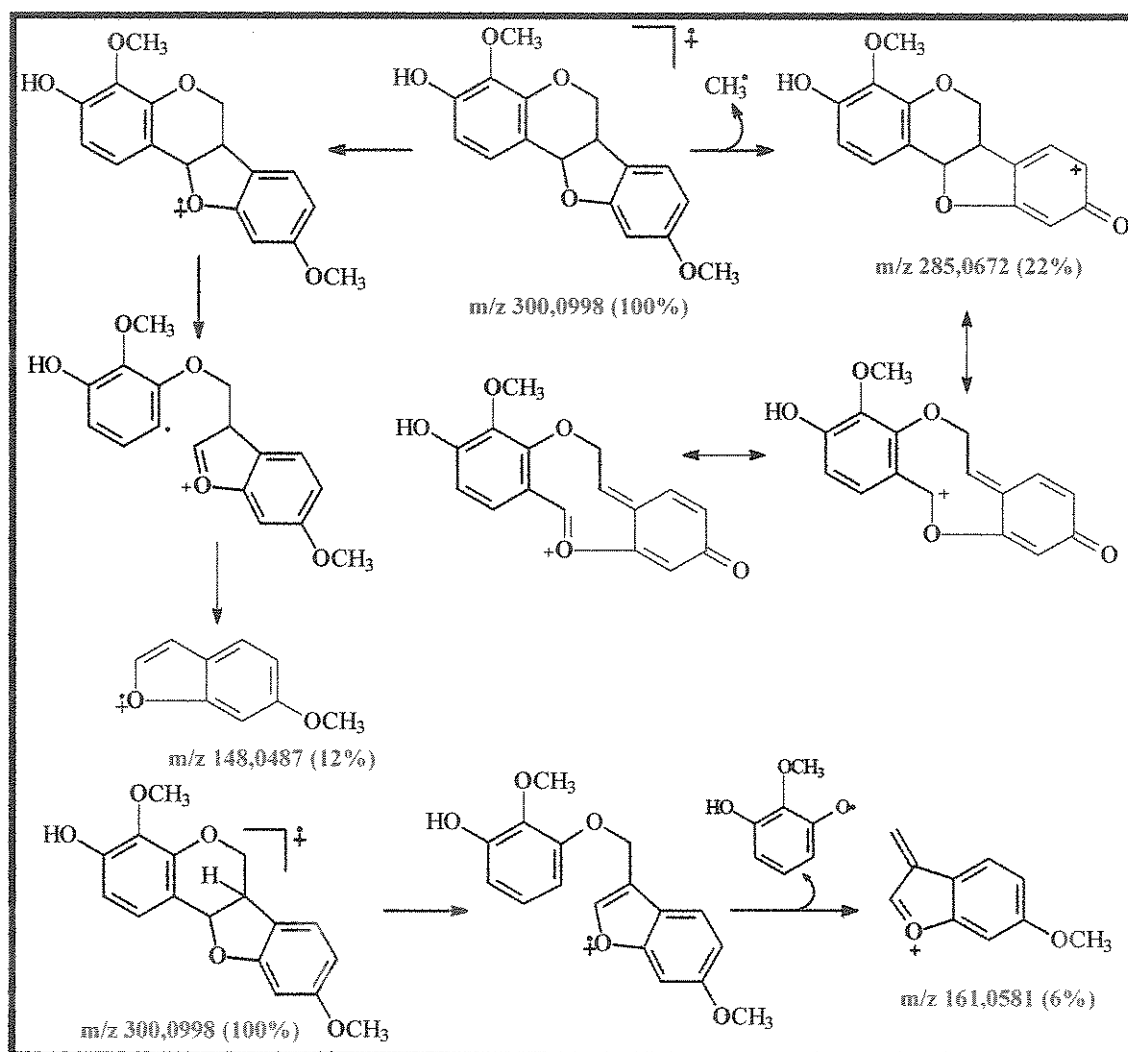


Figura 9- Propostas estruturais para a substância 2

Sendo que (a) foi sintetizado³⁷ e os dados correspondem ao de nosso produto natural.



Quadro 3- Proposta de fragmentação para o pterocarpano 2

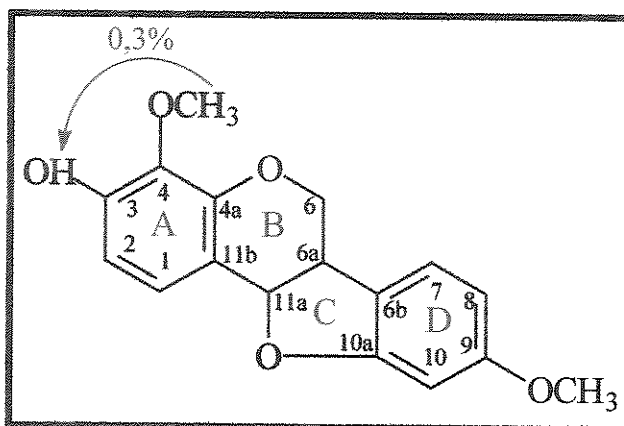


Figura 10- Incrementos de n.O.e. observados para o pterocarpano 2.

Finalmente, o esteróide estigmasterol (10) foi identificado por comparação de seus dados de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e espectrometria de massa de baixa resolução (tabela 10, apêndice A; E.115, anexo; tabela 11, apêndice A; E.116 e E.118, anexo) com os da literatura^{57,119,120}.

Apêndice A – Tabelas com dados de RMN das substâncias conhecidas na literatura isoladas de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae*

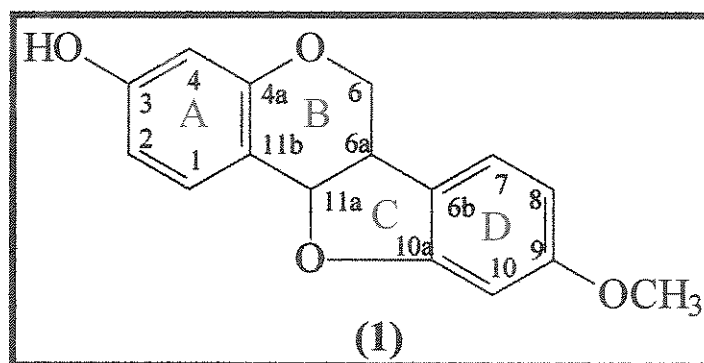


Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H (7,0 T, CDCl_3) da medicarpina (1).

δ_{H}	Multiplicidade e J (Hz)	H
7,34	1H, <i>d</i> , $J = 8$	H-1
7,10	1H, <i>d</i> , $J = 8$	H-7
6,69	1H, <i>s</i>	3-OH
6,51	1H, <i>dd</i> , $J = 2$ e 8	H-2
6,44	1H, <i>dd</i> , $J = 2$ e 8	H-8
6,43	1H, <i>d</i> , $J = 2$	H-10
6,39	1H, <i>d</i> , $J = 2$	H-4
5,47	1H, <i>d</i> , $J = 7$	H-11a
4,20	1H, <i>dd</i> , $J = 5$ e 11	H-6eq
3,74	3H, <i>s</i>	9-OCH ₃
3,60	1H, <i>t</i> , $J = 11$	H-6ax
3,50	1H, <i>m</i>	H-6a

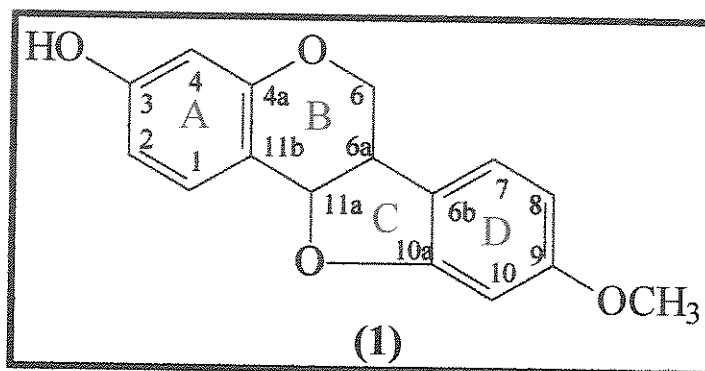


Tabela 6 – Dados de RMN de ^{13}C (7,0 T, CDCl_3) da medicarpina (1).

Carbono	δ_{C}	δ_{C} literatura ⁴¹
1	131,9	131,9
2	109,7	109,7
3	156,9	158,7
4	103,4	102,9
4a	156,2	156,4
6	66,4	65,5
6a	39,4	39,3
6b	118,9	119,4
7	124,5	125,0
8	106,3	106,0
9	160,6	160,6
10	96,7	96,3
10a	160,2	160,4
11a	78,5	78,1
11b	112,1	111,3
9-OCH ₃	55,4	55,3

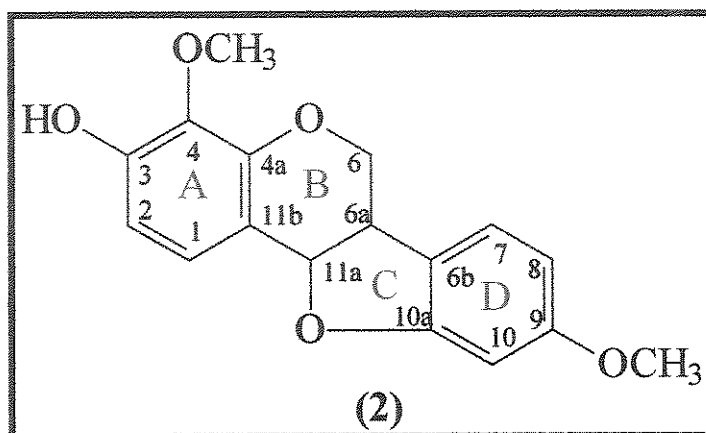


Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H (7,0 T, CDCl_3) do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2).

δ_{H}	Multiplicidade e J (Hz)	H
7,19	1H, d , $J = 8$	H-1
7,15	1H, d , $J = 8$	H-7
6,71	1H, d , $J = 8$	H-2
6,48	1H, d , $J = 2$	H-10
6,47	1H, dd , $J = 2$ e 8	H-8
5,90	1H, s	3-OH
5,51	1H, d , $J = 7$	H-11a
4,35	1H, dd , $J = 5$ e 11	H-6eq
3,91	3H, s	4-OCH ₃
3,78	3H, s	9-OCH ₃
3,65	1H, t , $J = 11$	H-6ax
3,55	1H, m	H-6a

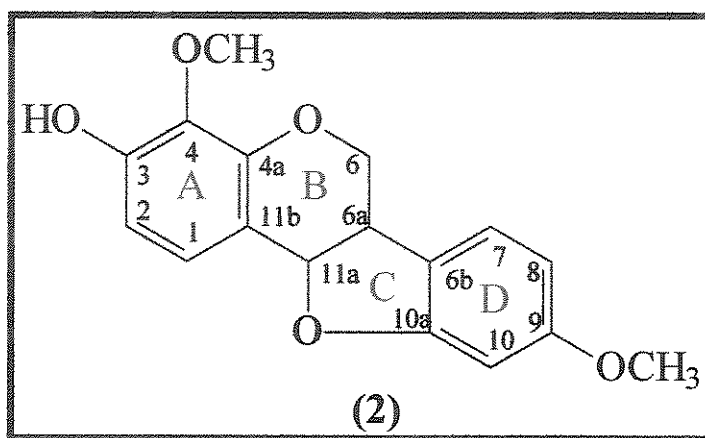


Tabela 8 – Dados de RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3) do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2).

Carbono	δ_{C}
1	126,1
2	109,0
3	149,6
4	134,9
4a	148,5
6	66,6
6a	39,3
6b	118,9
7	124,8
8	106,4
9	161,1
10	96,9
10a	160,6
11a	78,5
11b	113,2
4-OCH ₃	61,2
9-OCH ₃	55,5

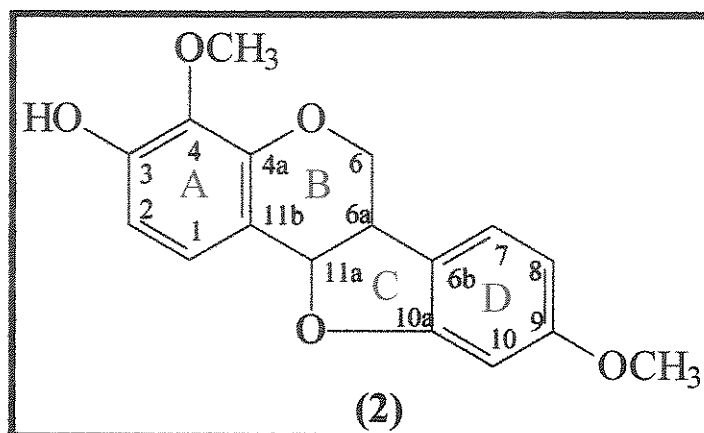


Tabela 9 – Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) do 3-hidroxi-4,9-dimetoxi-pterocarpano (2).

δ_{H}	$\delta_{\text{C}} (^1J)$	$\delta_{\text{C}} (^3J)$
7,19	126,1 (C-1)	148,5 (C-4a); 78,5 (C-11a)
7,15	124,8 (C-7)	160,6 (C-10a); 118,9 (C-6b); 39,3 (C-6a)
6,71	109,0 (C-2)	149,6 (C-3); 134,9 (C-4); 113,2 (C-11b)
6,48	96,9 (C-10)	118,9 (C-6b); 106,4 (C-8); 96,9 (C-10)
6,47	106,4 (C-8)	160,6 (C-10a); 118,9 (C-6b); 106,4 (C-8)
5,90	-	149,6 (C-3)
5,51	78,5 (C-11a)	148,5 (C-4a); 126,1 (C-1); 66,6 (C-6)
4,35	66,6 (C-6)	148,5 (C-4a); 78,5 (C-11a)
3,91	61,2 (4-OCH ₃)	134,9 (C-4)
3,78	55,5 (9-OCH ₃)	161,1 (C-9)
3,65	66,6 (C-6)	148,5 (C-4a); 78,5 (C-11a)
3,55	39,3 (C-6a)	118,9 (C-6b); 66,6 (C-6)

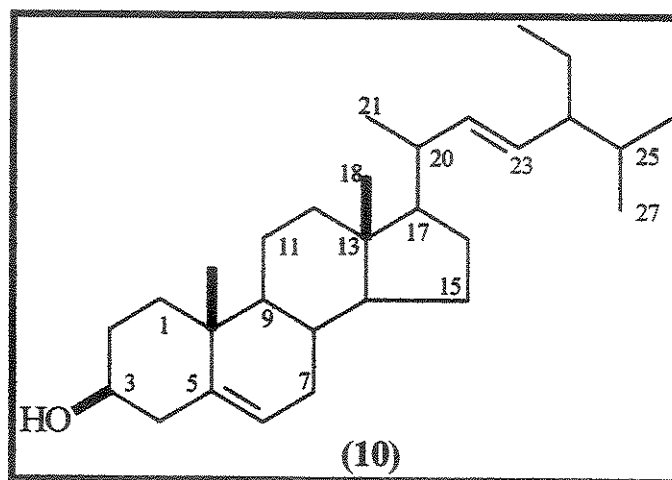


Tabela 10– Dados de RMN de ^1H (7,0 T, CDCl_3) do estigmasterol (10).

$\delta_{\text{LIT.}}^{119}$	δ_{EXP}	H
n.r.	3,53 (m)	H-3
n.r.	5,35 (d, $J = 5$ Hz)	H-6
0,69(s)	0,69 (s)	H-18
1,02 (s)	1,02 (s)	H-19
1,02 (d, $J = 7$ Hz)	0,93 (d, $J = 7$ Hz)	H-21
n.r.	5,02 (dd, $J = 15$ e 8 Hz)	H-22
n.r.	5,15 (dd, $J = 15$ e 8 Hz)	H-23
0,84 (d, $J = 7$ Hz)	0,84 (d, $J = 7$ Hz)	H-26
0,79 (d, $J = 7$ Hz)	0,81 (d, $J = 7$ Hz)	H-27
-	0,78 (d, $J = 7$ Hz)	H-28
0,80 (t, $J = 7$ Hz)	0,83 (t, $J = 7$ Hz)	H-29

n.r.: não relatado; Exp.: 300 MHz; Ref. 119: 220 MHz; em CDCl_3/TMS .

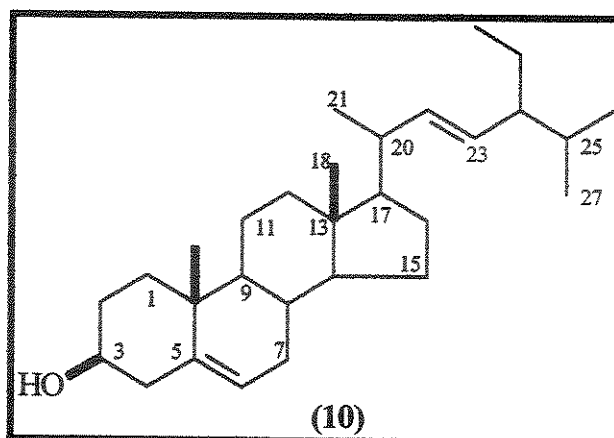


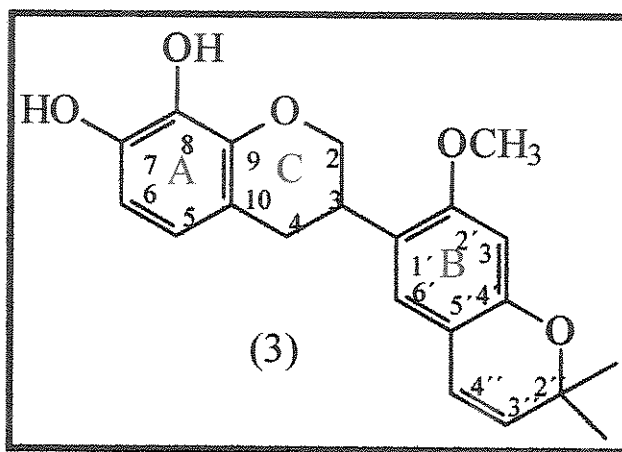
Tabela 11– Dados de RMN de ^{13}C (7,0 T, CDCl_3) do stigmasterol (10).

Carbono	Multiplicidade	δ_{C}	δ_{C} -literatura ¹²⁰
1	CH_2	37,2	37,3
2	CH_2	31,6	31,7
3	CH	71,8	71,8
4	CH_2	42,3	42,4
5	C_0	140,7	140,8
6	CH	121,7	121,7
7	CH_2	31,9	31,9
8	CH	31,9	31,9
9	CH	50,1	50,2
10	C_0	36,5	36,6
11	CH_2	21,1	21,1
12	CH_2	39,7	39,7
13	C_0	42,3	42,4
14	CH	56,7	56,9
15	CH_2	24,3	24,4
16	CH_2	28,2	29,0
17	CH	56,0	56,1
18	CH_3	12,0	12,1
19	CH_3	19,4	19,4
20	CH	40,5	40,5
21	CH_3	21,0	21,1
22	CH	138,3	138,4
23	CH	129,2	129,3
24	CH	51,2	51,3
25	CH	31,9	31,9
26	CH_3	21,2	21,3
27	CH_3	19,8	19,0
28	CH_2	25,4	25,4
29	CH_3	11,8	12,3

II.1.2. Identificação estrutural das substâncias inéditas 3-9

A descrição da determinação estrutural dos novos isoflavonóides encontra-se detalhada nos parágrafos seguintes.

II.1.2.1. Determinação estrutural da 7,8-diidroxi-2'-metoxi [(4',5':5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] isoflavana (3)



A análise do espectro de RMN ^1H (tabela 12, apêndice B; E.19, anexo) da substância 3 indicou a existência de um anel heterocíclico (C) de um esqueleto isoflavânico, representado por 5H ($\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$)^{45,47,48,49,58}. Os deslocamentos químicos destes hidrogênios ($\delta_{\text{H4eq}}=2,89$; $\delta_{\text{H4ax}}=2,99$; $\delta_{\text{H3}}=3,48$; $\delta_{\text{H2ax}}=4,02$; $\delta_{\text{H2eq}}=4,40$) compatíveis para o anel C de uma isoflavana, podem ser confirmados pela interpretação do espectro de HSQC (tabela 13, apêndice B; E.25, anexo), em consonância com as absorções no espectro de RMN ^{13}C (tabela 22, apêndice E E.21, anexo) respectivamente em δ 30,0 (C_4), 31,6 (C_3) e 70,4 (C_2).

No espectro de RMN ^1H observou-se também os sinais referentes aos dois anéis aromáticos (A e B) tetrassubstituídos, um dos quais contendo 2H em posição relativa para, representados por dois singletos em δ 6,41 (1H) e 6,72 (1H). O outro anel aromático, por sua vez, suporta os 2H em posição relativa orto, representados pelos dois dubletos em δ 6,52 (1H, $J=8$ Hz) e 6,56 (1H, $J=8$ Hz). Além disto observou-se a presença de um grupo metoxila em δ 3,81 (3H, *s*, OCH_3); de dois grupos hidroxilas em δ 5,18 (1H, *s/l*, OH) e 5,30 (1H, *s/l*, OH) e um sistema 2,2 dimetil-cromênico representado pelos sinais em δ 1,45 (6H, *s*, 2''- CH_3); 5,48 (1H, *d*, $J=10$ Hz) e 6,25 (1H, *d*, $J=10$ Hz).

A análise do espectro de massas (quadro 4, página 70; E.29, anexo) foi relevante no posicionamento dos substituintes nos anéis A ou B. A perda de um radical metil ($\cdot\text{CH}_3$) a partir do pico molecular (M^+ 354), típico na fragmentação de 2,2 dimetilcromeno, seguido de uma clivagem RDA, resultando no pico m/z 201 Da, remanescente do anel B, contendo o resíduo 2,2 dimetilcromeno e o grupo metoxila. Assim ao anel A restaria os dois grupos hidroxílicos restantes, que só poderiam estar localizados em C_7 e C_8 ou C_6 e C_7 , para ser coerente com a bissíntese, sempre levando à oxigenação em C-7 e a presença de 2H).

Os experimentos NOESY-1D mostraram interação do H-4'' do cromeno com o H-3'' e com o hidrogênio aromático, representado pelo singlete em δ 6,72, por sua vez, o grupo metoxila mostrou interação única com o hidrogênio aromático representado pelo singlete em δ 6,41 (figura 11, página 69; E.28a, E.28b, anexo).

Os espectros de HSQC e gHMBC (tabela 13, apêndice B; E.25 e E.27, anexo) forneceram os demais dados para definir a estrutura de 3.

Após amplo levantamento bibliográfico, localizou-se duas estruturas que eram semelhantes a isoflavana isolada de *Harleyodendron unifoliolatum*:

faseolinaisoflavana⁴⁵ (estrutura IV, figura 12, página 69) e erythbidina A (estrutura V, figura 12, página 69).

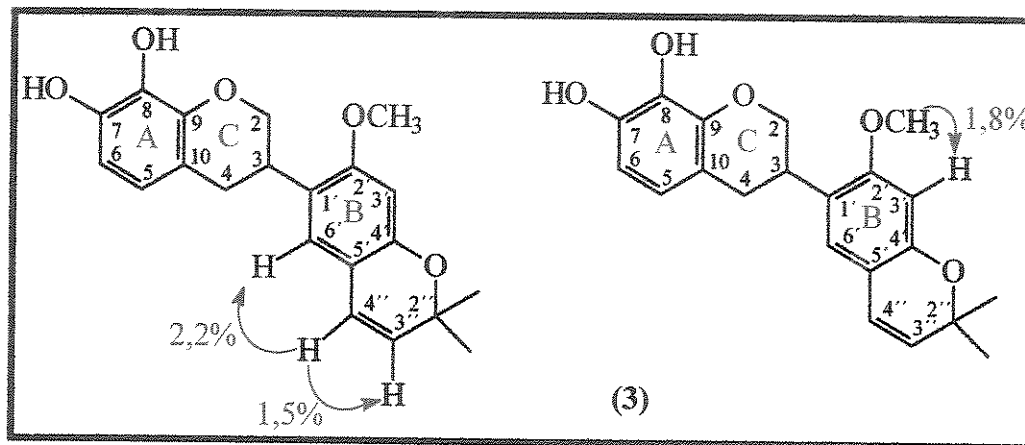


Figura 11- Incrementos de n.O.e. observados para a isoflavana 3.

Os valores de α_D obtidos para a substância 3 ($\alpha_D = -16,0^\circ$) com faseolinaisoflavana ($\alpha_D = -9,0^\circ$) e com a erythbidina A ($\alpha_D = -13,0^\circ$) mostraram-se bastante próximos.

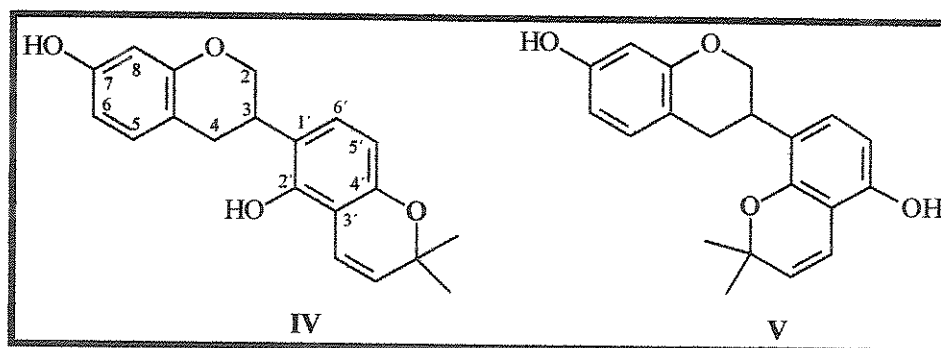
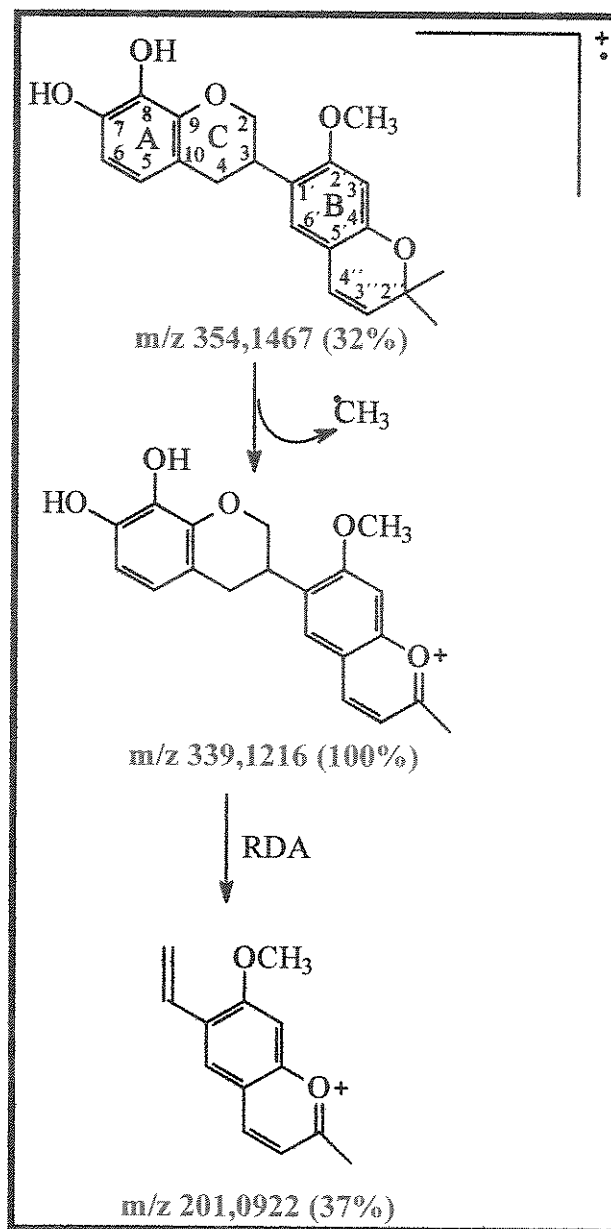


Figura 12- Estruturas das substâncias faseolinaisoflavana (IV) e erythbidina A (V)

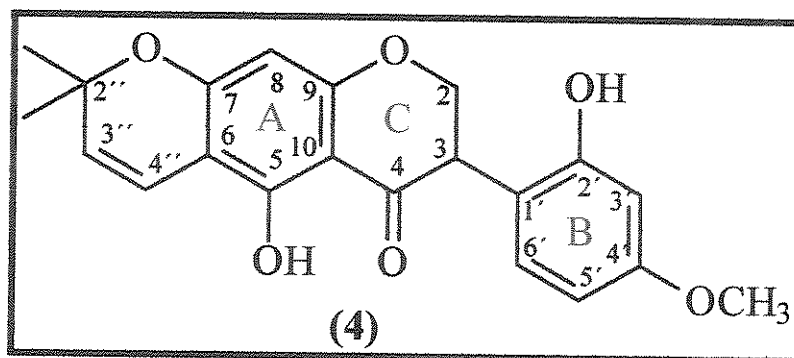


Quadro 4 – proposta de fragmentação para a substância 3.

O espectro no IV de 3 (E.18, anexo) apresentou absorção a 3449 cm^{-1} característica de grupos hidroxilas e as absorções em 1618 cm^{-1} e 1509 cm^{-1} confirmaram a presença do anel aromático; enquanto no espectro no UV de 3

(E.17, anexo) as bandas em 215, 275 e 315 nm confirmaram a presença do núcleo de uma isoflavana.

II.1.2.2. Determinação estrutural da 5,2'-diidroxil-[(6,7:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]-4'-metoxi isoflavanona (4)



A análise do espectro de RMN ^1H (11 T, CDCl_3/TMS , tabela 14, apêndice E.32, anexo) da substância 4 indicou a existência de um anel heterocíclico (C) de um esqueleto isoflavanoídico, representado por 3H ($\text{CH}_2\text{-CH}$)^{51,52,53,58}. C deslocamentos químicos destes hidrogênios ($\delta_{\text{H3}} = 3,96$; $\delta_{\text{H2ax}} = 4,71$ e $\delta_{\text{H2eq}} = 4,85$) compatíveis para o anel C de uma isoflavanona, podem ser confirmados pela interpretação do espectro de HSQC (tabela 15, apêndice B; E.45, anexo) e consonância com as absorções no espectro de RMN ^{13}C (11 T, CDCl_3/TMS , tabela 30, apêndice B, E.34, anexo), respectivamente em δ 69,4 (C-2); 44,7 (C-3) e em 196,6 (C-4).

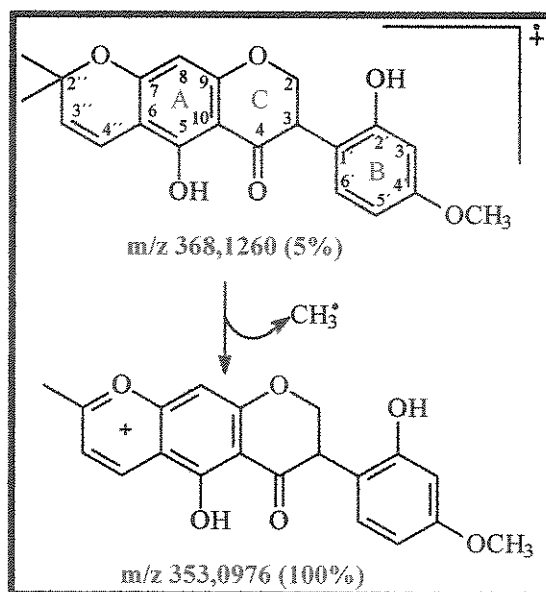
No espectro de prótons observou-se também os dois anéis aromáticos (A e B). Um suportando um H (representado pelo singlete em δ 5,94). O outro anel aromático, por sua vez, suporta 3H em posições relativas orto-meta; representado pelo duplo-dublete em δ 6,50 (1H, *dd*, $J = 2$ e 8 Hz); pelo dublete em δ 6,53 (1H, *c*, $J = 2$ Hz) e pelo dublete em δ 7,37 (1H, *d*, $J = 8$ Hz). Além disto observou-se

presença de um grupo metoxila em δ 3,77 (3H, *s*, OCH₃); dois grupos hidroxilas em δ 11,93 (1H, *s*, OH) e 7,81 (1H, *s*, OH), o primeiro indicando que este grupo hidroxila apresentava-se em posição “peri” à carbonila (C-4) e um sistema 2,2 dimetil-cromênico representado pelos sinais em δ 6,62 (1H, *d*, *J*=10 Hz); 5,44 (1H, *d*, *J*=10 Hz); 1,41 (3H, *s*, 2''-CH₃) e 1,39 (3H, *s*, 2''-CH₃). A análise dos espectros bidimensionais obtidos para a isoflavanona 4 (HSQC, gHMBC, tabela 15, apêndice B, E.38 e E.40, anexo) forneceram os demais dados para definir a estrutura de 4.

A análise do espectro de massas (quadro 5, página 73; E.41, anexo) forneceu como fragmentação principal a perda de um radical metil (.CH₃) a partir do pico molecular (M⁺ 368), típico na fragmentação de 2,2 dimetilcromeno. No espectro de RMN ¹H (tabela 16, apêndice B, E.43, anexo) da isoflavanona acetilada observou-se a ausência dos sinais dos dois grupos hidroxilas observados no espectro de prótons da isoflavanona 4 e a presença de dois grupos acetatos em δ 2,27 (3H, *s*, CH₃) e 2,37 (3H, *s*, CH₃). No espectro de RMN ¹³C (tabela 30, apêndice B, E.45, anexo) observou-se outra evidência importante: o deslocamento da carbonila do C-4 que anteriormente era de δ_C 196,6, passou para 188,6; confirmando-se que uma das hidroxilas está em posição “peri” a carbonila.

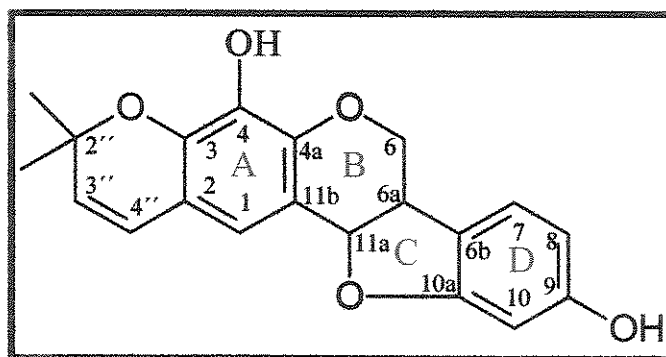
Pela análise dos espectros de RMN bidimensionais obtidos (HSQC, gHMBC, tabela 17, apêndice B, E.49 e E.51, anexo) para a isoflavanona acetilada, os dados foram totalmente compatíveis com a estrutura da isoflavanona 4 proposta acima.

O espectro no IV de 4 (E.31, anexo) apresentou absorção a 3389 cm⁻¹ característica de grupos hidroxilas, a absorção em 1519 cm⁻¹ confirmou a presença do anel aromático e absorção em 1643 cm⁻¹ indicou a presença de um grupo carbonila; enquanto no espectro no UV de 4 (E.30, anexo) as bandas em 233, 276 e 339 nm confirmaram a presença do núcleo de uma isoflavanona.



Quadro 5 – proposta de fragmentação para a substância 4.

II.1.2.3. Determinação estrutural do 4,9-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2'' dimetilpirano] pterocarpano (5)



A análise dos dados de RMN ^1H (11T, CDCl_3/TMS , tabela 18, apêndice I E.54, anexo) para a substância 5 indicou a existência de um anel heterocíclico (E de um esqueleto pterocarpânico, representado por 4H ($-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-$)^{44,46,55}. C deslocamentos químicos destes hidrogênios em δ 3,59 (1H, *m*, H_{6a}); 3,66 (1H, *t*, H_{6ax}); 4,35 (1H, *m*, H_{6eq}) e 5,50 (1H, *d*, $J=7$ Hz, H_{11a}), compatíveis para

anel B de um pterocarpano, podem ser confirmados pela interpretação do espectro de HSQC (tabela 19, apêndice B; E.60 anexo) em consonância com as absorções no espectro de RMN ^{13}C (tabela 25, apêndice B; E.56, anexo), respectivamente em δ 66,9 (C_6); 78,6 (C_{11a}) e 39,5 (C_{6a}).

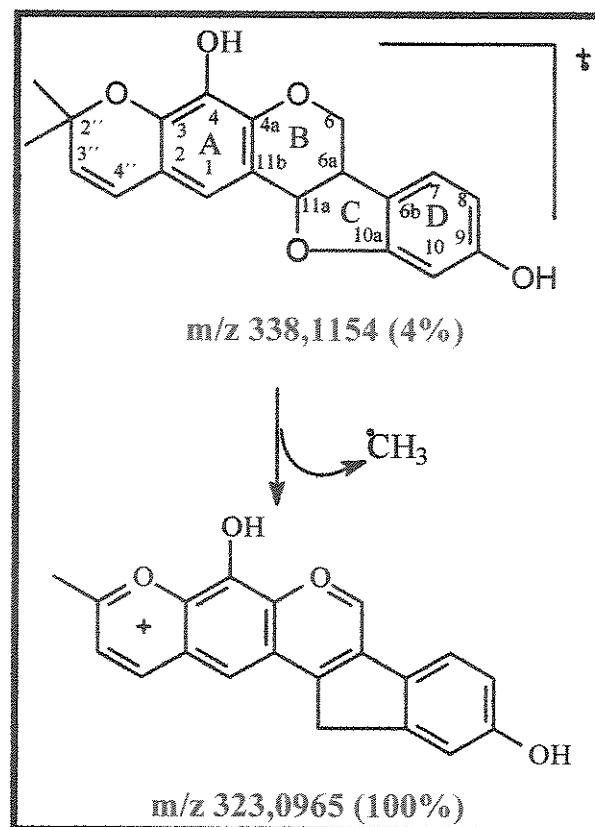
No espectro de prótons observou-se também outro anel aromático (D) suportando 3H em posições relativas orto-meta representados pelo dubleto em 6,37 (1H, *d*, $J=2$ Hz); pelo duplo-dubleto em δ 6,39 (1H, *dd*, $J=2$ e 8 Hz) e pelo dubleto em 7,10 (1H, *d*, $J=8$ Hz). Além disso observou-se a presença de um singleto em δ 6,78 (1H, *s*); dois grupos hidroxilas em δ 5,36 (1OH, *s*) e 4,95 (1OH, *sl*); além de um sistema 2,2 dimetil cromênico representado pelos sinais em δ 1,46 (3H, *s*, 2''-CH₃); 1,50 (3H, *s*, 2''-CH₃); δ 5,58 (1H, *d*, $J=10$ Hz) e 6,33 (1H, *d*, $J=10$ Hz).

A análise do espectro de massas (quadro 6, página 75; E.64, anexo) forneceu como fragmentação principal a perda de um radical metil ($\cdot\text{CH}_3$) a partir do pico molecular (M^+ 338), típico na fragmentação de 2,2 dimetilcromeno.

Os experimentos bidimensionais (gCOSY, HSQC e gHMBC- tabela 19, apêndice B; E.58, E.60 e E.62, anexo) forneceram os demais dados para definir a estrutura de **5**.

Através do experimento NOESY-1D observou-se que irradiação do próton que absorve em δ 6,78 (1H, *s*, H-1) causou incremento dos sinais referentes a H-4'' (δ 6,33; 1H, *dd*, $J=10$ Hz) e H-11a (δ 5,50; 1H, *d*, $J=7$ Hz) confirmando a estrutura proposta (figura 13, página 75; E.63, anexo).

O espectro no IV de **5** (E.53, Anexo) apresentou absorção a 3423 cm^{-1} característica de grupos hidroxila e as absorções em 1625 cm^{-1} e 1498 cm^{-1} confirmaram a presença do anel aromático; enquanto no espectro no UV de **5** (E.52, anexo) as bandas em 211, 220 e 285 nm confirmaram a presença do núcleo pterocarpânico.



Quadro 6– Proposta de fragmentação para a substância 5.

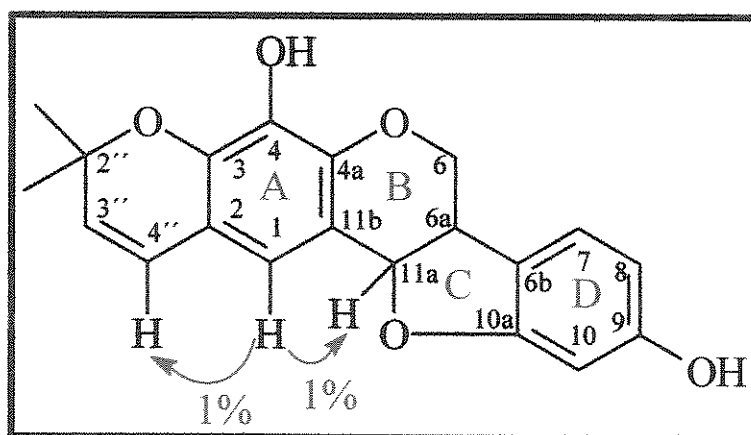
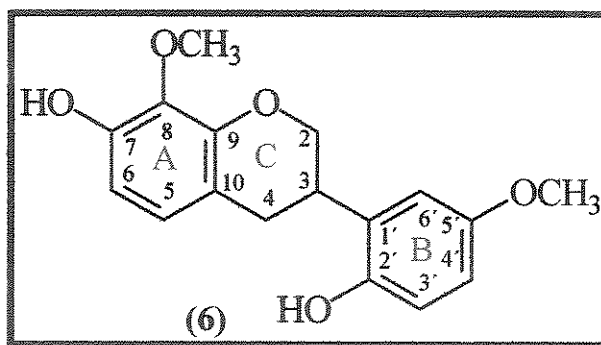


Figura 13- Incrementos de n.O.e. observados para o pterocarpano 5.

II.1.2.4. Determinação estrutural da 2',7-diidroxi-5',8-dimetoxi-isoflavana (6)



A análise do espectro de RMN ^1H (11 T, CDCl_3/TMS , tabela 20, apêndice B; E.67, anexo) da substância 6, mostrou grande semelhança com a isoflavana 3, principalmente pela presença do anel heterocíclico C de uma isoflavana ($\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$) representados pelas absorções em $\delta_{\text{H4eq}}=2,93$; $\delta_{\text{H4ax}}=2,99$; $\delta_{\text{H3}}=3,53$; $\delta_{\text{H2ax}}=4,09$ e $\delta_{\text{H2eq}}=4,44$ compatíveis para o anel C de uma isoflavana, podem ser confirmados pela interpretação do espectro de HSQC (tabela 21, apêndice B; E.73, anexo), em consonância com as absorções no espectro de RMN ^{13}C (tabela 22, apêndice B; E.69, anexo) respectivamente em δ 30,5 (C_4), 31,6 (C_3) e 69,4 (C_2).

Pode-se observar ainda a presença de dois grupos metoxilas e dois grupos hidroxilas, representados pelos sinais respectivamente em δ 3,79 (3H, s, OCH_3); 3,93 (3H, s, OCH_3); 4,94 (1H, s, OH) e 5,66 (1H, s, OH).

Como na isoflavana 3, a análise do espectro de massas (quadro 7, página 78; E.77 anexo) e experimentos de RMN bidimensionais (gCOSY, HSQC e gHMBC, tabela 21, apêndice B, E.71, E.73 e E.75, anexo) permitiram propôr a estrutura de 6 com bastante segurança.

Através do experimento NOESY-1D observou-se que irradiação dos próton da metoxila que absorve em δ 3,79 causou incremento dos sinais referentes a H-4 (δ 6,50, 1H, *dd*, $J=2$ e 8 Hz) e H-6' (δ 6,38, 1H, *d*, $J=2$ Hz). Por sua vez, irradiação dos prótons da metoxila que absorve em δ 3,93 não causou nenhum incremento, sugerindo esta estar em posição vizinha a grupos oxigenados (figura 14, página 77; E.76a, E.76b, anexo).

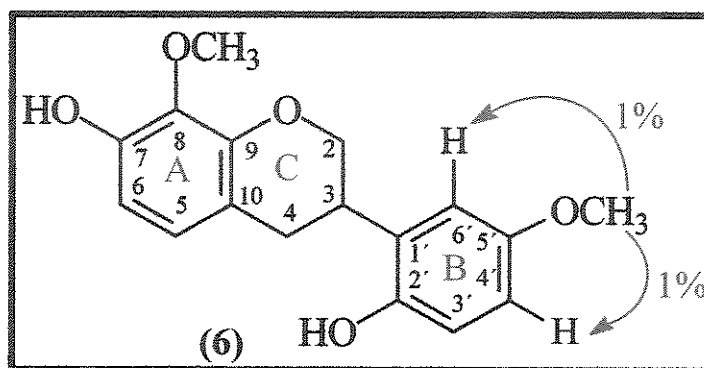
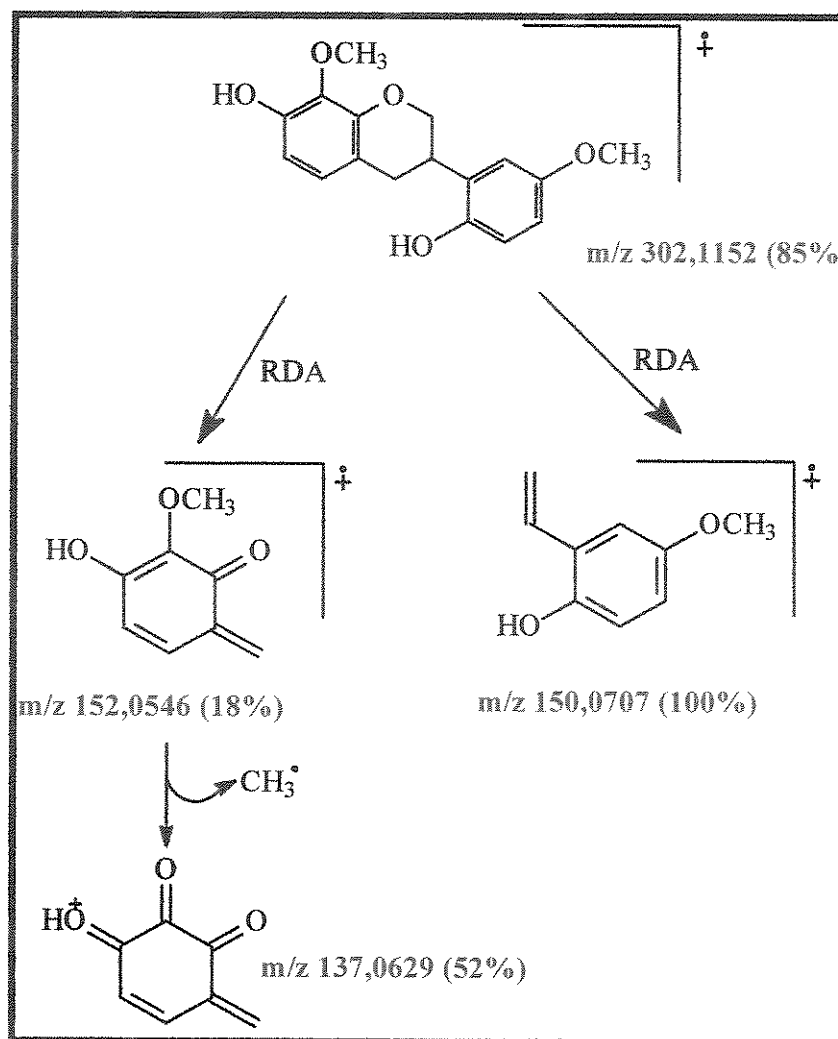


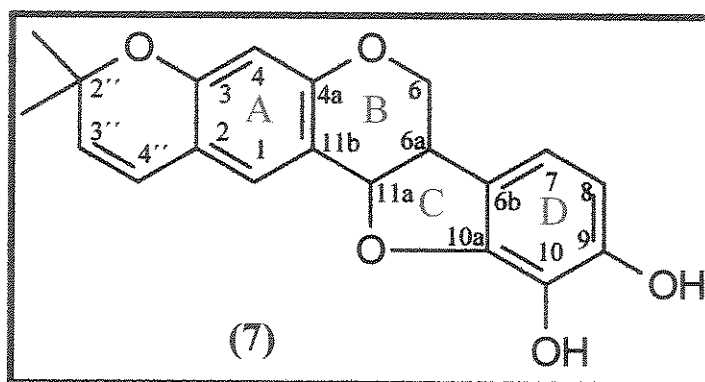
Figura 14- Incrementos de n.O.e. observados para a isoflavana 6.

O espectro no IV de 6 (E.66, anexo) apresentou absorção a 3370 cm^{-1} característica de grupos hidroxila e as absorções em 1618 cm^{-1} e 1498 cm^{-1} confirmaram a presença do anel aromático; enquanto no espectro no UV de (E.65, anexo) as bandas em 211 e 286 nm confirmaram a presença do núcleo de uma isoflavana.



Quadro 7 – Proposta de fragmentação para a substância 6.

II.1.2.5. Determinação estrutural do 9,10-diidroxi-[(2,3:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] pterocarpano (7)

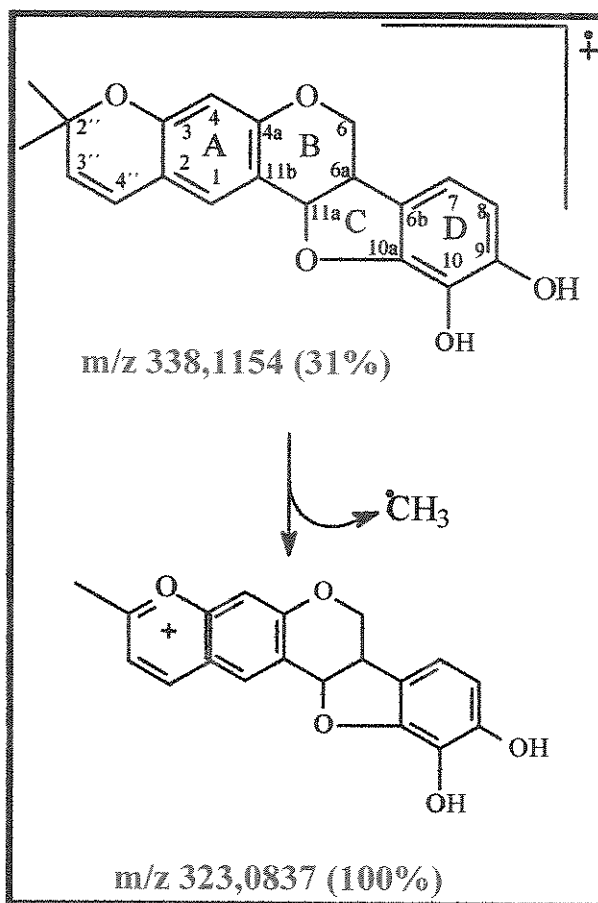


A análise do espectro de RMN ^1H (11T, CDCl_3/TMS , tabela 23, apêndice E E.80, anexo) da substância 7 mostrou uma grande semelhança com o pterocarpano 5, principalmente pela presença do anel heterocíclico (B) de um pterocarpano (- $\text{CH}_2\text{-CH-CH-}$) representados pelas absorções em δ 3,55 (1H, *m*, H_{6a}); 3,73 (1H, $J=11$ Hz, H_{6ax}); 4,34 (1H, *dd*, $J=5$ e 11 Hz, H_{6eq}) e 5,51 (1H, *d*, $J=7$ Hz, H_{11a}).

Pode-se observar ainda a presença de dois grupos hidroxilas representadas pelas absorções em δ 5,35 (1OH, *sl*) e 5,36 (1OH, *sl*); além da presença do sistema 2,2 dimetil cromênico em δ 1,42 (6H, *s*, 2''- CH_3); δ 5,48 (1H, *d*, $J=10$ Hz) e δ 6,2 (1H, *d*, $J=10$ Hz).

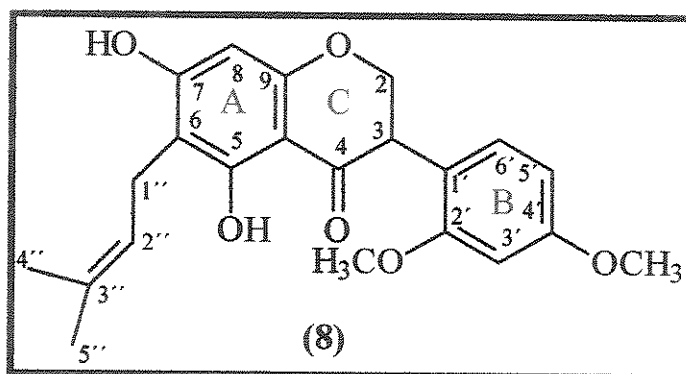
Como no pterocarpano 5, a análise do espectro de massas (quadro 8, página 80, E.89, anexo) forneceu como fragmentação principal a perda de um radical metil ($\cdot\text{CH}_3$) a partir do pico molecular (M^+ 338), típico na fragmentação de 2, dimetilcromeno. Os experimentos de RMN bidimensionais (gCOSY, HSQC gHMBC, tabela 24, apêndice B, E.84, E.86 e E.88, anexo) obtidos permitiram propor a estrutura de 7 com bastante segurança.

O espectro no IV de 7 (E.79, anexo) apresentou absorção a 3448 cm^{-1} característica de grupos hidroxila e as absorções em 1624 cm^{-1} e 1482 cm^{-1} confirmaram a presença do anel aromático; enquanto no espectro no UV de 7 (E.78, anexo) as bandas em 205 e 320 nm confirmaram a presença do núcleo de um pterocarpano.



Quadro 8 – Proposta de fragmentação para a substância 7.

II.1.2.6. Determinação estrutural da 5,7-diidroxi-2',4'-dimetoxi-6-(3''-metil-2''-butenil) isoflavanona (8)



Pela análise dos espectros de RMN ^1H (11T, CDCl_3/TMS , tabela 26, apêndice B; E.92, anexo) e RMN ^{13}C (11T, CDCl_3/TMS , tabela 30, apêndice E; E.94, anexo) foi possível verificar que a substância (8) tratava-se de um isoflavanona^{56,58} pelos sinais característicos em δ 4,53 (1H, *t*, J = 11 Hz, H-2_{eq}), 4,42 (1H, *dd*, J = 5 e 11 Hz, H-2_{ax}); 4,31 (1H, *dd*, J = 5 e 11 Hz, H-3) e em δ 70,4 (C-2); 46,7 (C-3) e em 197,6 (C-4).

O espectro de RMN ^1H mostrou que havia a presença de dois grupos metoxilas na molécula pelos deslocamentos químicos em δ 3,79 (3H, *s*, OCH_3) e em 3,81 (3H, *s*, OCH_3), dois grupos hidroxilas pelos deslocamentos químicos em δ 6,19 (1H, *s*, OH) e em 12,70 (1H, *s*, OH); este último indicando que este grupo hidroxila apresentava-se em posição “peri” à carbonila do carbono 4. Foi possível evidenciar também a presença do grupo γ,γ dimetil alil pelo conjunto de sinais em δ 1,57 (6H, *s*, $2 \times \text{CH}_3$); 3,39 (2H, *d*, J = 7 Hz) e 5,28 (1H, *t*, J = 11 Hz); além da presença de quatro prótons aromáticos pelos deslocamentos químicos em δ 5,9'

(1H, s); 6,49 (1H, dd, $J = 2$ e 8 Hz); 6,51 (1H, d, $J = 2$ Hz) e em 7,03 (1H, d, $J = 8$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C mostrou a presença de 22 sinais correspondendo a 22 átomos de carbono presentes na estrutura. Pelos experimentos tipo DEPT (90° e 135° , E.95, anexo) foi possível atribuir a multiplicidade de cada átomo de carbono.

A análise do espectro de massas de alta resolução (quadro 9, página 83; E.101, anexo) e do conjunto de espectros bidimensionais obtidos para a isoflavanona (8) foram de fundamental importância para a elucidação estrutural da substância. Pelo espectro HSQC (11T, CDCl_3/TMS , tabela 27, apêndice B, E.98, anexo) (correlação próton-carbono a uma ligação) foi possível atribuir em quais átomos de carbono cada hidrogênio estava ligado e pelo espectro de gHMBC (11T, CDCl_3/TMS , tabela 27, apêndice B, E.100, anexo) (correlação próton-carbono a três ligações) (figura 15, página 82) foi possível atribuir a localização exata dos substituintes. Após um amplo levantamento bibliográfico realizado, verificou-se que tratava-se de uma estrutura inédita.

O espectro no IV de 8 (E.91, anexo) apresentou absorção a 3423 cm^{-1} característica de grupos hidroxila, a absorção em 1509 cm^{-1} confirmou a presença do anel aromático e absorção em 1638 cm^{-1} indicou a presença de um grupo carbonila, enquanto no espectro no UV de 8 (E.90, anexo) as bandas em 233 e 276 nm confirmaram a presença do núcleo de uma isoflavanona.

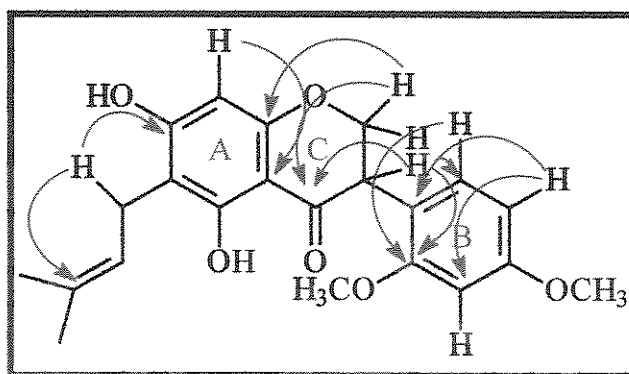
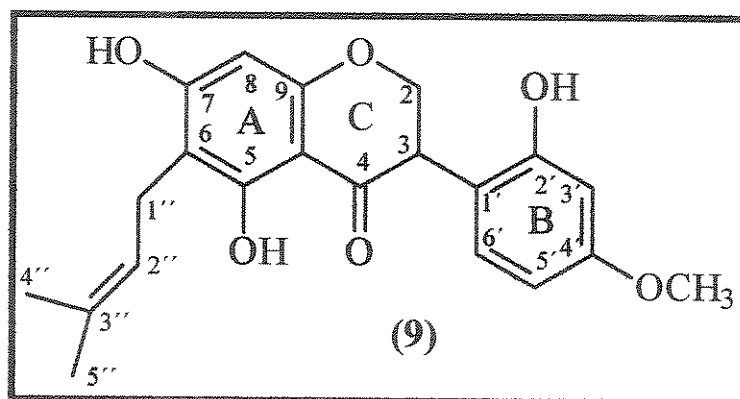


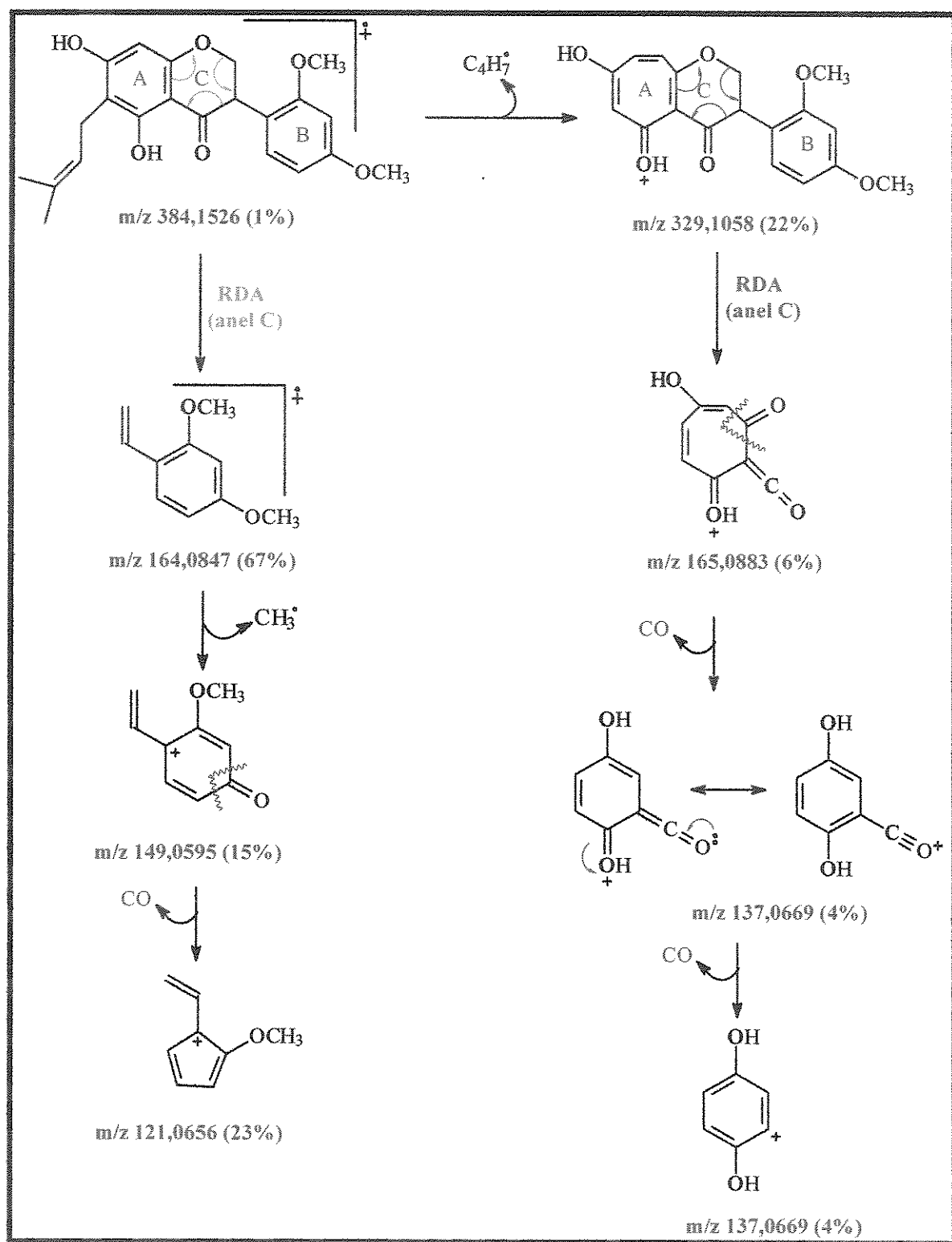
Figura 15- Algumas correlações do espectro de gHMBC (H-C, 3J) para a substância 8.

II.1.2.7. Determinação estrutural da 5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-6-(3'' metil-2''-butenil) isoflavanona (9)



Pela análise dos espectros de RMN ^1H (11T, CDCl_3/TMS , tabela 28 apêndice B, E.105, anexo) e RMN ^{13}C (11T, CDCl_3/TMS , tabela 30, apêndice E E.107, anexo) foi possível verificar que a substância (9) tratava-se de um isoflavanona^{56,58} pelos sinais característicos em δ 4,02 (1H, *dd*, $J = 5$ e 11 Hz, H-3'), 4,66 (1H, *dd*, $J = 5$ e 11 Hz, H-2_{ax}); 4,79 (1H, *t*, $J = 11$ Hz, H-2_{eq}) e em δ 69,5 (C-2'), 45,0 (C-3) e em 197,1 (C-4), bastante similar a isoflavanona 8 isolada.

O espectro de RMN ^1H mostrou que havia a presença de um grupo metoxil na molécula pelo deslocamento químico em δ_{H} 3,74 (3H, *s*, OCH_3), três grupo hidroxilas pelos deslocamentos químicos em δ 6,80 (1H, *sl*, OH); 7,80 (1H, *sl*, OH) e em 12,10 (1H, *s*, OH); este último indicando que este grupo hidroxil apresentava-se em posição “peri” à carbonila do carbono 4. Foi possível evidenciar também a presença do grupo γ,γ dimetil alil pelo conjunto de sinais em δ 1,60 (6H, *s*); 3,33 (2H, *d*, $J = 7$ Hz) e 5,23 (1H, *tl*, $J = 11$ Hz); além da presença de quatro prótons aromáticos pelos deslocamentos químicos em δ 5,98 (1H, *s*); 6,47 (1H, *dc*, $J = 2$ e 8 Hz); 6,49 (1H, *d*, $J = 2$ Hz) e em 7,31 (1H, *d*, $J = 8$ Hz).



Quadro 9 – Proposta de fragmentação para a substância **8**.

Com os espectros bidimensionais obtidos para a isoflavanona (**9**) e pelo espectro de massas de alta resolução (quadro 10, página 86; E.114, anexo) foi possível propor a sua estrutura com bastante segurança. Pelo espectro HSQC (117 CDCl₃/TMS, tabela 29, apêndice B; E.111, anexo) (correlação próton-carbono uma ligação) foi possível atribuir em quais átomos de carbono cada hidrogênio estava ligado e pelo espectro de gHMBC (11 T, CDCl₃/TMS, tabela 29, apêndice B; E.113, anexo) (correlação próton-carbono a três ligações) (figura 16, página 85) foi possível atribuir a localização dos substituintes. Após um amplo levantamento bibliográfico realizado, verificou-se que tratava-se de uma estrutura inédita.

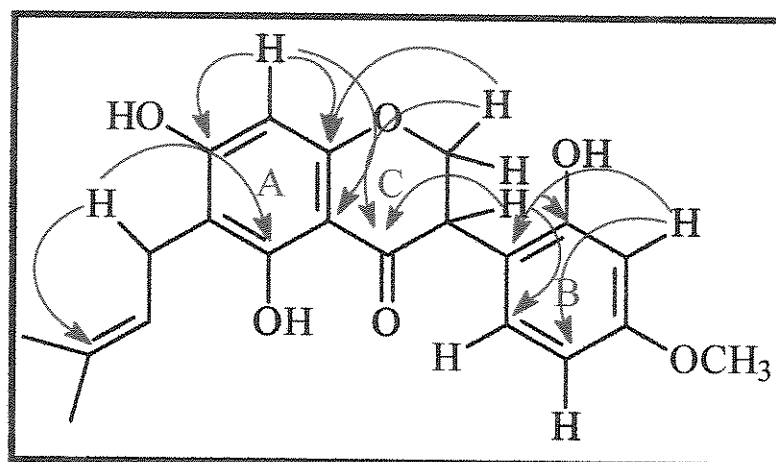
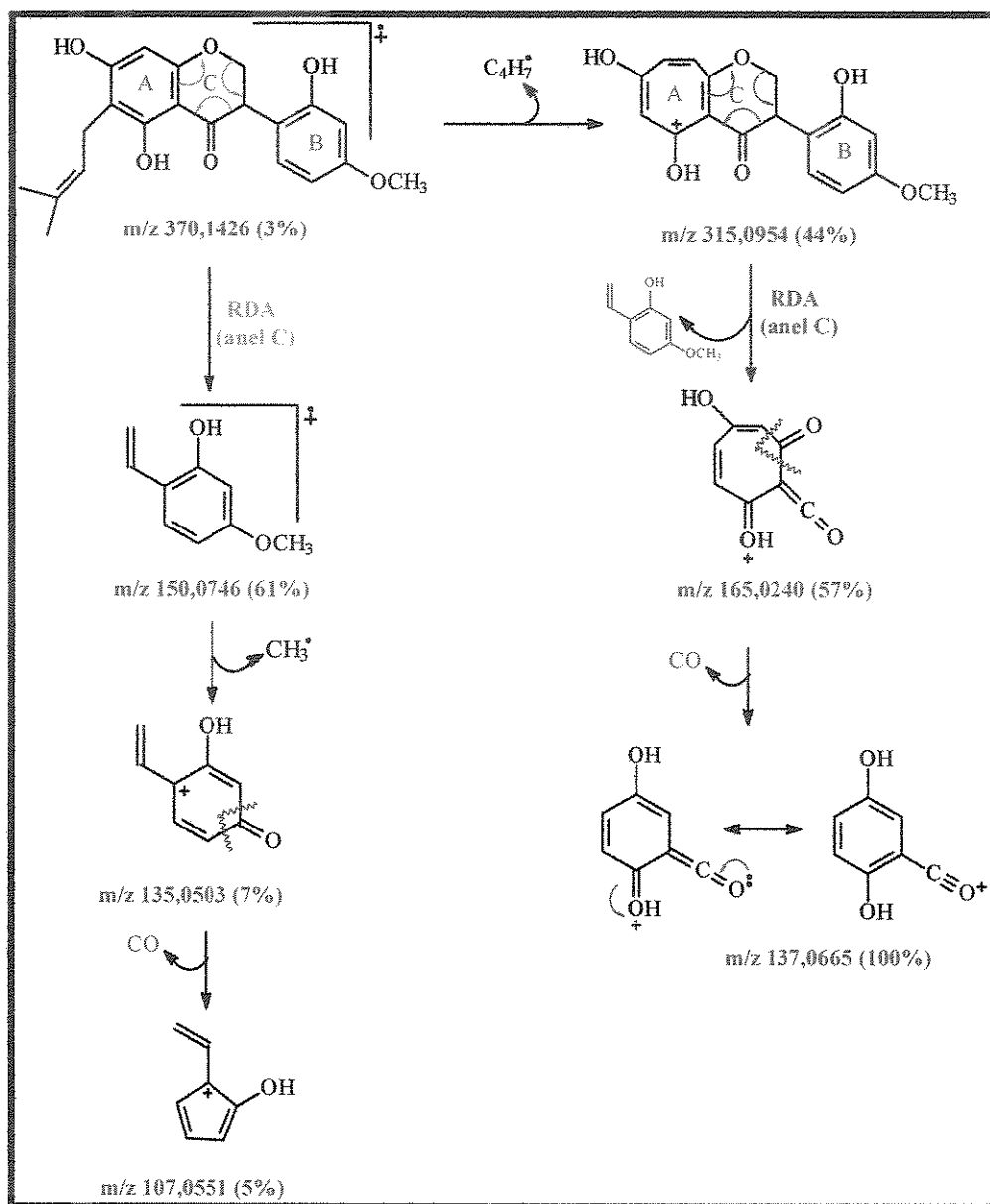


Figura 16- Algumas correlações do espectro de gHMBC (H-C, ³J) para a substância **9**.



Quadro 10 – Proposta de fragmentação para a substância 9.

O espectro no IV de 9 (E.104, anexo) apresentou absorção a 3370 cm^{-1} característica de grupos hidroxila; a absorção em 1519 cm^{-1} confirmou a presença do anel aromático e absorção em 1637 cm^{-1} indicou a presença de um grupo carbonila, enquanto no espectro no UV de 9 (E.103, anexo) as bandas em 234 e 276 nm confirmaram a presença do núcleo de uma isoflavanona.

Apêndice B – Dados de RMN dos isoflavonóides inéditos

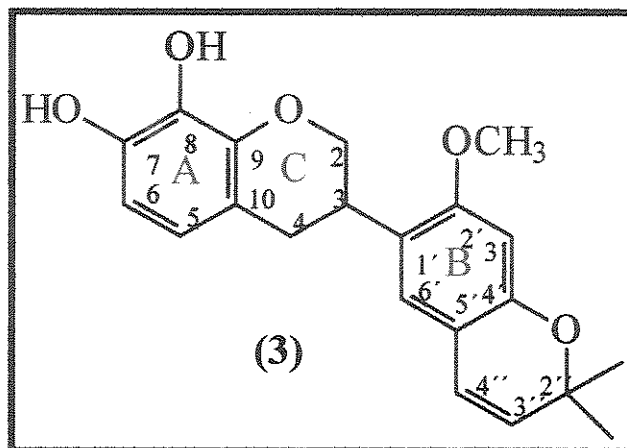


Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3) da isoflavana 3.

δ_{H}	Multiplicidade e J (Hz)	H
6,72	1H, <i>s</i>	H-6'
6,56	1H, <i>d</i> , $J = 8$	H-5
6,52	1H, <i>d</i> , $J = 8$	H-6
6,41	1H, <i>s</i>	H-3'
6,25	1H, <i>d</i> , $J = 10$	H-4''
5,48	1H, <i>d</i> , $J = 10$	H-3''
5,30	1H, <i>sl</i>	8-OH
5,18	1H, <i>sl</i>	7-OH
4,40	1H, <i>ddd</i> , $J = 2, 3$ e 10	H-2 _{eq}
4,02	1H, <i>t</i> , $J = 10$	H-2 _{ax}
3,81	3H, <i>s</i>	2'-OCH ₃
3,48	1H, <i>m</i>	H-3
2,99	1H, <i>dd</i> , $J = 11$ e 15	H-4 _{ax}
2,89	1H, <i>ddd</i> , $J = 2, 5$ e 15	H-4 _{eq}
1,45	6H, <i>s</i>	2''-CH ₃

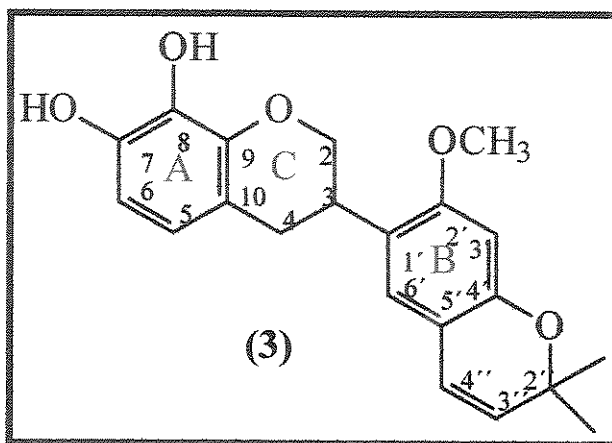


Tabela 13– Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) da isoflavana 3.

δ_{H} (H)	δ_{C} (C, 1J)	δ (C, 3J)
6,72	124,9 (C-6')	158,0 (C-2'); 153,0 (C-4'); 31,6 (C-3)
6,56	119,9 (C-5)	141,8 (C-9); 114,8 (C-10); 30,0 (C-4)
6,52	107,6 (C-6)	142,1 (C-7); 131,5 (C-8); 114,8 (C-10)
6,41	99,7 (C-3')	158,0 (C-2'); 153,0 (C-4'); 120,9 (C-1'); 113,9 (C-5')
6,25	121,8 (C-4')	153,0 (C-4'); 124,9 (C-6'); 113,9 (C-5'); 76,5 (C-2')
5,48	127,8 (C-3'')	113,9 (C-5'); 76,5 (C-2''); 28,1 (2''-CH ₃)
5,30	-	141,8 (C-9)
5,18	-	107,6 (C-6)
4,40	70,4 (C-2)	141,8 (C-9); 30,0 (C-4)
4,02	70,4 (C-2)	141,8 (C-9); 30,0 (C-4)
3,81	55,5 (2'-OCH ₃)	158,0 (C-2')
3,48	31,6 (C-3)	158,0 (C-2'); 124,9 (C-6'); 120,9 (C-1'); 70,4 (C-2) e 30,0 (C-4)
2,99	30,0 (C-4)	141,8 (C-9); 120,9 (C-1'); 119,9 (C-5); 114,8 (C-10); 70,4 (C-2)
2,89	30,0 (C-4)	141,8 (C-9); 120,9 (C-1'); 119,9 (C-5); 114,8 (C-10); 70,4 (C-2)
1,45	28,1 (2''-CH ₃)	127,8 (C-3'') e 76,5 (C-2'')

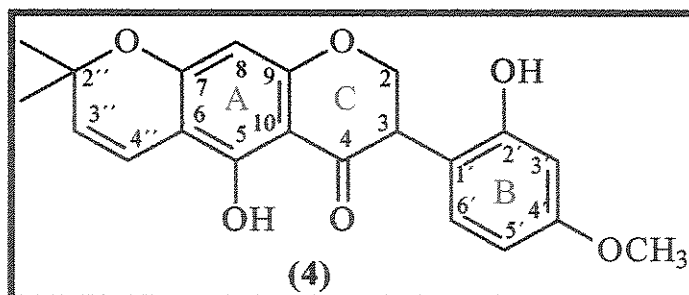


Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona 4.

δ_{H}	Multiplicidade e J (Hz)	H
11,93	1H, <i>s</i>	5-OH
7,81	1H, <i>sl</i>	2'-OH
7,37	1H, <i>d</i> , $J = 8$	H-6'
6,62	1H, <i>d</i> , $J = 10$	H-4''
6,53	1H, <i>d</i> , $J = 2$	H-3'
6,50	1H, <i>dd</i> , $J = 2$ e 8	H-5'
5,94	1H, <i>s</i>	H-8
5,44	1H, <i>d</i> , $J = 10$	H-3''
4,85	1H, <i>t</i> , $J = 11$	H-2 _{eq}
4,71	1H, <i>dd</i> , $J = 5$ e 11	H-2 _{ax}
3,96	1H, <i>dd</i> , $J = 5$ e 11	H-3
3,77	3H, <i>s</i>	4'-OCH ₃
1,41	3H, <i>s</i>	2''-CH ₃
1,39	3H, <i>s</i>	2''-CH ₃

Tabela 15 – Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona 4.

δ_{H}	δ_{C} (1J)	δ_{C} (3J)
11,93	-	196,6 (C-4); 163,5 (C-7); 162,3 (C-9)
7,81	-	114,8 (C-1'); 107,2 (C-3')
7,37	127,9 (C-6')	160,7 (C-4'); 156,2 (C-2'); 114,8 (C-1'); 103,4 (C-5')
6,62	115,6 (C-4'')	102,9 (C-6); 81,2 (C-2'')
6,53	107,2 (C-3')	160,7 (C-4'); 114,8 (C-1'); 103,4 (C-5')
6,50	103,4 (C-5')	114,8 (C-1'); 107,2 (C-3')
5,94	95,9 (C-8)	162,3 (C-9); 102,9 (C-6); 101,2 (C-10)
5,44	125,1 (C-3'')	102,9 (C-6); 81,2 (C-2'')
4,85	69,4 (C-2)	196,6 (C-4); 162,3 (C-9); 44,7 (C-3)
4,71	69,4 (C-2)	196,6 (C-4); 162,3 (C-9); 44,7 (C-3)
3,96	44,7 (C-3)	196,6 (C-4); 114,8 (C-1'); 101,2 (C-10); 69,4 (C-2)
3,77	55,5 (4'-OCH ₃)	160,7 (C-4')
1,41	17,6 (2''-CH ₃)	125,1 (C-3''); 81,2 (C-2'')
1,39	17,6 (2''-CH ₃)	125,1 (C-3''); 81,2 (C-2'')

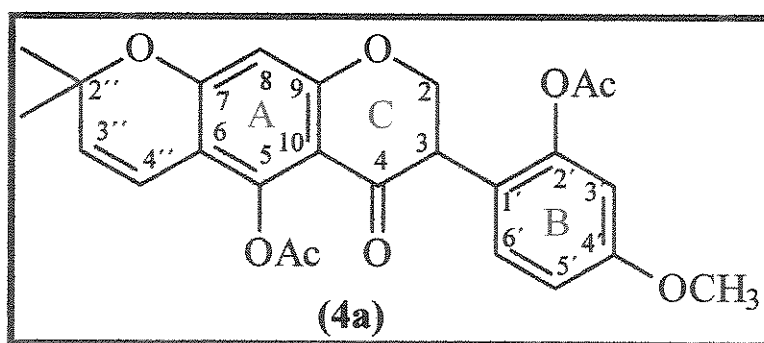


Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona acetilada **4a**.

δ_{H}	Multiplicidade e J (Hz)	H
7,09	1H, <i>d</i> , $J = 8$	H-6'
6,74	1H, <i>dd</i> , $J = 2$ e 8	H-5'
6,71	1H, <i>d</i> , $J = 2$	H-3'
6,41	1H, <i>d</i> , $J = 10$	H-4''
6,31	1H, <i>s</i>	H-8
5,59	1H, <i>d</i> , $J = 10$	H-3''
4,48	2H, <i>m</i>	H-2 _{ax} e H-2 _{eq}
3,99	1H, <i>t</i> , $J = 11$	H-3
3,79	3H, <i>s</i>	4'-OCH ₃
2,37	3H, <i>s</i>	CH ₃ (2'-OAc)
2,27	3H, <i>s</i>	CH ₃ (5-OAc)
1,43	3H, <i>s</i>	2''-CH ₃
1,42	3H, <i>s</i>	2''-CH ₃

Tabela 17 – Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona acetilada **4a**.

δ_{H}	δ_{C} (1J)	δ_{C} (3J)
7,09	132,1 (C-6')	159,8 (C-4'); 149,8 (C-2')
6,74	112,4 (C-5')	159,8 (C-4'); 108,8 (C-3')
6,71	108,8 (C-3')	159,8 (C-4'); 149,8 (C-2'); 112,4 (C-1')
6,41	115,7 (C-4'')	160,2 (C-5); 80,7 (C-2'')
6,31	102,1 (C-8)	107,9 (C-6)
5,59	128,8 (C-3'')	107,9 (C-6); 80,7 (C-2'')
4,48	70,6 (C-2)	188,6 (C-4)
3,99	47,8 (C-3)	188,6 (C-4); 70,6 (C-3)
3,79	55,5 (4'-OCH ₃)	159,8 (C-4')
2,37	27,3 (CH ₃ -2' OAc)	169,3* (2'-OAc)
2,27	27,3 (CH ₃ -5 OAc)	169,0* (5-OAc)
1,43	22,7 (2''-CH ₃)	128,8 (C-3''); 80,7 (C-2'')
1,42	22,7 (2''-CH ₃)	128,8 (C-3''); 80,7 (C-2'')

*- Os valores podem ser intercambiáveis

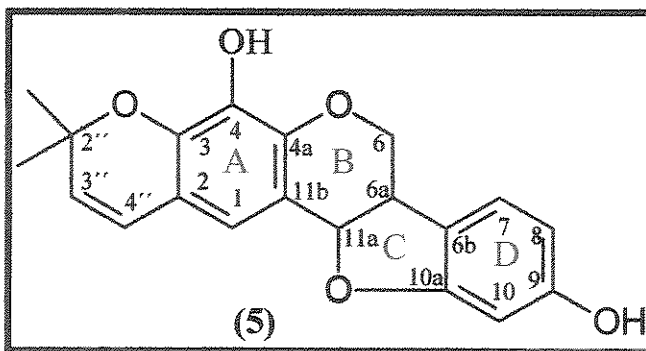


Tabela 18 –Dados de RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3) do pterocarpano 5.

δ_{H}	Multiplicidade e J (Hz)	H
7,10	1H, <i>d</i> , $J = 8$	H-7
6,78	1H, <i>s</i>	H-1
6,39	1H, <i>dd</i> , $J = 2$ e 8	H-8
6,37	1H, <i>d</i> , $J = 2$	H-10
6,33	1H, <i>d</i> , $J = 10$	H-4''
5,58	1H, <i>d</i> , $J = 10$	H-3''
5,50	1H, <i>d</i> , $J = 7$	H-11a
5,36	1H, <i>s</i>	4-OH
4,95	1H, <i>sl</i>	9-OH
4,35	1H, <i>dd</i> , $J = 5$ e 11	H-6 _{eq}
3,66	1H, <i>t</i> , $J = 11$	H-6 _{ax}
3,59	1H, <i>m</i>	H-6a
1,50	3H, <i>s</i>	2''-CH ₃
1,46	3H, <i>s</i>	2''-CH ₃

Tabela 19 – Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) do pterocarpano 5.

δ_{H}	δ_{C} (1J)	δ_{C} (3J)
7,10	125,0 (C-7)	160,6 (C-10a); 157,0 (C-9)
6,78	118,4 (C-1)	143,7 (C-4a); 140,3 (C-3); 121,8 (C-4''); 78,6 (C-11a)
6,39	98,4 (C-8)	119,1 (C-6b); 107,7 (C-10)
6,37	107,7 (C-10)	160,6 (C-10a); 125,0 (C-7)
6,33	121,8 (C-4'')	140,3 (C-3); 76,6 (C-2'')
5,58	129,4 (C-3'')	116,1 (C-2); 76,6 (C-2'')
5,50	78,6 (C-11a)	118,4 (C-1); 66,9 (C-6)
5,36	-	143,7 (C-4a)
4,95	-	107,7 (C-10)
4,35	66,9 (C-6)	143,7 (C-4a); 78,6 (C-11a); 39,5 (C-6a)
3,66	66,9 (C-6)	143,7 (C-4a); 78,6 (C-11a); 39,5 (C-6a)
3,59	39,5 (C-6a)	160,6 (C-10a); 66,9 (C-6)
1,50	28,2 (2''-CH ₃)	129,4 (C-3''); 76,6 (C-2''); 27,9 (2''-CH ₃)
1,46	27,9 (2''-CH ₃)	129,4 (C-3''); 76,6 (C-2''); 28,2 (2''-CH ₃)

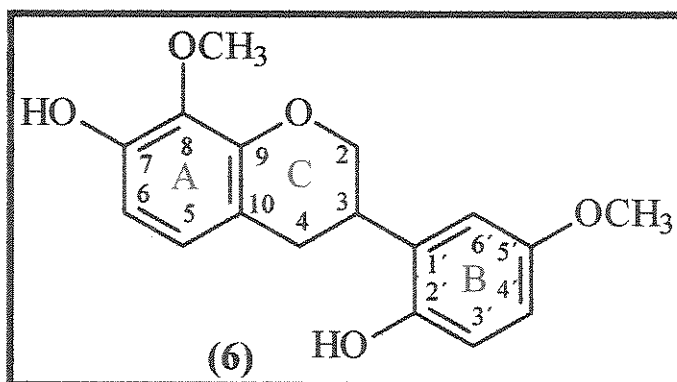


Tabela 20 –Dados de RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3) da isoflavana 6.

δ_{H}	Multiplicidade e J (Hz)	H
7,04	1H, d , $J=8$	H-3'
6,74	1H, d , $J=8$	H-5
6,53	1H, d , $J=8$	H-6
6,50	1H, dd , $J=2$ e 8	H-4'
6,38	1H, d , $J=2$	H-6'
5,66	1H, s	7-OH
4,94	1H, s	2'-OH
4,44	1H, ddd , $J=2, 3$ e 10	H-2 _{eq}
4,09	1H, t , $J=10$	H-2 _{ax}
3,93	3H, s	8-OCH ₃
3,79	3H, s	5'-OCH ₃
3,53	1H, m	H-3
3,03	1H, dd , $J=11$ e 15	H-4 _{ax}
2,93	1H, ddd , $J=2, 5$ e 15	H-4 _{eq}

Tabela 21 – Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) da isoflavana 6.

δ_{H}	δ_{C} (1J)	δ_{C} (3J)
7,04	128,2 (C-3')	159,4 (C-5'); 154,2 (C-2')
6,74	124,3 (C-5)	147,5 (C-7)
6,53	107,0 (C-6)	134,8 (C-8); 115,3 (C-10)
6,50	106,0 (C-4')	128,2 (C-3'); 102,1 (C-6')
6,38	102,1 (C-6')	119,7 (C-1'); 106,0 (C-4')
5,66	-	107,0 (C-6)
4,94	-	119,7 (C-1')
4,44	69,9 (C-2)	147,2 (C-9); 31,6 (C-3) e 30,5 (C-4)
4,09	69,9 (C-2)	147,2 (C-9); 31,6 (C-3) e 30,5 (C-4)
3,93	61,0 (8-OCH ₃)	134,8 (C-8)
3,79	55,3 (5'-OCH ₃)	159,4 (C-5')
3,53	31,6 (C-3)	115,3 (C-10); 69,9 (C-2)
3,03	30,5 (C-4)	147,2 (C-9); 115,3 (C-10); 69,9 (C-2)
2,93	30,5 (C-4)	147,2 (C-9); 115,3 (C-10); 69,9 (C-2)

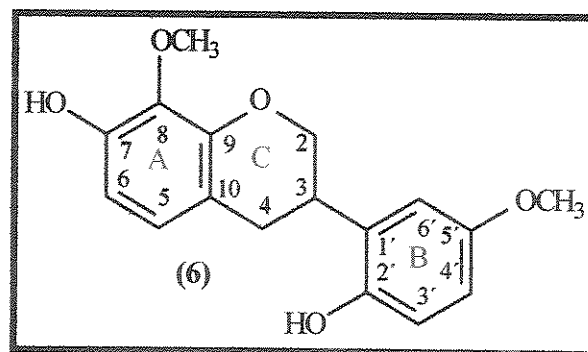
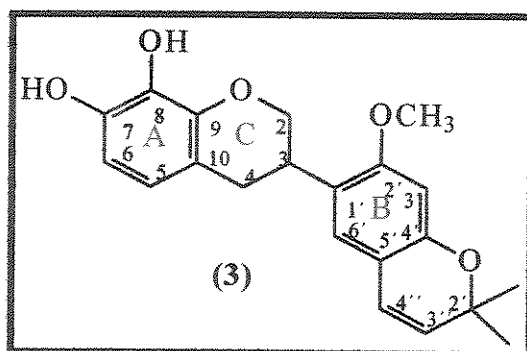


Tabela 22 – Dados de RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3) das isoflavanas 3 e 6.

Carbono	δ_{C} 3	δ_{C} 6
2	70,4	69,4
3	31,6	31,6
4	30,0	30,5
5	119,9	124,3
6	107,6	107,0
7	142,1	147,5
8	131,5	134,8
9	141,8	147,2
10	114,8	115,3
1'	120,9	119,7
2'	158,0	154,2
3'	99,7	128,2
4'	153,0	106,0
5'	113,9	159,4
6'	124,9	102,1
2''	76,9	-
3''	127,8	-
4''	121,8	-
2''-CH ₃	28,1	-
8-OCH ₃	-	61,0
2'-OCH ₃	55,5	-
5'-OCH ₃	-	55,3

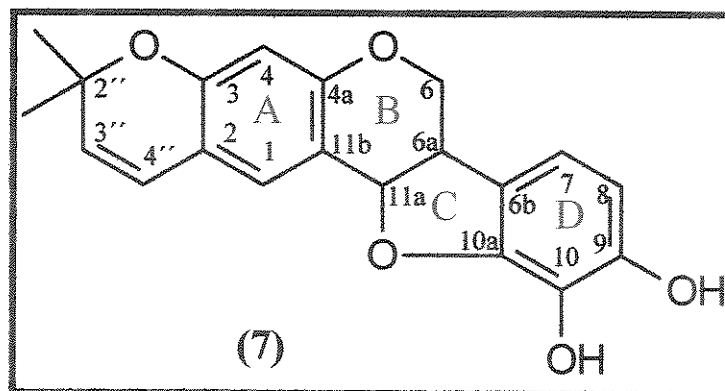


Tabela 23–Dados de RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3) do pterocarpano 7.

δ_{H}	Multiplicidade J (Hz)	H
7,02	1H, d , $J = 8$	H-7
6,86	1H, s	H-4
6,70	1H, d , $J = 8$	H-8
6,35	1H, s	H-1
6,27	1H, d , $J = 10$	H-4''
5,51	1H, d , $J = 7$	H-11a
5,48	1H, d , $J = 10$	H-3''
5,36*	1H, sl	9-OH
5,35*	1H, sl	10-OH
4,34	1H, dd , $J = 5$ e 11	H-6 _{eq}
3,73	1H, t , $J = 11$	H-6 _{ax}
3,55	1H, m	H-6a
1,42	6H, s	2''-CH ₃

*-Os valores podem ser intercambiáveis.

Tabela 24– Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) do pterocarpano 7.

δ_{H}	δ_{C} (1J)	δ_{C} (3J)
7,02	121,9 (C-7)	143,1 (C-9); 39,5 (C-6a)
6,86	121,9 (C-4)	160,2 (C-4a); 154,6 (C-3); 122,0 (C-4'')
6,70	109,5 (C-8)	131,5 (C-10a); 144,4 (C-10); 112,5 (C-6b)
6,35	99,5 (C-1)	118,6 (C-2); 114,9 (C-11b)
6,27	122,0 (C-4'')	154,6 (C-3); 76,5 (C-2'')
5,51	78,2 (C-11a)	121,9 (C-4); 114,9 (C-11b); 67,0 (C-6)
5,48	127,7 (C-3'')	118,6 (C-2); 76,5 (C-2'')
5,36	-	121,9 (C-7); 109,5 (C-8)
5,35	-	109,5 (C-8)
4,34	67,0 (C-6)	78,2 (C-11a); 39,5 (C-6a)
3,73	67,0 (C-6)	78,2 (C-11a); 39,5 (C-6a)
3,55	39,5 (C-6a)	121,9 (C-7); 78,2 (C-11a); 67,0 (C-6)
1,42	28,0 (2''-CH ₃)	127,7 (C-3'')

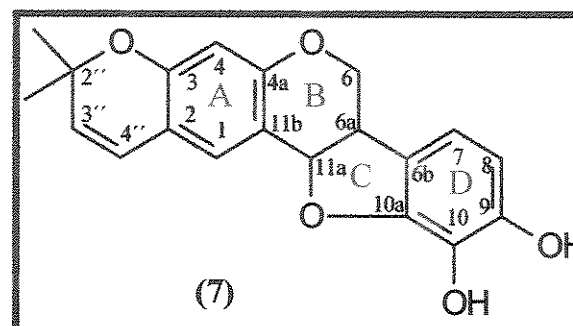
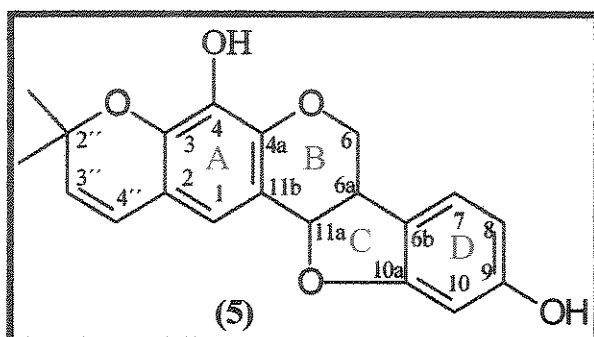


Tabela 25 – Dados de RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3) dos pterocarpanos 5 e 7.

Carbono	δ_{C} 5	δ_{C} 7
1	118,4	99,5
2	116,1	118,6
3	140,3	154,6
4	133,0	121,9
4a	143,7	160,2
6	66,9	67,0
6a	39,5	39,5
6b	119,1	112,5
7	125,0	121,9
8	98,4	109,5
9	157,0	143,1
10	107,7	144,4
10a	160,6	131,5
11a	78,6	78,2
11b	112,6	114,9
2''	76,6	76,5
3''	129,4	127,7
4''	121,8	122,0
2''-CH ₃	28,2	28,0
2''-CH ₃	27,9	28,0

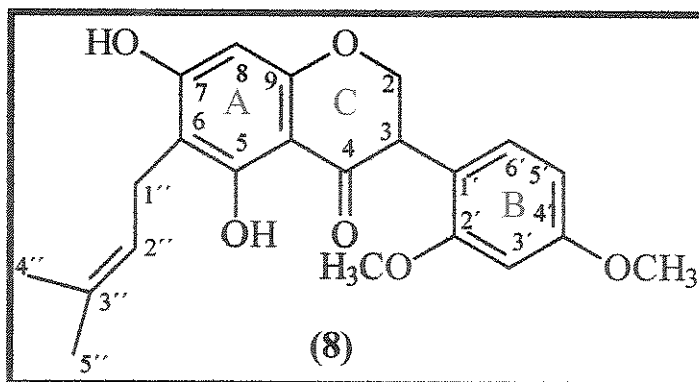


Tabela 26–Dados de RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona 8.

δ_{H}	Multiplicidade J (Hz)	H
12,70	1H, s	5-OH
7,03	1H, d, $J = 8$	H-6'
6,51	1H, d, $J = 2$	H-3'
6,49	1H, dd, $J = 2$ e 8	H-5'
6,19	1H, s	7-OH
5,97	1H, s	H-8
5,28	1H, t, $J = 11$	H-2''
4,53	1H, t, $J = 11$	H-2 _{eq}
4,42	1H, dd, $J = 5$ e 11	H-2 _{ax}
4,31	1H, dd, $J = 5$ e 11	H-3
3,81	3H, s	4'-OCH ₃
3,79	3H, s	2'-OCH ₃
3,39	2H, d, $J = 7$	H-1''
1,57	6H, s	H-4'' e H-5''

Tabela 27– Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona 8.

δ_{H}	$\delta_{\text{C}} (^1J)$	$\delta_{\text{C}} (^3J)$
12,70	-	161,4 (C-5) e 103,2 (C-10)
7,03	130,7 (C-6')	158,3 (C-2') e 46,7 (C-3)
6,51	99,1 (C-3')	160,7 (C-4'); 115,3 (C-1') e 104,6 (C-5')
6,49	104,6 (C-5')	115,3 (C-1') e 99,1 (C-3')
6,19	-	163,7 (C-7); 106,8 (C-6) e 95,2 (C-8)
5,97	95,2 (C-8)	161,5 (C-9) e 103,2 (C-10)
5,28	121,5 (C-2'')	17,7 (4''-CH ₃ e 5''-CH ₃)
4,53	70,4 (C-2)	197,6 (C-4); 161,4 (C-9) e 46,7 (C-3)
4,42	70,4 (C-2)	197,6 (C-4); 161,4 (C-9) e 46,7 (C-3)
4,31	46,7 (C-3)	197,6 (C-4); 158,3 (C-2'); 130,7 (C-6') e 70,4 (C-2)
3,81	55,5 (4'-OCH ₃)	160,7 (C-4')
3,79	55,4 (2'-OCH ₃)	158,3 (C-2')
3,39	21,1 (C-1'')	163,7 (C-7); 139,0 (C-3''); 121,5 (C-2'') e 106,8 (C-6)
1,57	17,7 (4''-CH ₃ e 5''-CH ₃)	121,5 (C-2'')

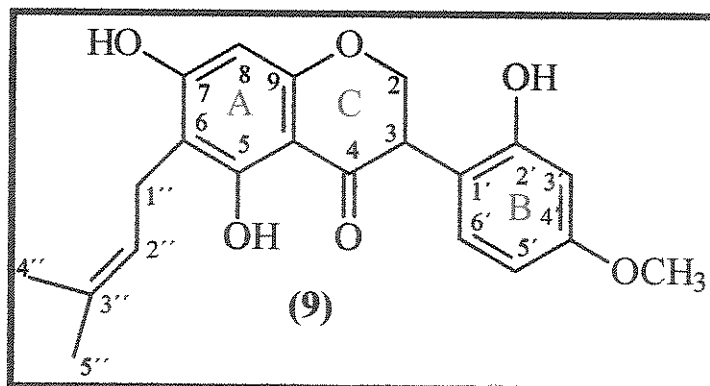


Tabela 28–Dados de RMN de ^1H (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona 9.

δ_{H}	Multiplicidade J (Hz)	H
12,10	1H, <i>s</i>	5-OH
7,80	1H, <i>sl</i>	2'-OH
7,31	1H, <i>d</i> , $J = 8$	H-6'
6,80	1H, <i>sl</i>	7-OH
6,49	1H, <i>d</i> , $J = 2$	H-3'
6,47	1H, <i>dd</i> , $J = 2$ e 8	H-5'
5,98	1H, <i>s</i>	H-8
5,23	1H, <i>tl</i> , $J = 11$	H-2''
4,79	1H, <i>t</i> , $J = 11$	H-2 _{eq}
4,66	1H, <i>dd</i> , $J = 5$ e 11	H-2 _{ax}
4,02	1H, <i>dd</i> , $J = 5$ e 11	H-3
3,74	3H, <i>s</i>	4'-OCH ₃
3,33	2H, <i>d</i> , $J = 7$	H-1''
1,60	6H, <i>s</i>	H-4'' e H-5''

Tabela 29– Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, 1J) e gHMBC (H-C, 3J) (11,0 T, CDCl_3) da isoflavanona 9.

δ_{H}	δ_{C} (1J)	δ_{C} (3J)
12,1	-	161,9 (C-5); 107,4 (C-6); 101,6 (C-10)
7,80	-	155,9 (C-2'); 114,8 (C-1'); 103,2 (C-3')
7,31	128,3 (C-6')	160,6 (C-4'); 155,9 (C-2'); 103,2 (C-3')
6,80	-	95,5 (C-8)
6,49	103,2 (C-3')	160,6 (C-4'); 155,9 (C-2'); 107,1 (C-5')
6,47	107,1 (C-5')	160,6 (C-4'); 155,9 (C-2'); 103,2 (C-3')
5,98	95,5 (C-8)	164,9 (C-7); 161,0 (C-9); 107,4 (C-6); 101,6 (C-10)
5,23	121,2 (C-2'')	107,4 (C-6); 16,1 (4''-CH ₃ e 5''-CH ₃)
4,79	69,5 (C-2)	197,1 (C-4); 161,0 (C-9); 114,8 (C-1')
4,66	69,5 (C-2)	197,1 (C-4); 161,0 (C-9); 114,8 (C-1')
4,02	45,0 (C-3)	197,1 (C-4); 155,9 (C-2'); 128,3 (C-6'); 114,8 (C-1')
3,74	55,3 (4'-OCH ₃)	160,6 (C-4')
3,33	21,0 (C-1'')	161,9 (C-5); 139,0 (C-3''); 121,2 (C-2''); 107,4 (C-6)
1,60	16,1 (4''-CH ₃ e 5''-CH ₃)	121,2 (C-2'')

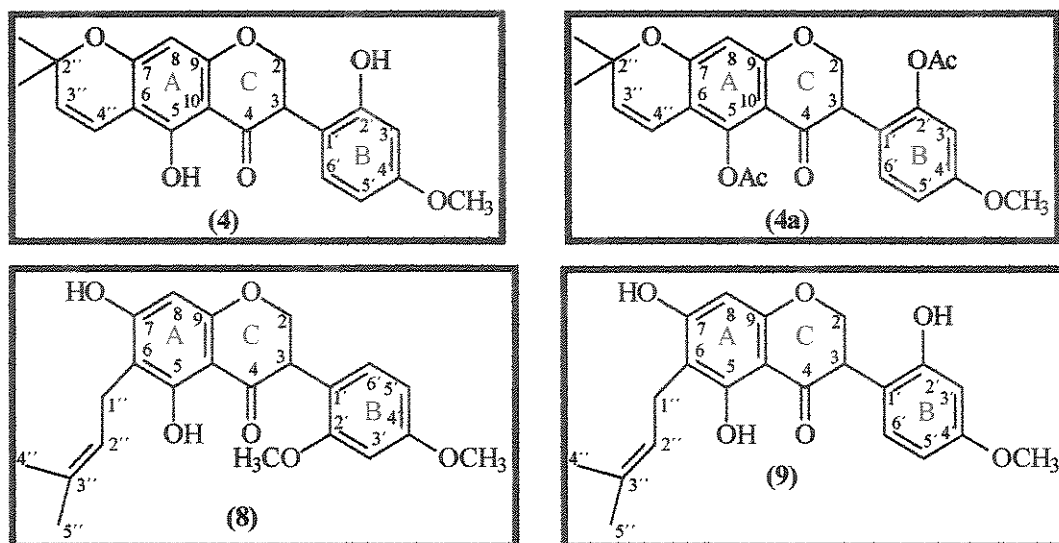


Tabela 30 – Dados de RMN de ^{13}C (11,0 T, CDCl_3) das isoflavanonas 4, 4a, 8 e 9.

Carbono	δ_{C} 4	δ_{C} 4a	δ_{C} 8	δ_{C} 9
2	69,4	70,6	70,4	69,5
3	44,7	47,8	46,7	45,0
4	196,6	188,6	197,6	197,1
5	159,0	160,2	161,4*	161,9
6	102,9	107,9	106,8	107,4
7	163,5	160,2	163,7	164,9
8	95,9	102,1	95,2	95,5
9	162,3	163,5	161,5*	161,0
10	101,2	102,1	103,2	101,6
1'	114,8	112,4	115,3	114,8
2'	156,2	149,8	158,3	155,9
3'	107,2	108,8	99,1	103,2
4'	160,7	159,8	160,7	160,6
5'	103,4	112,4	104,6	107,1
6'	127,9	132,1	130,7	128,3
1''	-	-	21,1	21,0
2''	81,2	80,7	121,4	121,2
3''	125,1	128,8	139,0	139,0
4''	115,6	115,6	17,7	16,1
5''	-	-	17,7	16,1
2''-CH ₃	17,6	22,7	-	-
2'-OCH ₃	-	-	55,4	-
4'-OCH ₃	55,5	55,5	55,5	55,3
5-OCH ₃	-	169,3*	-	-
2'-OCH ₃	-	169,0*	-	-
5-OCH ₃	-	27,3	-	-
2'-OCH ₃	-	27,3	-	-

*-Os valores podem ser intercambiáveis

CAPÍTULO II – ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA

Há mais de 10 anos já se estimava em cerca de 100 mil o número de metabólitos secundários conhecidos, em plantas⁶⁰. Por outro lado, os primeiros trabalhos sobre a aplicação envolvendo a ocorrência destes metabólitos, para fim de classificação dos vegetais que os produzem, remotam quase ao tempo em que se veio conhecer a estrutura molecular: Lindley (1830)⁶¹ por exemplo, usou a presença de glicosídeos cianogênicos, para separar *Amygdaleae* (presença) de *Chrysotalansae* (ausência).

Mas foi principalmente com o desenvolvimento das técnicas analíticas (cromatografia) a partir da década de 50, o que proporcionou o formidável desenvolvimento da quimiotaixonomia. Harborne considera o período áureo de quimiosistemática de plantas, as décadas compreendidas de 1965 até 1985. Nomes como Bohlmann, Gottlieb, Harborne, Hegnauer, Heywood, Turner, Swain e muitos outros, tornaram-se familiares a todos nós, justamente a partir dos anos 60. E tal foi a prolixidade dos trabalhos sobre quimiosistemática, que ao final da década de 80, o professor Gottlieb alertava para o fato da presença ou ausência de determinadas classes de substâncias naturais nas plantas, deveria ser interpretada com cautela; embora reconhecesse que a presença predominate de flavonóides no âmbito da família Leguminosa, continua sendo altamente proficiente nas revisões taxonômicas.

É importante portanto, fazer algumas considerações sobre a divisão dos flavonóides e sua biossíntese.

II.1. Os Flavonóides

Os compostos fenólicos representam uma larga classe de substâncias orgânicas. No reino vegetal, são conhecidos cerca de 8000 substâncias fenólicas⁶² que por sua vez classificam-se de acordo com o número de carbonos em seu esqueleto básico. Todas as plantas verdes contém algum tipo de composto fenólico. A tabela 31, página 105 ilustra as principais classes de compostos fenólicos.

Os flavonóides representam uma das mais importantes classes de compostos fenólicos conhecidas, sendo encontrados em todas as partes da planta, como raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes, apresentando amplas funções biológicas, que vão desde a cor das flores, proteção contra radiação U.V., até interações biológicas complexas com outros organismos⁶³.

Estes metabólitos secundários possuem um esqueleto básico formado por unidades C₆-C₃-C₆ (bis-aril-propanóide), sendo que o anel A é formado por três unidades de 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^{64,65}. Durante a formação da chalcona, a presença de uma redutase resulta na eliminação da hidroxila no carbono C-5, formando os flavonóides 5-desóxi⁶⁶, 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 17, página 103).

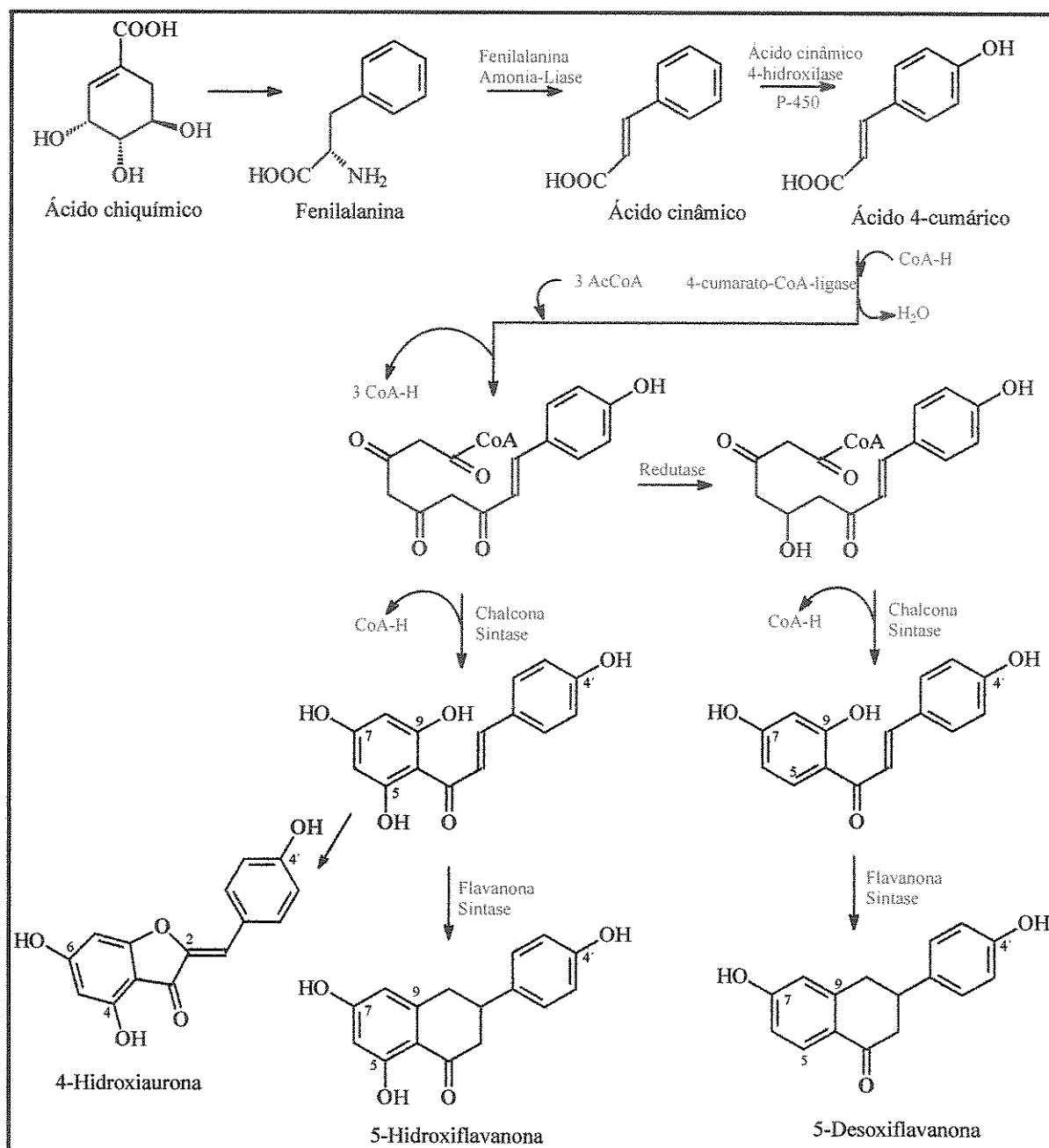


Figura 17- Origem biossintética dos flavonóides 5-hidróxi e 5-desóxi.

II.2. Os Isoflavonóides

Os isoflavonóides são compostos flavonoídicos derivados do esqueleto 1,2 difenil propano. Os isoflavonóides são biogeneticamente originados a partir das chalconas, com a participação da enzima chalcona isomerase, onde são sintetizadas as flavanonas. Na seqüência, com a participação do citocromo P-450 e cofatores, ocorre a migração 1-2 do anel aromático⁶⁷, seguida da eliminação de água pela ação de uma desidratase levando às isoflavonas (figura 18, página 105), primeira classe dos isoflavonóides. Os isoflavonóides podem ser encontrados em diversas partes da planta como folhas, sementes, raízes, caules e flores.

A diversidade estrutural dos isoflavonóides naturais depende dos seguintes fatores: a) modificação estrutural do esqueleto cíclico (que resulta na formação dos tipos de isoflavonóides naturais conhecidos); b) oxigenação dos carbonos aromáticos; c) C- ou O- alquilação, metilação e isoprenilação e d) modificação dos substituintes⁶⁸. Encontra-se dentro dos isoflavonóides naturais nove classes, dentre elas as isoflavanos, as isoflavanonas, as isoflavonas e os pterocarpanos (figura 19, página 106) onde se enquadram os compostos isolados neste trabalho.

n° de átomos de C	Esqueleto básico	Classe de substâncias
6	C ₆	Fenóis simples
7	C ₆ -C ₁	Benzoquinonas
8	C ₆ -C ₂	Ácidos fenólicos, acetofenonas
9	C ₆ -C ₃	Ácidos fenilacéticos e hidroxicinâmicos
9	C ₆ -C ₃	Cumarinas, isocumarinas
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenos, antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides, isoflavonóides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanas
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonóides

Tabela 31- Principais classes de compostos fenólicos⁵⁴.

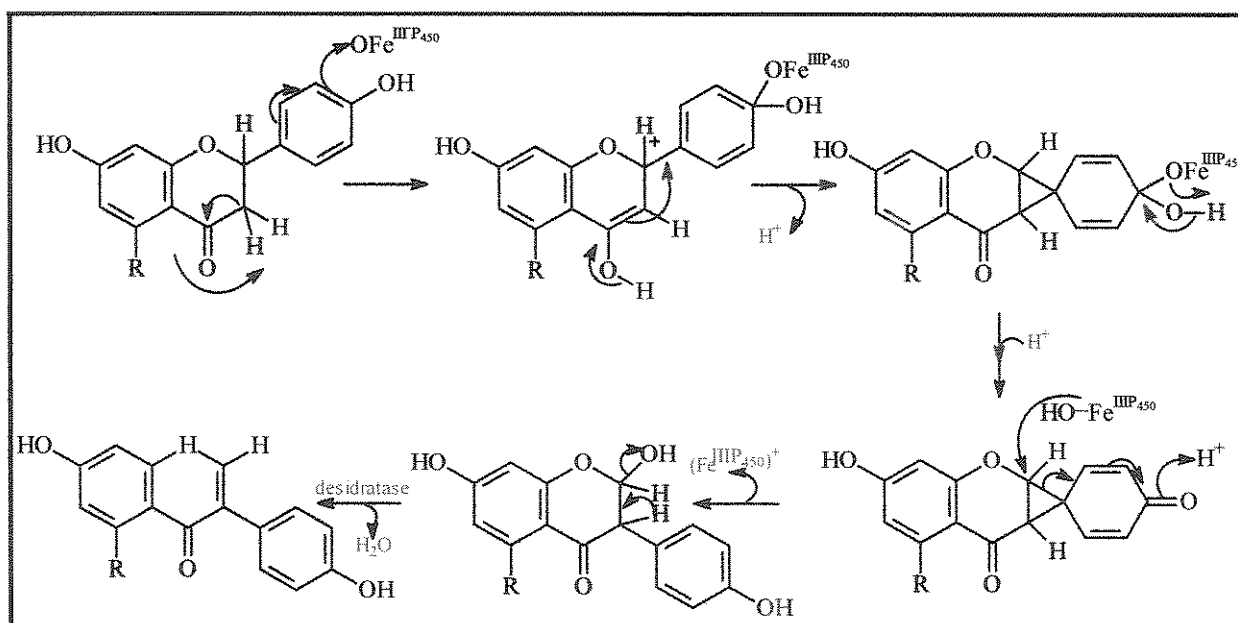


Figura 18- Mecanismo de migração 1-2 do anel aromático.

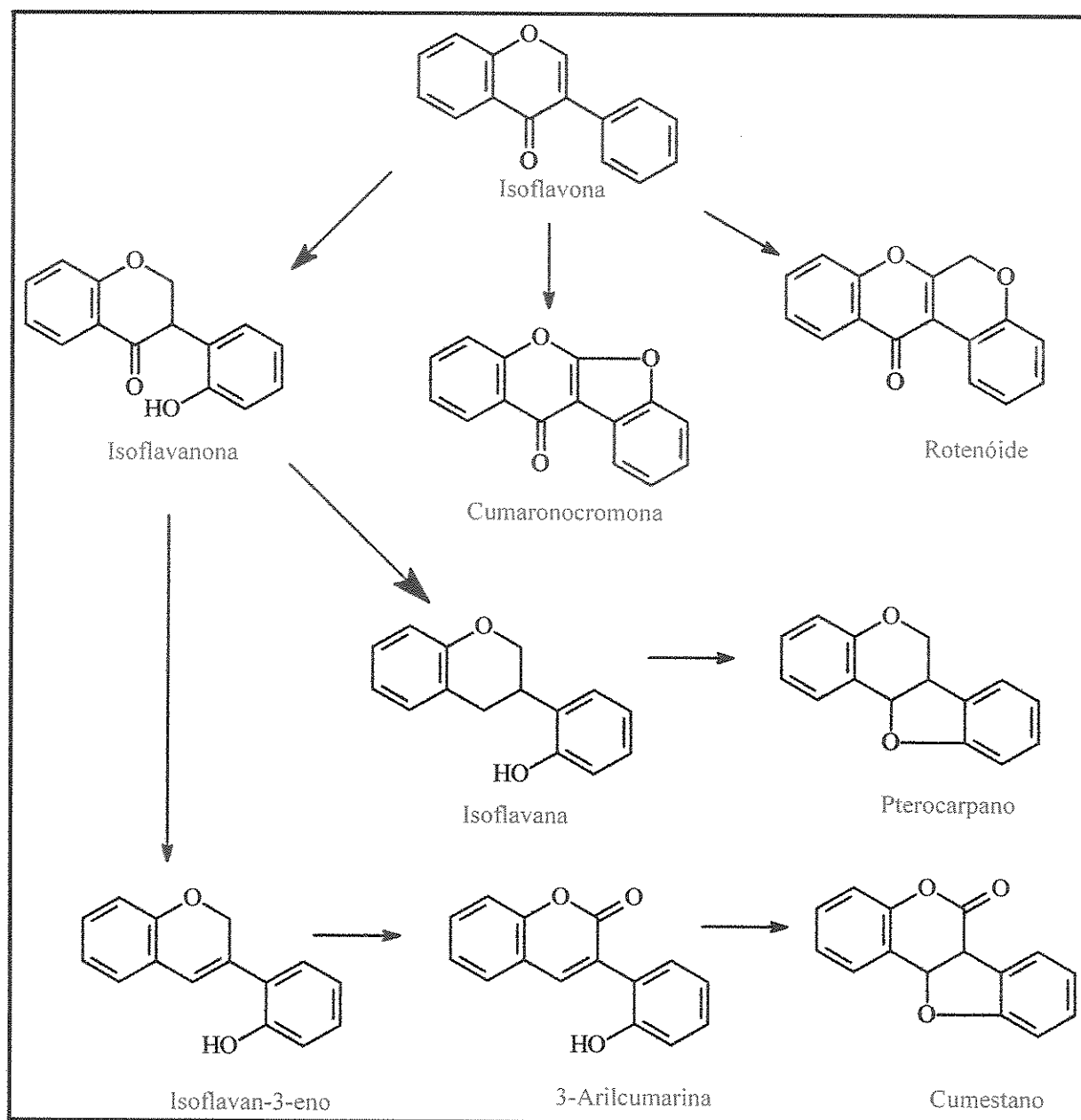


Figura 19- Derivados biossintéticos das isoflavonas.

II.2.1. As Isoflavanas

As isoflavanos são compostos bastante raros na natureza, sendo conhecidos em levantamento bibliográfico no *Chemical Abstracts* (1907-2004) e no *Web of Science* (1945-2004), 62 substâncias⁶⁹ (tabelas 32 e 33, páginas 107 e 108) sendo que aproximadamente 25 delas possuem estruturas similares a isoflavana abaixo⁶⁸ (figura 20, página 107).

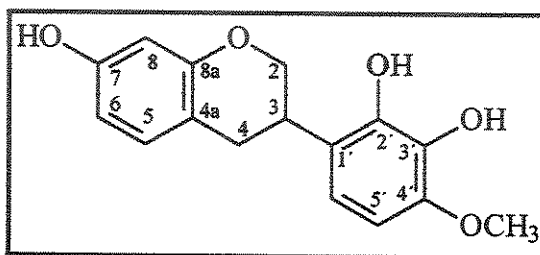


Figura 20-Estrutura da isoflavana arizonicanol A.

Classe de isoflavonóides	Total de compostos	complexos	simples	5-OH	5-H
Isoflavonas	334	170	123	190	103
Pterocarpanóides	152	78	74	16	136
Rotenóides	72	54	8	18	44
Isoflavanonas	74	38	36	47	27
Isoflavanas	62	28	34	8	54
Cumestanos	45	22	19	8	33
3-Arilmumarinas	22	19	3	17	5
Isoflavonóides Oligoméricos	22	-	22	2	20
Cumaronocromonas	14	13	1	14	0
Isoflav-3-eno	11	2	9	1	10
Total	808	424	329	321	432

Tabela 32-Isoflavonóides encontrados em plantas terrestres: em plantas Leguminosas⁶³.

Classe de isoflavonóides	complexos	simples	5-OH	5-H
Isoflavonas	10	48	52	6
Pterocarpanóides	2	2	0	4
Rotenóides	2	11	12	1
Isoflavanonas	-	-	-	-
Isoflavanas	-	-	-	-
Cumestanos	-	5	4	1
3-Arilcumarinas	-	-	-	-
Isoflavonóides Oligoméricos	-	-	-	-
Cumaronocromonas	-	-	-	-
Isoflav-3-eno	-	-	-	-
Total	14	66	68	12

Tabela 33- Isoflavonóides encontrados em plantas terrestres: em plantas não Leguminosas⁶³.

As isoflavananas como a relatada na figura 20 apresentam normalmente substituintes como grupos hidroxí/metoxi nas posições 7, 2' e 4' , menos freqüentemente nas posições 8 e 3'⁶⁹. Existem relatos na literatura onde as isoflavananas são empregadas como agentes antitumorais e fungicidas na medicina popular chinesa⁷⁰.

II.2.2. As Isoflavanonas

As isoflavanonas também são substâncias de baixa ocorrência, sendo conhecidos em levantamento bibliográfico até o ano de 2005, 74 substâncias (tabelas 32 e 33)⁶⁸. Possuem ocorrência um pouco maior que as isoflavananas, porém bem menos que as isoflavonas, a classe de isoflavonóides com maior número de representantes. São derivadas biossinteticamente das isoflavonas (Figura 21, página 109).

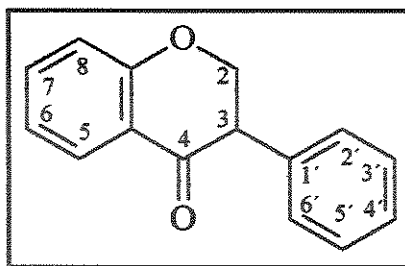


Figura 21-Estrutura básica das isoflavanonas.

II.2.3. Os Pterocarpanos

Após as isoflavyonas, os pterocarpanos formam o segundo maior grupo de isoflavonóides naturais com cerca de 200 compostos não glicosilados caracterizados. Os pterocarpanos contém um sistema de anel tetracíclico derivado do esqueleto básico dos isoflavonóides com formação da função éter pela ligação entre as posições 4 e 2'. Os pterocarpanos subdividem-se em pterocarpanos, 6a-hidroxi pterocarpanos e pterocarpenos (Figura 22, página 110).

Embora os pterocarpanos contenham dois centros assimétricos, somente o 6aR, 11aR e 6aS e 11aS são estericamente possíveis. Estudos computacionais mostram que a fusão trans entre os anéis C e D é muito menos favorável que a fusão cis⁷¹ por conferirem maiores tensões à molécula. A conformação mais estável do anel C, confirmada por RMN ¹H é a meia cadeira⁷², 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-6axial^{73,74}.

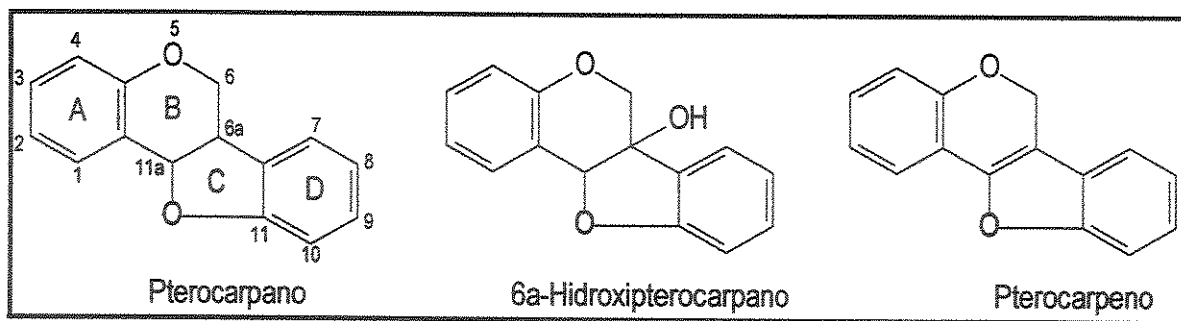


Figura 22- Principais classes de pterocarpanos.

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

As fitoalexinas são, de fato, um subgrupo especial daqueles compostos coletivamente chamados de “metabólitos de estresse”. Este termo é aplicado a algumas substâncias (independentemente da sua atividade antimicrobiana) que acumulam nos tecidos de uma planta após sua exposição a agentes elicitores vivos ou antibióticos.

Fitoalexinas tem sido obtidas de uma variedade de grupos de plantas. Os compostos com atividade fitolaxínica de uma família, freqüentemente, diferem de outros tanto em termos de estrutura como de sua origem biossintética⁷⁵. Espécies pertencentes à subfamília Papilionoideae geralmente produzem um ou dois (às vezes vários) isoflavonóides que atuam como fitoalexinas em resposta de defesa a uma invasão microbiana. Investigações em Papilionoideae tem confirmado sua grande habilidade para produzir fitoalexinas isoflavonoídicas. A medicarpina, um isoflavonóide pertencente à classe dos pterocarpanos é uma das fitoalexinas de maior ocorrência nas espécies Papilionoideae.

II.2.4. As isoflavonas

As isoflavonas constituem o maior grupo de isoflavonóides, com mais de 334 compostos descritos na literatura, dos quais cerca de 88% estão presentes em espécies da família Leguminosae. Apesar da restrição botânica, obviamente por motivos biossintéticos, as isoflavonas, apresentam alta diversidade estrutural, sendo descritos na literatura cerca de 40 padrões diferentes de oxidação⁶⁸.

Os substituintes mais comuns das isoflavonas são os grupamentos hidroxila, metoxila, metilenodióxido onde são freqüentes as estruturas C-5-desóxi e as hidroxiladas nas posições C-6 e C-2', além das já esperadas C-7 e C-4'.

As concentrações destes compostos são relativamente maiores nas leguminosas (quase que exclusivamente) e, em particular, na soja (*Glicine max*). Assim, as dietas ocidentais, pobres em produtos de soja, possuem conteúdo baixíssimo de isoflavonas. As principais isoflavonas encontradas na soja e produtos de soja são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína (Figura 23, página 113), as quais apresentam-se como várias formas de conjugados glicosídicos, dependendo da extensão do processamento ou fermentação. Do total de isoflavonas, dois terços são de glicosídeos conjugados de genisteína, sendo o restante composto de conjugados de daidizeína e pequenas quantidades de gliciteína. Já nos produtos fermentados de soja, predominam não só a genisteína, mas também a daidizeína, devido a ação de glicosidases bacterianas. Sendo assim, a maior parte da proteína de soja que é utilizada pela indústria de alimentos contém isoflavonas em concentrações variadas (0,1-3,0mg)⁷⁶.

As isoflavonas estão presentes nos alimentos ligadas a açúcares e beta-glicosídeos. Nesta forma, não são absorvidas pelo organismo humano, devendo ser clivadas antes de serem absorvidas. Somente as isoflavonas livres sem a molécula

de açúcar, as chamadas agliconas, são capazes de atravessar a membrana plasmática. Enzimas hidrolíticas de bactérias intestinais são responsáveis por estas reações. No lúmen, as bactérias convertem grande parte dessas agliconas em outras moléculas.

Existe uma variabilidade considerável na eficiência digestiva das isoflavonas. Somente as formas agliconas são absorvidas pela barreira epitelial do intestino, a qual ocorre passivamente via micelas. Após a absorção, estas moléculas são incorporadas nos quilomícrons, que as transportam ao sistema linfático antes de entrar no sistema circulatório. Os quilomícrons distribuem as isoflavonas em todos os tecidos extra-hepáticos, onde irão exercer seus efeitos metabólicos, antes de retorná-las ao fígado, como quilomícrons remanescentes. A retomada das isoflavonas circulantes do sangue ocorre passivamente e todas as células que contêm receptores para estrógenos potencialmente podem ser influenciadas por essas moléculas. Quando estas moléculas são secretadas na bile pelo fígado, parte é reabsorvida pela circulação entero-hepática e parte é excretada pelas fezes⁷⁷. Contudo, a eliminação urinária das isoflavonas é maior e corresponde a aproximadamente 10 – 30% da ingestão dietética.

Os efeitos das isoflavonas variam de tecido para tecido e em cada tipo, estas apresentam afinidade por receptores específicos⁷⁸. Tais efeitos ainda não são suficientemente elucidados a nível molecular. Entretanto, estudos tem demonstrado que as isoflavonas possuem mecanismos gerais de ação que podem interferir no metabolismo de muitos nutrientes, inclusive no metabolismo daqueles nutrientes relacionados aos processos bioquímicos de doenças crônicas tais como o câncer, o diabetes, as doenças cardiovasculares, a osteoporose, como principais.

O mecanismo de ação geral das isoflavonas proposto, inclui efeitos estrogênicos e anti-estrogênicos, regulação da atividade de proteínas (especialmente das tirosina quinases), regulação do ciclo celular e efeitos anti-

oxidantes.

Apesar de não existir recomendação dietética para as isoflavonas, as pesquisas tem demonstrado que existem muitos benefícios em se aumentar o consumo de alimentos ricos nestes compostos⁷⁸. Estudos em humanos, animais e sistemas de culturas de células sugerem que as isoflavonas, especificamente a genisteína e a daidzeína desempenham um papel importante na prevenção de doenças crônico-degenerativas tais como, osteoporose, doenças do coração e câncer.

Em humanos, estudos epidemiológicos claramente mostram uma maior incidência de alguns tipos comuns de câncer (por exemplo: mama, próstata e cólon) e doenças cardiovasculares nas populações ocidentais expostas a limitadas quantidades de isoflavonas de soja (por exemplo: daidzeína e genisteína) na dieta.

Evidência adicional para proteção contra o câncer e doenças cardíacas, resultantes da administração de isoflavonas de soja, tem sido verificada em vários modelos experimentais com animais. As isoflavonas podem também prevenir a perda óssea pós-menopausa e a osteoporose. Efeitos da genisteína na regulação da secreção de insulina também tem sido demonstrados⁷⁹. Os mecanismos pelos quais as isoflavonas podem exercer estes efeitos parecem depender, em parte, das suas propriedades agonistas-antagonistas dos estrógenos. Outros mecanismos hipotéticos poderiam derivar de outras propriedades bioquímicas, tais como inibição da atividade enzimática e efeito anti-oxidante.

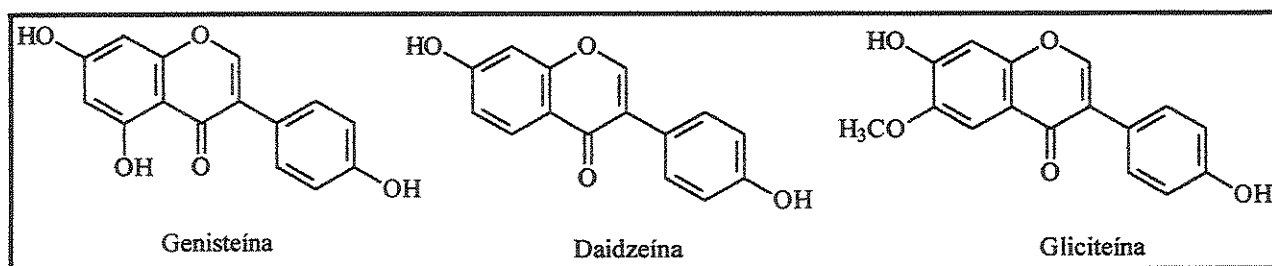


Figura 23- As principais isoflavonas encontradas na soja.

II.3. Metabólitos Especiais & Evolução Vegetal

Segundo a proposta dos autores Gottlieb & Borin (1996)⁸⁰, a evolução do metabolismo vegetal pode ser avaliada pela detecção de dois processos: disparidade de metabólitos e diversidade de metabólitos.

II.3.1. Disparidade (substituição de vias metabólicas)

A substituição de metabólitos derivados da rota do ácido chiquímico (CH) por metabólitos derivados da rota do acetato (AC) é uma tendência evolutiva. Essa tendência evolutiva é avaliada da seguinte forma:

$$CH\% = \frac{NO(CH)}{NO(CH) + NO(AC)} \times 100 \quad AC\% = \frac{NO(AC)}{NO(CH) + NO(AC)} \times 100$$

Pela aplicação destas fórmulas, quanto maior o valor de AC%, mais evoluída é a espécie. Neste cálculo o valor de NO (número de ocorrências), mostra o grau de relevância de um metabólito dentro de um táxon. A normalização dos dados pode ser feita através da divisão do número de ocorrências pelo número de espécies do táxon que apresentam o tipo de metabólito em questão (NO/sp).

Os metabólitos minoritários não são considerados já que se quer analisar uma tendência geral. Os metabólitos de ocorrência geral que não fornecem uma indicação significativa também não são considerados.

II.3.2. Diversidade causada pelo incremento no nível oxidativo dos produtos de cada categoria metabólica (Teoria Redox)⁸⁰

A cada ataque de um inseto ou predadores naturais a parede celular vegetal é invadida pela atmosfera gerando dentro da célula unidades ativas de oxigênio danosas e altamente reativas. O caráter destrutivo destas espécies moleculares permitiria propor que os metabólitos especiais funcionem como antioxidantes. Os principais atributos dos metabólitos especiais são polaridade, pequena massa molecular, meia vida curta, reatividade química (variabilidade estrutural), ocorrência esporádica e potencial antioxidante. Na família Leguminosae os isoflavonóides (figura 19, página 106) estão entre as substâncias que teriam as condições de agir como antioxidantes.

Esses metabólitos em geral possuem hidroxilas fenólicas livres e podem sofrer um grande número de modificações que levariam a uma grande variedade de derivados aumentando a capacidade de defesa.

Nas reações envolvidas observa-se a liberação de átomos de hidrogênio e um aumento de conjugação que é obtido através de um aumento de planaridade. É o que ocorre, por exemplo, na transformação de pterocarpanos em pterocarpenos (figura 22, página 110).

Assim, a simples presença de um composto não implica que ele seja um marcador. O que caracteriza o marcador é a presença de uma variedade de compostos advindos de um mesmo precursor e geralmente resultantes de reações de oxidação e metilação.

II.3.3. Utilidade e Cálculo de Índices Químicos

De acordo com Simmonds (1998)⁸¹ a ordem evolutiva das espécies dentro de uma classe é avaliada pela complexidade de seus metabólitos secundários. Geralmente supõem-se que uma espécie mais evoluída produza metabólitos mais elaborados, cuja biossíntese exija um número maior de etapas.

Sendo assim, para uma avaliação precisa seria necessário que se comprovasse a rota biossintética proposta o que a maioria das vezes é praticamente impossível. Entretanto, a metodologia proposta por Gottlieb & Borin (1996)⁸⁰ dispensa o conhecimento detalhado da rota biossintética para que se calcule índices químicos que permitam determinar a ordem evolutiva da espécie dentro de sua classe. O que é necessário saber é se o metabólito vem da rota do ácido chiquímico ou da rota do acetato (ou mevalonato) ou, para flavonóides e isoflavonóides, de rota mista, já que um indicativo de evolução, como já foi mencionado, é a substituição de uma rota pela outra. Como evolução está relacionada a diversificação, “o aumento do nível de oxidação ou a oxigenação de uma substância potencia a diversificação dos seus derivados”⁸⁰ e é outro indicativo de evolução dentro do táxon.

A primeira etapa desta metodologia consiste em relacionar através de um levantamento bibliográfico minucioso os metabólitos do tipo em análise que ocorrem no gênero em questão e compará-lo com um precursor comum aos metabólitos encontrados. Portanto, em *Harleyodendron* e *Holocalyx* serão considerados os isoflavonóides isolados (figura 8, capítulo 1, página 53).

II.4. Análise Quimiotaxonômica do Ramo *Lecointea* por Marcadores Químicos

Como já foi descrito na introdução desta tese, o ramo *Lecointea* é pertencente à tribo Swartzieae, uma das 30 pertencentes à família Leguminosae. Dentro deste ramo, apenas uma espécie do gênero *Zollernia* (*Zollernia paraensis*)^{82,83,84}; uma espécie do gênero *Lecointea* (*Lecointea hatschbachii*)⁸⁵ e a espécie *Holocalyx balansae*^{27,28} (pertencente ao gênero *Holocalyx*) foram estudadas fitoquimicamente.

Dentro das substâncias isoladas e identificadas destas espécies, os isoflavonóides isolados (figura 24, página 118) podem ser considerados para os cálculos dos índices químicos em função do grau de oxidação e do grau de metilação.

Os flavonóides, quando usados como marcadores químicos, podem ser avaliados quanto ao grau de oxidação e quanto ao grau de metilação⁸⁰. Esta avaliação permite calcular o índice de oxidação (O) e o índice de metilação (Me) dos flavonóides. As médias aritméticas dos valores de “O” e “Me” das substâncias de cada espécie constituem os parâmetros de avanço evolutivo AE_0 e AE_{Me} da espécie. Tendo em vista que estes cálculos exigem a escolha de um precursor comum para as estruturas escolheu-se o isoflavonóide cuja estrutura encontra-se ilustrada na figura 25, página 119.

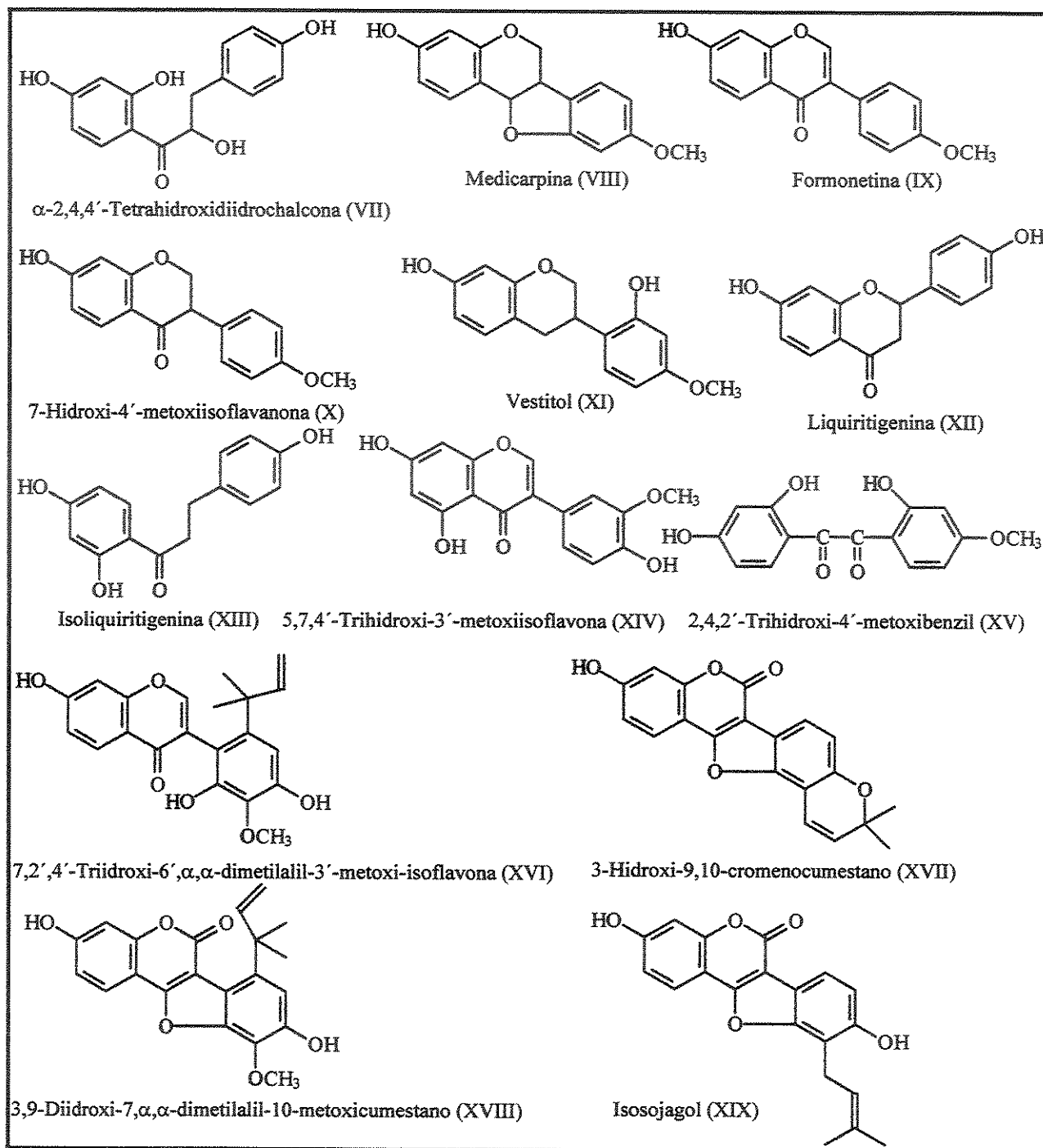


Figura 24- Substâncias isoladas de *Zollernia paraensis* (VII-XV) e *Lecointea hatschbachii* (XVI-XIX).

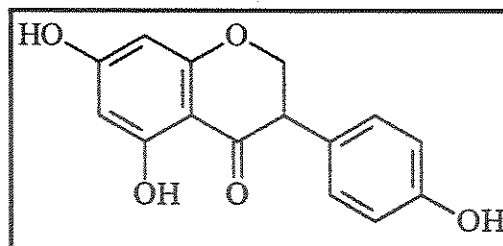


Figura 25- Precursor utilizado neste trabalho para os cálculos apresentados.

II.4.1. Cálculos de índice de oxidação para os isoflavonóides

O cálculo do valor do índice de oxidação do isoflavonóide se calcula a partir das ocorrências mencionadas abaixo e observadas no metabólito em análise, em relação ao precursor da figura 25, página 115:

-Cada grupo oxigenado adicional	+1
-Ausência de grupo oxigenado	-1
-Grupo metilenodioxí no anel	+1
-Grupo γ,γ ou α,α dimetilalila	0
-Dupla ligação adicional ou hidroxila adicional	+1
-Ciclização para dimetilcromeno ou isopropenilidrofurano	+1

II.4.2. Cálculos de índice de metilação para os isoflavonóides

O cálculo do valor do índice de metilação do isoflavonóide se calcula a partir das ocorrências mencionadas abaixo e observadas no metabólito em análise, em relação ao precursor da figura 25, página 115:

-Prenil	0
-OMe ou $-O_2-CH_2-$	+1
-OH	-1.

CAPÍTULO III – ENSAIOS BIOLÓGICOS

III.1 Introdução

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas vem desde as antigas civilizações. Por um longo período, produtos de origem vegetal, animal e mineral constituíam a fonte mais importante de drogas⁸⁶. A revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica resultou em uma preferência por produtos de origem sintética no tratamento farmacológico. Cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética, pelo isolamento de modelos estruturais para o desenvolvimento de novos derivados modificados que possuem uma maior atividade e/ou menor toxicidade e cerca de 25% são originários de plantas, isolados diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal. No entanto, nos últimos anos o interesse pelos medicamentos de origem vegetal voltou a crescer, acompanhado de um aumento significativo nos investimentos em pesquisa⁸⁷. Estima-se que os produtos naturais estejam envolvidos no desenvolvimento de 45% de todas as novas drogas^{88,89}.

Nos anos recentes, tem sido muito grande o interesse em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especialmente os que são derivados de plantas^{90,91,92}. Este interesse em drogas originárias de plantas tem diversos motivos, pode-se citar entre os principais: a) a medicina convencional muitas vezes pode ser ineficiente (baixos efeitos na cura ou terapia inefetiva); b) uso abusivo e/ou incorreto de drogas sintéticas, resultando em efeitos colaterais e outros problemas; c) uma grande porcentagem da população mundial não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional; d) a medicina popular sugere que os produtos naturais são curativos.

A investigação fitoquímica é um passo fundamental na procura de substâncias com atividades biológicas, e no entanto sabe-se que cerca de 360.000 espécies vegetais de todas que existem sobre a superfície da Terra (cerca de

380.000)² não possui nenhum estudo desta natureza.

Muitas vezes a busca por substâncias com potenciais atividades biológicas é guiada por informações a respeito sobre o uso de determinadas plantas na medicina popular, quimiotaxonômicas, biomonitoramento e outras formas de seleção, mas em face ao pequeno número de plantas estudadas é muito provável que novas substâncias com potencial promissor venham a ser descobertas de forma totalmente aleatória, devido a pesquisa em plantas pouco conhecidas ou de difícil acesso.

A descoberta de novas drogas para o tratamento de várias enfermidades, como por exemplo o câncer, representa uma grande necessidade da humanidade e as substâncias de origem vegetal constituem uma rica fonte para o desenvolvimento de novos princípios ativos mais eficientes no tratamento destas doenças^{93,94}.

Os flavonóides constituem uma classe de produtos naturais que possuem uma grande diversidade de propriedades biológicas, tais como as atividades antioxidante^{96,97}; anticarcinogênica^{98,99,100}; antiestrogênica e estrogênica^{101,102}; antimicrobiana^{95,103,104,105,106}; de prevenção de doenças coronárias¹⁰⁷; do stress^{108,109} e anti-HIV¹¹⁰. Possuem também um importante papel como barreira química contra microorganismos invasores.

As plantas são as principais fontes de produtos naturais biologicamente ativos. Uma planta produz milhares de substâncias diferentes, em que apenas uma pequena parte é responsável pela sua atividade biológica. Muitos compostos naturais são caracterizados e publicados sem que sua atividade biológica tenha sido testada. Muitas vezes isso ocorre devido ao custo ou complexidade do ensaio.

Neste trabalho, os extratos obtidos das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae*, bem como os isoflavonóides 1-9 isolados foram avaliados quanto aos seus potenciais citotóxico e antimicrobiano (ensaios preliminares de letalidade com *Artemia salina*, de bioautografia e concentração inibitória mínima CIM).

III.2 Materiais e métodos

III.2.1 Letalidade com *Artemia salina*

O ensaio de avaliação da toxicidade foi realizado segundo a metodologia descrita por McLaughlin e colaboradores¹¹¹.

O teste é feito com larva do crustáceo *Artemia salina* e tem sido utilizado como indicador de toxicidade tanto para screening de substâncias com atividade anti-tumoral, como para substâncias com atividade pesticida. Este teste é considerado um teste rápido, barato e bastante fácil de ser executado.

Também denominado “Brine Shrimp Letality Test” (BST), o teste tem a vantagem de utilizar indivíduos vivos bem pequenos e em pequena quantidade. Valores de $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ são considerados significativos para extratos brutos¹¹².

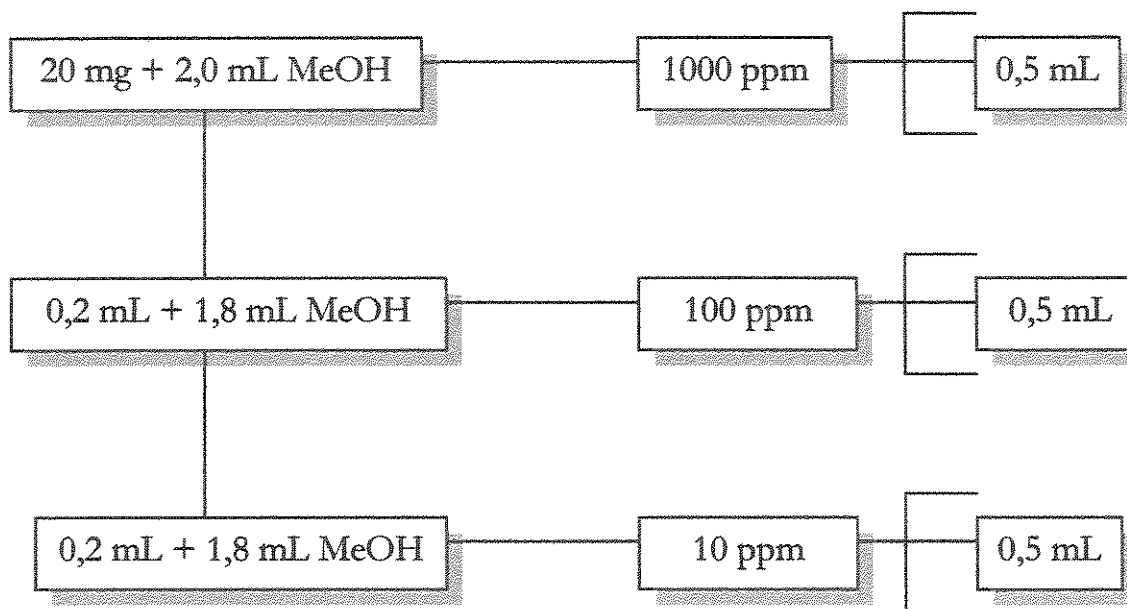
Este bioensaio apresenta uma correlação positiva com os ensaios sobre células 9 kb (carcinoma nasofaríngeo humano $p=0,036$ e $kappa=0,56$), onde os valores de ED_{50} para citotoxicidade são geralmente próximos a uma décima parte dos valores CL_{50} encontrados nos bioensaios com *Artemia salina*, conforme observado por McLaughlin¹¹¹ e citotoxicidade sobre células cancerosas P-388, observado por Meyer e colaboradores¹¹³.

Ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em solução de sal marinho (38g/L), num pequeno recipiente coberto parcialmente, pois as larvas possuem fototropismo positivo (são atraídas pela luz). Este sistema foi deixado em repouso por 48h para que os ovos se convertessem em larvas tipo nauplii.

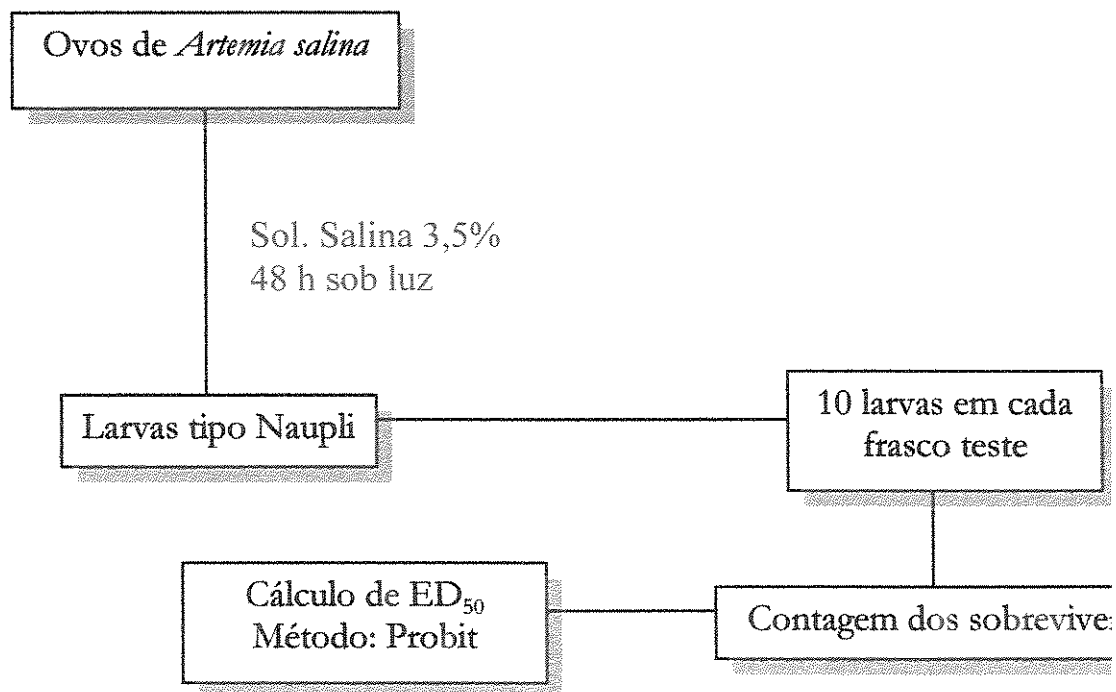
Os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* e os extratos hexânico, diclorometânico e

metanólico de *Holocalyx balansae* foram pesados e diluídos em solventes apropriados (esquema 5, página 127). A partir desta solução preparou-se três conjuntos de diluição para serem testados conforme ilustrado no esquema 6, página 127. Após a evaporação do solvente, cada um dos nove frascos recebeu uma gota de dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar a amostra, cerca de 3 mL de solução de sal marinho, 10 larvas de *Artemia salina* e o volume foi ajustado para 5 mL resultando soluções de concentrações de 1000, 100 e 10 µg/mL, em triplicata. Os nove frascos testes e um frasco branco de controle foram deixados em repouso e descobertos e, após 24 horas procedeu-se à contagem do número de larvas sobreviventes. A cafeína foi utilizada como controle positivo neste ensaio, sendo as concentrações utilizadas de 1000, 100 e 10 µg mL⁻¹ (306 µg mL⁻¹)¹¹³.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico Probit¹¹⁴ e calculadas a CL₅₀ dos extratos.



Esquema 5-procedimento para diluição da amostra no teste contra *Artemia salina*.



Esquema 6-Procedimento do teste contra *Artemia salina*.

III.2.2 Bioautografia

Os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* e os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das raízes de *Holocalyx balansae*, assim como os isoflavonóides 1-9 foram submetidos ao ensaio de bioautografia segundo metodologia de Saxena¹¹⁵ com algumas modificações por Magalhães e colaboradores¹¹⁶.

Este bioensaio combina as técnicas de cromatografia em camada delgada e ação fungistática e/ou bacteriostática, sendo imprescindível na identificação de substâncias com atividades antifúngicas e antibacterianas, principalmente em misturas complexas. Os microorganismos empregados neste ensaio 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.

O ensaio de bioautografia resumiu-se na preparação de duas placas de CCDC contendo quatro pontos, sendo um para o antibiótico padrão (10 µg de ciclopirox olamina para fungos e a mesma quantidade de cloranfenicol para bactérias- figura 26, página 129) e os outros três para as amostras em análise (20 µg). Após, procedeu-se a aplicação das amostras e desenvolvimento da placa em fase móvel previamente estabelecida, seguida de total evaporação do solvente, onde aplicou-se o antibiótico padrão. A seguir, uma das placas foi colocada no fundo de uma placa de Petri, sobre a qual verteu-se o meio de cultura adequado e a outra ficou reservada como placa testemunha para posterior comparação. Após solidificação e resfriamento do meio de cultura, fez-se a inoculação do microorganismo (100µL, suspensão a 10^6 NMP de células mL⁻¹). Foi preparada também uma placa de Petri controle apenas com meio de cultura e o microorganismo (branco). Depois do

período de incubação adequado, verificou-se a formação de halos de inibição d crescimento e assim procedeu-se a revelação da placa de CCDC testemunha.

Os microorganismos foram fornecidos pela Coleção Tropical de Cultur (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”.

Dentre os microorganismos testados encontram-se seis bactérias (*Bacillu subtilis* CCT 0089, *Escherichia coli* CCT 5050, *Micrococcus luteus* CCT 2720, *Salmonella tiphyrium* CCT 0528, *Staphilococcus aureus* CCT 4295, *Streptococcus mutans* CCT 3440), sete fungos do tipo filamentosos (*Alternari alternata* CCT 1250, *Aspergillus fumigatus* CCT 01277, *Aspergillus niger* CCT 1435, *Cladosporium cladosporioides* CCT 5039, *Fusarium oxysporum* CCT 3244, *Penicillium funiculosum* CCT 0490 e *Rhizopus oryzae* CCT 4964), além de um fungo do tipo levedura (*Candida albicans* CCT 0776).

Os meios de cultura utilizados foram NA (Ágar Nutriente) para bactérias e MA (Malte Ágar) para fungos. O NA foi constituído de 5,0 g de peptona, 3,0 g de extrato de carne, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada, enquanto que o MA foi constituído de 20,0 g de extrato de malte, 20,0 g de ágar e 1000 mL de água destilada.

Os fungos foram incubados durante 2 a 3 dias, a 27° C, exceto para *C. albicans* que exigiu 24 h a 37°C, já as bactérias foram incubadas pelo período de 24h a 37°C.

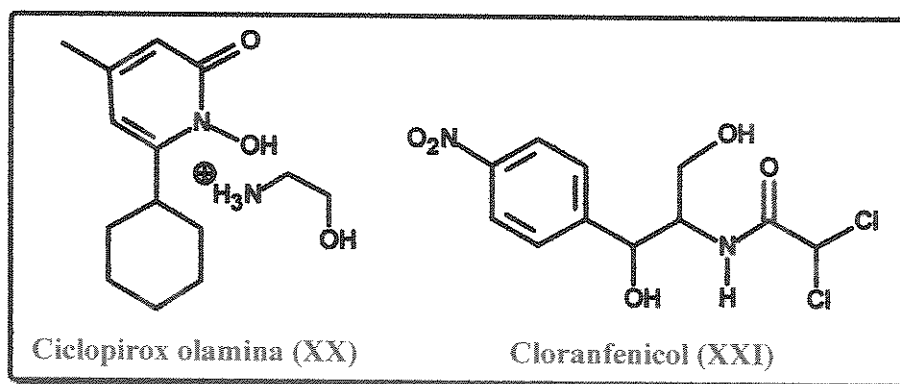


Figura 26: Antibióticos padrões empregados.

III.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado segundo adaptação da metodologia proposta por Bicalho e colaboradores¹¹⁷.

As substâncias testadas (1 e 2) foram dissolvidas em 20% de DMSO e 80% de água destilada. Primeiramente todos os poços da microplaca foram adicionados de 100 μL do meio de cultura [Müller Hinton (DIFCOS) 20 g L^{-1} para bactéria e Extrato Malte (OXOID) 20 g L^{-1} para fungos)]. Em seguida, 100 μL das soluções das substâncias foram adicionadas e diluídas em série (8 diluições), onde as concentrações das substâncias foram avaliadas de 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após, acrescentou-se 100 μL da suspensão do microrganismo (10^8 NMP de célula mL^{-1}) aos poços.

Nesta análise, o controle negativo foi preparado utilizando-se o meio de cultura, DMSO e microrganismo e o controle positivo foi preparado como o meio de cultura, DMSO, microrganismo e cloranfenicol (bactéria) ou ciclopirox olamina (fungos). As microplacas foram incubadas conforme o tipo de microrganismo utilizado conforme citado no teste de bioautografia.

Os resultados foram observados através do uso de um revelador a 0,05%, o MTT, onde se adicionou 50 μL do mesmo a todos os poços da microplaca. A menor concentração capaz de inibir o desenvolvimento dos microrganismos foi considerada a CIM das substâncias.

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Biocatálise (IQ – UNICAMP) pela técnica Andréia Bucci sob a supervisão da Sra. Suzan Pantaroto, que é farmacêutica e está desenvolvendo o trabalho da tese de doutorado sob a orientação da Profa. Dra. Anita Marsaioli.

III.3 Resultados e Discussão

III.3.1 Letalidade com *Artemia salina*

O resultado positivo deste ensaio indica potencial atividade tóxica de compostos bioativos em extratos vegetais, sendo essa atividade correlacionada com atividade antitumoral e/ou inseticida^{111,113}.

Após análise estatística dos dados, as concentrações letais (CL₅₀) dos extratos hexânico, clorofórmico e metanólico das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* e hexânico, diclorometânico e metanólico de *Holocalyx balansae* foram respectivamente 31,8 µg mL⁻¹, 23,6 µg mL⁻¹, 39,5 µg mL⁻¹, 48,9 µg mL⁻¹, 44,6 µg mL⁻¹ e 51,2 µg mL⁻¹. Esses valores são considerados ativos, uma vez que encontram-se dentro da faixa de interesse (CL₅₀ ≤ 1000 µg mL⁻¹). Os isoflavonóides isolados também apresentaram forte atividade frente à *Artemia salina*. Os resultados encontram-se expressos nas tabelas 34 e 35, páginas 131 e 132.

Extrato	CL ₅₀ (µg/mL)
Hexânico- <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	31,8
Clorofórmico- <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	23,6
Metanólico- <i>Harleyodendron unifoliolatum</i>	39,5
Hexânico- <i>Holocalyx balansae</i>	48,9
Diclorometânico- <i>Holocalyx balansae</i>	44,6
Metanólico- <i>Holocalyx balansae</i>	51,2

Tabela 34- Resultados do ensaio com *Artemia salina* com os extratos das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae*.

Isoflavonóide	CL ₅₀ (µg/mL)
Pterocarpano 1	13,8
Pterocarpano 2	15,9
Isoflavana 3	9,4
Isoflavanona 4	38,3
Pterocarpano 5	18,8
Isoflavana 6	12,1
Pterocarpano 7	21,4
Isoflavanona 8	35,9
Isoflavanona 9	33,3

Tabela 35- Resultados do ensaio com *Artemia salina* com as substâncias isoladas de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae*.

III.3.2 Bioautografia

O extrato hexânico de *Harleyodendron unifoliolatum* apresentou atividade contra os fungos *Aspergillus fumigatus* CCT 01277 e *Fusarium oxysporium* CCT 3244, enquanto que o pterocarpano 1 mostrou-se ativo contra os fungos *Alternaria alternata* CCT 1250 e *Penicillium funiculosum* CCT 0490; o pterocarpano 2 mostrou-se ativo contra a bactéria *Escherichia coli* CCT 5050 e contra o fungo *Aspergillus niger* CCT 1435; os pterocarpanos 5 e 7 mostraram-se ativos contra as bactérias *Bacillus subtilis* CCT 0089, *Staphilococcus aureus* CCT 4295 e o fungo *Penicillium funiculosum* CCT 0490; as isoflavanos 3 e 6 apresentaram atividade contra os fungos *Aspergillus fumigatus* CCT 01277 e *Rhizopus orizae* CCT 4964 e contra a bactéria *Bacillus subtilis* CCT 0089.

Os fungos *Aspergillus fumigatus* CCT 01277 e *Fusarium oxysporium* CCT

3244 possuem papel importante na indústria alimentícia pois são responsáveis pela produção de várias micotoxinas¹¹⁸ (metabólitos secundários produzidos por certos fungos). As tabelas 36 e 37; páginas 133 e 134, ilustram os resultados dos ensaios de bioautografia.

Microrganismos testados	EH	EC	EM	EH2	ED	EM2
BACTÉRIAS						
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> CCT 5050	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> CCT 2720	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> CCT 0528	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCT 4295	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> CCT 3440	-	-	-	-	-	-
FUNGOS DO TIPO FILAMENTOSO						
<i>Alternaria alternata</i> CCT 1250	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> CCT 01277	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> CCT 5039	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> CCT 3244	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium funiculosum</i> CCT 0490	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus orizae</i> CCT 4964	-	-	-	-	-	-
FUNGO DO TIPO LEVEDURA						
<i>Candida albicans</i> CCT 0776	-	-	-	-	-	-

EH = Extrato Hexânico de *Harleyodendron unifoliolatum*

EC = Extrato Clorofórmico de *Harleyodendron unifoliolatum*

EM = Extrato Metanólico de *Harleyodendron unifoliolatum*

EH2 = Extrato Hexânico de *Holocalyx balansae*

ED = Extrato Diclorometânico de *Holocalyx balansae*

EM2 = Extrato Metanólico de *Holocalyx balansae*

(+) presença de um halo de inibição

(-) ausência de um halo de inibição

Tabela 36- Ensaios de bioautografia realizados com os extratos de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae*.

Microrganismos testados	P1	P2	I3	IF4	P5	I6	P7	IF8	IF9
BACTÉRIAS									
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> CCT 5050	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> CCT 2720	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella tiphymurium</i> CCT 0528	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphilococcus aureus</i> CCT 4295	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> CCT 3440	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FUNGOS DO TIPO FILAMENTOSO									
<i>Alternaria alternata</i> CCT 1250	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> CCT 01277	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> CCT 5039	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> CCT 3244	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium funiculosum</i> CCT 0490	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Rhizopus orizae</i> CCT 4964	-	-	+	-	-	+	-	-	-
FUNGO DO TIPO LEVEDURA									
<i>Candida albicans</i> CCT 0776	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P1 = Pterocarpano 1

P2 = Pterocarpano 2

I3 = Isoflavana 3

IF4 = Isoflavanona 4

P5 = Pterocarpano 5

I6= Isoflavana 6

P7= Pterocarpano 7

IF8= Isoflavanona 8

IF9= Isoflavanona 9

(+) presença de um halo de inibição

(-) ausência de um halo de inibição

Tabela 37- Ensaios de bioautografia realizados com as substâncias isoladas de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae*.

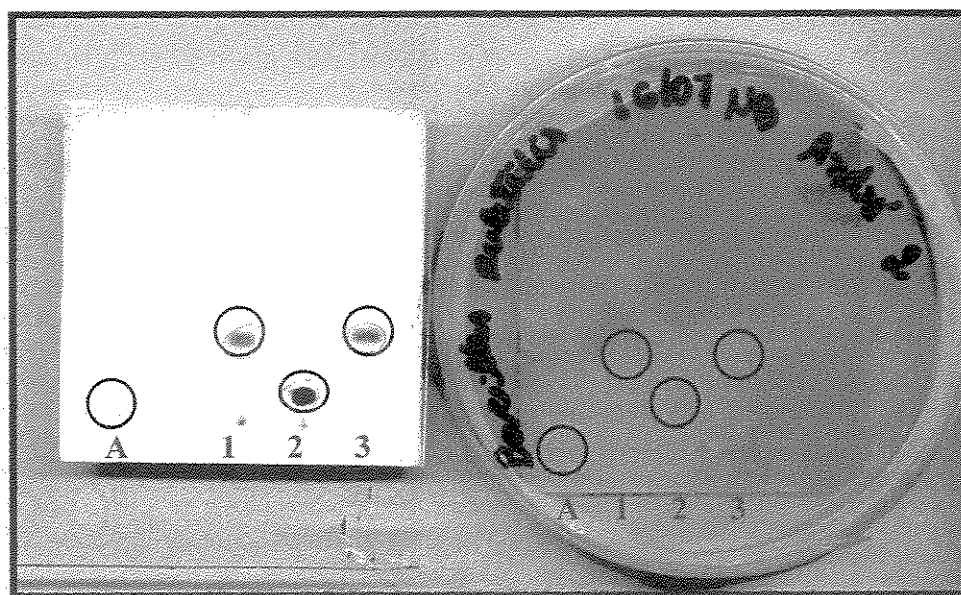


Figura 27: Bioautografia – Substâncias isoladas
Bactéria: *Bacillus subtilis*; A: Cloranfenicol; 1: P1; 2: I3; 3: P2.

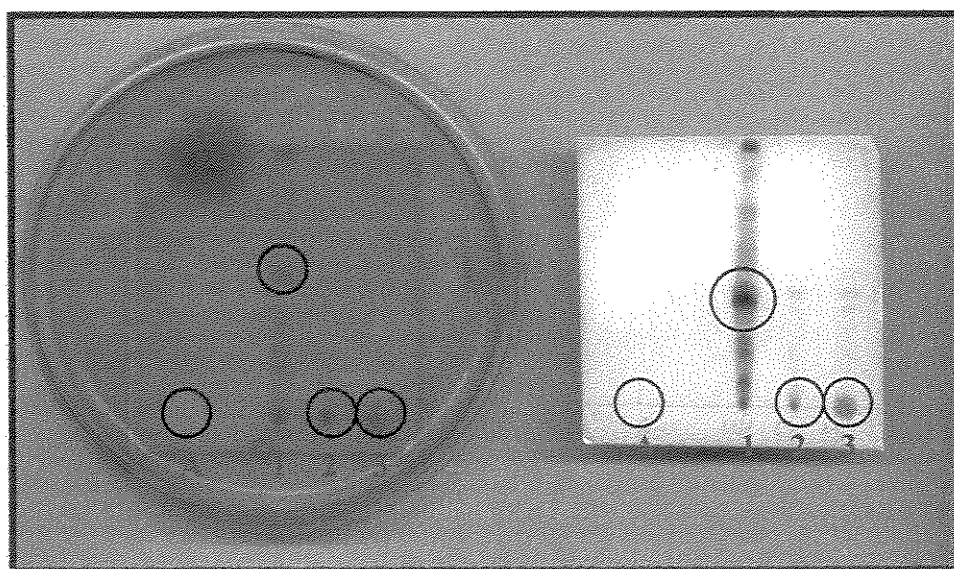


Figura 28: Bioautografia – Extratos de *Harleyodendron unifoliolatum*
Fungo: *Aspergillus fumigatus*; A: Loprox; 1: EH; 2: EC; 3: EM.

III.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

As substâncias 1 e 2 foram submetidas ao ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) utilizando novamente as linhagens de quatro microorganismos: duas bactérias *Escherichia coli* CCT 5050 (bactéria gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* CCT 4295 (bactéria gram-positiva), e dois fungos *Aspergillus niger* CCT 1435 (fungo do tipo filamentoso) e *Candida albicans* CCT 0776 (fungo do tipo levedura) contra as quais apresentou um halo de inibição no teste de bioautografia.

Isto porque a ausência de halo de inibição no ensaio de bioautografia pode ser decorrente da baixa difusibilidade da substância no ágar, assim procedeu-se o protocolo padrão de CIM para escolha dos microorganismos a serem testados.

As concentrações das substâncias 1 e 2 utilizadas na CIM foram: 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As substâncias 1 e 2 mostraram-se ativas frente a quase todos os microorganismos empregados no teste (CIM: 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), exceto para a substância 1 contra *Staphylococcus aureus* CCT 4295. Neste teste, são consideradas ativas as substâncias com $\text{CIM} \leq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A tabela 38, página 136 retrata as concentrações mínimas para os microorganismos testados. As substâncias 1 e 2 foram escolhidas por serem as majoritárias isoladas dos extratos hexânico e clorofórmico de *Harleyodendron unifoliolatum*. As figuras 29 e 30, página 137 ilustram o teste de CIM.

Substâncias	<i>E. Coli</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
Pterocarpano 1	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	>1000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Pterocarpano 2	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	125 $\mu\text{g mL}^{-1}$	62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 38- Concentração inibitória mínima (CIM) realizadas com as substâncias 1 e 2 isoladas de *Harleyodendron unifoliolatum*.

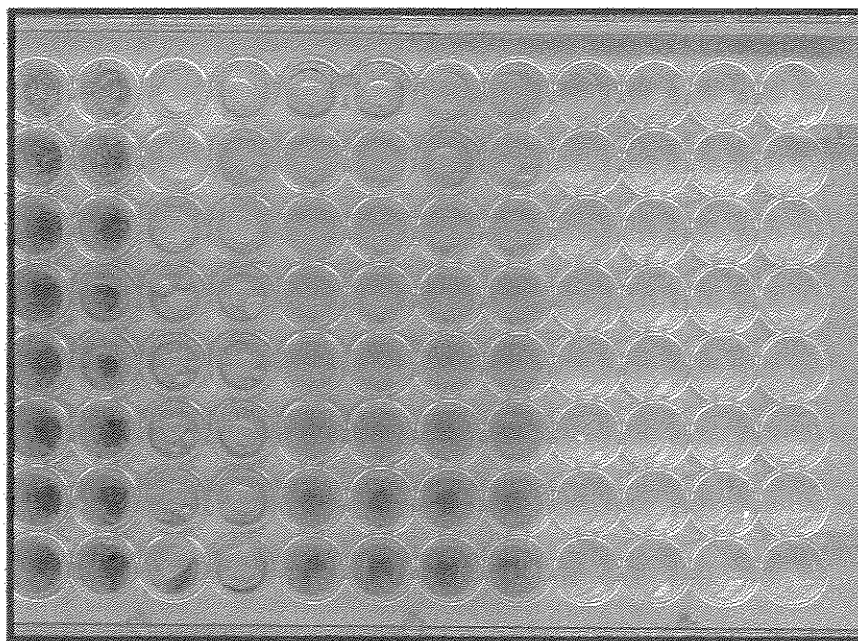


Figura 29: CIM – *Aspergillus niger* CCT 1435.

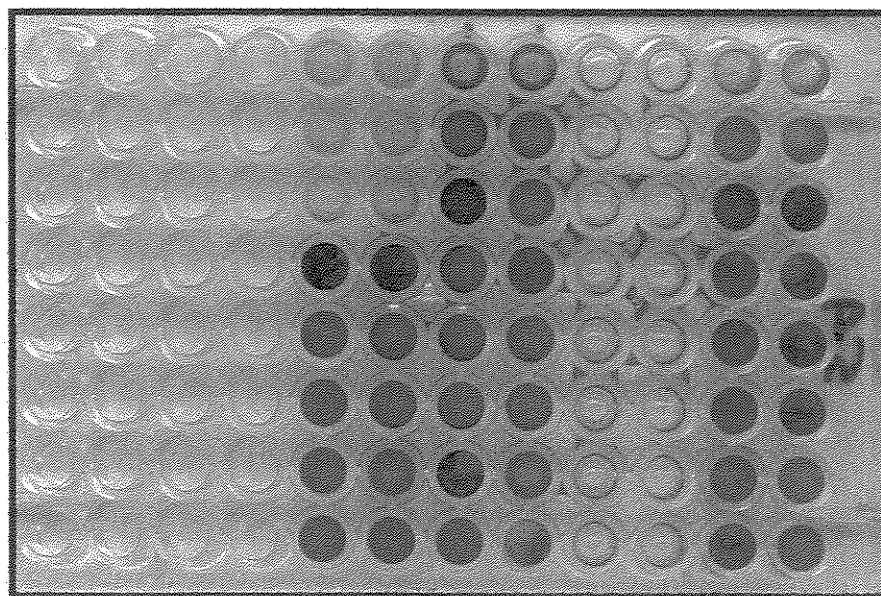


Figura 30: CIM – *Staphylococcus aureus* CCT 4295.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

♣ O estudo fitoquímico dos extratos hexânico e clorofórmico das raízes de *Harleyodendron unifoliolatum* Cowan e do extrato hexânico de *Holocalyx balansae* Micheli resultou no isolamento e determinação estrutural de duas isoflavanos, três isoflavanonas, quatro pterocarpanos e um fitoesteróide; dos quais as isoflavanos, as isoflavanonas e dois pterocarpanos isolados são inéditos e as informações fitoquímicas sobre as espécies dos gêneros *Harleyodendron* e *Holocalyx* (neste último gênero, as folhas foram estudadas fitoquimicamente, vide capítulo I, página 21) estão sendo divulgadas pela primeira vez.

♣ Os extratos obtidos de *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae*, bem como as substâncias isoladas mostraram-se significativamente ativas no teste de letalidade frente a *Artemia salina*, justificando a possibilidade de futuros testes de citotoxicidade a células tumorais. Os isoflavonóides, em geral, possuem diversas atividades (vide capítulo III), sendo os pterocarpanos e as isoflavanos atuantes como fitoalexinas (vide capítulo II).

♣ O extrato hexânico de *Harleyodendron unifoliolatum* apresentou atividade contra os fungos *Aspergillus fumigatus* CCT 01277 e *Fusarium oxysporum* CCT 3244. Os demais extratos testados apresentaram-se inativos. O pterocarpano 1 mostrou-se ativo contra os fungos *Alternaria alternata* CCT 1250 e *Penicillium funiculosum* CCT 0490; o pterocarpano 2 mostrou-se ativo contra a bactéria *Escherichia coli* CCT 5050 e contra o fungo *Aspergillus niger* CCT 1435; os pterocarpanos 5 e 7 mostraram-se ativos contra as bactérias *Bacillus subtilis* CCT 0089 e *Staphylococcus aureus* CCT 4295, além do fungo *Penicillium funiculosum* CCT 0490; as isoflavanos 3 e 6 apresentaram atividade contra os fungos *Aspergillus fumigatus* CCT 01277 e *Rhizopus orizae* CCT 4964, além da bactéria *Bacillus subtilis* CCT 0089.

♣ No teste de concentração inibitória mínima realizado com os pterocarpanos 1 e 2; estes mostraram-se ativos frente a quase todos os microrganismos empregados no teste (CIM: 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), exceto para o pterocarpano 1 contra *Staphylococcus aureus*. Neste teste, são consideradas ativas as substâncias com $\text{CIM} \leq 1000\mu\text{g mL}^{-1}$. O resultado obtido com o ensaio de CIM confirmou o resultado obtido no teste de bioautografia.

♣ O perfil flavonoídico observado para *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae* foi semelhante, tendo em vista que os isoflavonóides isolados possuem grande correlação biossintética, demonstrando que estas espécies estão alocadas adequadamente dentro da tribo Swartzieae, corroborando com a proposta recente da Dra. Ana Maria Goulart Azevedo Tozzi¹⁵, em que os gêneros *Harleyodendron* e *Holocalyx* sejam incluídos no “*ramo Lecointea*”.

♣ De acordo com este perfil flavonoídico, *Harleyodendron unifoliolatum* apresentou metabólitos mais elaborados (pterocarpanos) do que *Holocalyx balansae* (isoflavanonas), cuja biossíntese exigiu um número maior de etapas, indicando que *Harleyodendron unifoliolatum* é mais evoluída que *Holocalyx balansae*⁸¹.

♣ Tendo em vista a escassez de dados fitoquímicos sobre as espécies pertencentes ao “*ramo Lecointea*”, uma melhor avaliação quimiosistemática dos gêneros e também do grupo só será possível com a inclusão do estudo fitoquímico de novas espécies selecionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lewis G.F. 2004. 55^o Congresso Nacional de Botânica / 26^o Encontro Regional de Botânica, Viçosa-MG, CD-ROM.
2. Batsford B.T. 1993. Heywood, V.H.(ed) *Flowering Plants of the World*. London.
3. Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. 1996. Diversidade. In: *Biologia Vegetal*, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p 157-407.
4. Duke J.Á. 1981. *Handbook of Legumes of World Economic Importance*. New York, Plenum Press.
5. Zomlefer W.B. 1994. *Guide to flowering plant families*. Chapel Hill: University of North Carolina Press.
6. Dixon R.A., Steele C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids-a gold mine for metabolic engineering. *Trends in plant science review* 4: p 394-400.
7. Hutchinson J. 1967. *The genera of flowering plants*. London: Oxford Univ., p 221-227.
8. Pennington R.T., Lavin M., Ireland H., Klitgaard B., Preston J., Hu J. 2001. Phylogenetic relationships of basal papilionoid legumes based upon sequences of chloroplast *trnL* intron. *Systematic botany* 26: p 537-556.
9. Bentham G. 1865. In '*Genera Plantarum*.' By G. Bentham and J. D. Hooker. Vol. 1. (Reeve.)
10. Polhill R.M., Raven P.H. (eds.). 1981. '*Advances in Legume Systematics*.' Parts 1 and 2. (Royal Botanic Gardens, Kew. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (Great Britain)).
11. Polhill R.M. 1994. Complete synopsis of legume genera. In Bisby F.A., Buckingham J., Harborne J.B. (eds.). *Phytochemical dictionary of the Leguminosae*. London. Chapman & Hall. I: p xxxv-lvii.
12. Cowan R.S. 1961. Morphology and taxonomy of genus *Swartzia* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 48: p 545-567.
13. Yakovlev G.P. 1976. Survey of genera *Zollernia* Nees and *Lecointea* Ducke. *Bot. Zhurn.* 61: p 1304-1308.
14. Mansano V.F., Tozzi A.M.G.A. 1999. The taxonomy of some *Swartzieae* (Leguminosae, subfam. Papilionoideae) from southeastern Brazil. *Brittonia* 51: p 149-158.
15. Mansano V.F., Bittrich V., Tozzi A.M.G.A., Souza A.P. 2004. Composition of the *Lecointea* clade (Leguminosae, Papilionoideae, *Swartzieae*), a re-evaluation based on combined evidence from morphology and molecular data. *Taxon Viena*, 53 (4): p 1007-1018.
16. Ferguson I.K., Schrire B.D. 1994. A cladistic analysis of the pollen morphology of the tribe *Swartzieae* (Leguminosae). *Acta Botanica Gallica* 141 (2): p 207-215.
17. Ireland H.R., Pennington T., Preston J. 2000. Molecular systematics of the *Swartzieae*, p 217-231. In: Herendeen P.S., Bruneau A. (eds.) *Advances in legume systematics. Part 9*. Royal Botanic Gardens, Kew.

- 18.Mansano, V.F. 2002. 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.
- 19.Harborne J.B. 2000. Arsenal for survival: secondary plant products. *Taxon* **49**: p 435-449.
- 20.*The New York Botanical Garden- NY Specimen ID*: 11929.
- 21.Fundação SOS Mata Atlântica. 1990. *Workshop Mata Atlântica: problemas, diretrizes e estratégias de conservação*. SOS Mata Atlântica, São Paulo, p 53-62.
- 22.Cowan R.S. 1979. *Harleyodendron*, a new genus of Leguminosae (Swartzieae). *Brittonia* **31** (1): p 72-78.
- 23.Micheli M. 1883. *Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève* **28** (7): p 41.
- 24.Dallwitz M.J., Paine T.A., Zurcher E.J. 1998. Interactive keys. In: '*Information Technology, Plant Pathology and Biodiversity*', p 201-212 (eds. Bridge P., Jeffries P., Morse D.R., Scott P.R.) (CAB International: Wallingford).
- 25.Tokarnia C.H., Peixoto P.V., Brito M.F., Duarte M.D., Brust L.A.C. 1999. Experimental studies in cattle with cyanogenic plants. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **19** (2): p 84-90.
- 26.Brito M.F., Franca T.N., Oliveira K.D., Cerqueira V.D. 2000. Experiments in rabbits with cyanogenic plants. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **20** (2): p 65-70.
- 27.Nahrstedt A. 1976. Prunasin in *Holocalyx balansae*. *Phytochemistry* **15** (12): p 1983-1984.
- 28.Gmelin R., Schuler E. Bordas M. 1973. Holocalin: Ein neues cyanogenes glykosid aus *Holocalyx balansae*. *Phytochemistry* **12** (2): p 457-461.
- 29.Rushel A.D., Nodari E.S., Guerra M.P., Nodari R.O. 2000. Evolução do uso e valorização das espécies madeiráveis da floresta estacional decidual do alto-Uruguai, SC. *Ciência Florestal- Santa Maria* **13** (1): p 153-156.
- 30.Still C.W., Kahn M., Mitra A. 1978. Chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry* **43** (14): p 2923-2925.
- 31.Stahl E., Müller J. 1982. Parameters of preparative centrifugal thin-layer chromatography. *Chromatographia* **15** (8): p 493-497.
- 32.Hostettmann K., Hostettmann M., Sticher O. 1980. Rapid preparative separation of natural products by centrifugal thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography* **202** (1): p 154-156.
- 33.Bohm B.A. 1998. Introduction to flavonoids. Harwood Academic Publishers, Australia. p 80-112.

34. Chalmers A.A., Rall G.J.H., Oberholzer M.E. 1977. ^{13}C NMR of pterocarpan. *Tetrahedron* **33** (14): p 1735-1738.
35. Agrawal P.K. 1989. Carbon-13 NMR of isoflavonoids. Elsevier, Amsterdam. p 183-235.
36. Kaha V.K., Kukla A.S., Seshadri T.R. 1967. Syntheses of ($\pm$)-7,8,4'-trimethoxypterocarpan and ($\pm$)-7-hydroxy-8,4'-dimethoxypterocarpan *Tetrahedron* **23** (7): p 3221-3225.
37. Harper S.H., Kemp A.D., Underwood W.G.E., Campbell R.V.M. 1969. Pterocarpanoid Constituents of the Heartwoods of *Pericopsis angolensis* and *Swartzia madagascariensis*. *Journal of Chemical Society C*: p 1109-1116.
38. Bandara B.M.R., Kumar N.S., Samaranayake K.M.S. 1989. An antifungal constituent from the stem bark of *Butea monosperma*. *Journal of Ethnopharmacology* **25**: p 73.
39. Herath H.M.T.B., Dassanayake R.S., Priyadarshani A.M. A., Susila S., Wannigama G.P., Joanne J. 1998. Isoflavonoids and a pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry* **47** (1): p 117-119.
40. Pachler K.G.R., Underwood W.G.E. 1967. Proton magnetic resonance study of some pterocarpan derivatives. The conformation of the 6a,11a-dihydro-6H-benzofuro[3,2-c][1]benzopyran ring system. *Tetrahedron* **23** (4): p 1817-1826.
41. Sannomiya M. 2001. Análise Fitoquímica de *Platymiscium floribundum* var. *Latifolium* e *Lonchocarpus montanus*. Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica. Tese de Doutorado. Instituto de Química-Unicamp p 107.
42. Cook J.T., Ollis W.D., Sutherland I.O., Gottlieb O.R. 1978. Isoflavonoid constituents of *Dalbergia* and *Machaerium* species. Part 5. Pterocarpan from *Dalbergia spruceana*. *Phytochemistry* **17** (8): p 1419-1422.
43. Antus S., Kurtán T., Juhász L., Kiss L., Hollósi M., Májer Z.S. 2001. Chiroptical properties of 2,3-dihydrobenzo[b]furan and chromane chromophores in naturally occurring O-heterocycles. *Chirality* **13**: p 493-506.
44. Braz Filho R., Demoraes M.P.L., Gottlieb O.R. 1980. The chemistry of Brazilian Leguminosae. 57. Pterocarpan from *Swartzia laevicarpa*. *Phytochemistry* **19** (9): p 2003-2006.
45. Burden RS, Bailey JA, Dawson GW. 1972. Structures of three new isoflavonoids from *Phaseolus vulgaris* infected with tobacco necrosis. *Tetrahedron Letters* **13** (41): P 4175-4178.
46. Kiss L., Kurtán T., Antus S., Bényei A. 2003. Chiroptical properties and synthesis of enantiopure *cis* and *trans* pterocarpan skeleton. *Chirality* **15**: p 558-563.

- 47.Kurosawa K., Ollis W.D., Redman B.T., Sutherland I.O. 1968. Absolute configurations of the animal metabolite, equol, three naturally occurring isoflavans, and one natural isoflavanquinone. *Chemical Communications* 20: p 1265-1267.
- 48.Kurosawa K., Ollis W.D., Redman B.T., Sutherland I.O., Alves H.M., Gottlieb O.R. 1978. Isoflavonoid constituents of *Dalbergia* and *Machaerium* species. Part 6. Absolute configuration of isoflavans. *Phytochemistry* 17 (8): p 1423-1426.
- 49.Versteeg M., Bezuidenhoudt B.C.B., Ferreira D. 1999. Stereoselective synthesis of isoflavonoids. (*R*)- and (*S*)-isoflavans. *Tetrahedron* 55 (11): p 3365-3376.
- 50.Dewick P.M. 1994. Isoflavonoids. In: Harborne J.B. (Ed.), *The flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman and Hall Ltd., London, p 117-238.
- 51.Galeffi C., Rasoanaivo P., Federici E., Palazzino G., Nicoletti M., Rasolondratovo B. 1997. Two prenylated isoflavanones from *Millettia pervilleana*. *Phytochemistry* 45 (1): p 189-192.
- 52.Van Aardt T.G., Van Rensburg H., Ferreira D. 2001. Synthesis of isoflavonoids. Enantiopure *cis*- and *trans*-6a-hidroxypterocarpanes and a racemic *trans*-pterocarpan. *Tetrahedron* 57 (33): p 7113-7126.
- 53.Pelter A., Amenechi P.I. 1969. Isoflavonoid and pterocarpinoid extractives of *Lonchocarpus laxiflorus*. *Journal of the Chemical Society* 6: p 887-896.
- 54.Wong E. 1975. The isoflavonoids. In: Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (Eds.), *The flavonoids*. Chapman & Hall Ltd. London, p 743-800.
- 55.Kurtán T., Baitz-Gács E., Májer Z., Antus S. 2000. Síntesis and circular dichroism of steroids with 2,3-dihydro-1-benzofuran and 4*H*-benzopyran chromophores; revision of the absolute configuration of some neolignans from *Krameria cystisoides*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, p 453-469.
- 56.Tanaka H., Oh-Uchi T., Etoh H., Shimizu H., Tateishi Y. 2002. Isoflavonoids from the roots of *Erythrina poeppigiana*. *Phytochemistry* 60 (8): p 789-794.
- 57.Budzikiewicz H., Djerassi C., Williams D.H. 1964. *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. Vol II. Steroids, terpenoids, sugar and miscellaneous classes*. Holden-Day, Inc. San Francisco, USA, p 96.
- 58.Harborne J.B., Mabry T.J. 1982. *Advances in research: The Flavonoids*, Chapman & Hall, p 536.
- 59.Tanaka H., Toshihiro T., Hosoya A., Kitade Y., Etoh H. 1998. An isoflavan from *Erythrina x bidwillii*. *Phytochemistry* 47 (7): p 1397-1400.
- 60.Buckingham, J. (ed.). 1994. *Dictionary of natural products*. 11 vols. London.
- 61.Lindley, J. 1830. *An introduction to the natural system of botany*. London.

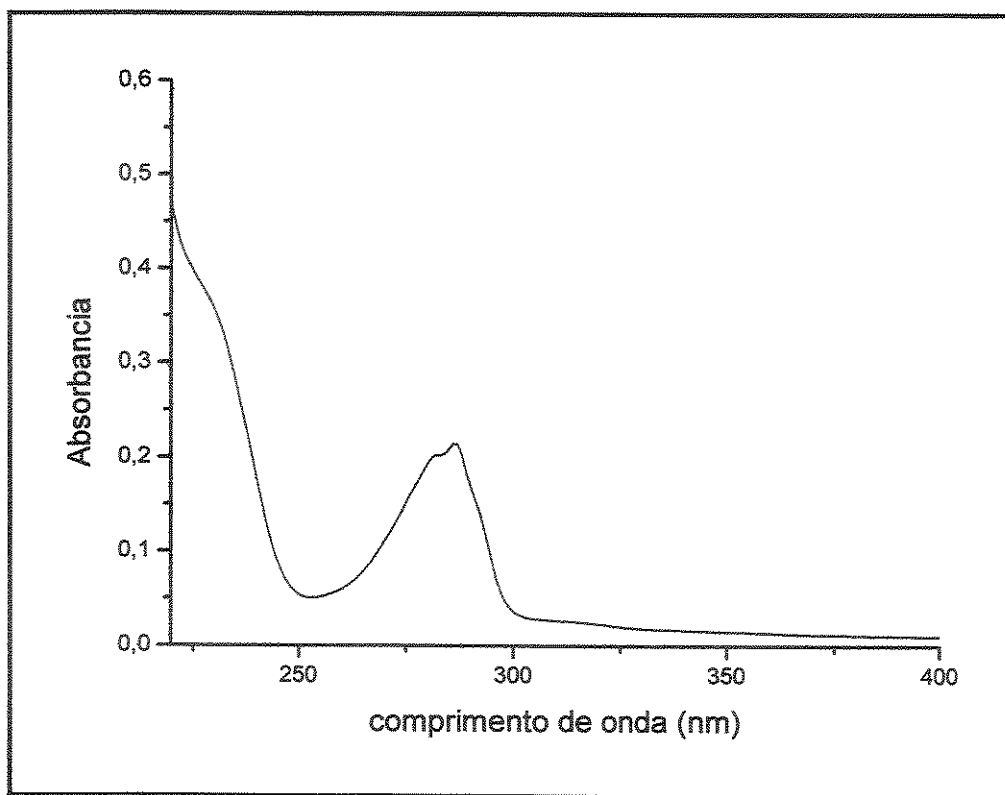
- 62.Strack D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey, P.M., Harborne J.B. (Eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, p 387-416.
- 63.Dixon R.A., Steele C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids-a gold mine for metabolic engineering. *Trends in plant science review* 4: p 394-400.
- 64.Knaggs A.R. 2000. The Biosynthesis of Shikimate Metabolites. *Natural Product Reports* 17: p 269-292.
- 65.Dewick P.M. 1997. The Shikimate Pathway: Aromatic, Aminoacids and Phenylpropanoids. In: Medicinal natural Products, a Biosynthetic Approach. N.Y. John Wiley & Sons p 109-151.
- 66.Hegnauer R, Grayer-Barkmeijer J. 1993. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: A chemotaxonomic approach. *Phytochemistry* 34 (1): p 3-16.
- 67.Crombie L., Whiting D.A. 1998. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. *Phytochemistry* 49 (6): p 1479-1507.
- 68.Tahara S., Ibrahim R.K. 1995. Prenylated isoflavonoids- an update. *Phytochemistry* 38 (5): p 1073-1094.
- 69.Tanaka T. et al. 1998. Isoflavonoids from *Sophora secundiflora*, *S.arizonica* and *S.gypsophila*. *Phytochemistry* 48 (7): p 1187-1193.
- 70.Zeng J.F. 1998. Three prenylated isoflavans from *Maackia tenuifolia*. *Phytochemistry* 47 (5): p 903-905.
- 71.Harborne J.B. 1994. The flavonoids: advanced in research since 1986, Chapman & Hall, London, **Cap.5**.
- 72.Pachler K.G.R., Underwood W.G.E. 1967. 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 (4): p 1817-1820.
- 73.Schöning A., Friedrichsen W. 1989. The stereochemistry of pterocarpanoids. A theoretical study. *Zeitschrift fur Naturforschung B* 44, 975-982.
- 74.Friedrichsen W., Schöning A. 1990. The stereochemistry of *cis*-pterocarpan. A theoretical study. *Zeitschrift fur Naturforschung Chemical Sciences*. 45, 1049-1054.
- 75.Ingham J.L. 1990. Systematics aspects of phytoalexin formation within tribe Phaseolae of the Leguminosae (subfamily Papilionoideae). *Biochemical Systematics and ecology* 18 (5): p 329-343.
- 76.Setchell K.D. 1996. Overview of isoflavone structure, metabolism and pharmacokinetics. Second International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease. Belgium. *Program & Abstract Book* p 15.
- 77.Anderson J.J.B., Garner S.C. 1997. Phytoestrogens and human function. *Nutrition Today* 32 (6): p 232-239.

- 78.Kurzer M.S., Xu X. 1997. Dietary phytoestrogens. *Annual Revist of Nutrition* 17, 353-381.
- 79.Brandi M.L. 1997. Natural and syntetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. *Calcification Tissue International* 61 (1), S1-8.
- 80.Gottlieb O.R., Kaplan M.A.C., Borin M.R. de M.B. 1996. Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico. Editora UFRJ, Rio de Janeiro.
- 81.Simmonds M.S.J. 1998. Chemoecology: The legacy left by Tony Swain. *Phytochemistry* 49 (5): p 1183-1190.
- 82.Ferrari F., Botta B., Alves de Lima R., Marini Bettolo G.B. 1984. 7,2',4'-Trihydroxy-3'-methoxyisoflavone from *Zollernia paraensis*. *Phytochemistry* 23 (3): p 708-709.
- 83.Ferrari F., Alves de Lima R., Marini Bettolo G.B. 1984. 2,4,2'-Trihydroxy-4'-methoxybenzil from *Zollernia paraensis*. *Phytochemistry* 23 (11): p 2691-2692.
- 84.Ferrari F., Botta B., Alves de Lima R. 1983. Flavonoids and isoflavonoids from *Zollernia paraensis*. *Phytochemistry* 22 (7): p 1663-1664.
- 85.Barbosa C.A. 2004. Estudo fitoquímico de *Lecointea hatschbachii* Barneby. Dissertação de Mestrado. IQ-Unicamp. p 22-23.
- 86.De Pasquale A. 1984. Pharmacognosy: the oldest modern science. *Journal of Ethnopharmacology* 11 (1): p 1-16.
- 87.Rates S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39 (5): p 603-613.
- 88.Mallavarapu G.O. 2001. Contribution of medicinal plants to modern medicine. *Journal of Medicinal Plants to Modern Medicine* 22/4A-23/1A: p 572 - 578.
- 89.Mary S.A., Winston-Salem., Eden, J.A., Gardner C.D., Williams J.L., Dalais F., Anderson D., Ashton J.W. 2001. In: Third international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease. *Nutrition* 17: p 73-77.
- 90.Goldfrank L. 1982. The pernicious panacea: herbal medicine. *Hospital Physician* 10: p 64-86.
- 91.Vulto A.G., Smet P.A.G.M. 1988. In: Dukes, M.M.G. (Ed.). *Meyler's side effects of drugs*, 11th Ed., Elsevier, Amsterdam, p 999-1005.
- 92.Mentz L.A., Schenkel E.P. 1989. A coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. *Caderno de farmácia* 5 (1/2): p 93-119.
- 93.Wu J.H., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. 2003. Progress in the recent discovery and development of promising anticancer and anti-HIV agents from natural products in the United States. *Journal of chinese chemical society* 50: p 11-22.
- 94.Ravelo A.G., Estevez-Braun A., Chavez-Orellana H., Perez-Sacau E., Mesa-Siverio D. 2004. Recent studies on natural products as anticancer agents, *Current topics in medicinal chemistry* 4: p 214-265.

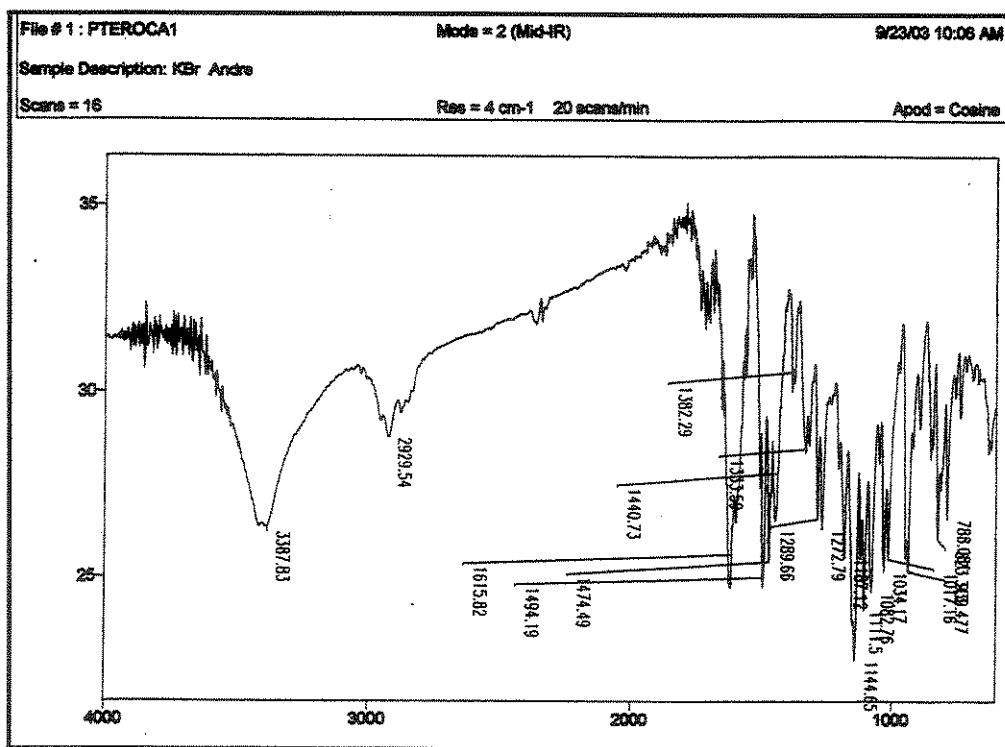
95. Basile A., Giordano S., López-Sáez J.A., Cobianchi C. 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mocees. *Phytochemistry* **52** (8): p 1479-1482.
96. Lien E.J., Ren S., Bui H., Wang R. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: p 285-294.
97. Pietta P. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63** (7): p 1035-1042.
98. Hollman P.C.H., Katan M.B. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **51**: p 305-310.
99. Birt D.F., Hendrich S., Wang W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **90**: p 157-177.
100. Marchand L.L. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **56**: p 296-301.
101. Mazur W., Adlercreutz H. 1998. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Natural occurring oestrogens in food. *Pure & Applied Chemistry* **70**: p 1759-1776.
102. Hodek P., Trefil P., Stiborova M. 2002. Flavonoids – potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P-450. *Chemico-Biological Interactions* **139**: p 1-21.
103. Grayer R.J., Kokubun T. 2001. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **56** (3): p 253-263.
104. Dixon R.A., Ferreira D. 2002. Genistein. *Phytochemistry* **60** (3): p 205-211.
105. Monache G.D., Botta B., Vinciguerra V., Mello J.F., Chiappeta A. 1997. Antimicrobial isoflavanones from *Desmodium canum*. *Phytochemistry* **41** (2): p 537-544.
106. Padmavati M., Sakthivel N., Thara K.V., Reddy A.R. 1997. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry* **46** (3): p 499-502.
107. Visioli F., Borsani L., Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research* **47**: p 419-425.
108. Shirley B.W. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: p 218-223.
109. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: p 179-194.

110. Kraft C., Janett-Siems K., Siems K., Gupta M.P., Bienzle U., Eich E. 2000. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *Journal of Ethnopharmacology* 73 (1/2): p 131-135.
111. McLaughlin J.L., Saizarbitoria T.C., Anderson J.E. 1995. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química* 18: p 13-18.
112. Parra A.L., Yhebra R.S., Sardinias I.G., Buelas L.I. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8 (5): p 395-400.
113. Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., McLaughlin J.L. 1982. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Medica* 45: p 31-34.
114. Haddad M.L., de Moraes R.C.B. 1996. Modelos bioestatísticos aplicados à entomologia - MOBAE – Análise de Probit. Aplicativo desenvolvido no Departamento de Entomologia – ESALQ/USP.
115. Saxena G., Farmer S., Towers G.H.N., Hancock R.E.W. 1995. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. *Phytochemical Analysis* 6: p 125-129.
116. Magalhães A.F., Tozzi A.M.G.A., Magalhães E.G., Nogueira M.A., Roncancio V.J.F. 1998. Ensayos biológicos con extractos obtenidos de raíces de *Lonchocarpus latifolius* (WILLD) D. C. Y. de un nuevo dibenzoilmetano aislado. *Revista Ceres* 45: p 351-358.
117. Bicalho B., Gonçalves R.A., Zibordi A.P., Manfio G.P., Marsaioli A.J. 2003. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* ssp. (Clusiaceae) pollinating bees. *Zeitschrift für Naturforschung C* 58: p 746-751.
118. Sweeney M.J., Dobson D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43 (3): p 141-158.
119. Rubinstein I., Goad L.J., Clague A.D.H., Mulheirn L.J. 1976. The 220 MHz spectra of phytosterols. *Phytochemistry* 15 (1): p 195-200.
120. Wright J.L.C., McInnes A.G., Shimizu S., Smith D.G., Walter J.A., Idler D., Khalil W. 1978. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry* 56 (14): p 1898-1903.

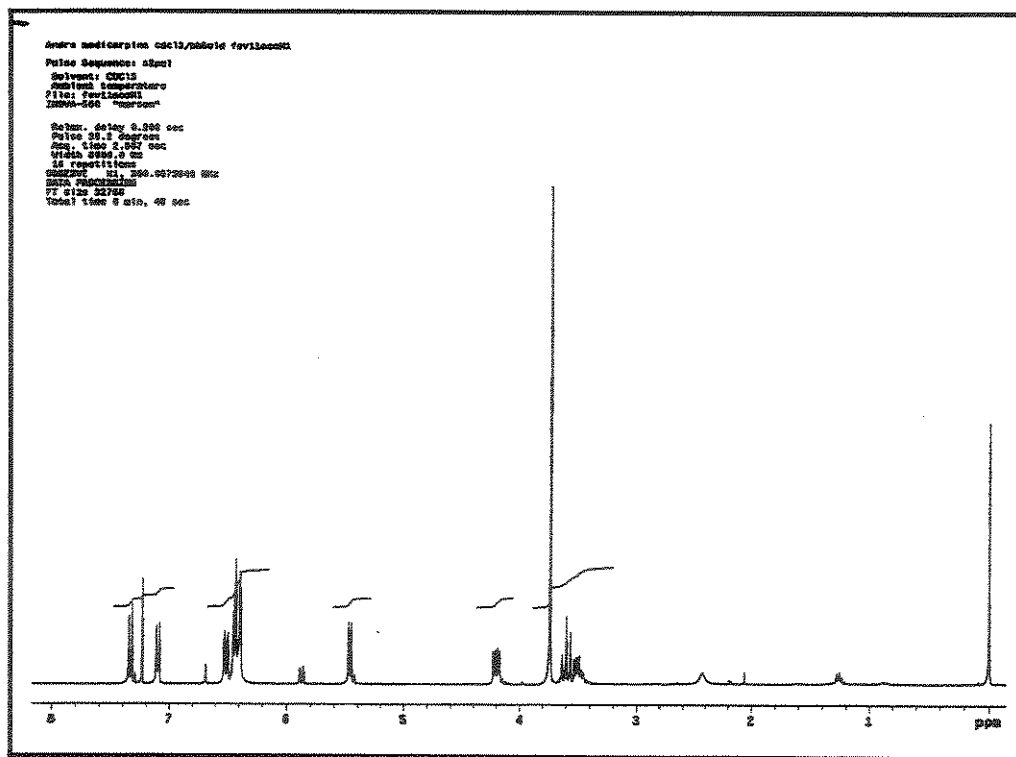
ANEXO-ESPECTROS



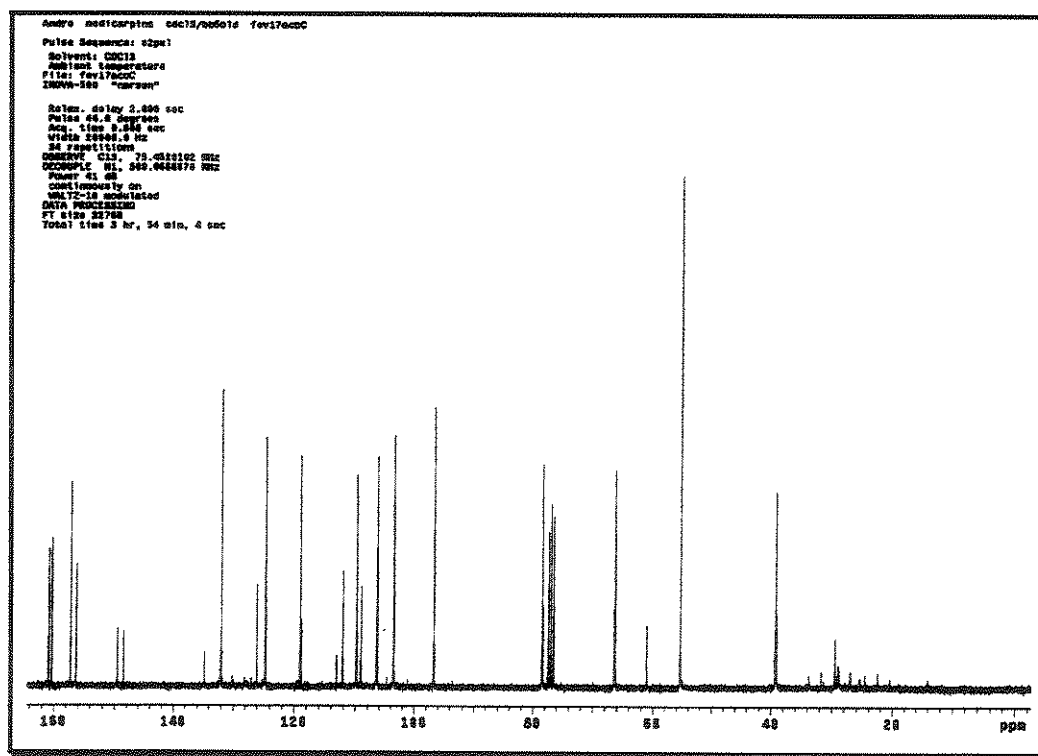
E.1- Espectro na região do U.V. para o pterocarpano 1.



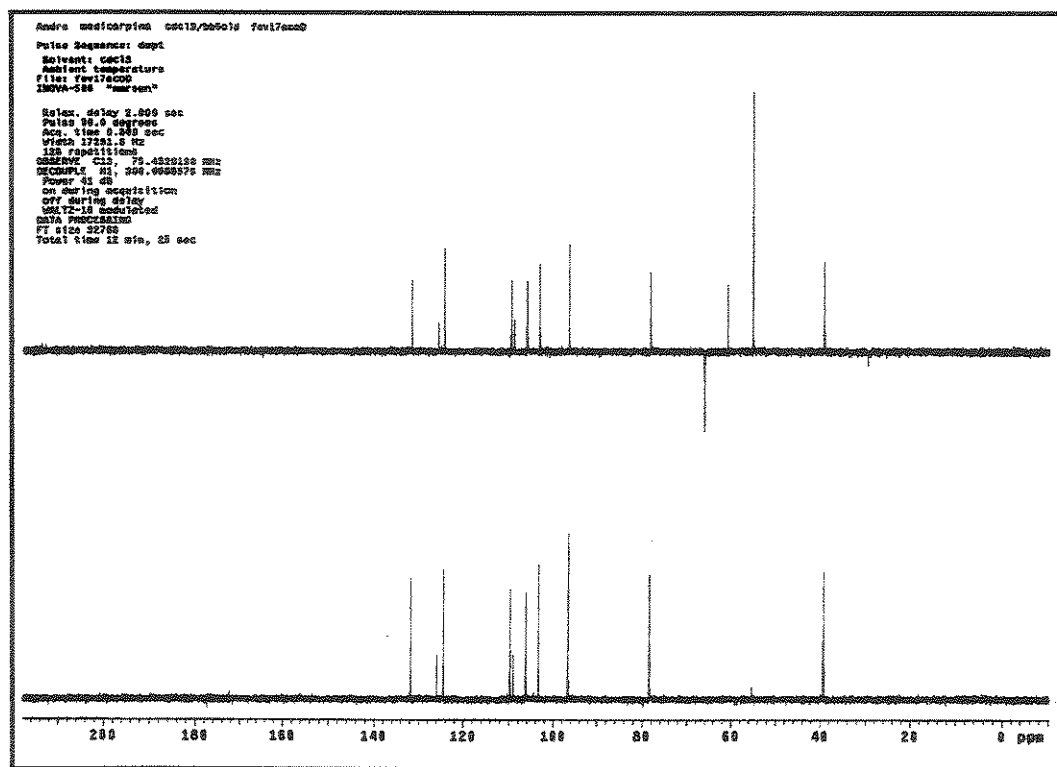
E.2- Espectro na região do I.V. para o pterocarpano 1.



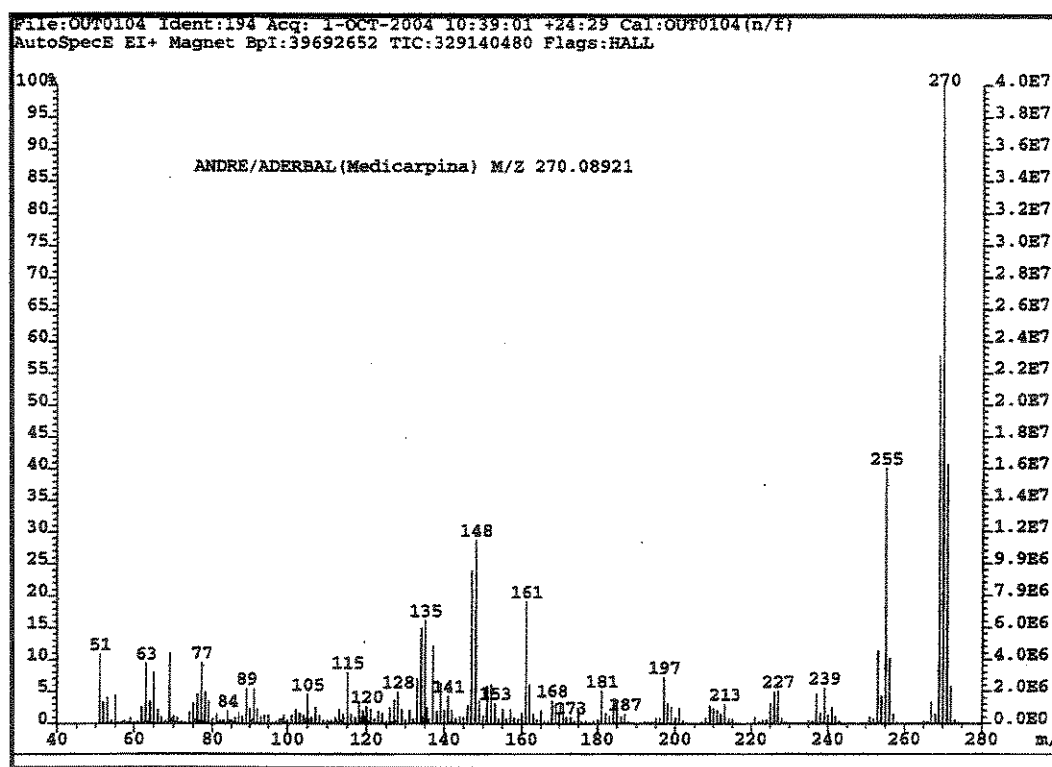
E.3- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) para o pterocarpano 1.



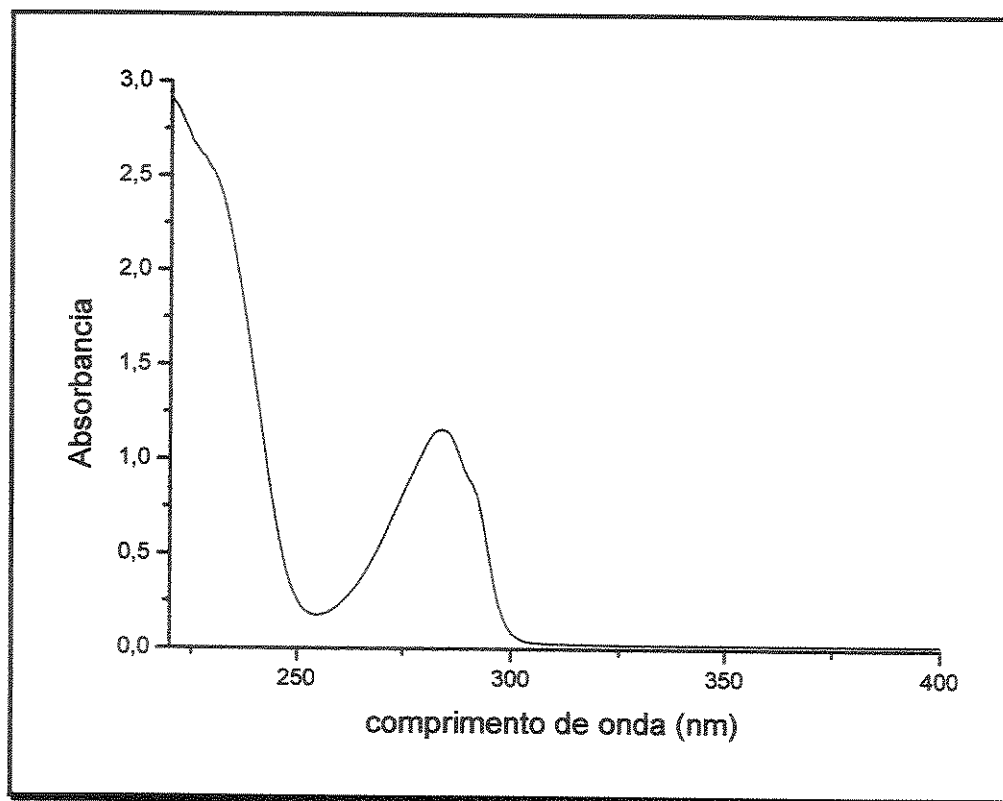
E.4- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 7,0 T) para o pterocarpano 1.



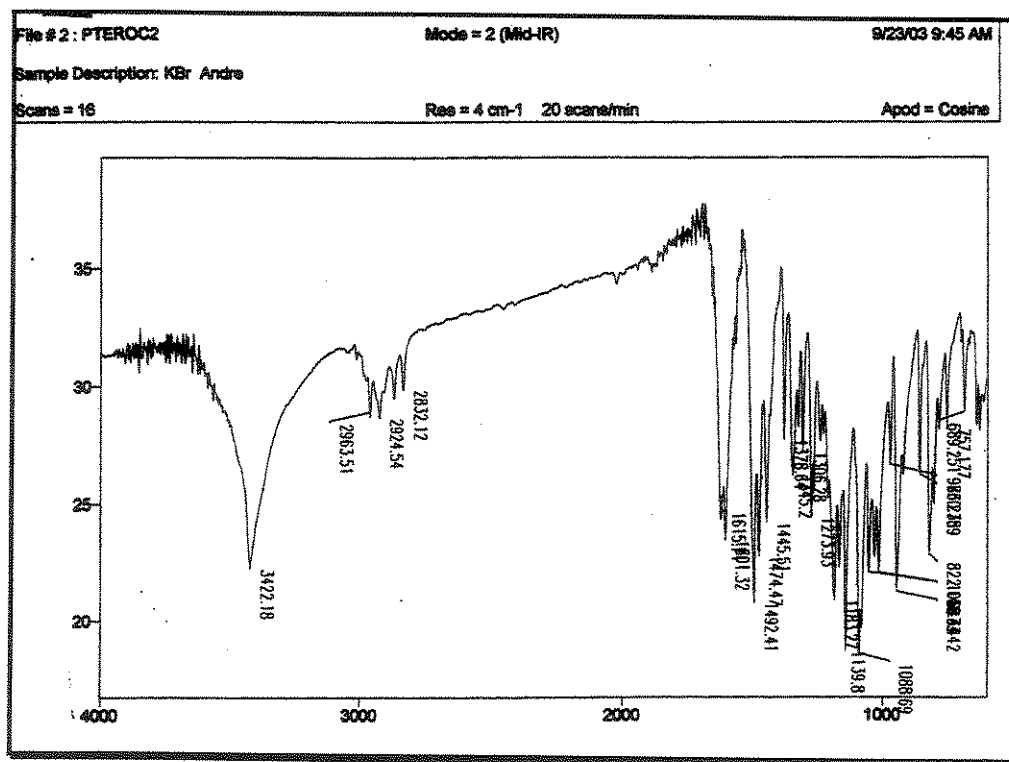
E.5- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl₃, 7,0 T) para o pterocarpano 1.



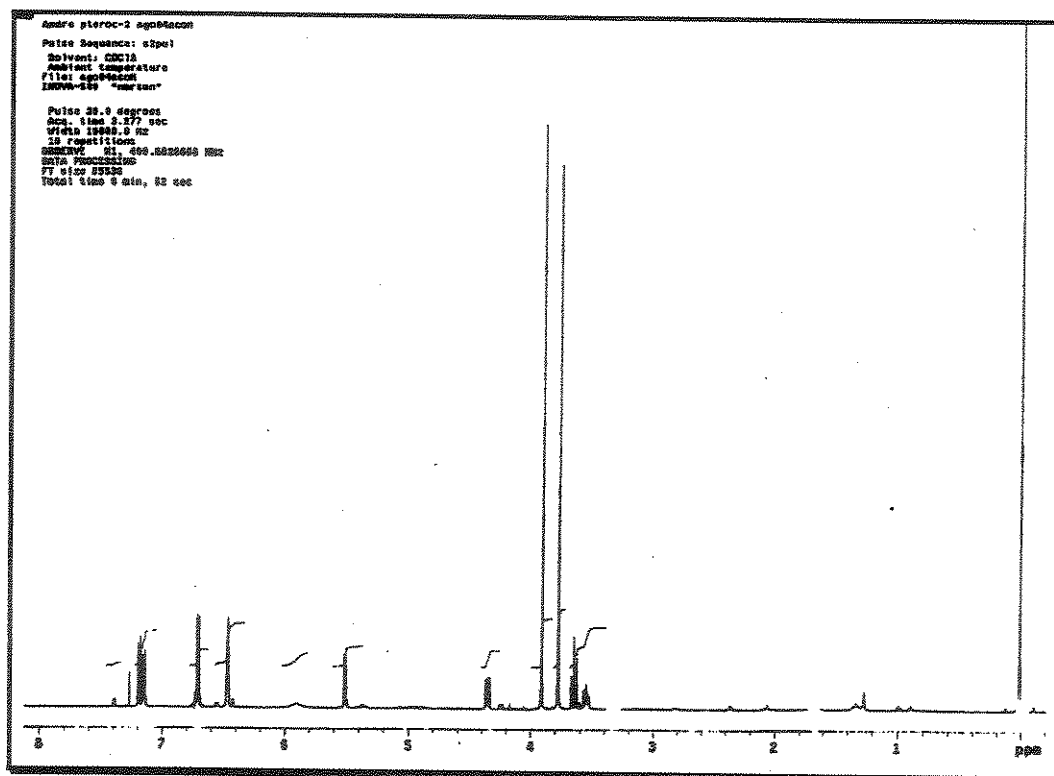
E.6- Espectro de massas de baixa resolução para o pterocarpano 1.



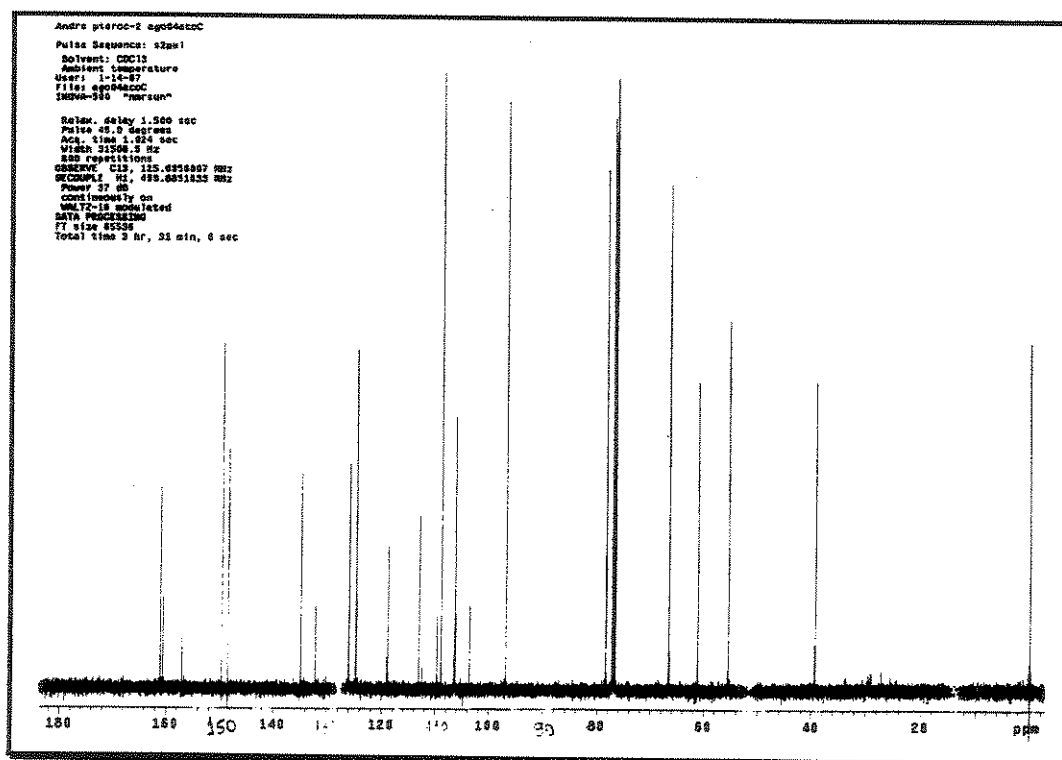
E.7- Espectro na região do U.V. para o pterocarpano 2.



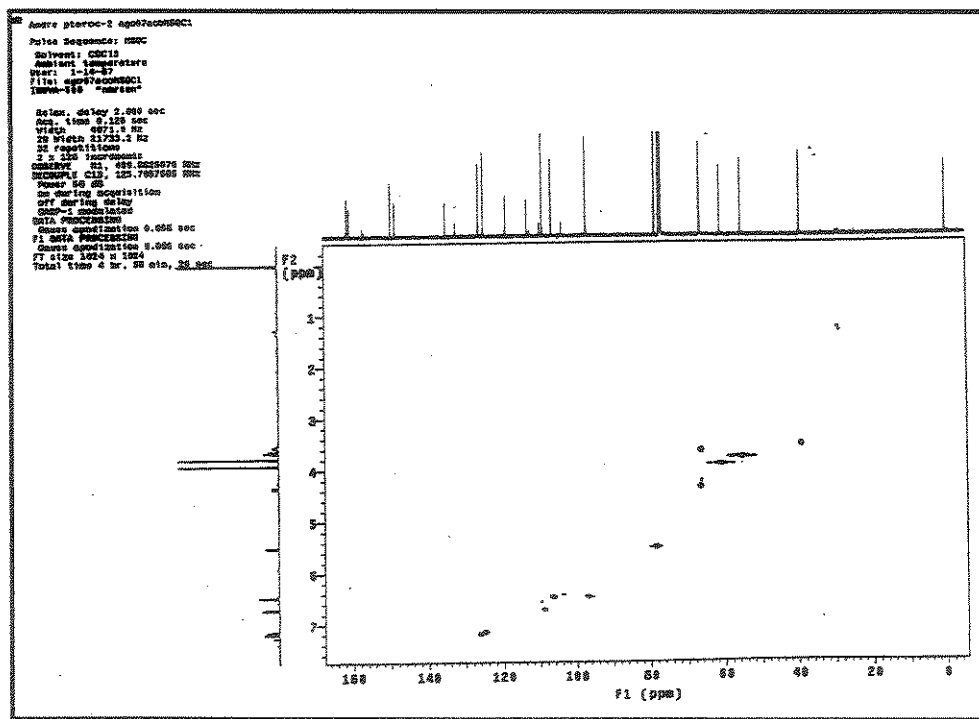
E.8- Espectro na região do I.V. para o pterocarpano 2.



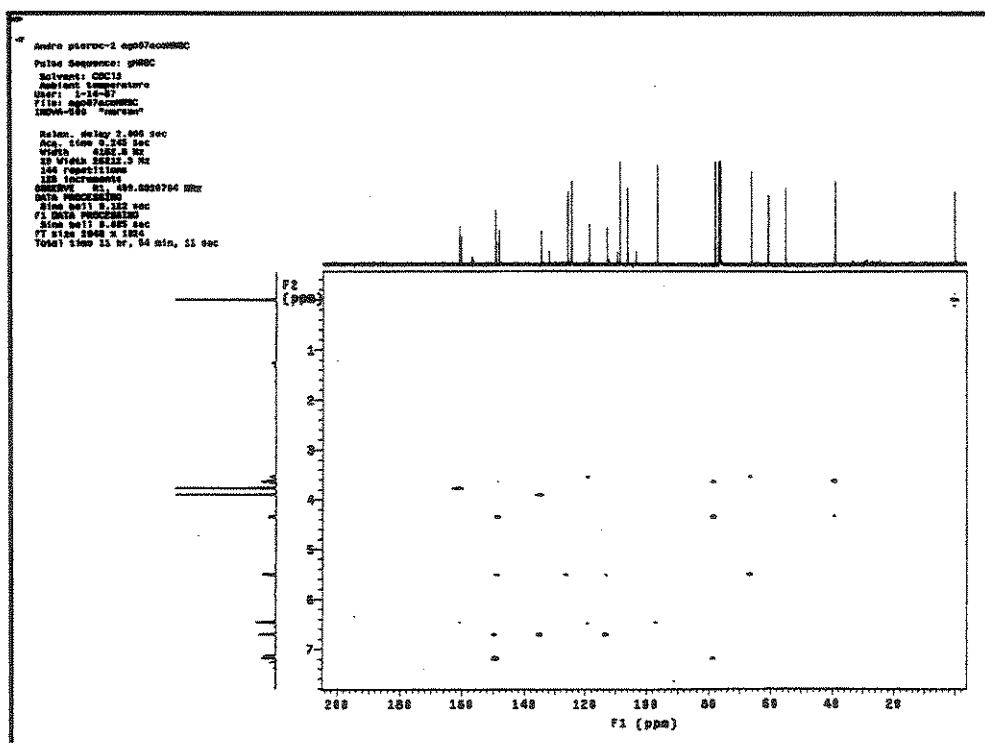
E.9- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.



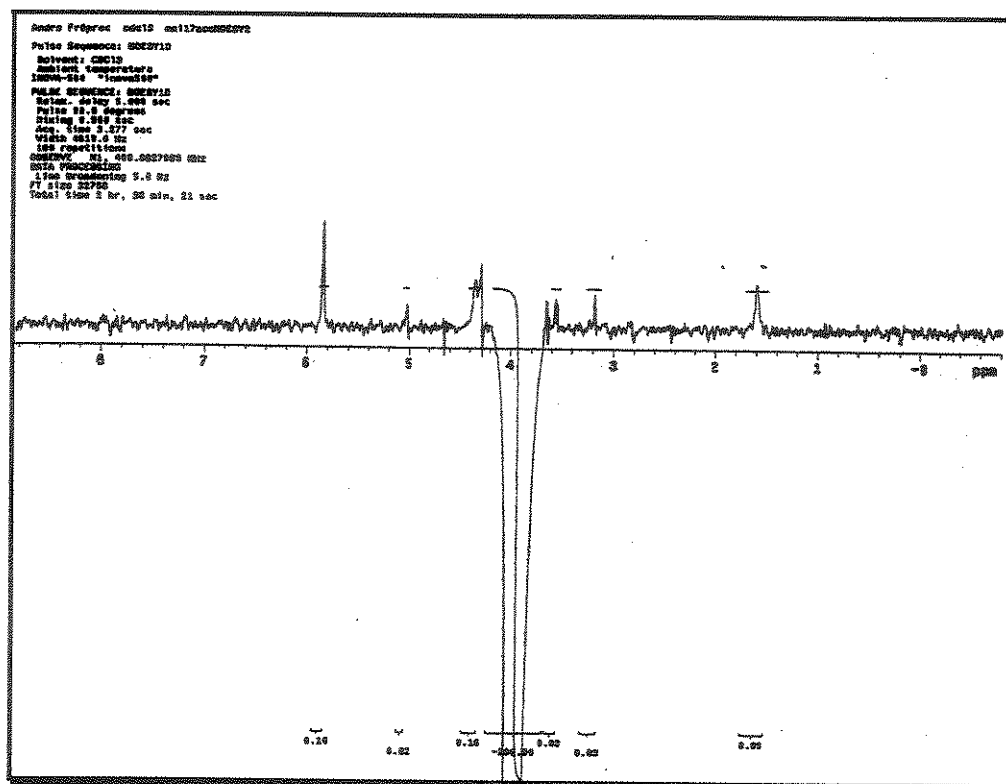
E.10- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.



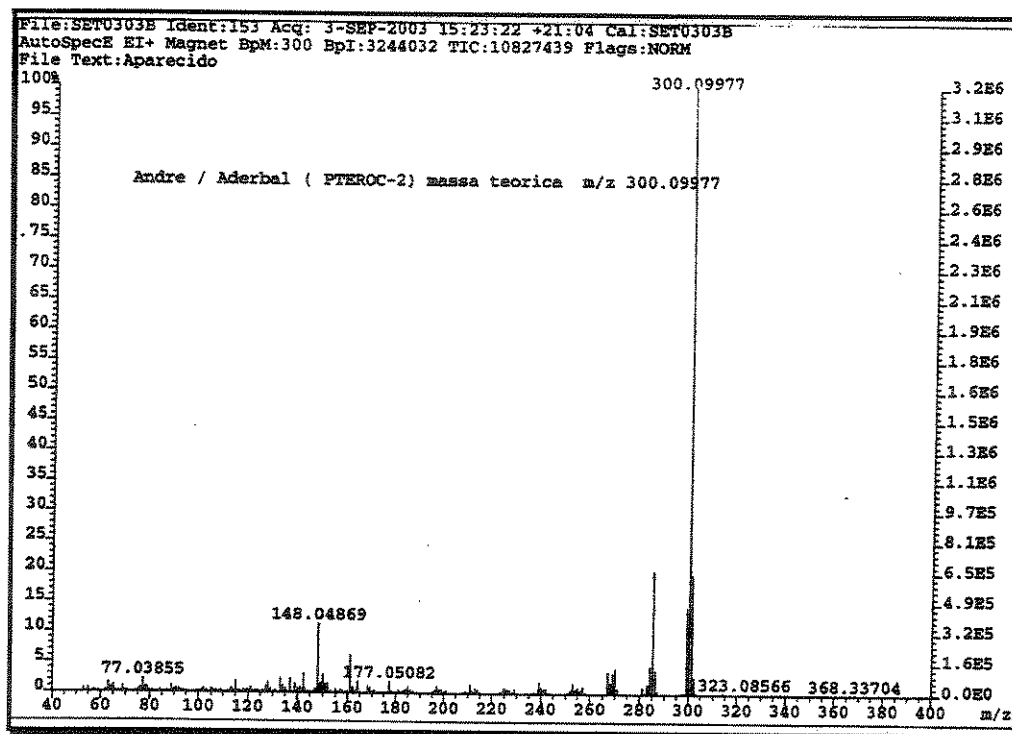
E.13- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.



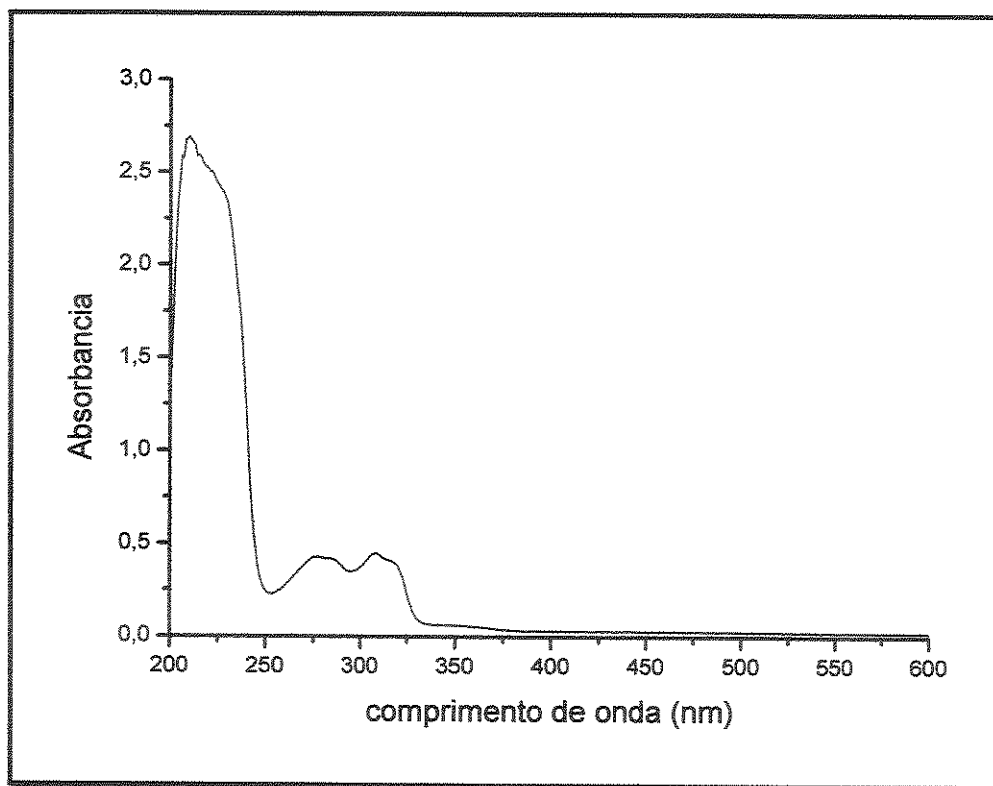
E.14- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 2.



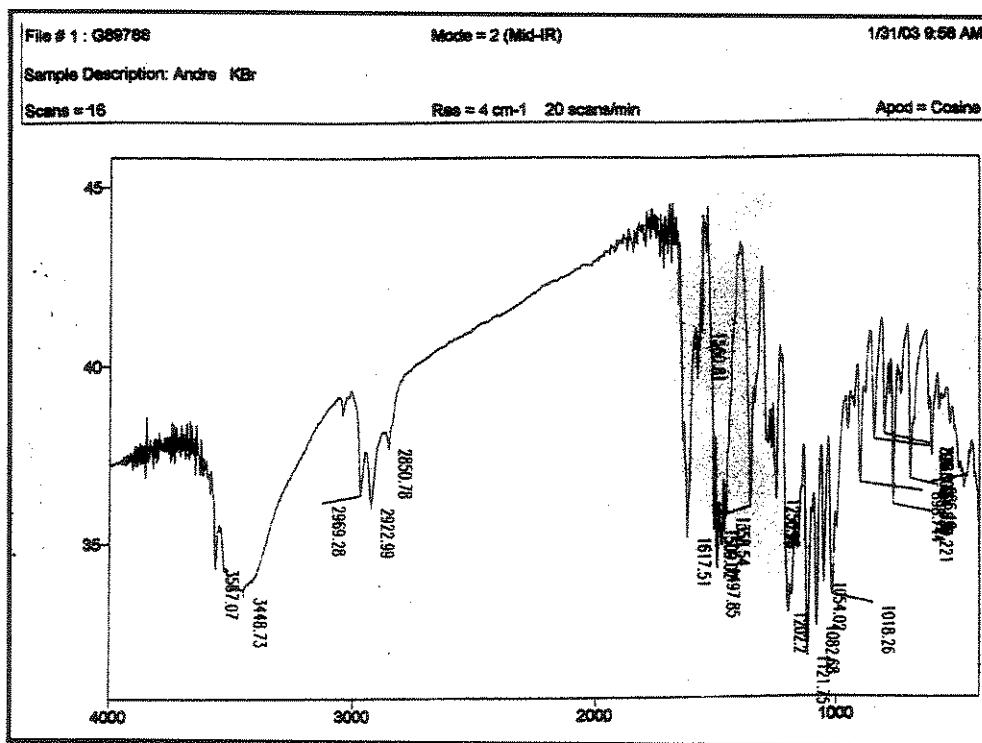
E.15- Experimento NOESY-1D (CDCl₃, 11,0 T) para o pterocarpano 2.



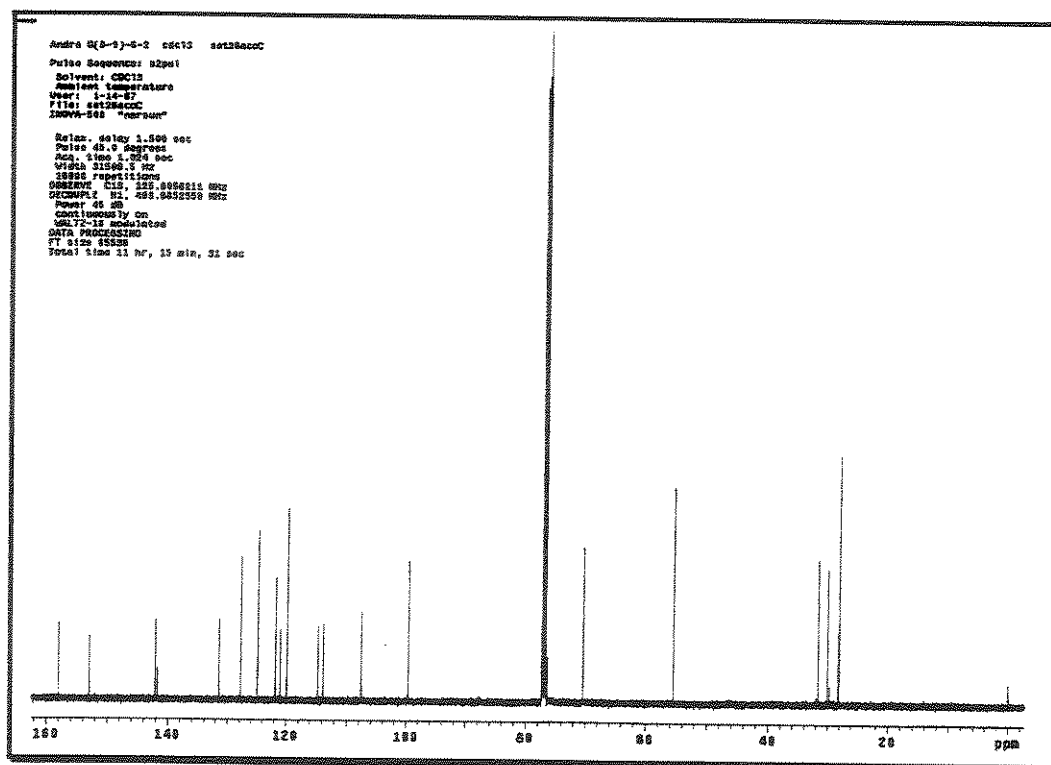
E.16- Espectro de massas de alta resolução para o pterocarpano 2.



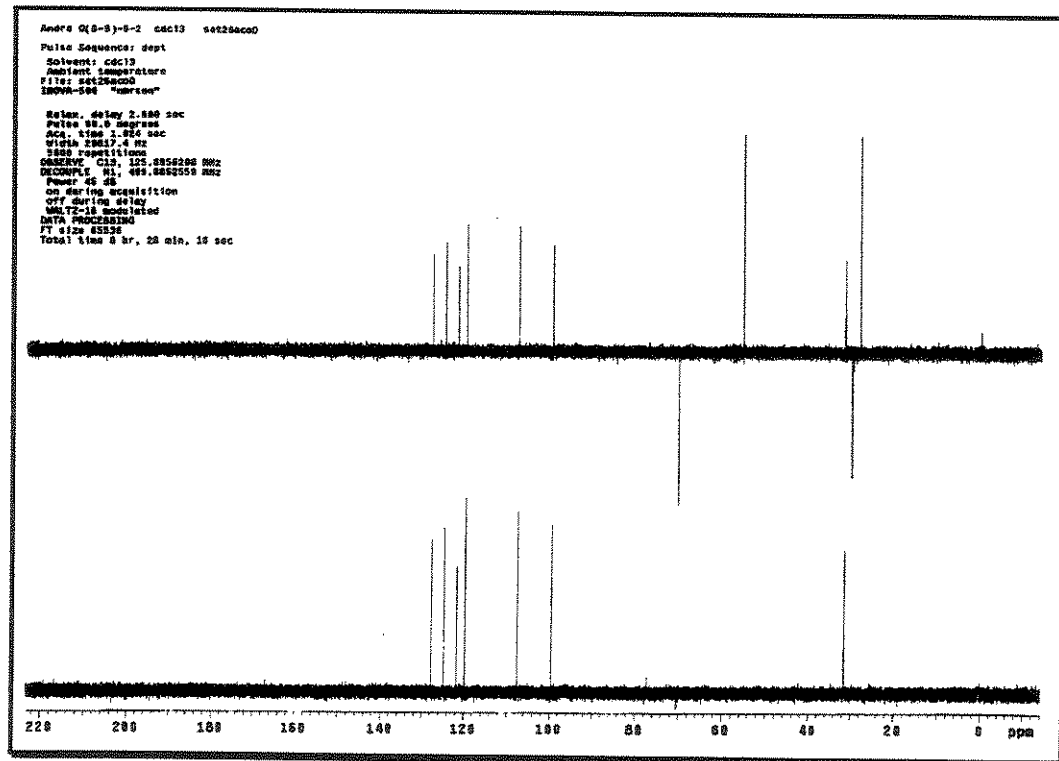
E.17- Espectro na região do U.V. para a isoflavana 3.



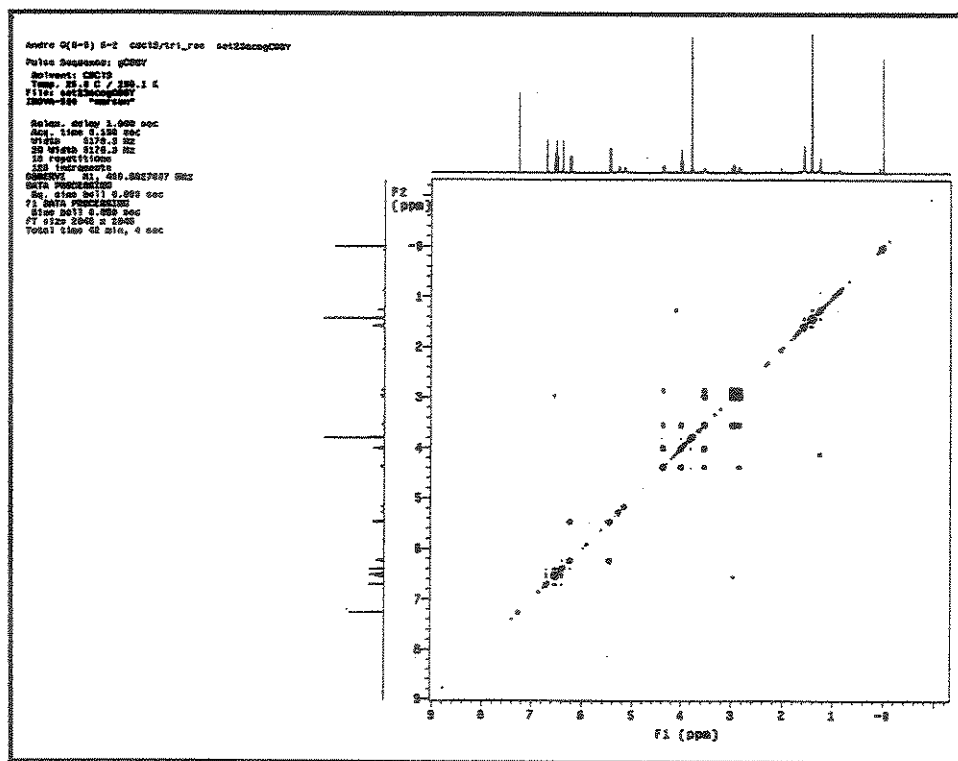
E.18- Espectro na região do I.V. para a isoflavana 3.



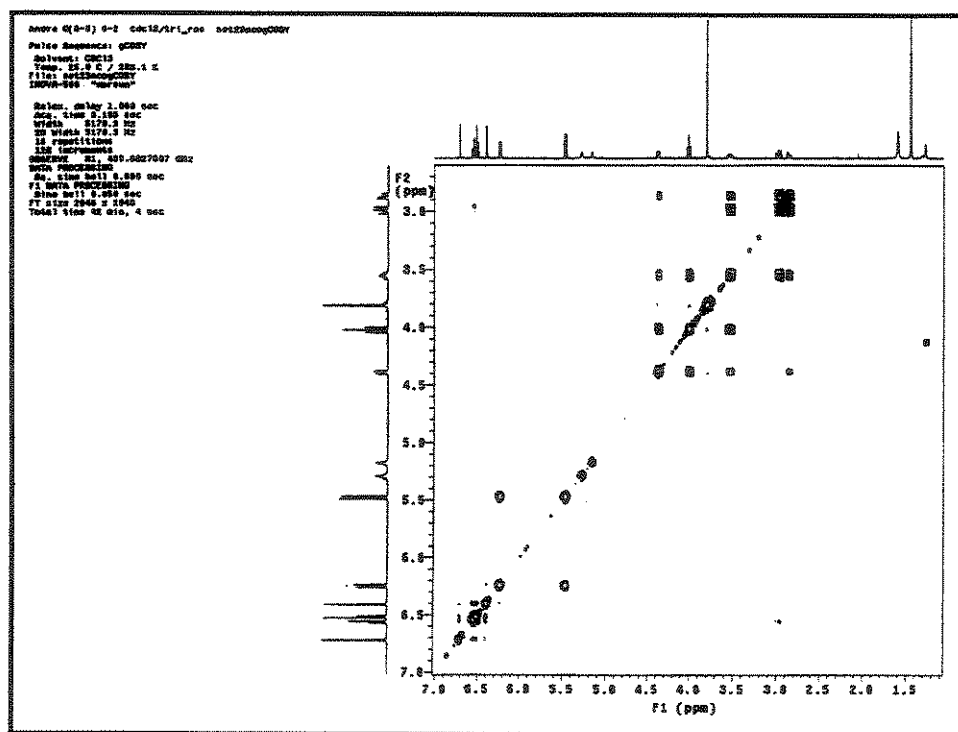
E.21- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.



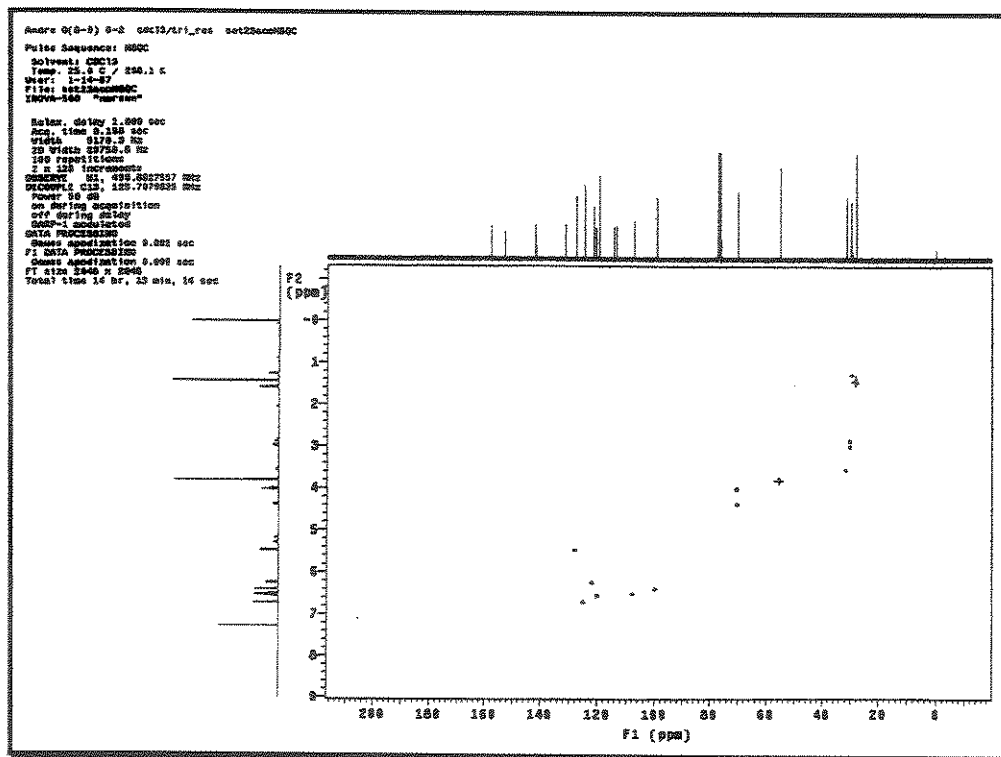
E.22- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 3.



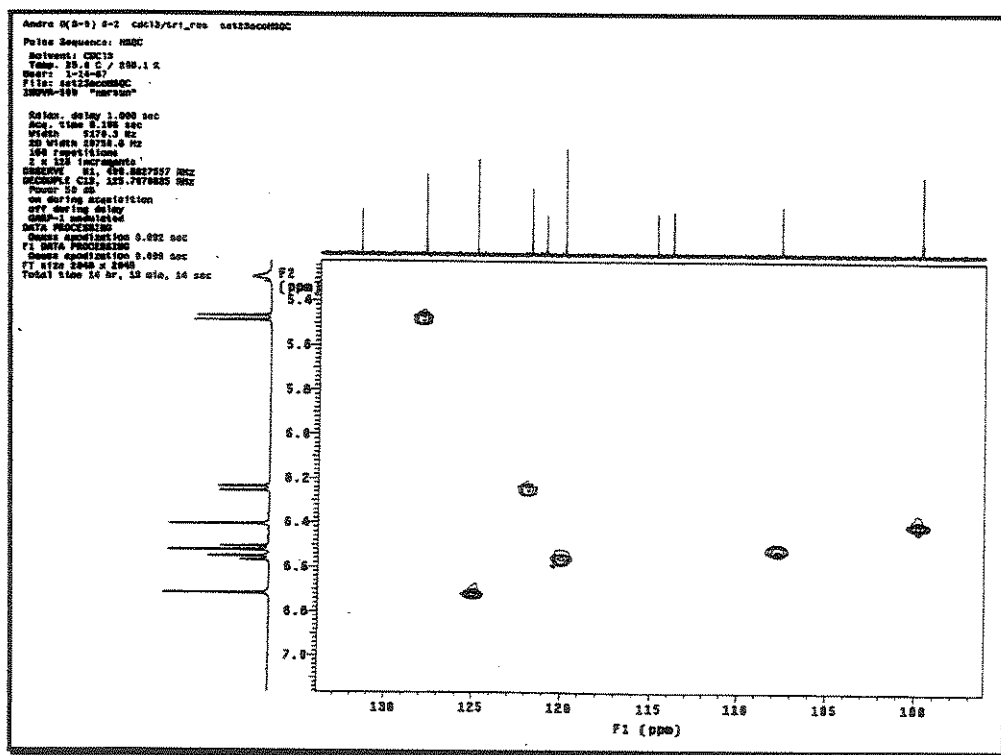
E.23- Mapa de contorno de RMN 2D (H,H-gCOSY) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavana 3.



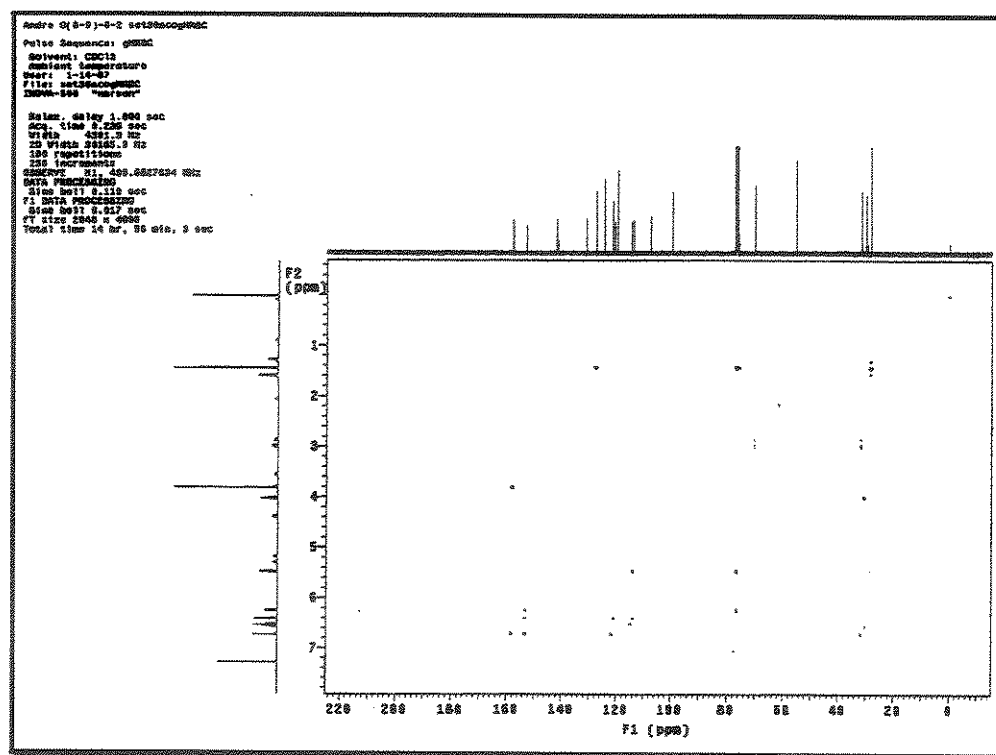
E.24- Expansão do espectro anterior.



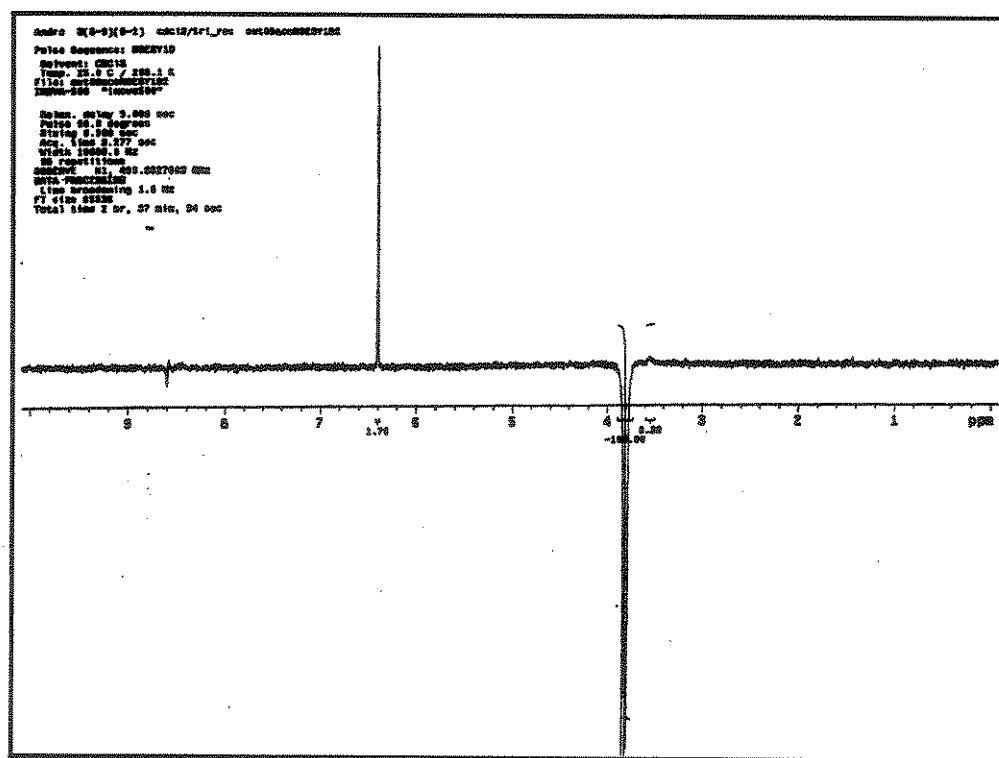
E.25- Mapa de contorno de RMN 2D (H,C-HSQC) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavana 3.



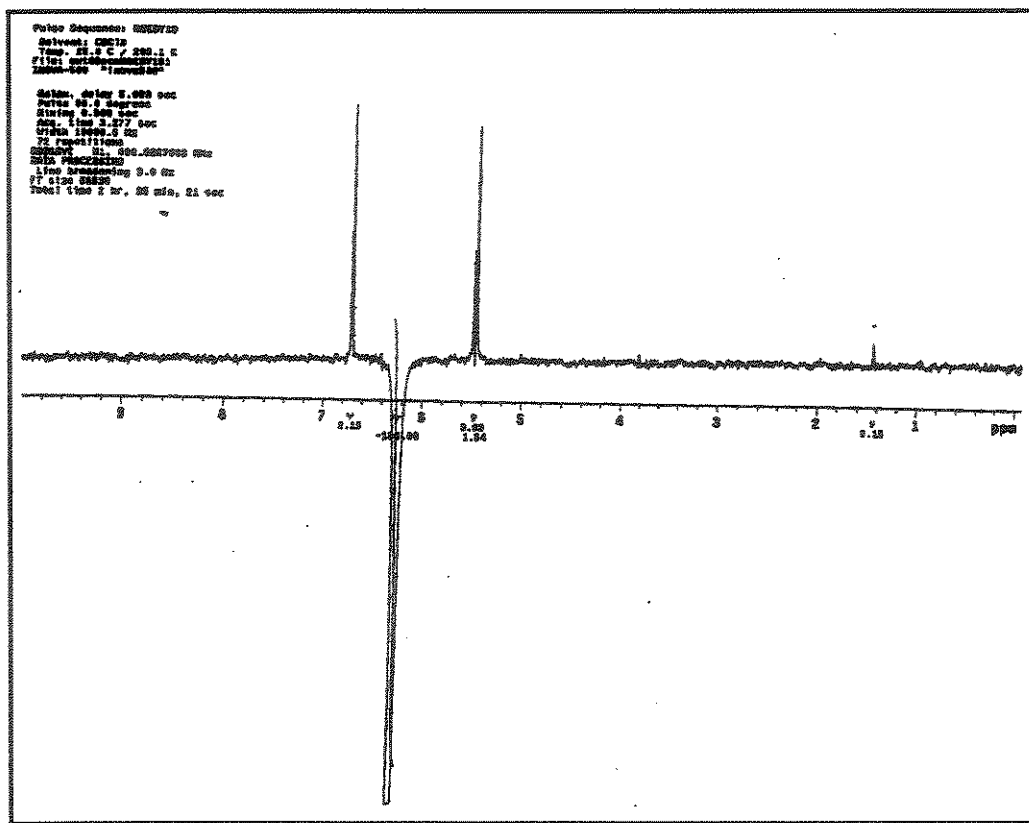
E.26- Expansão do espectro anterior.



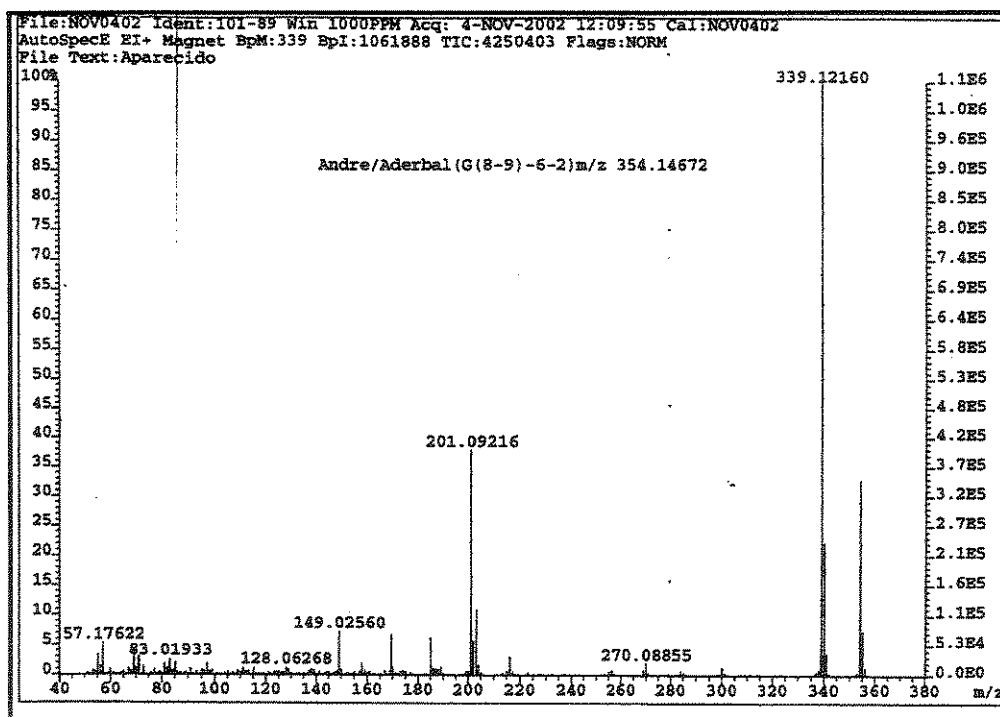
E.27- Mapa de contorno de RMN 2D (H,C-gHMBC) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavana 3.



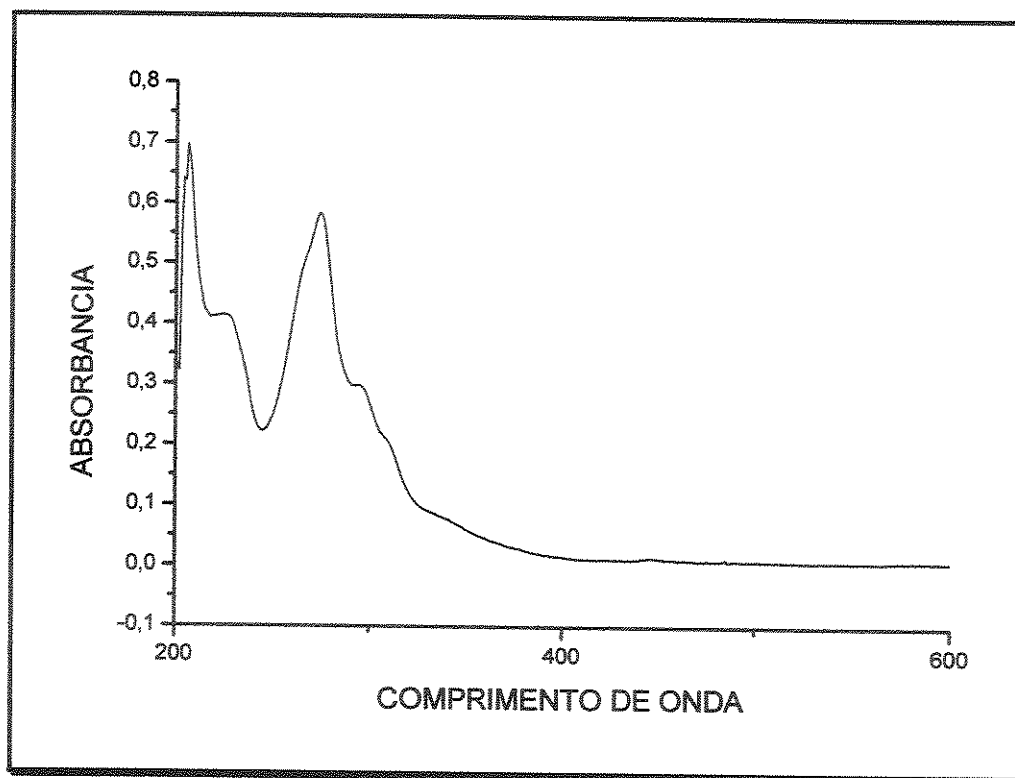
E.28a- Experimento NOESY-1D para a isoflavana 3.



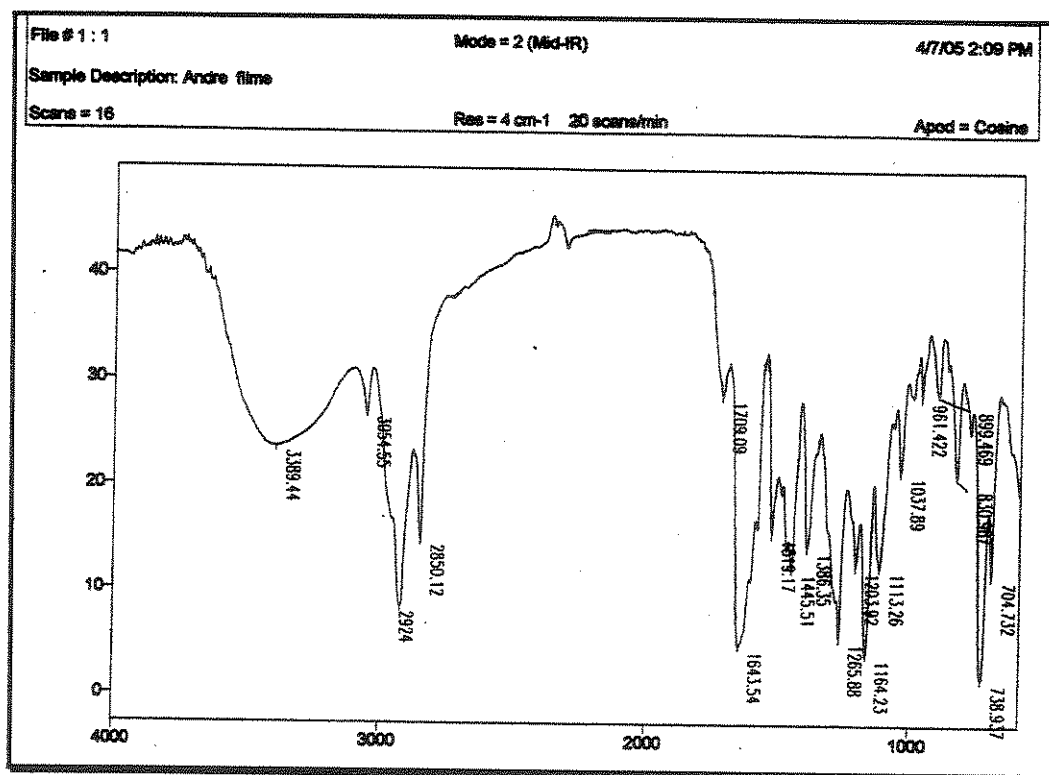
E.28b- Experimento NOESY-1D para a isoflavana 3.



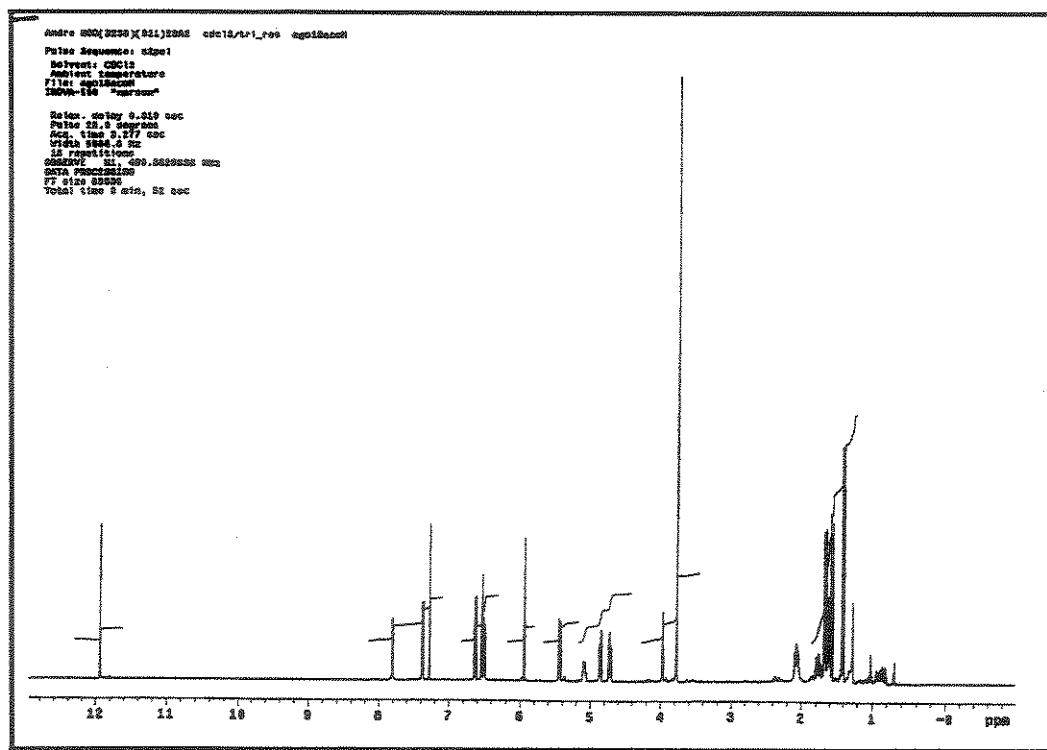
E.29- Espectro de massas de alta resolução para a isoflavana 3.



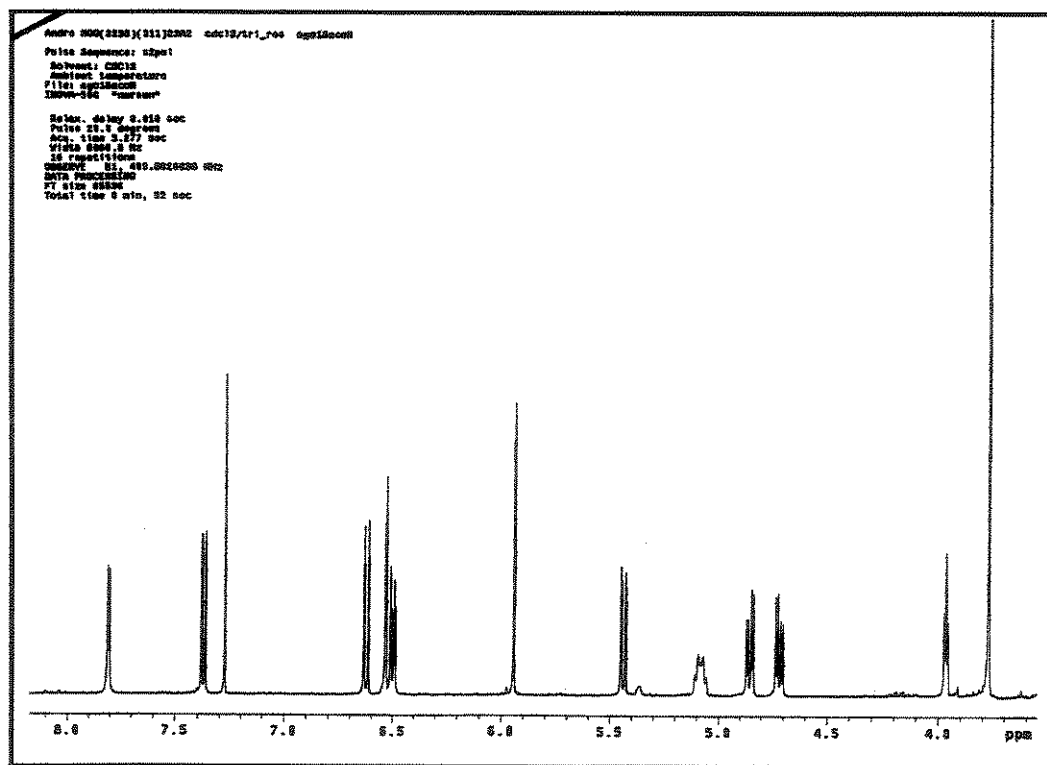
E.30- Espectro na região do U.V. para a isoflavanona 4.



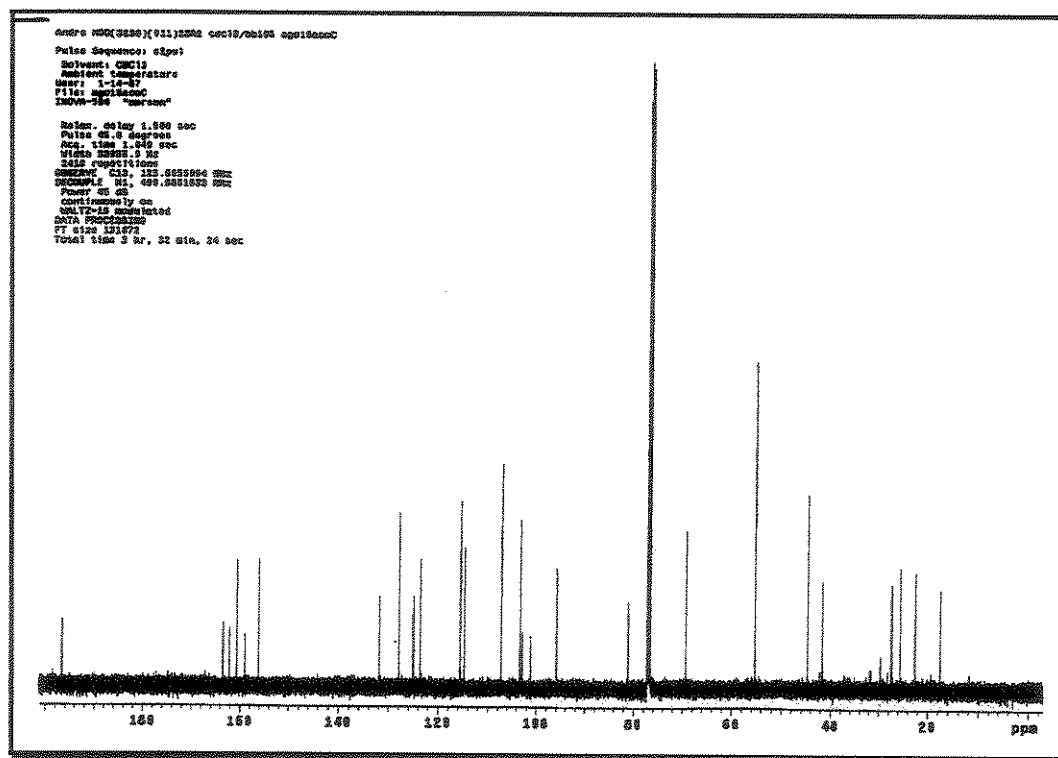
E.31- Espectro na região do I.V. para a isoflavanona 4.



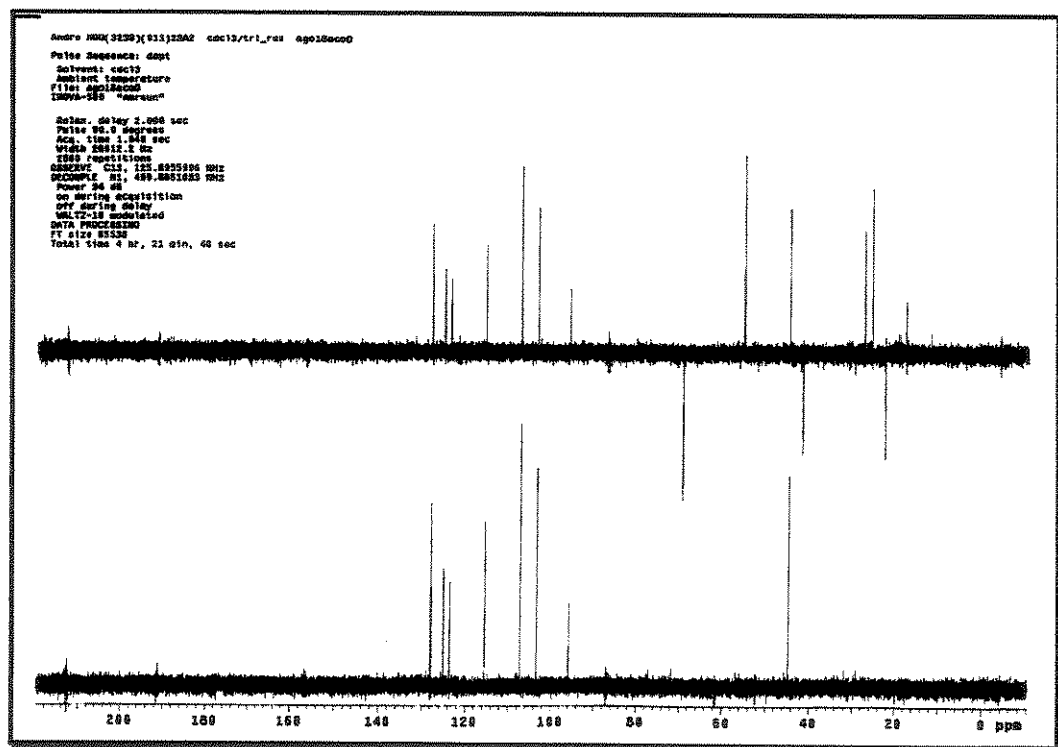
E.32- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 4.



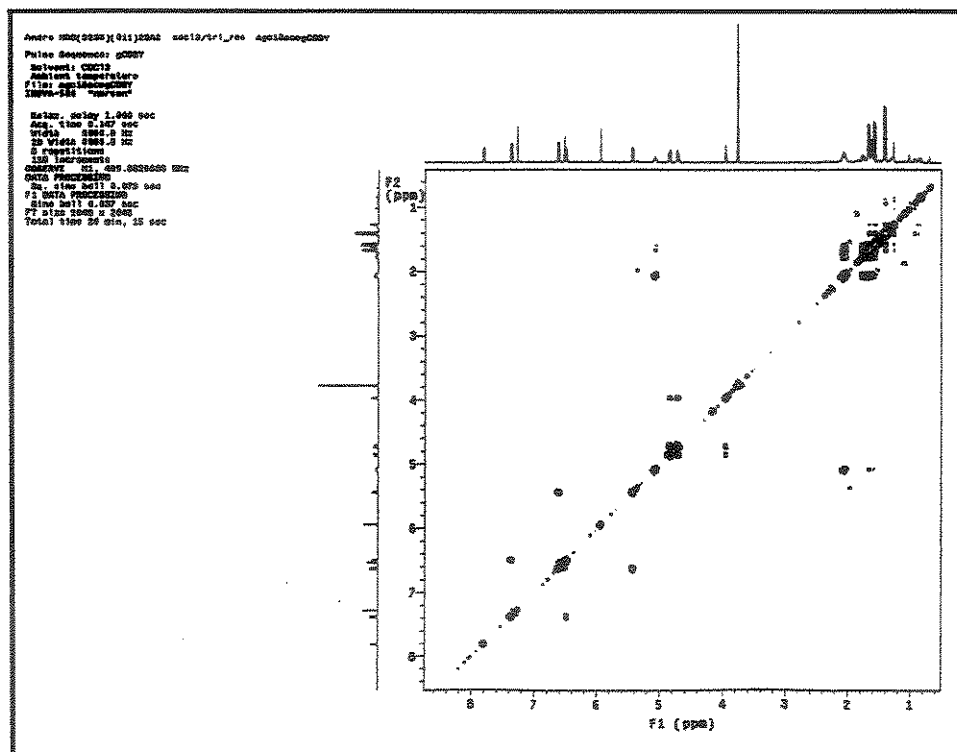
E.33- Expansão do espectro anterior.



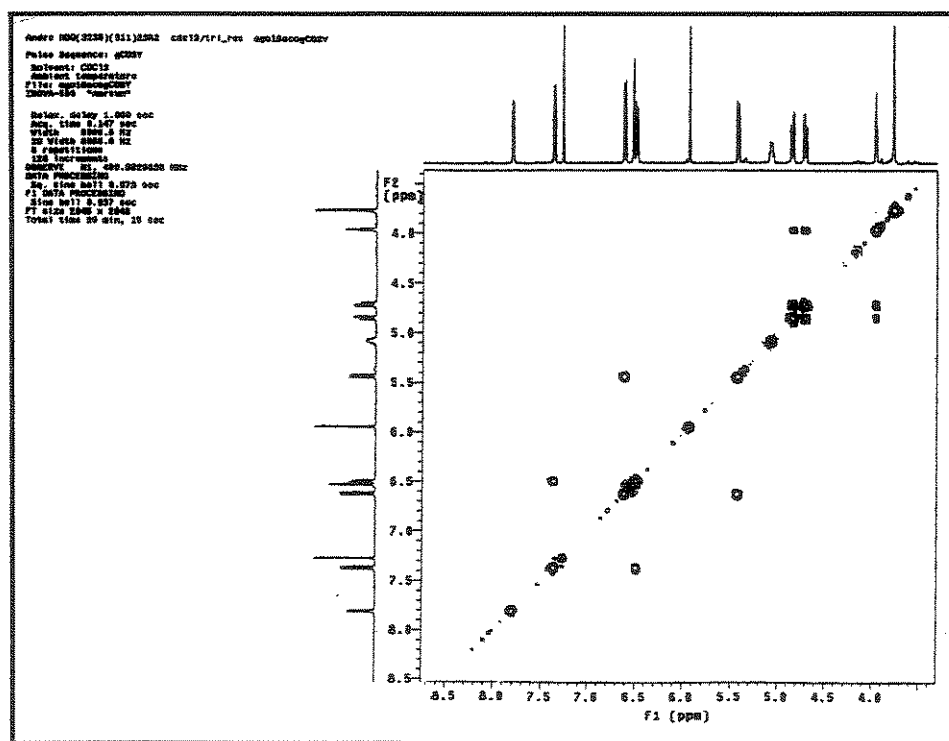
E.34- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 4.



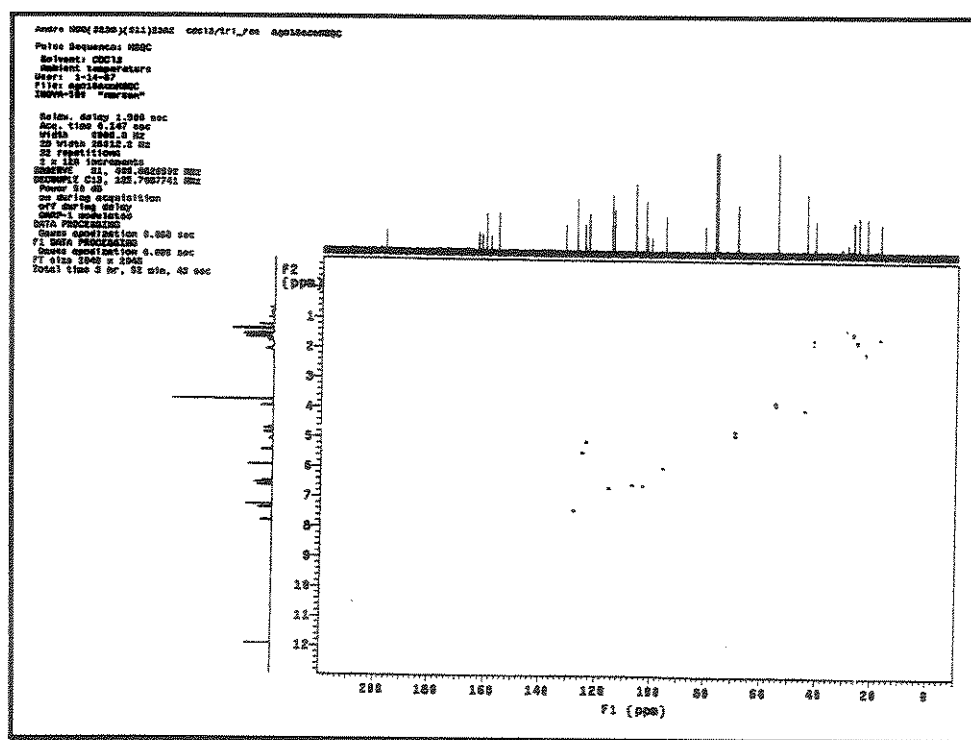
E.35- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 4.



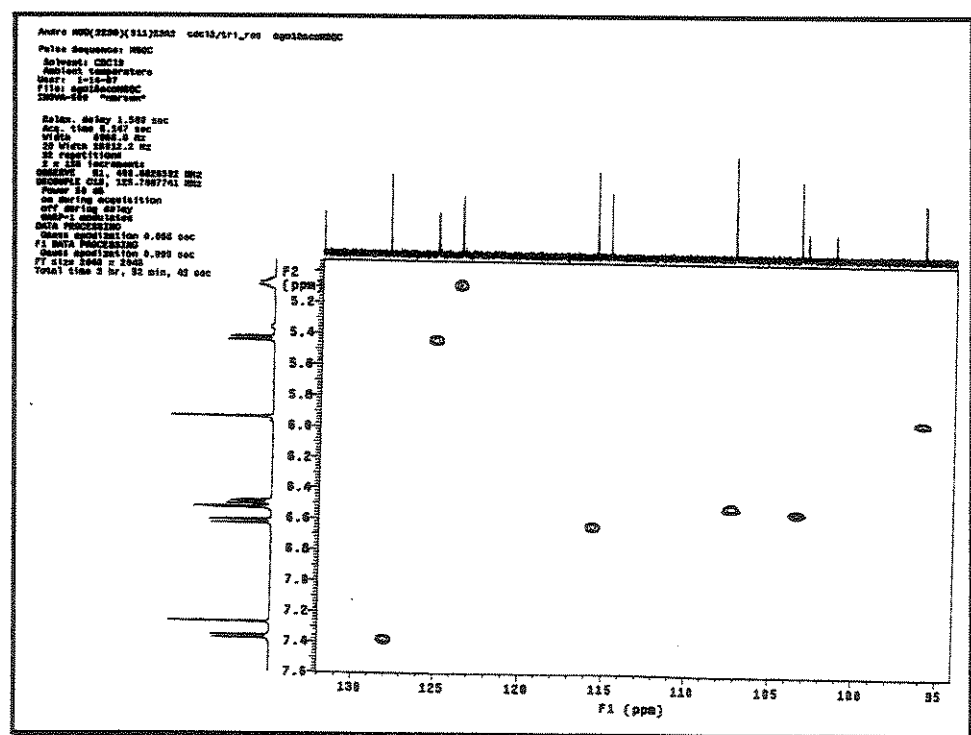
E.36- Mapa de contorno de RMN 2D (H,H-gCOSY) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona **4**.



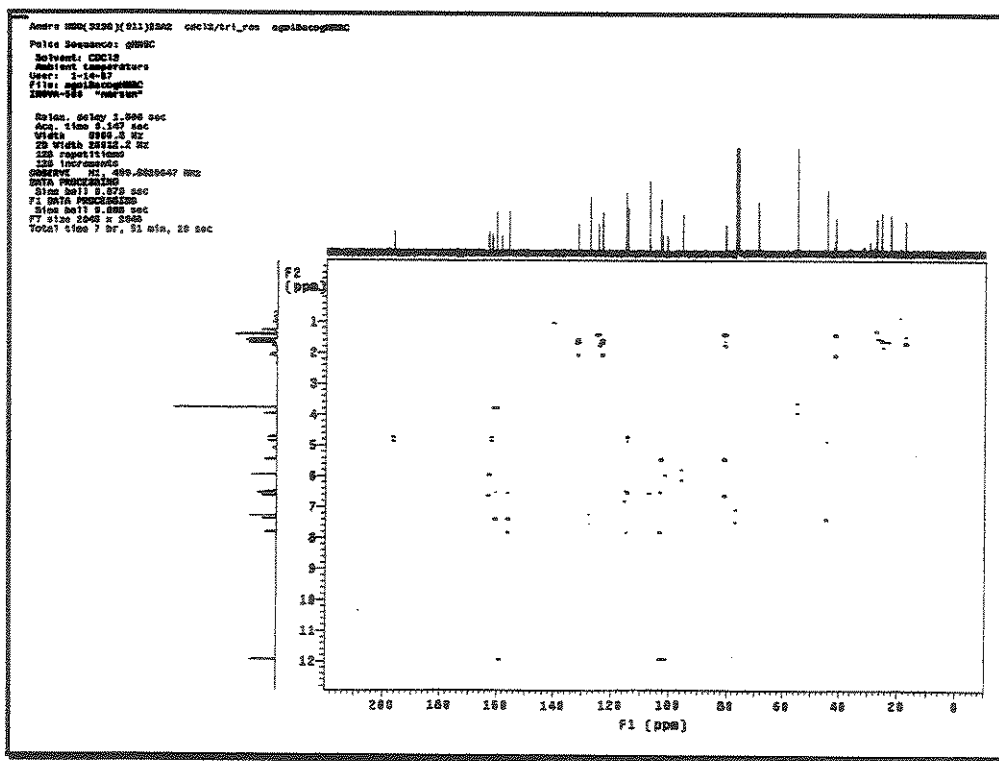
E.37- Expansão do espectro anterior.



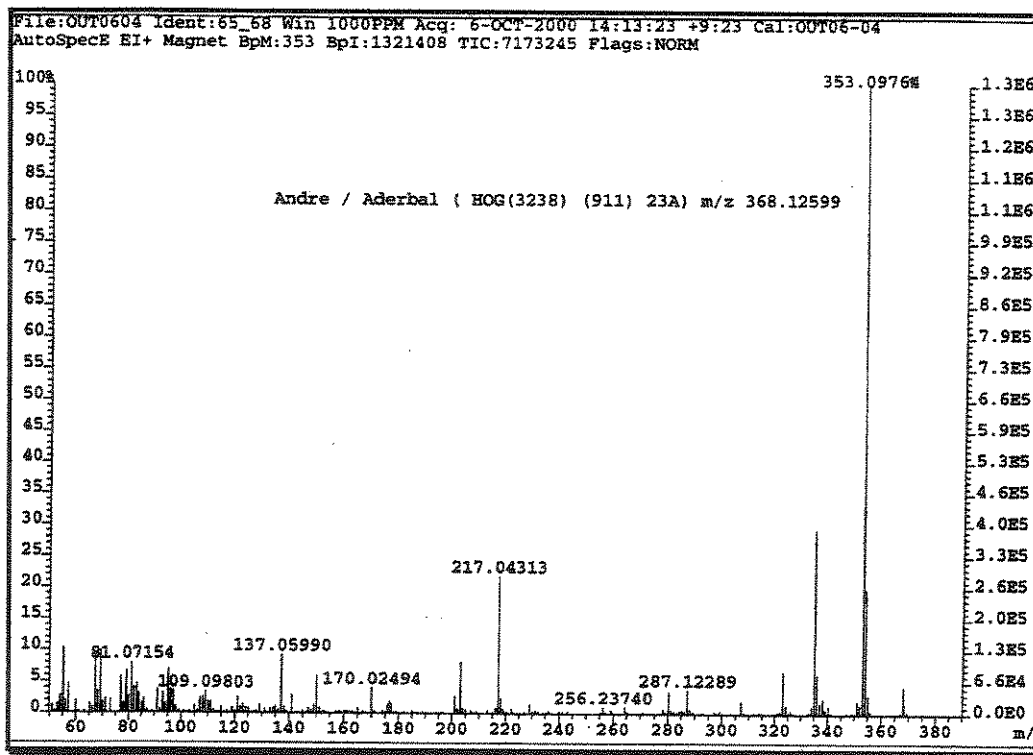
E.38- Mapa de contorno de RMN 2D (H,C-HSQC) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona 4.



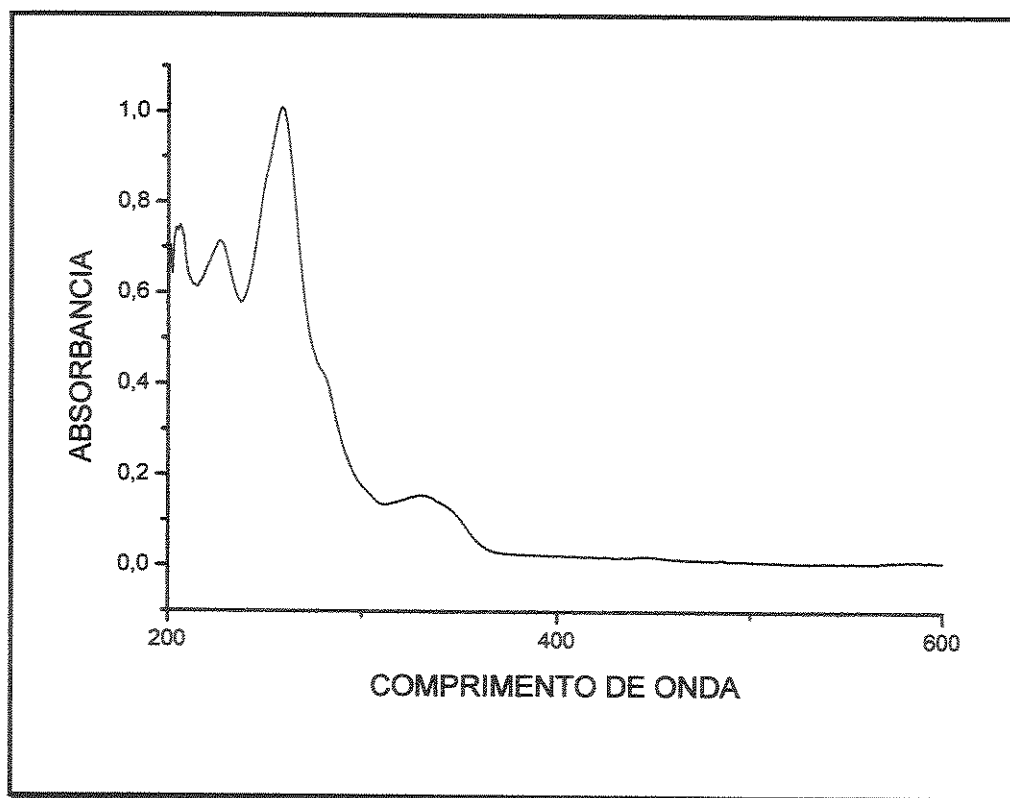
E.39- Expansão do espectro anterior.



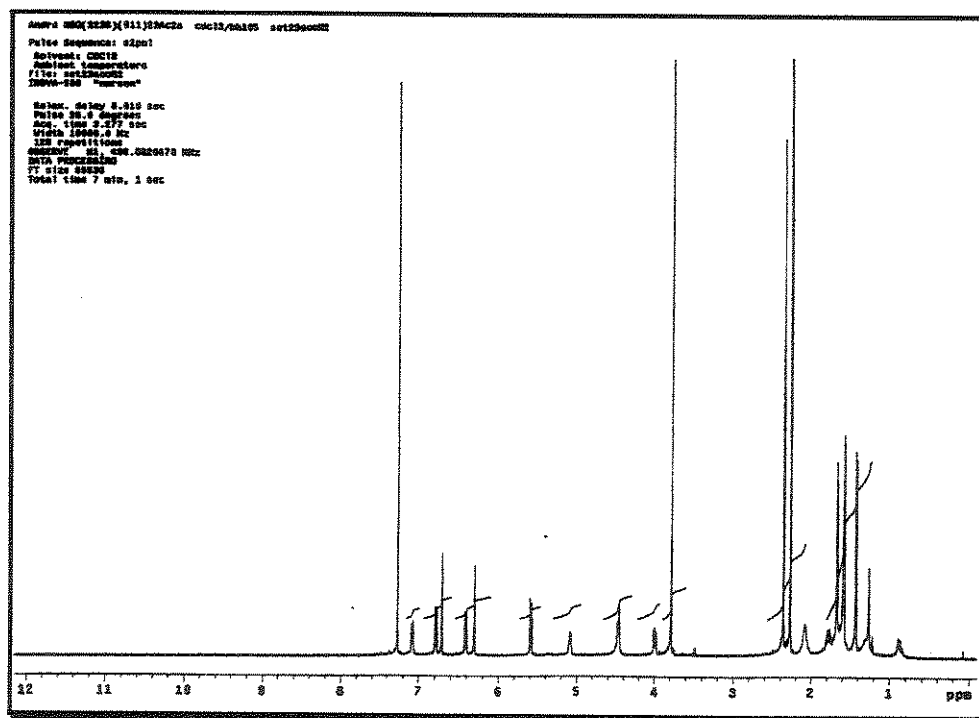
E.40- Mapa de contorno de RMN 2D (H,C-gHMBC) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona **4**.



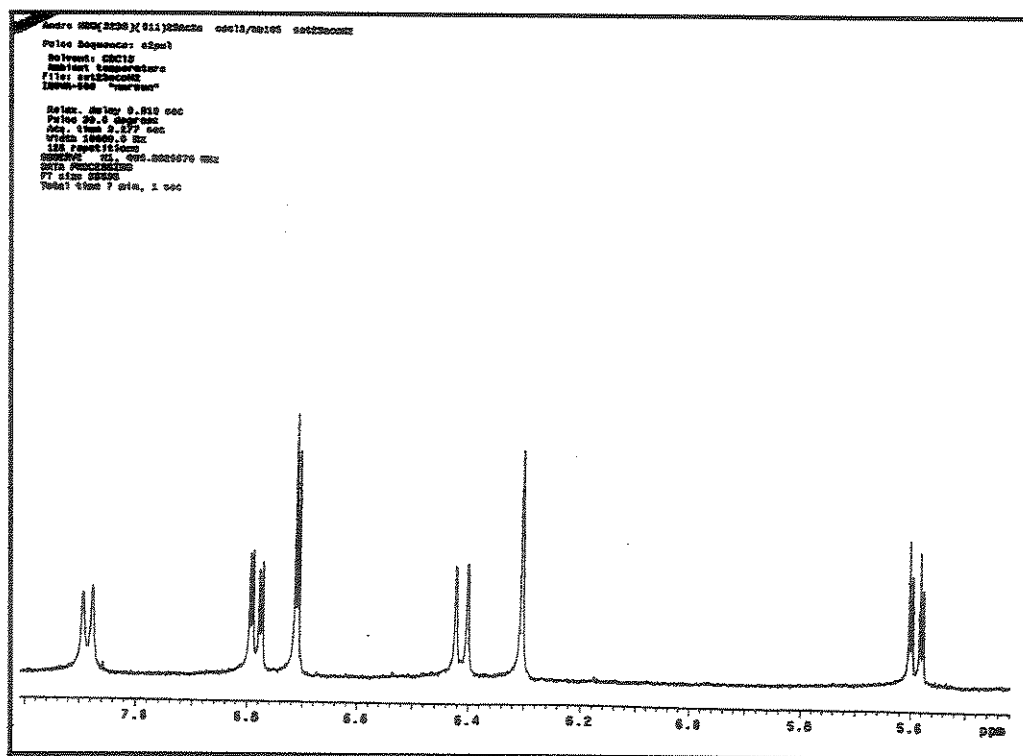
E.41- Espectro de massas de alta resolução para a isoflavanona 4.



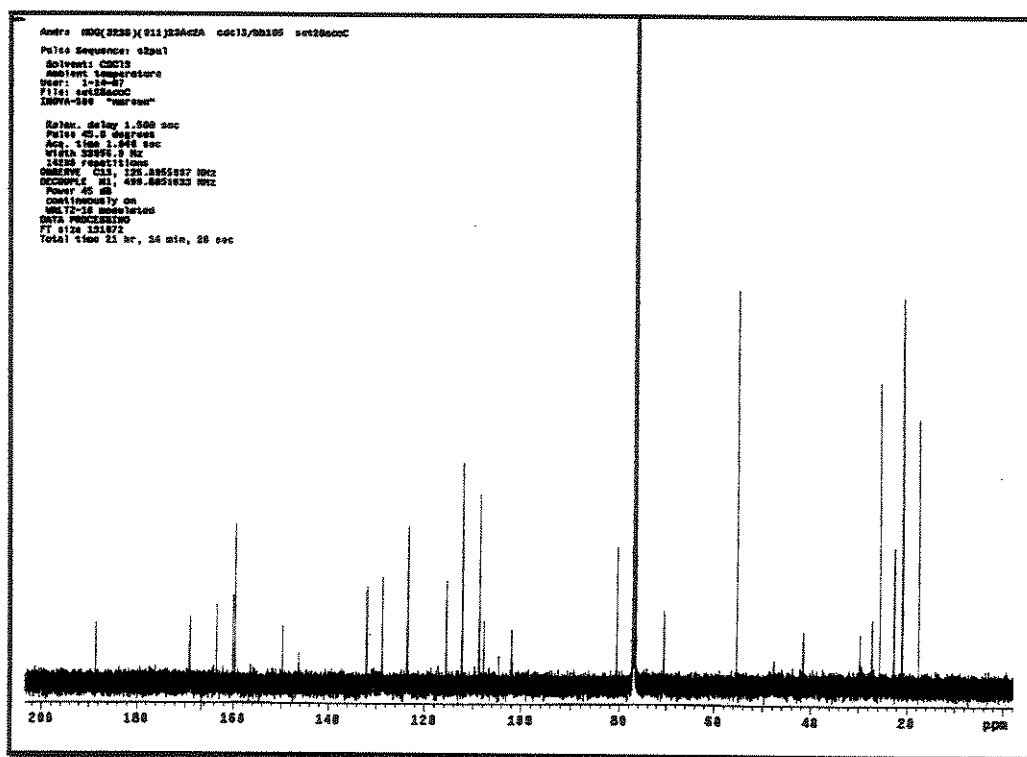
E.42- Espectro na região do U.V. para a isoflavanona 4a.



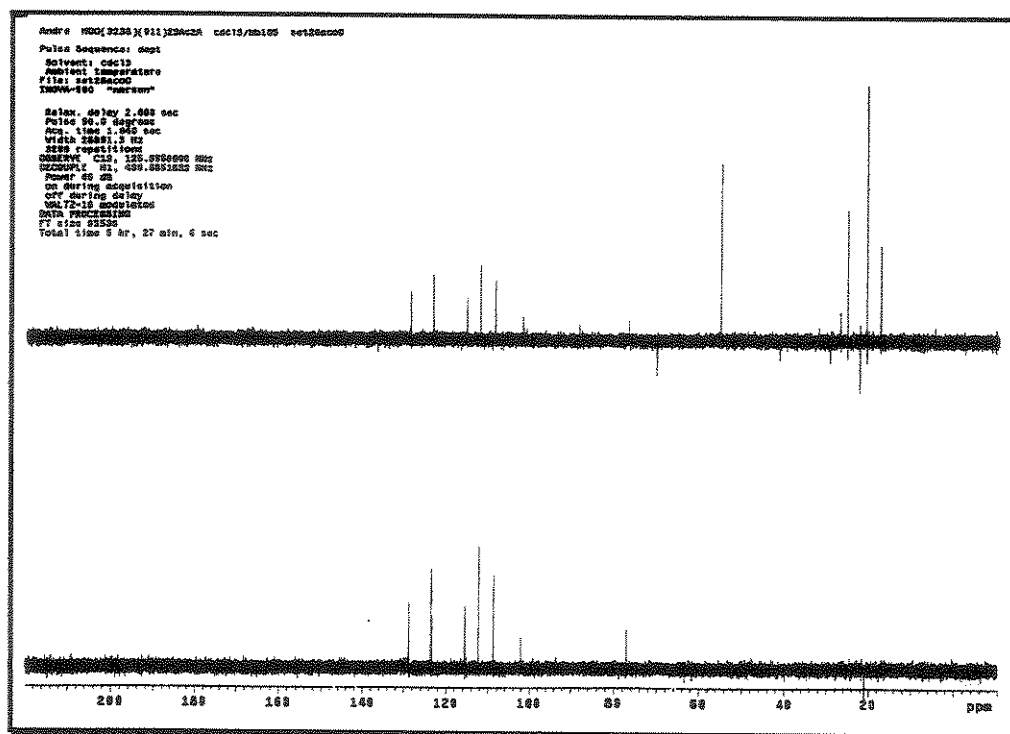
E.43- Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona 4a.



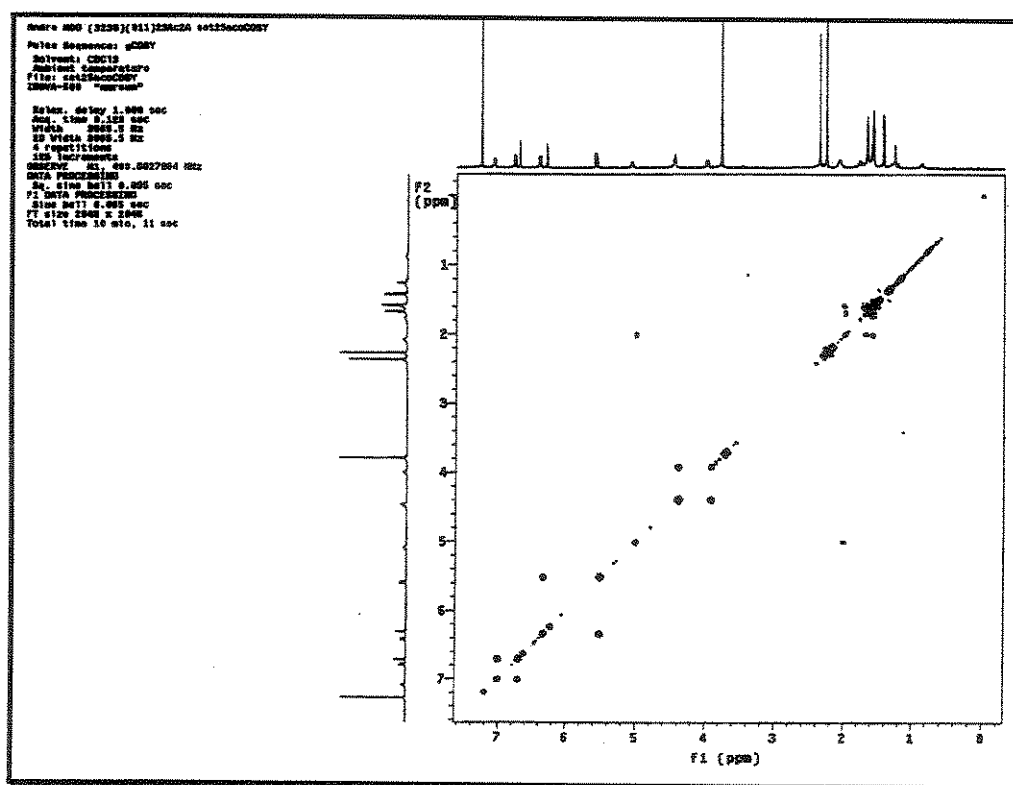
E.44- Expansão do espectro anterior.



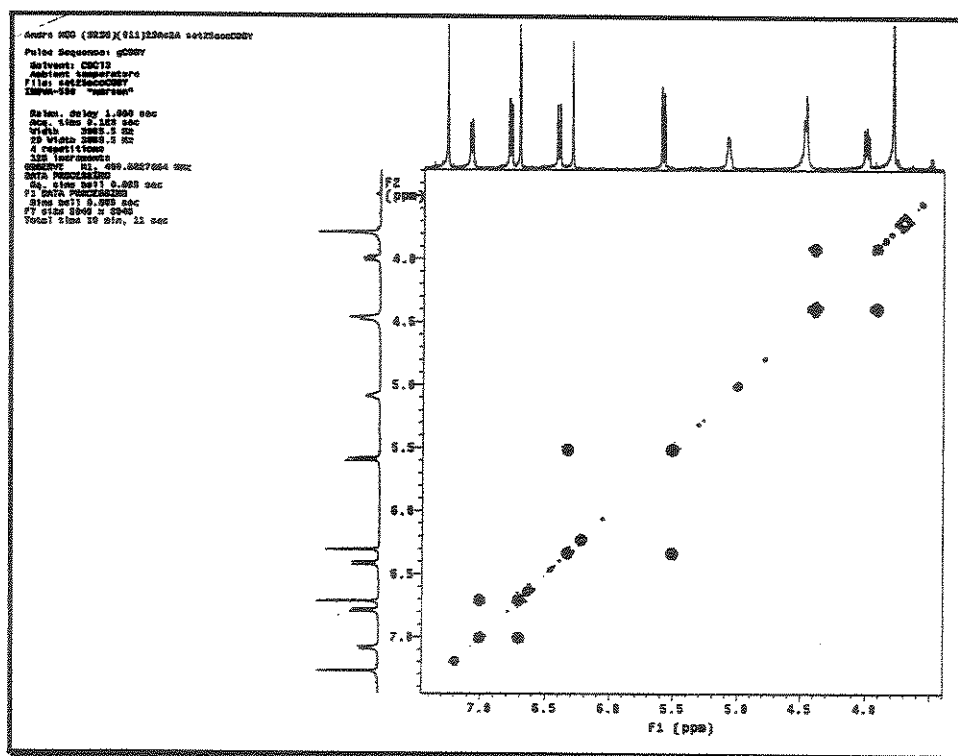
E.45- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 4a.



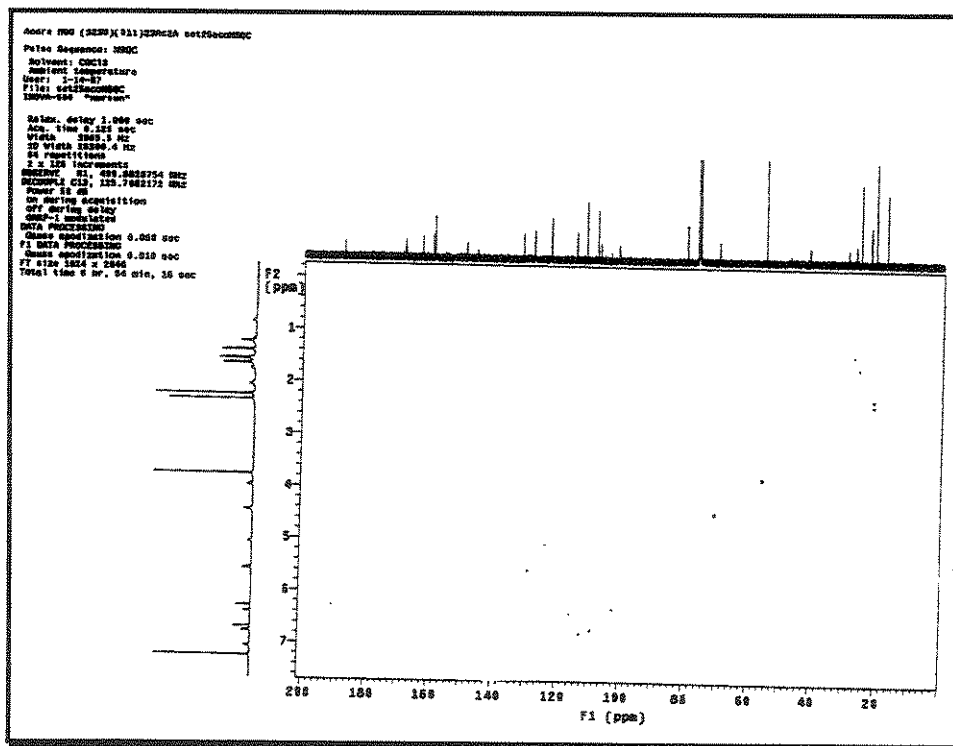
E.46- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona 4a.



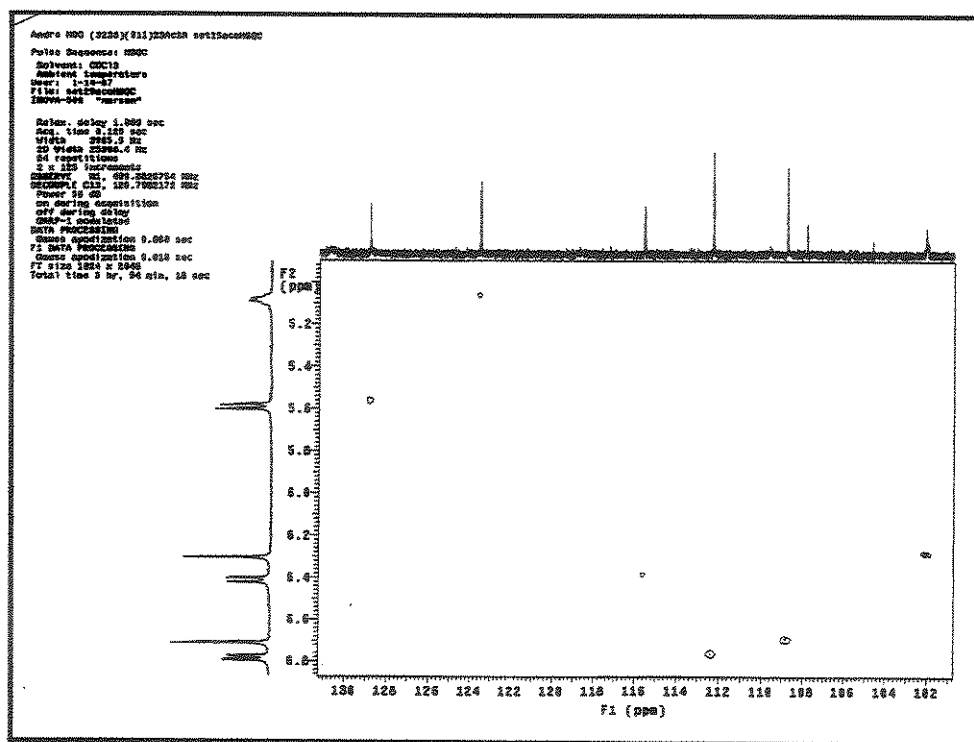
E.47- Mapa de contorno de RMN 2D (H₁H-gCOSY) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona 4a.



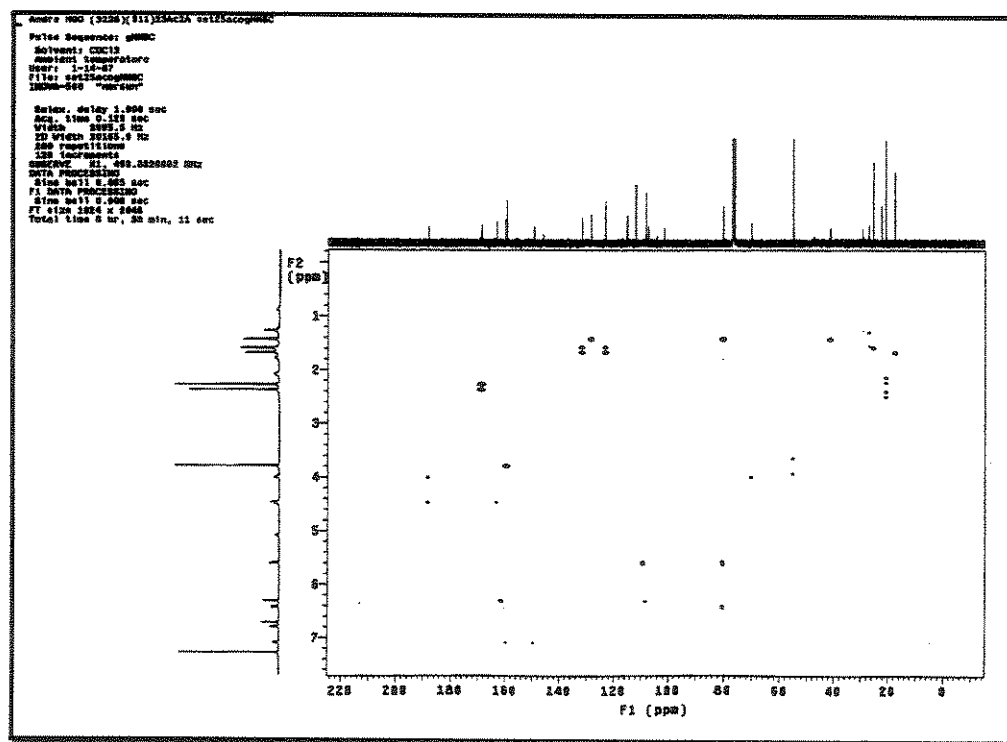
E.48- Expansão do espectro anterior.



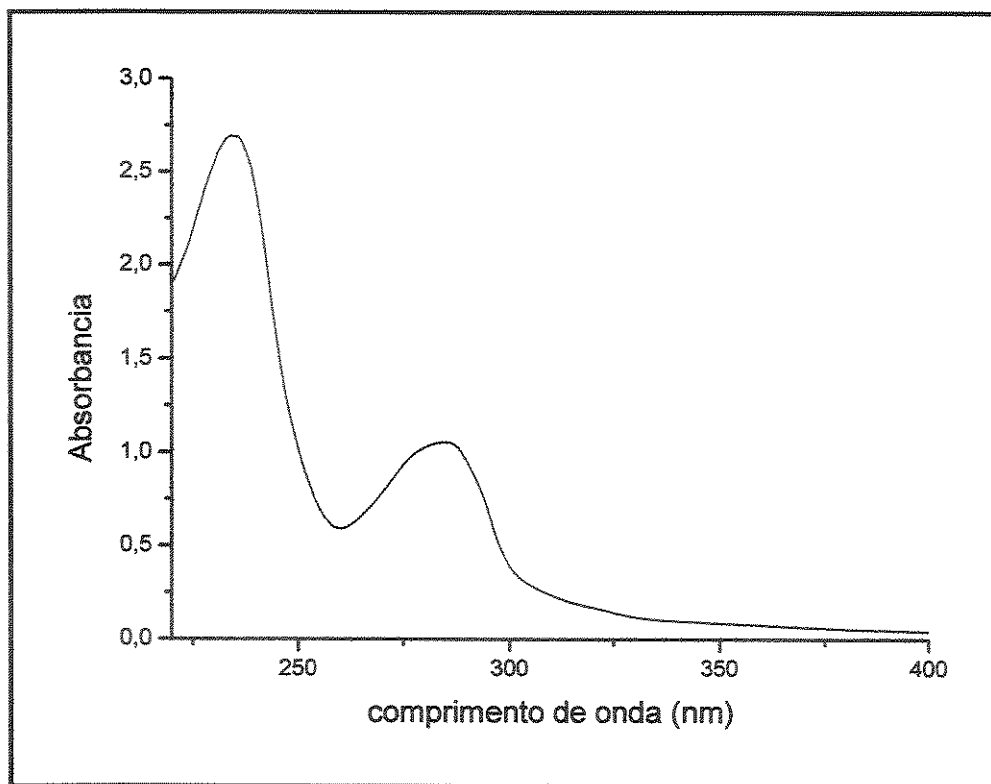
E.49- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 4a.



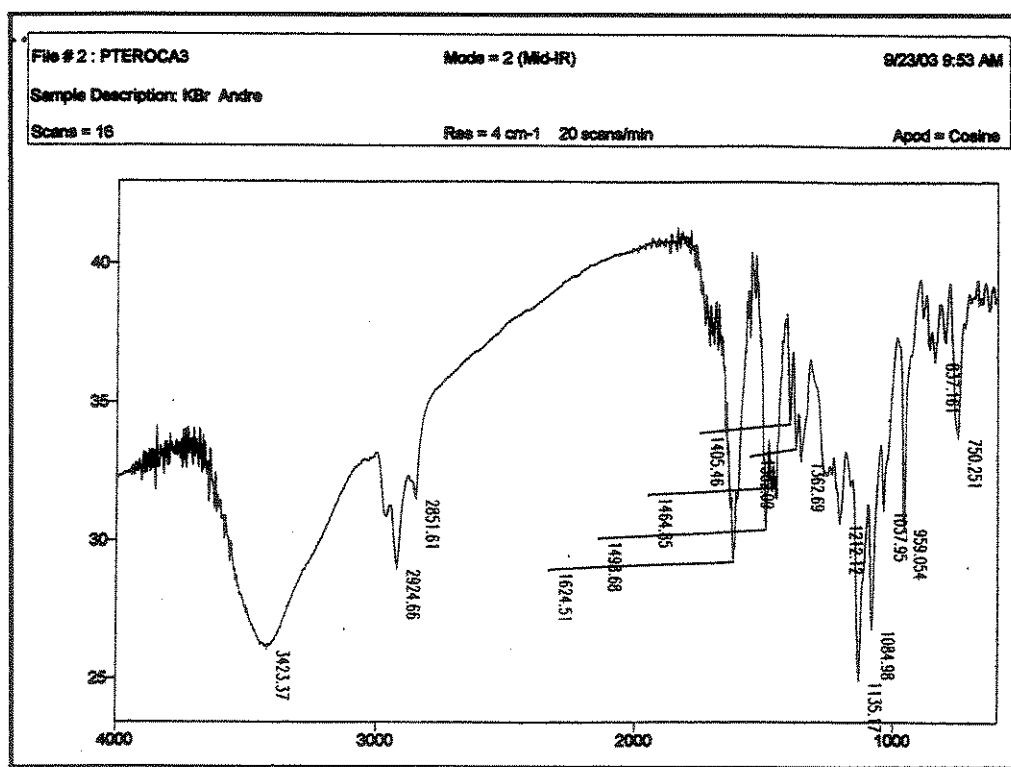
E.50- Expansão do espectro anterior.



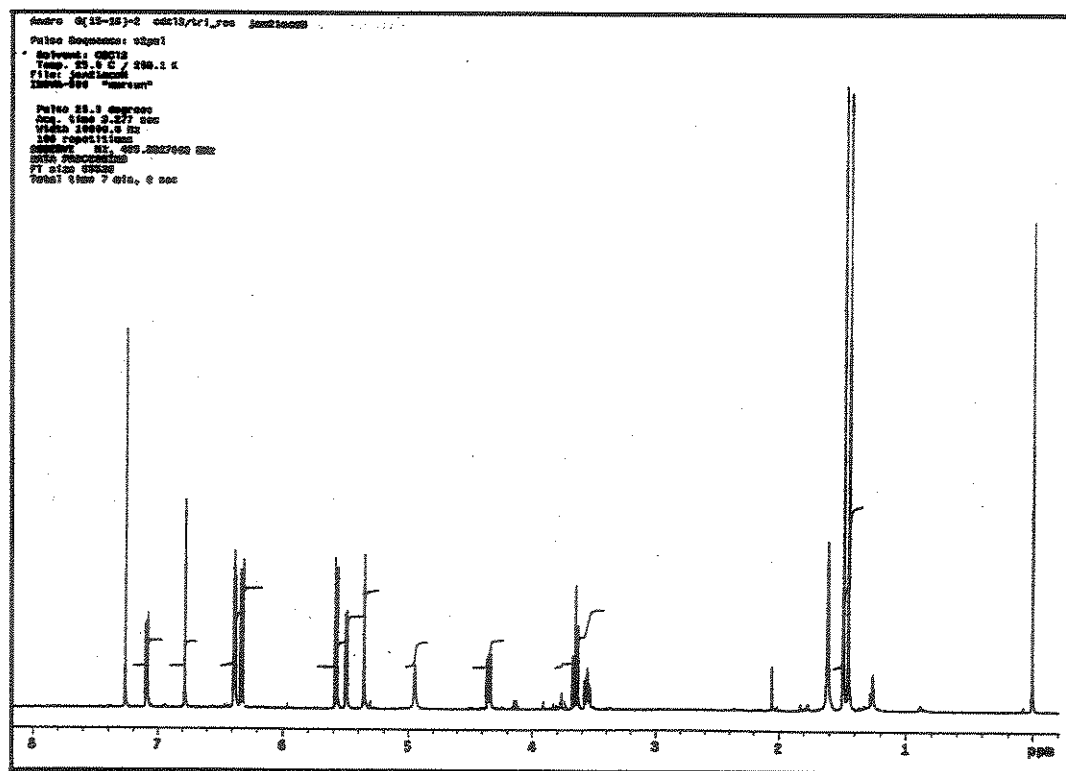
E.51- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona **4a**.



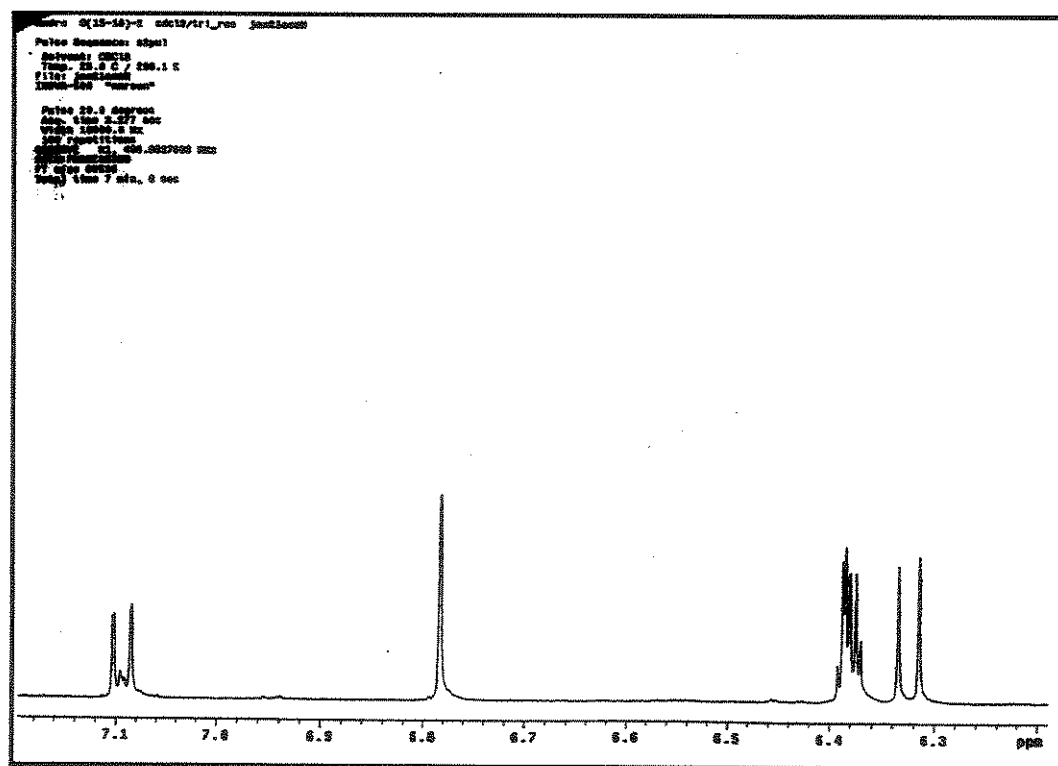
E.52- Espectro na região do U.V. para o pterocarpano 5.



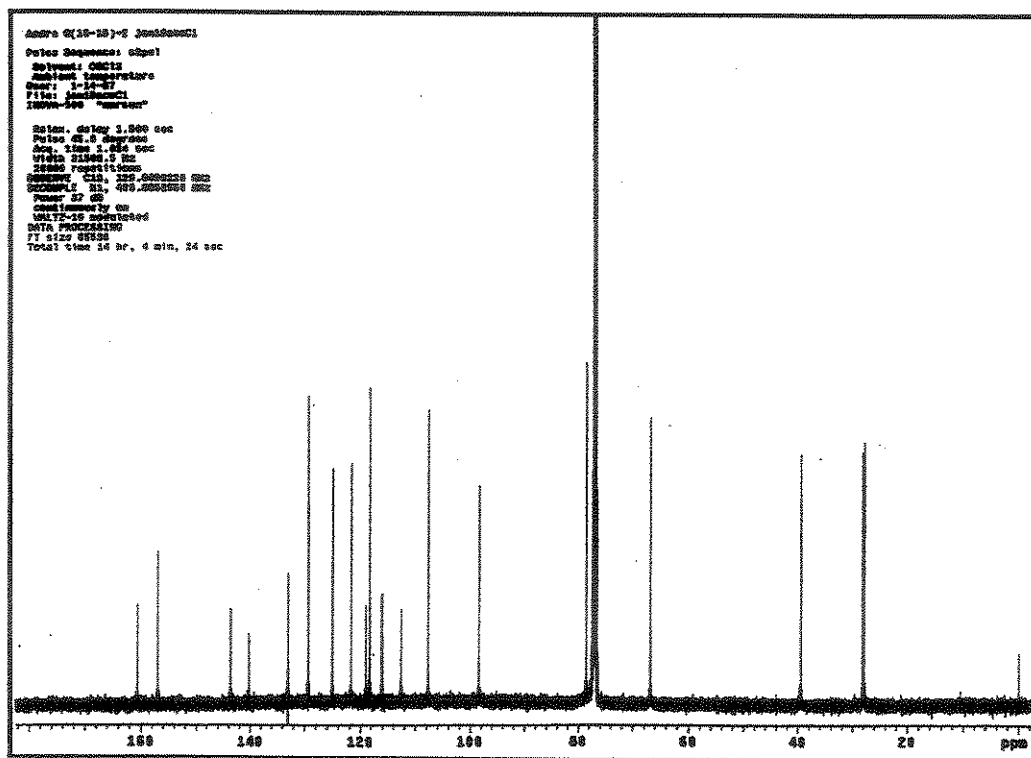
E.53- Espectro na região do I.V. para o pterocarpano 5.



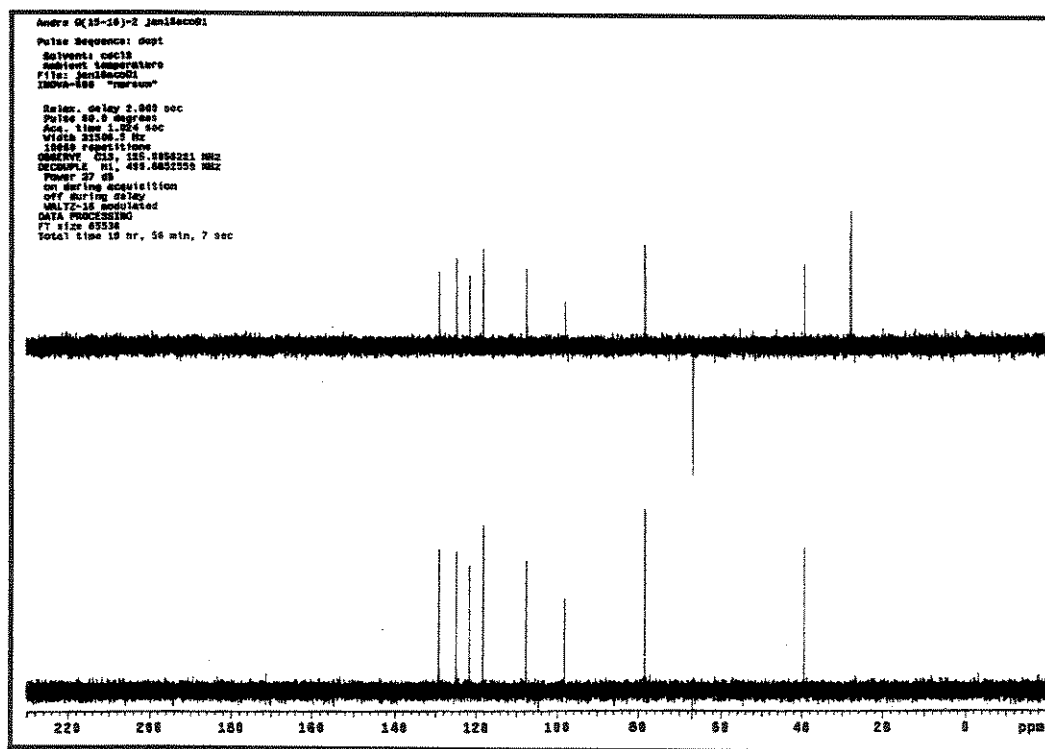
E.54- Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 11,0 T) para o pterocarpano 5.



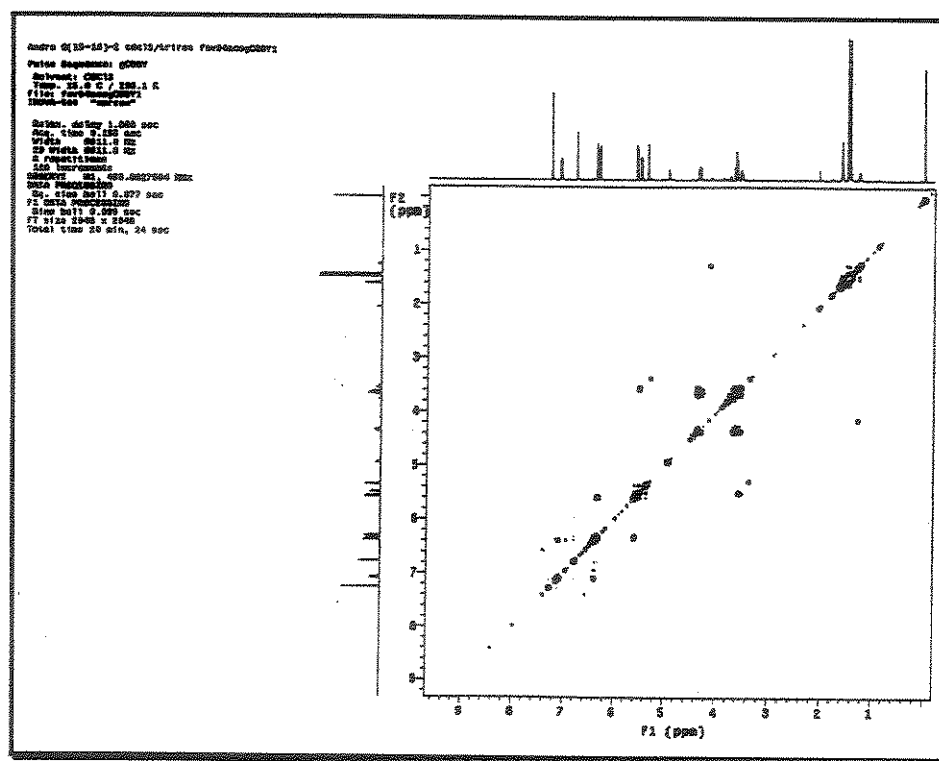
E.55- Expansão do espectro anterior.



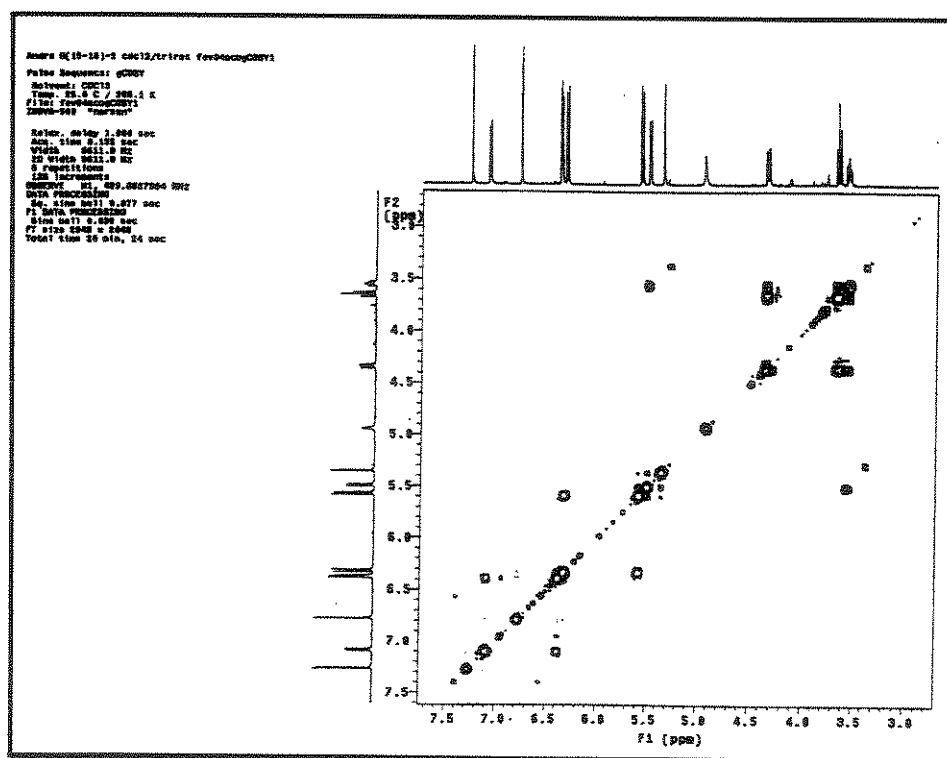
E.56- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.



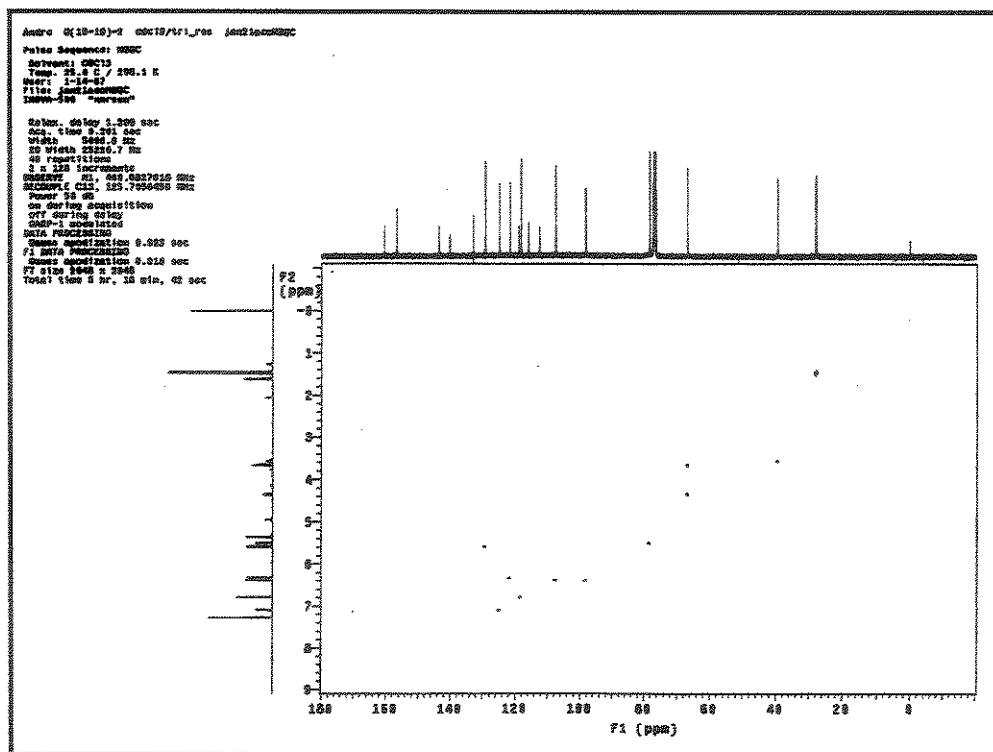
E.57- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.



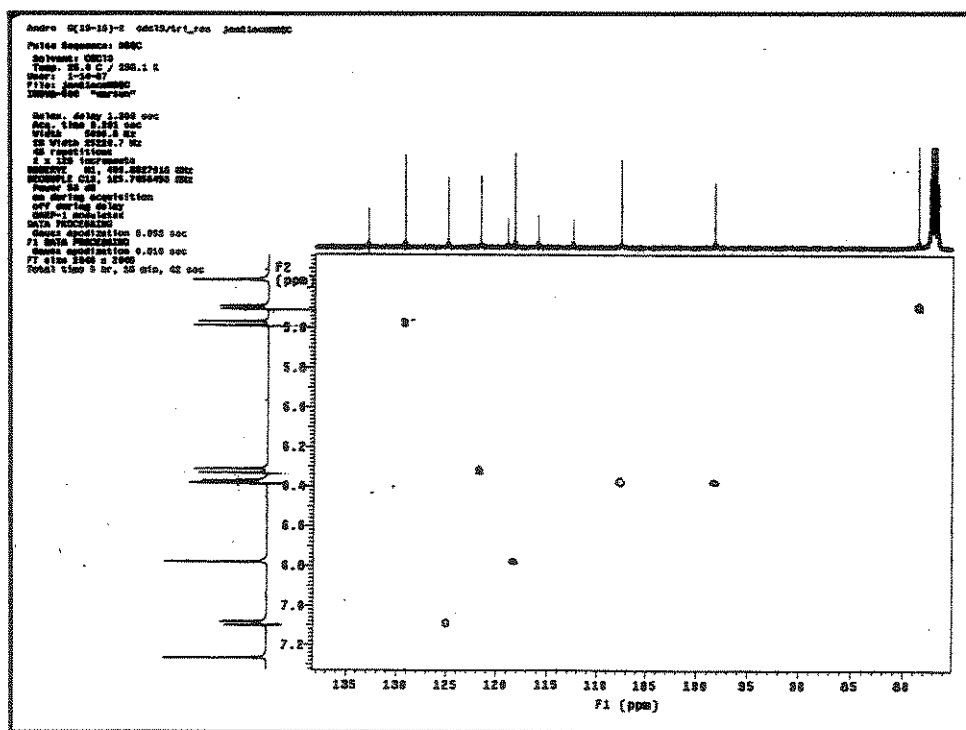
E.58- Mapa de contorno de RMN 2D (H,H-gCOSY) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 5.



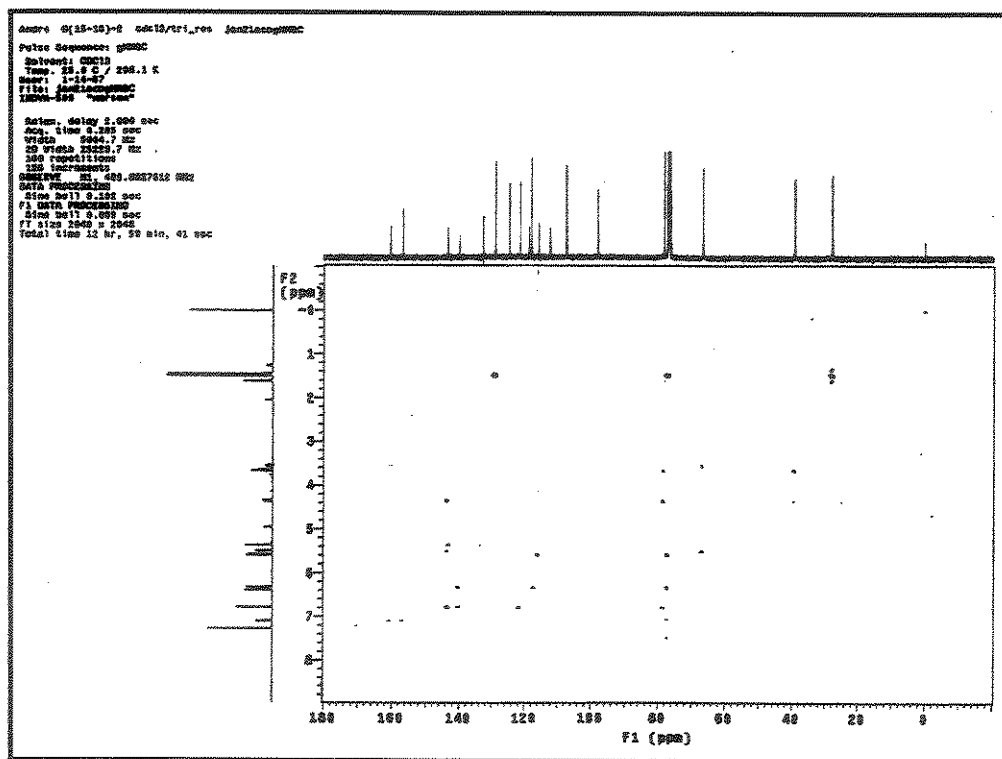
E.59- Expansão do espectro anterior.



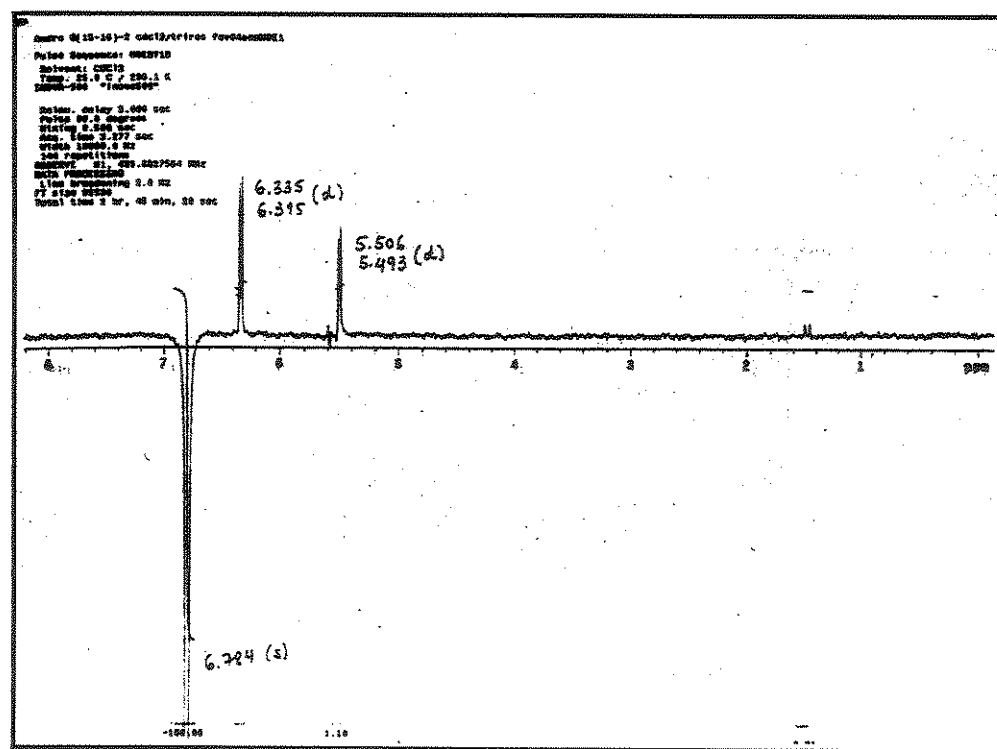
E.60- Mapa de contorno de RMN 2D (H,C-HSQC) (CDCl₃, 11,0 T) para o pterocarpano 5.



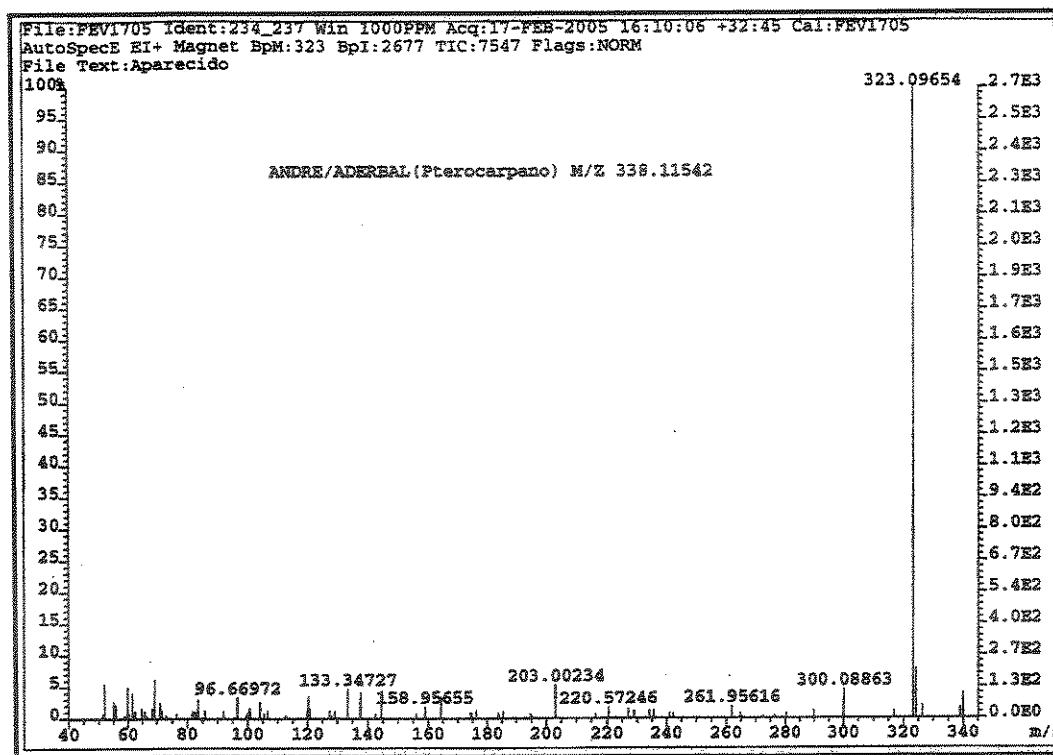
E.61- Expansão do espectro anterior.



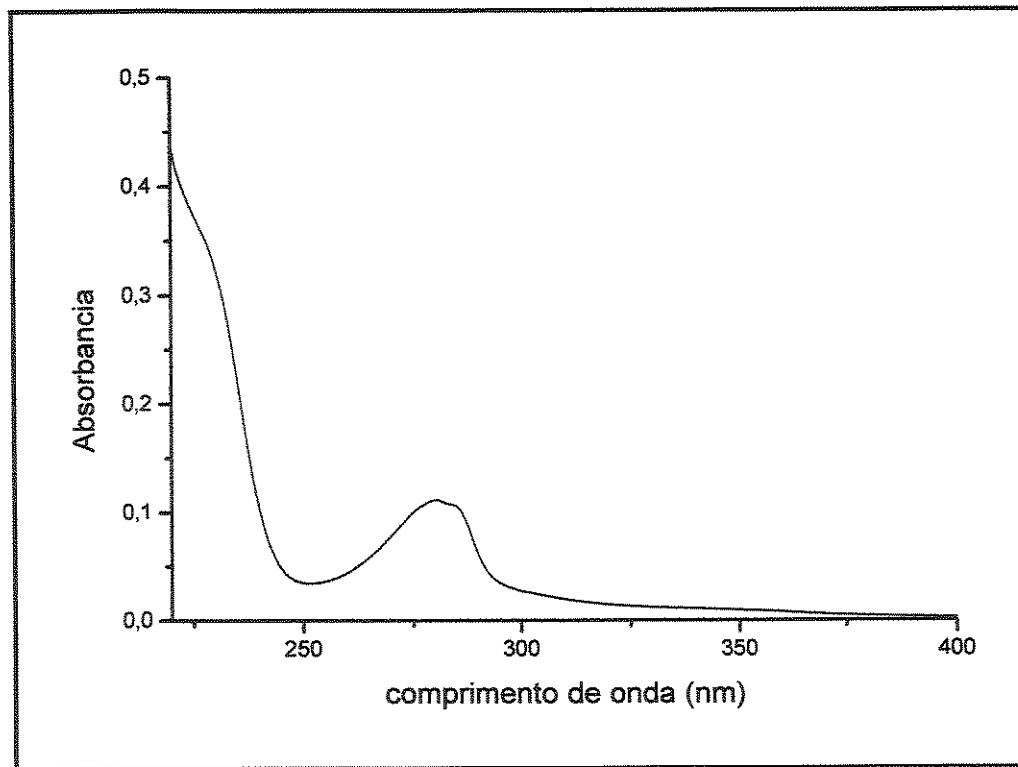
E.62- Mapa de contorno de RMN 2D (H,C-gHMBC) (CDCl₃, 11,0 T) para o pterocarpano 5.



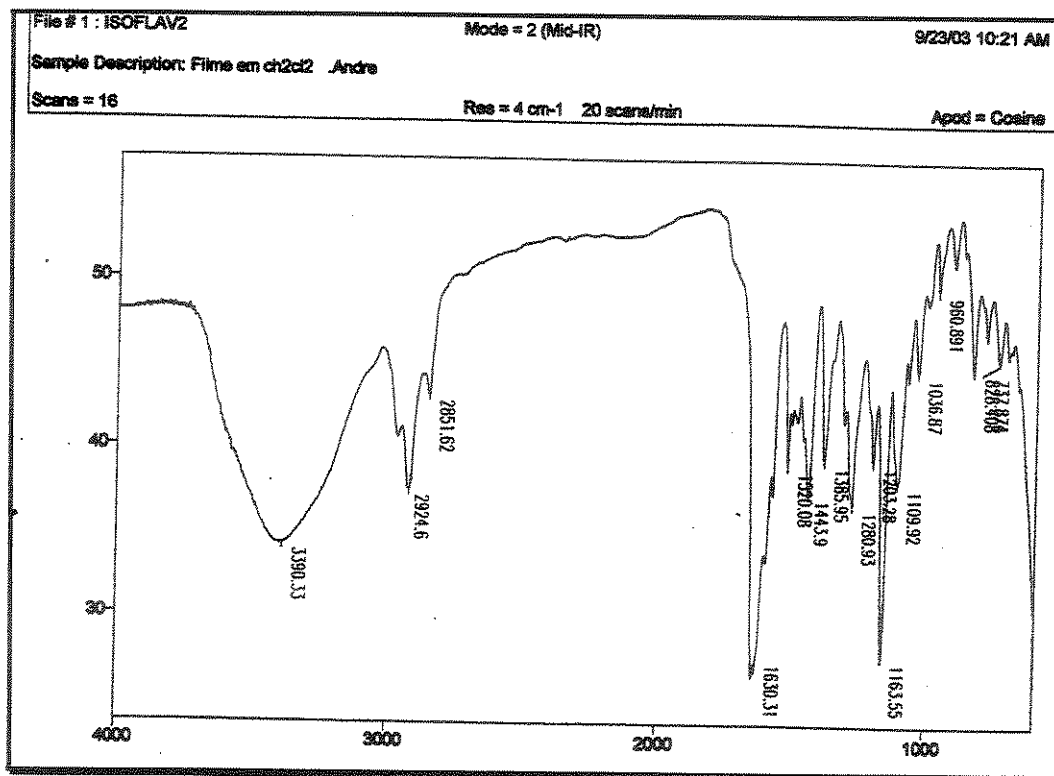
E.63- Experimento NOESY-1D para o pterocarpano 5.



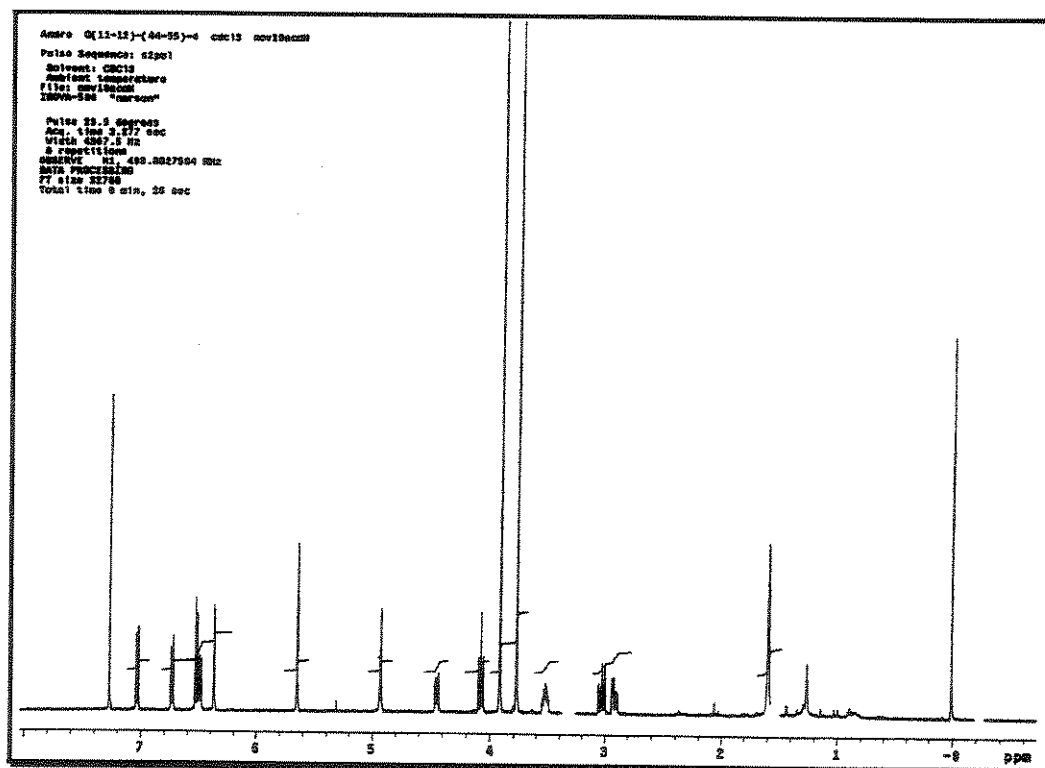
E.64- Espectro de massas de alta resolução para o pterocarpano 5.



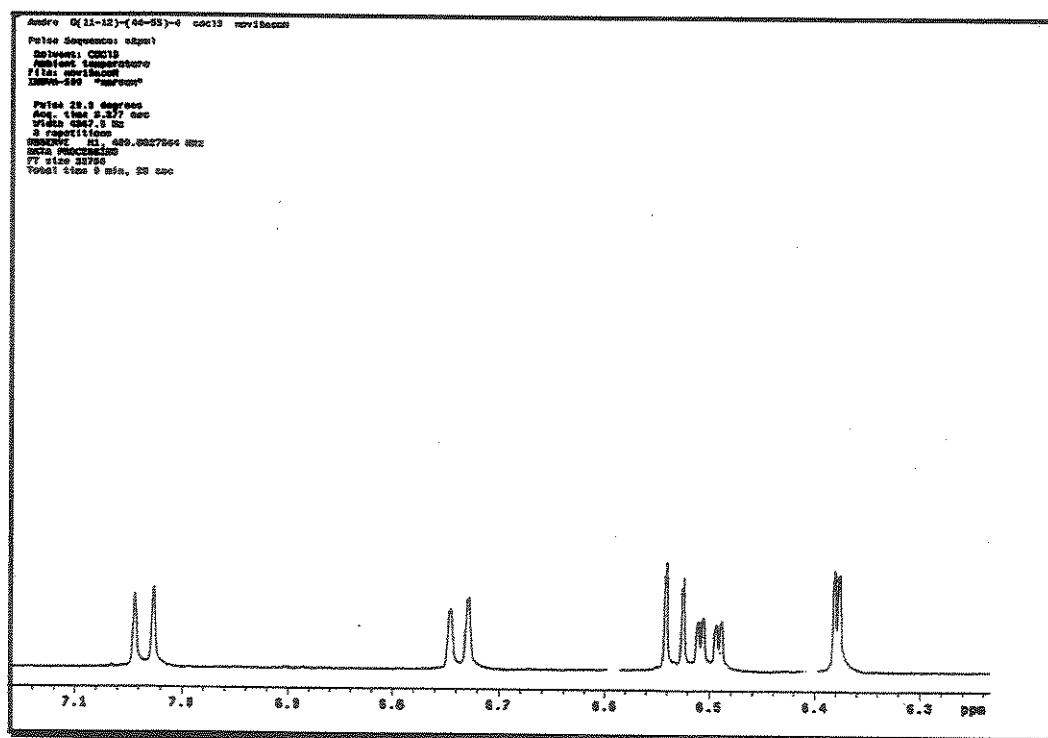
E.65- Espectro na região do U.V. para a isoflavana 6.



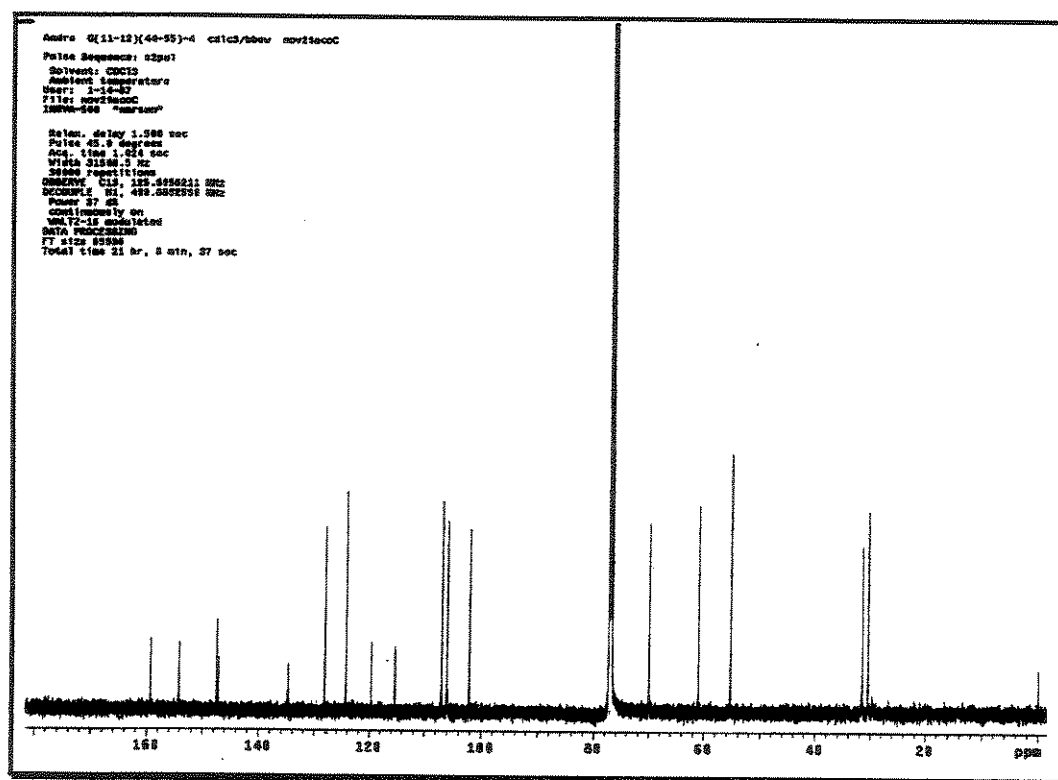
E.66- Espectro na região do I.V. para a isoflavana 6.



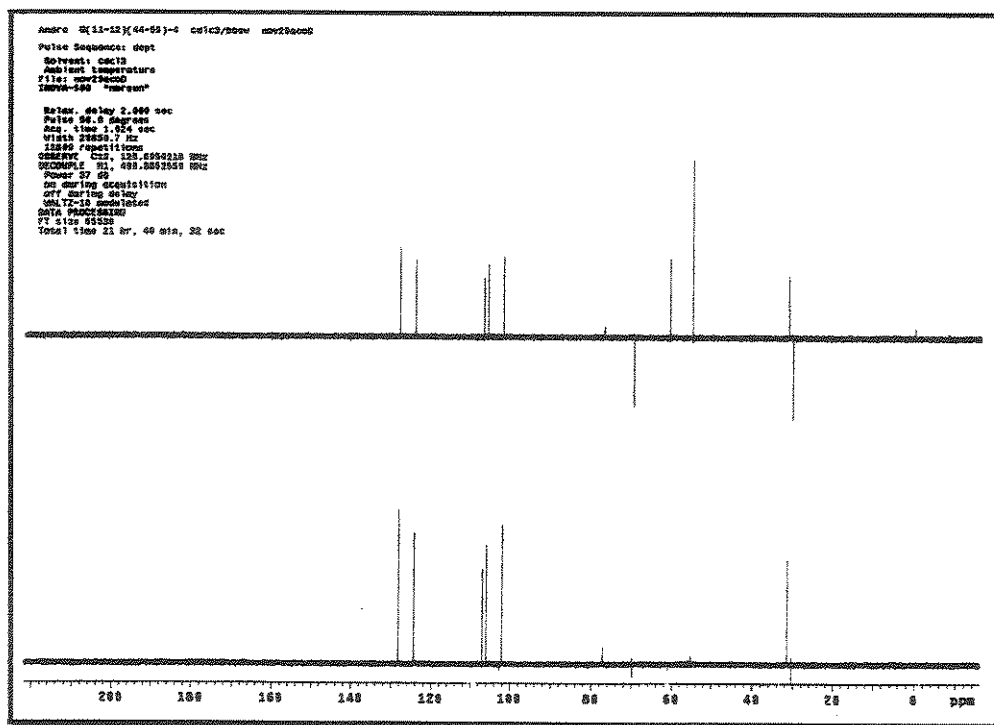
E.67- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 6.



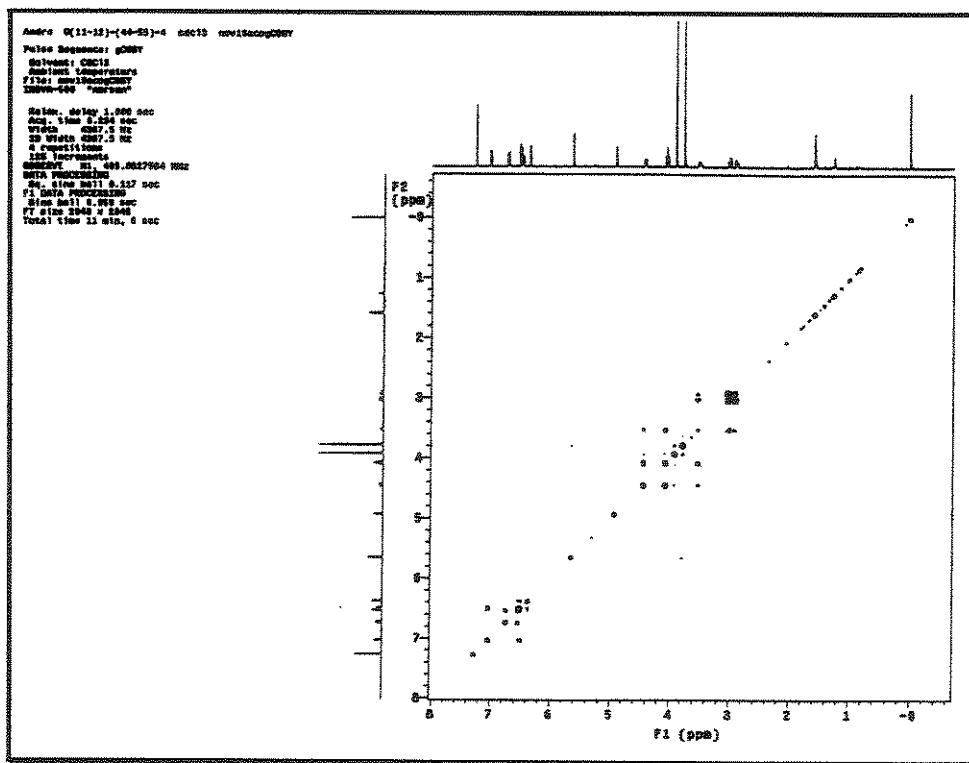
E.68- Expansão do espectro anterior.



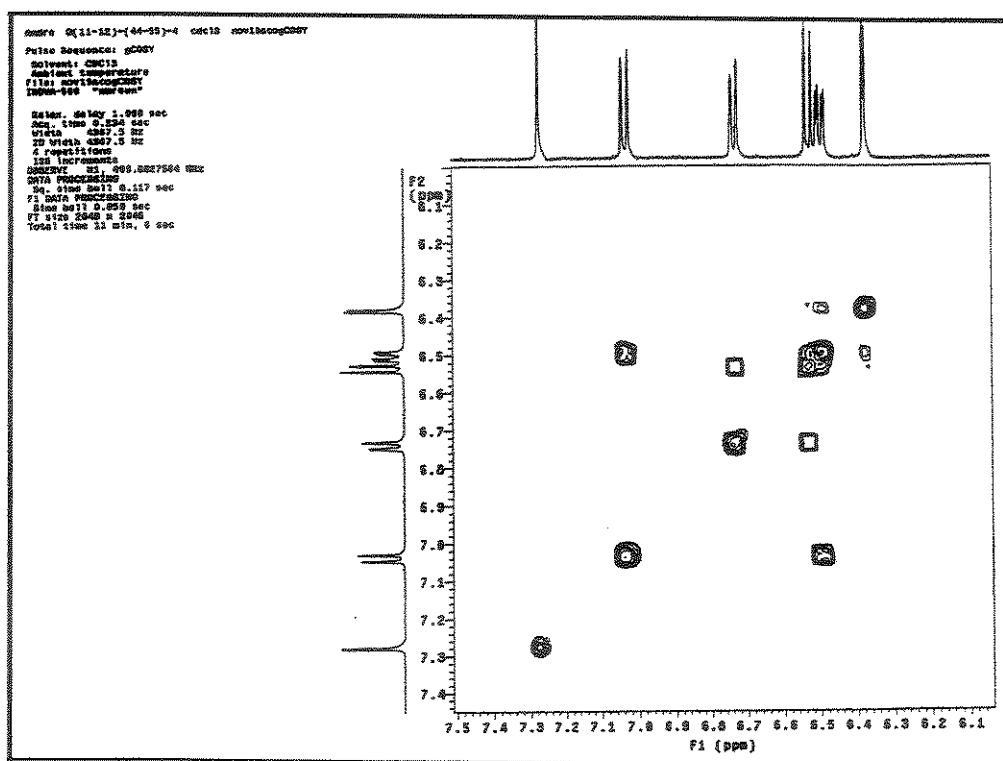
E.69- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 6.



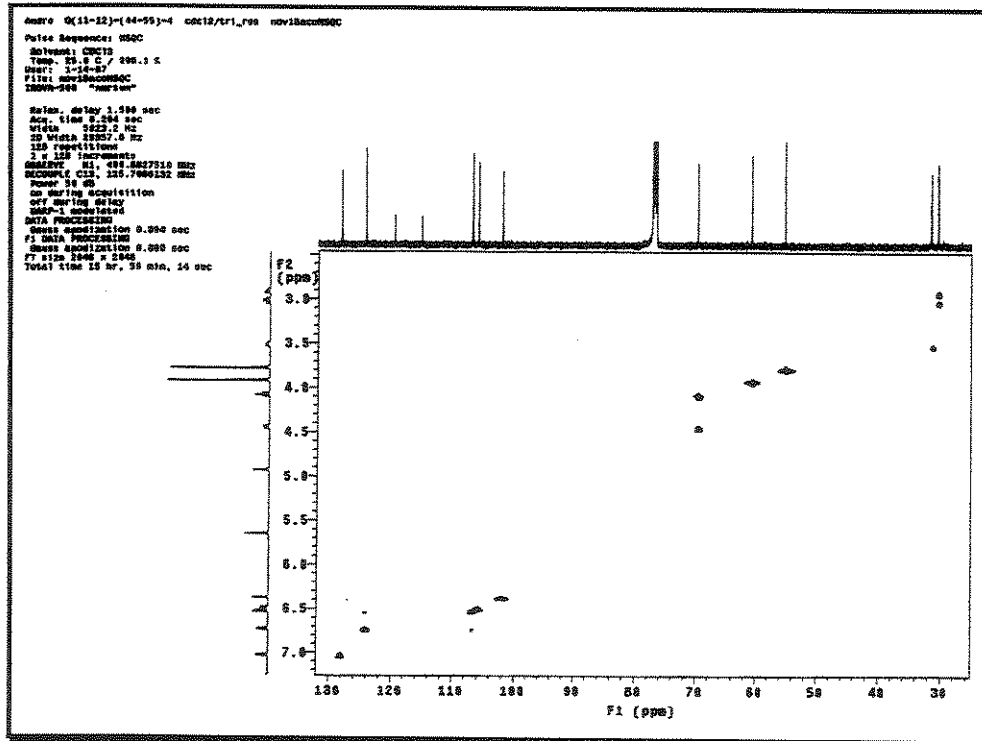
E.70- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavana 6.



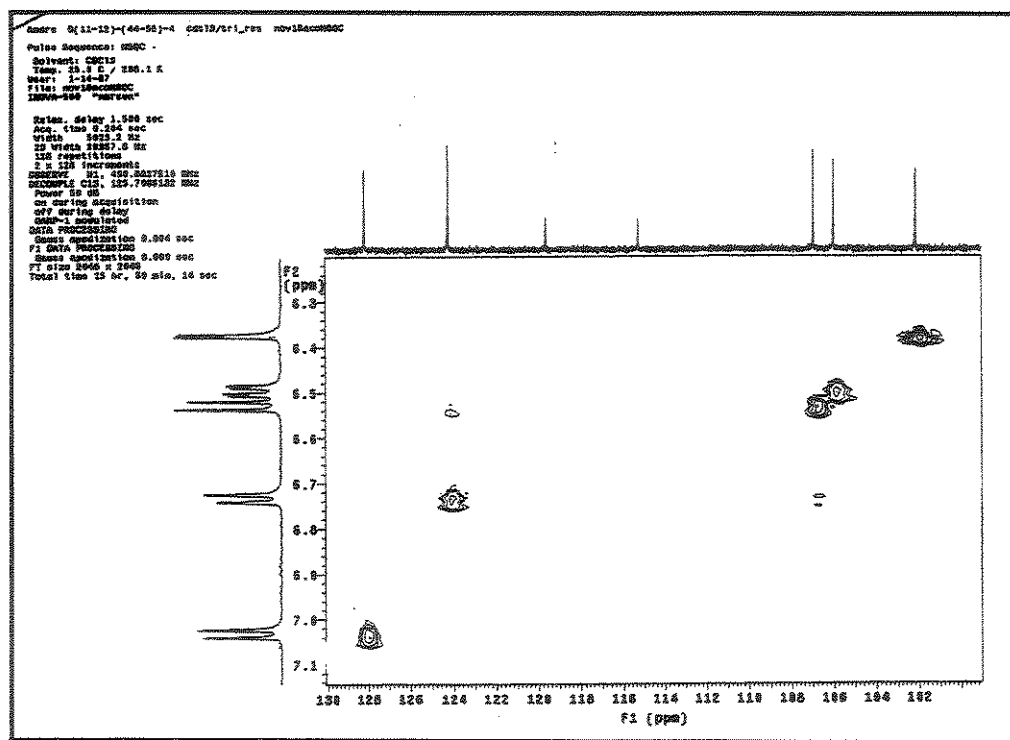
E.71- Mapa de contorno de RMN 2D (H,H-gCOSY) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavana 6.



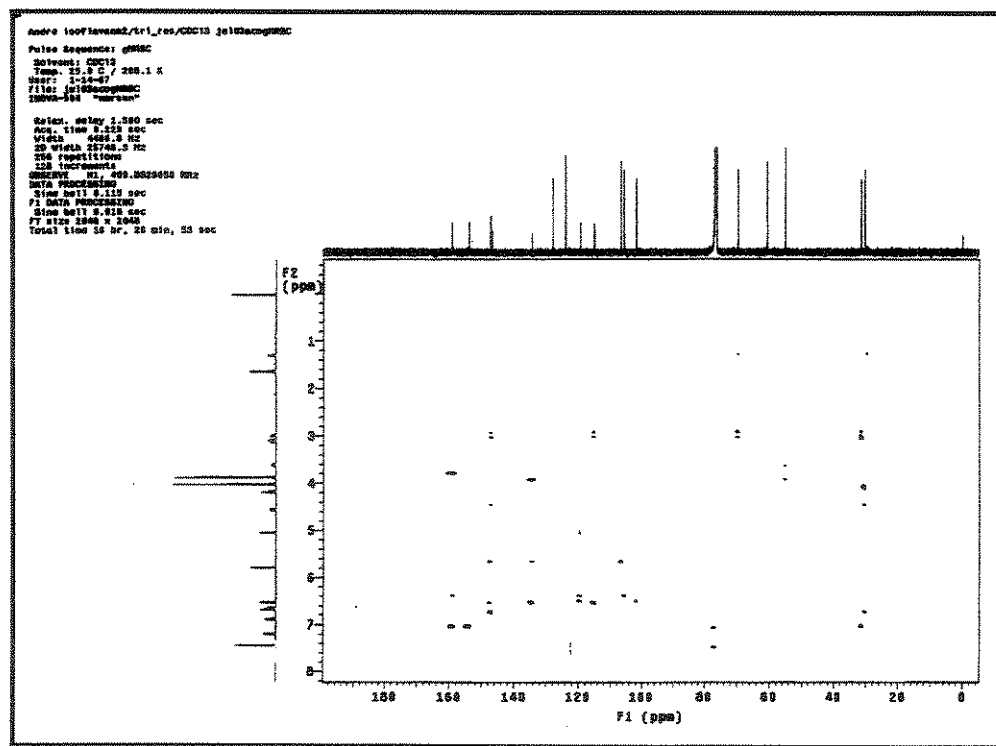
E.72- Expansão do espectro anterior.



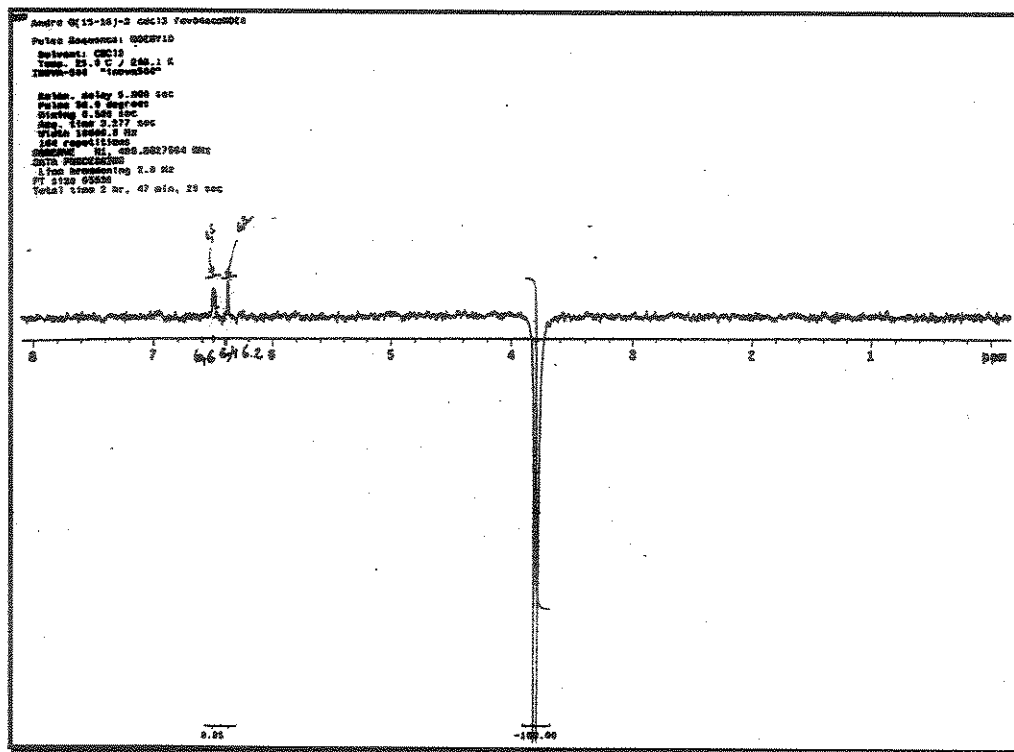
E.73- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana 6.



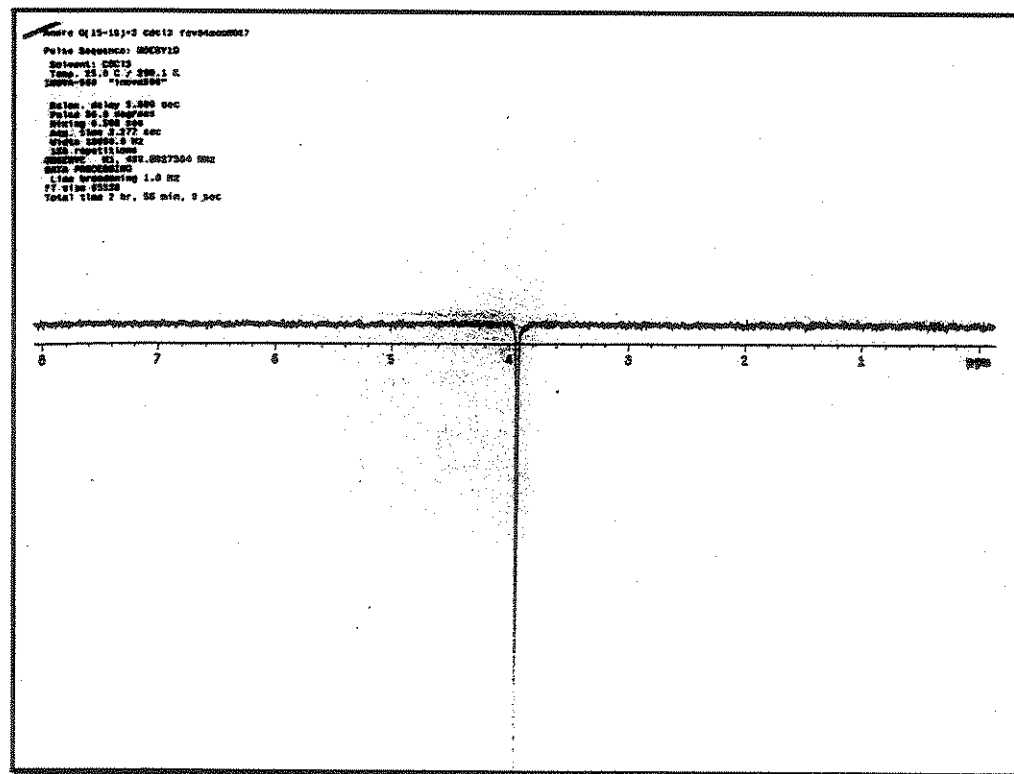
E.74- Expansão do espectro anterior.



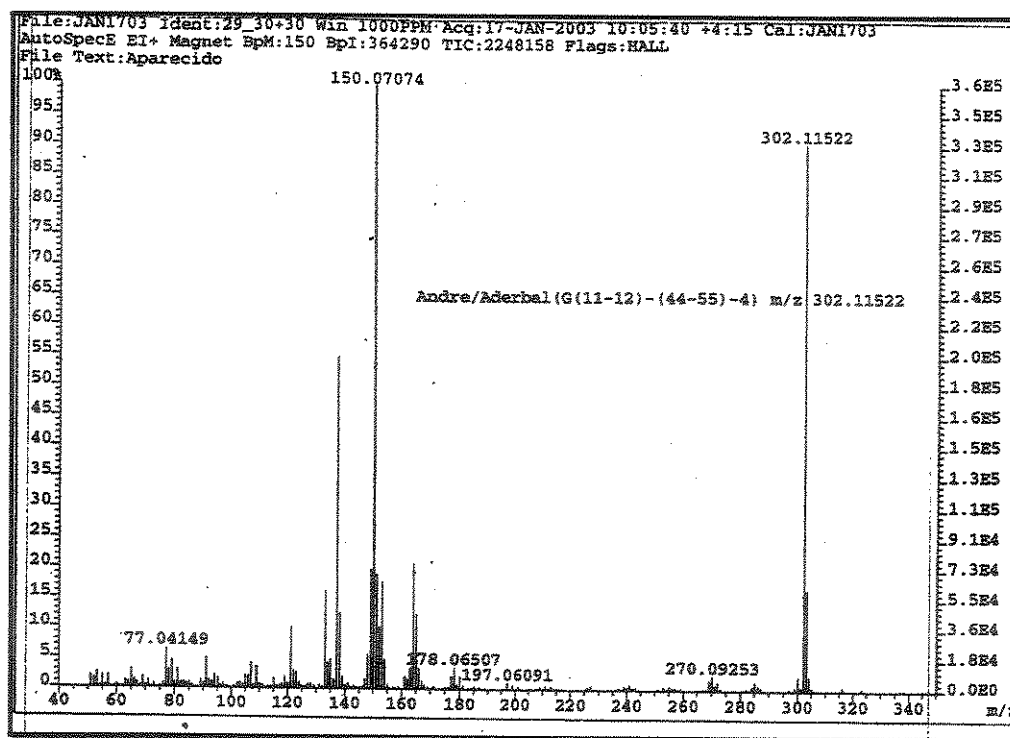
E.75- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H ,C-gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavana **6**.



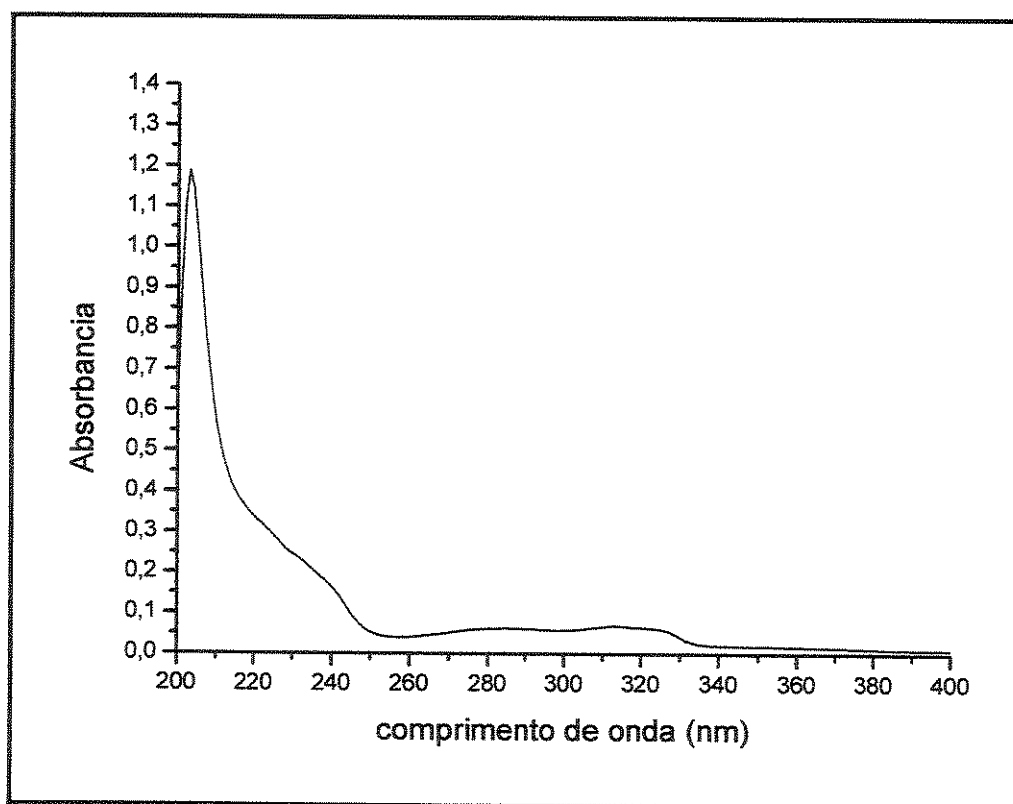
E.76a- Experimento NOESY-1D para a isoflavana 6.



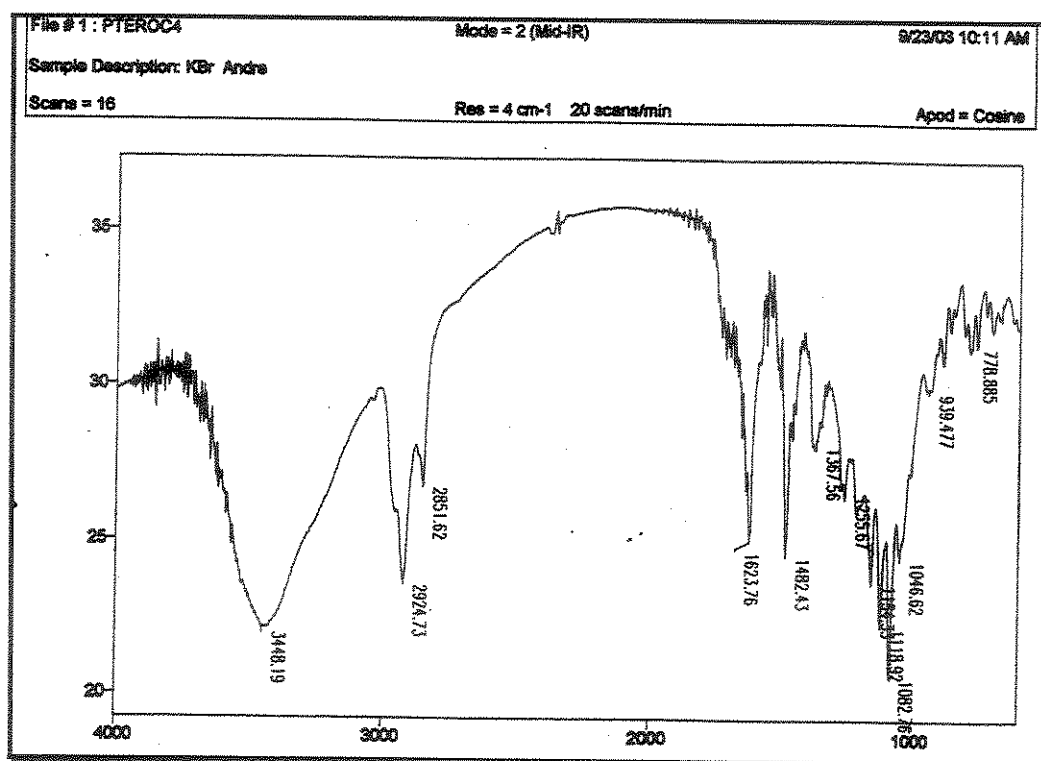
E.76b- Experimento NOESY-1D para a isoflavana 6.



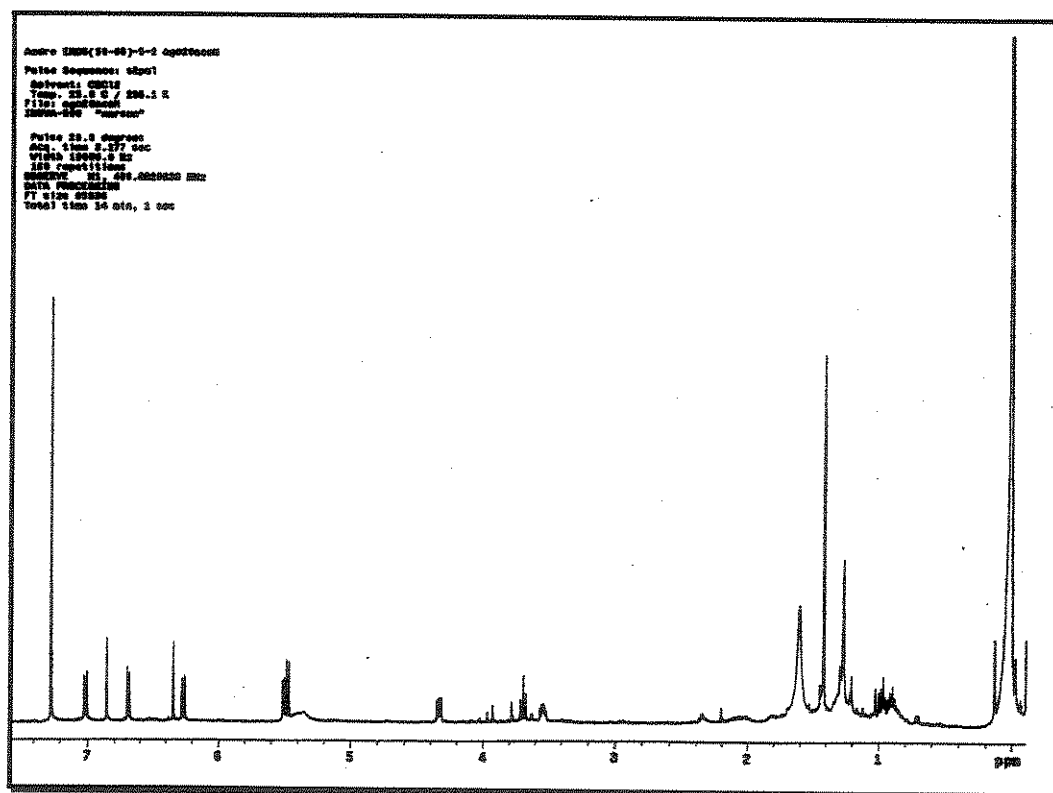
E.77- Espectro de massas de alta resolução para a isoflavana 6.



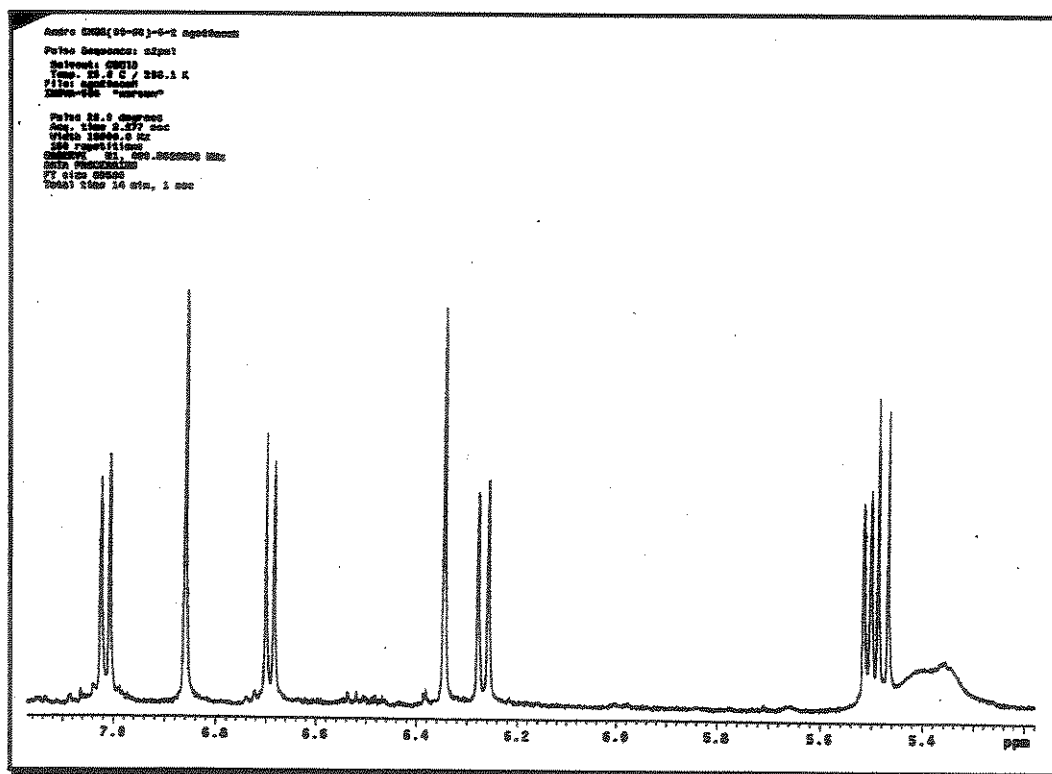
E.78- Espectro na região do U.V. para o pterocarpano 7.



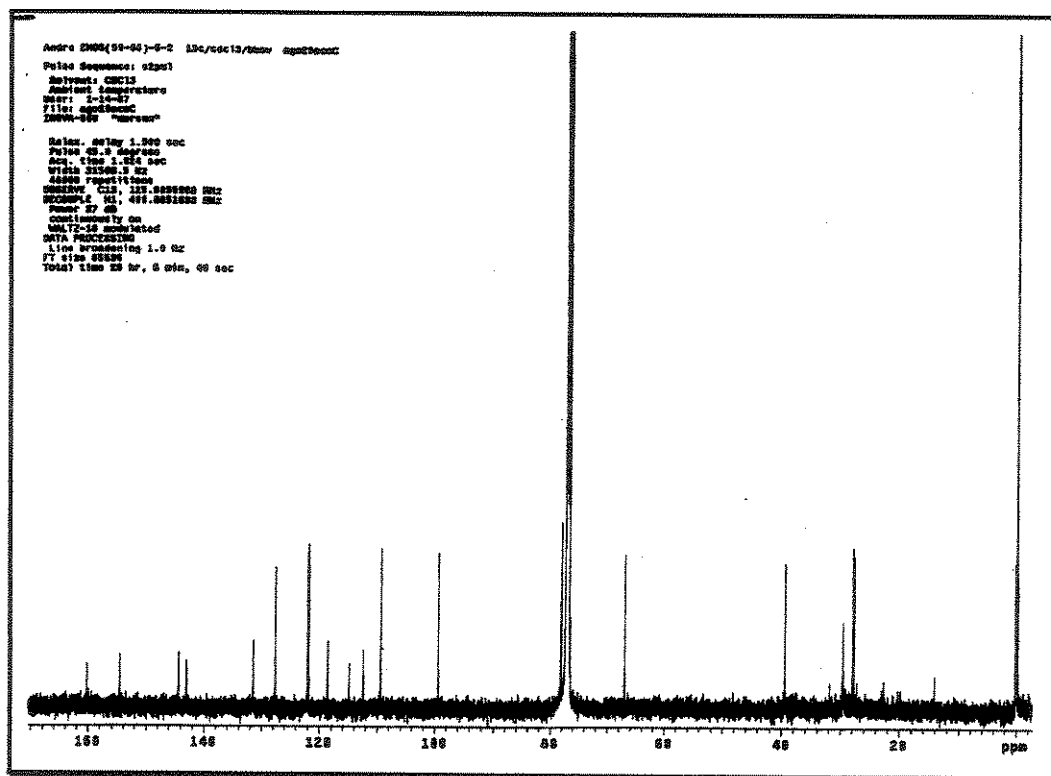
E.79- Espectro na região do I.V. para o pterocarpano 7.



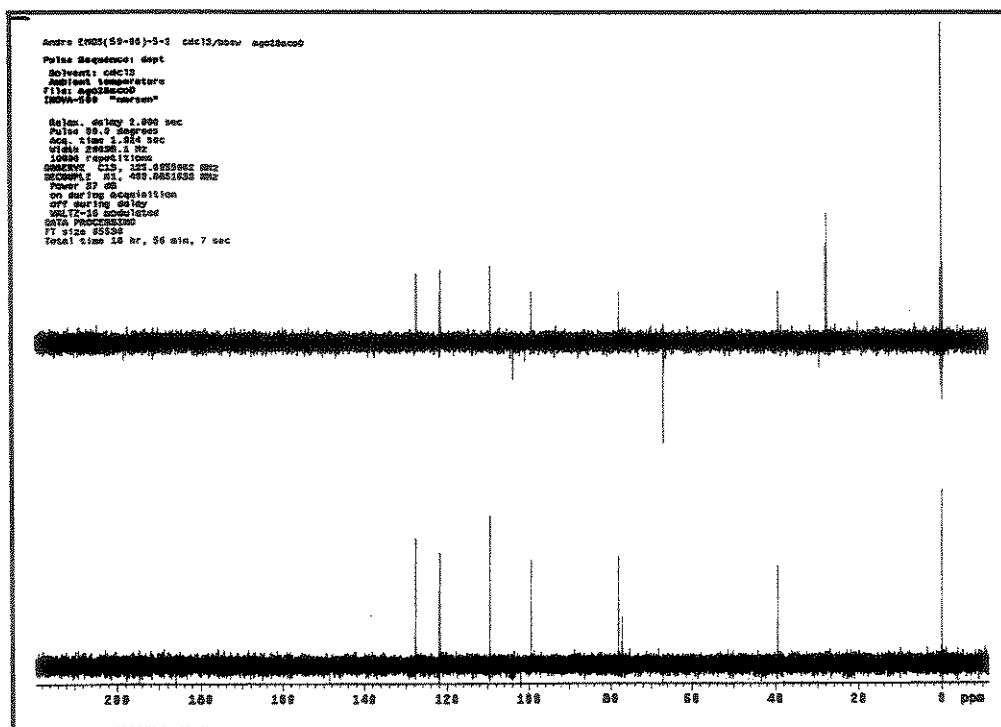
E.80- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 7.



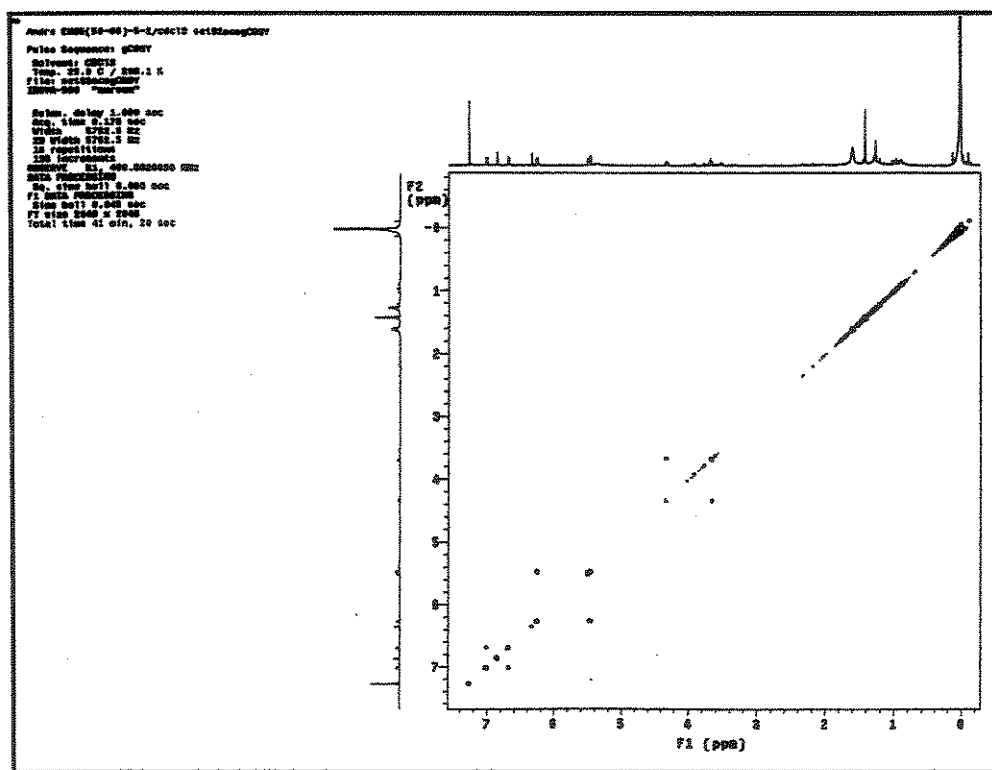
E.81- Expansão do espectro anterior.



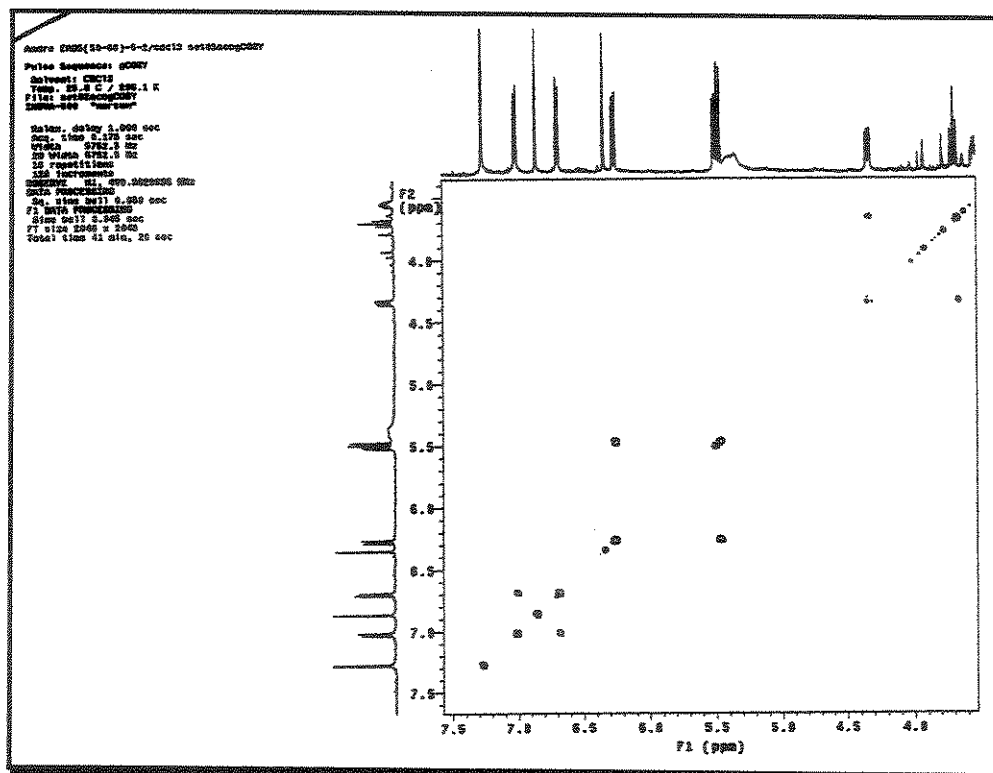
E.82- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 7.



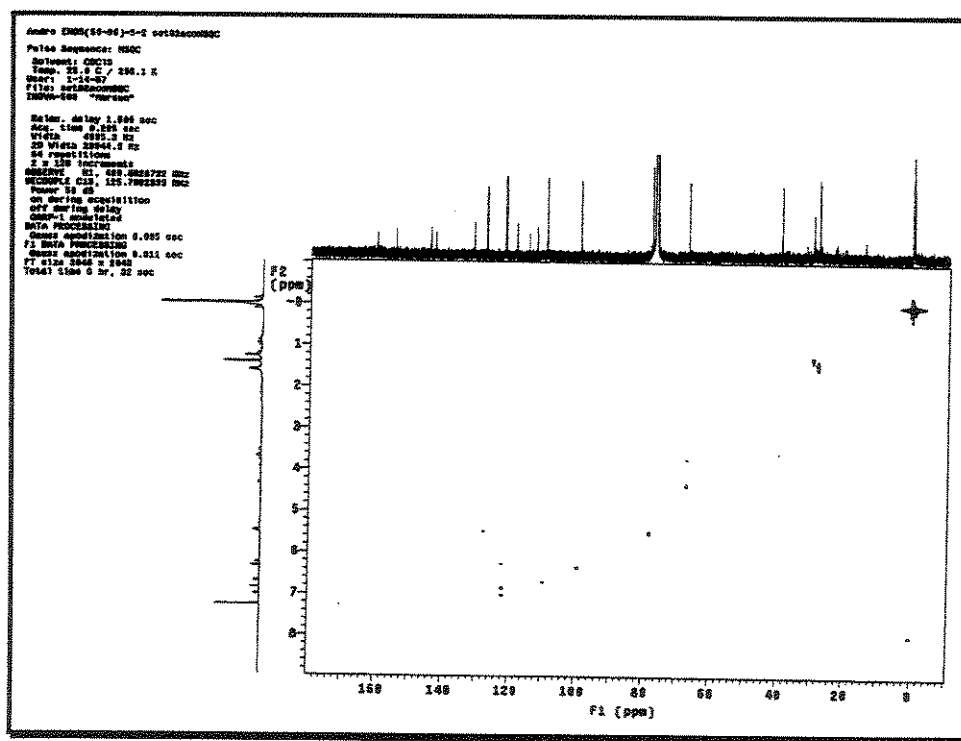
E.83- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl₃, 11,0 T) para o pterocarpano 7.



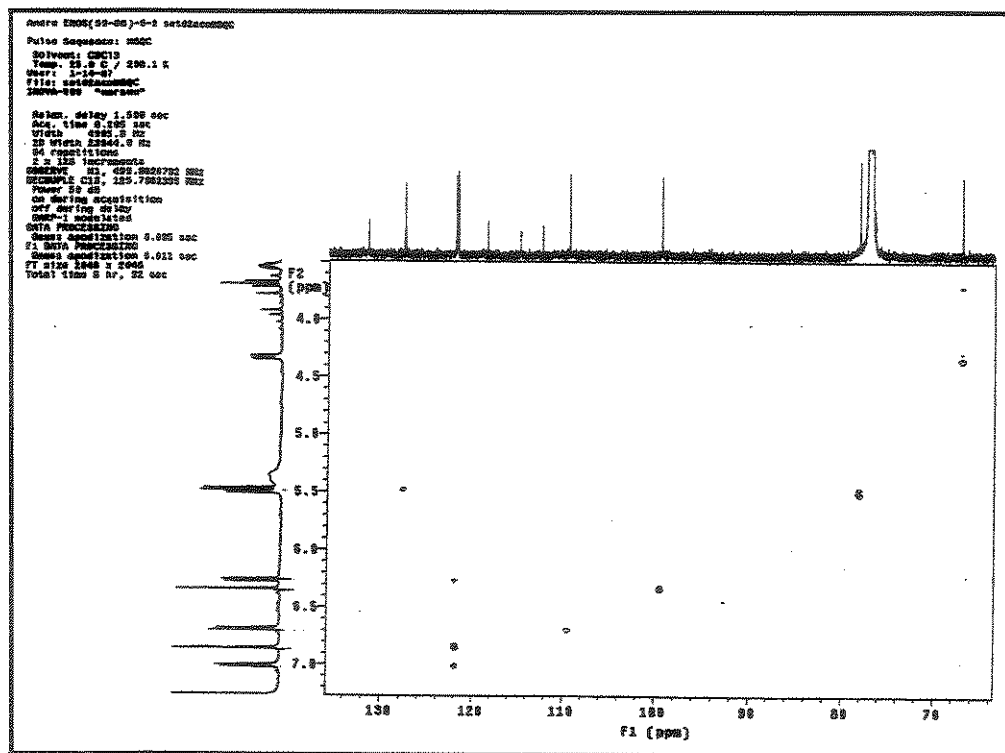
E.84- Mapa de contorno de RMN 2D (H,H-gCOSY) (CDCl₃, 11,0 T) para o pterocarpano 7.



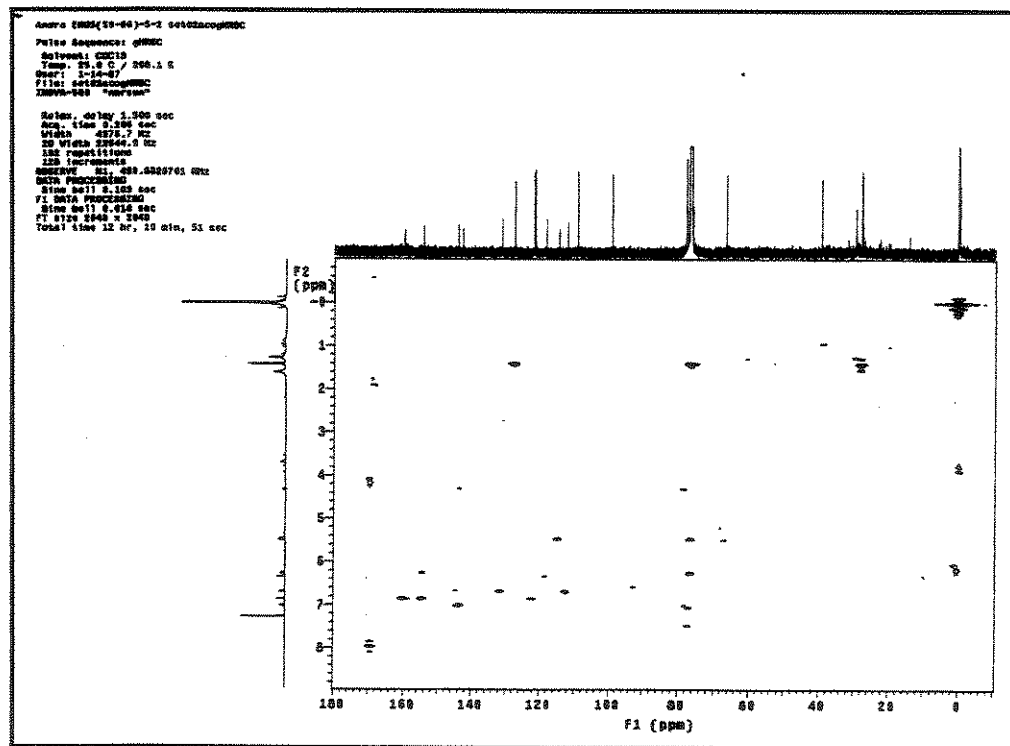
E.85- Expansão do espectro anterior.



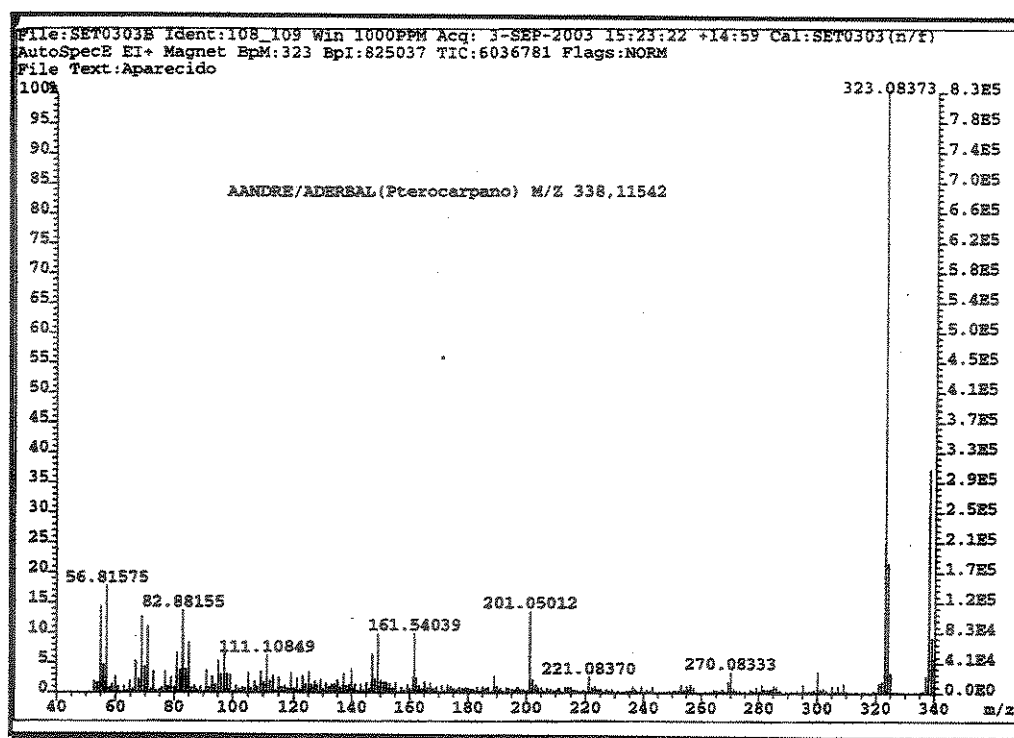
E.86- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H ,C-HSQC) (CDCl_3 , 11,0 T) para o pterocarpano 7.



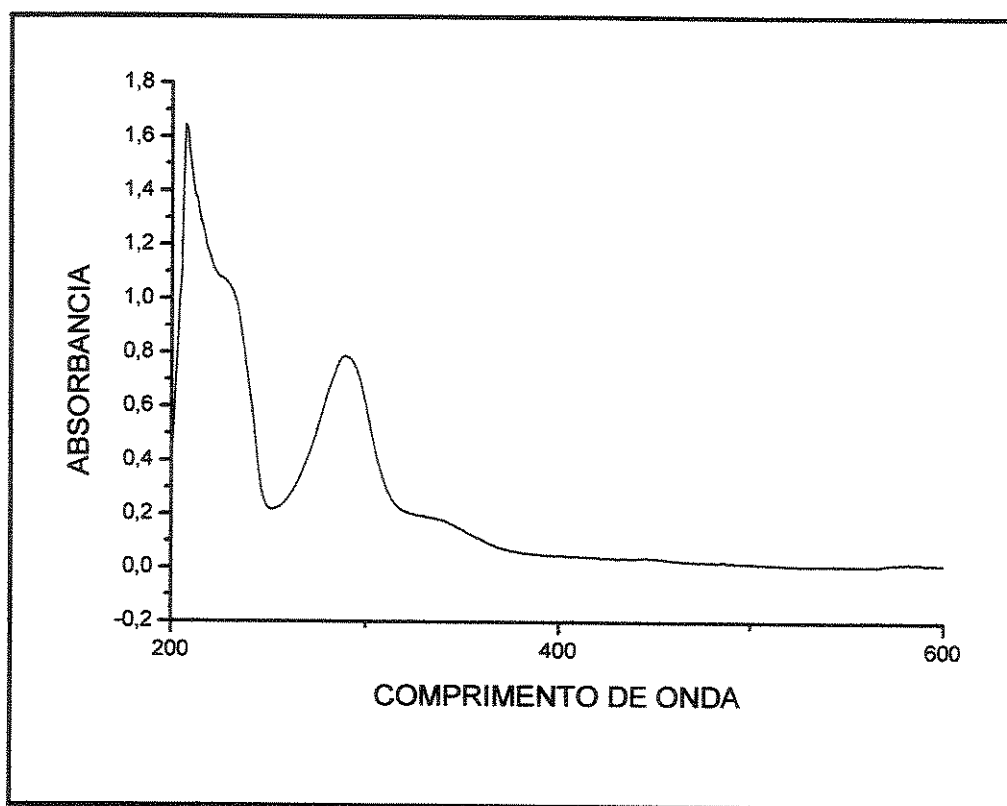
E.87- Expansão do espectro anterior.



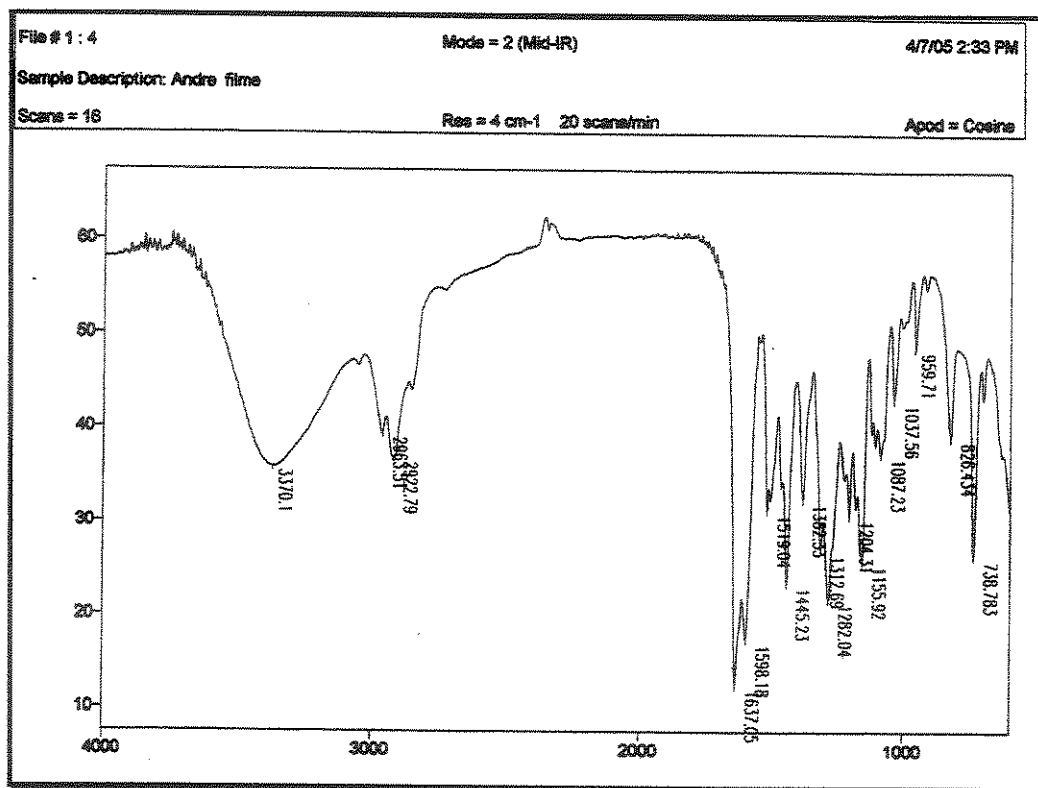
E.88- Mapa de contorno de RMN 2D (H,C -gHMBC) ($CDCl_3$, 11,0 T) para o pterocarpano 7.



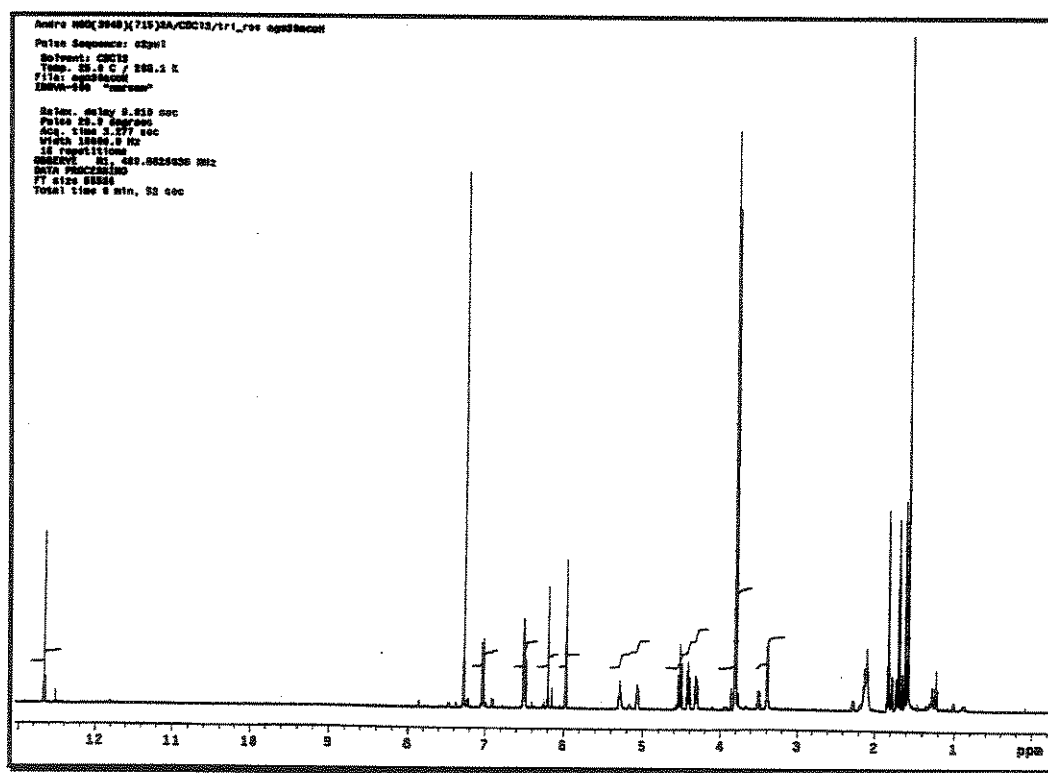
E.89- Espectro de massas de alta resolução para o pterocarpano 7.



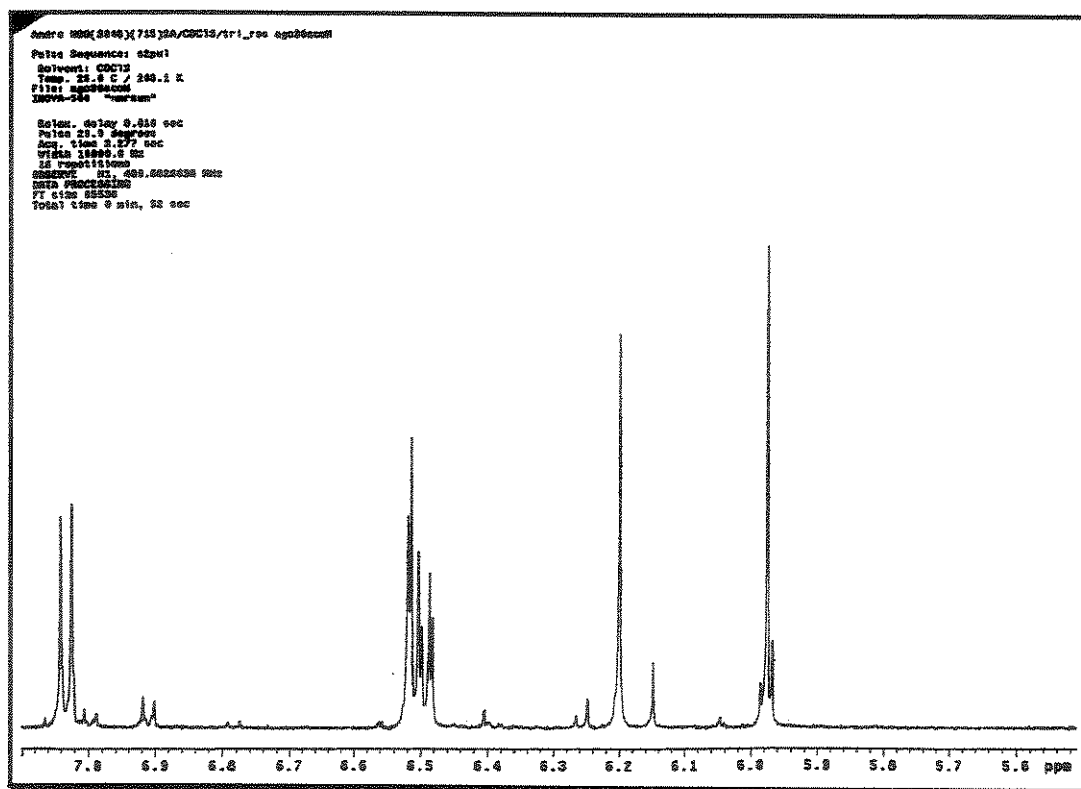
E.90- Espectro na região do U.V. para a isoflavanona 8.



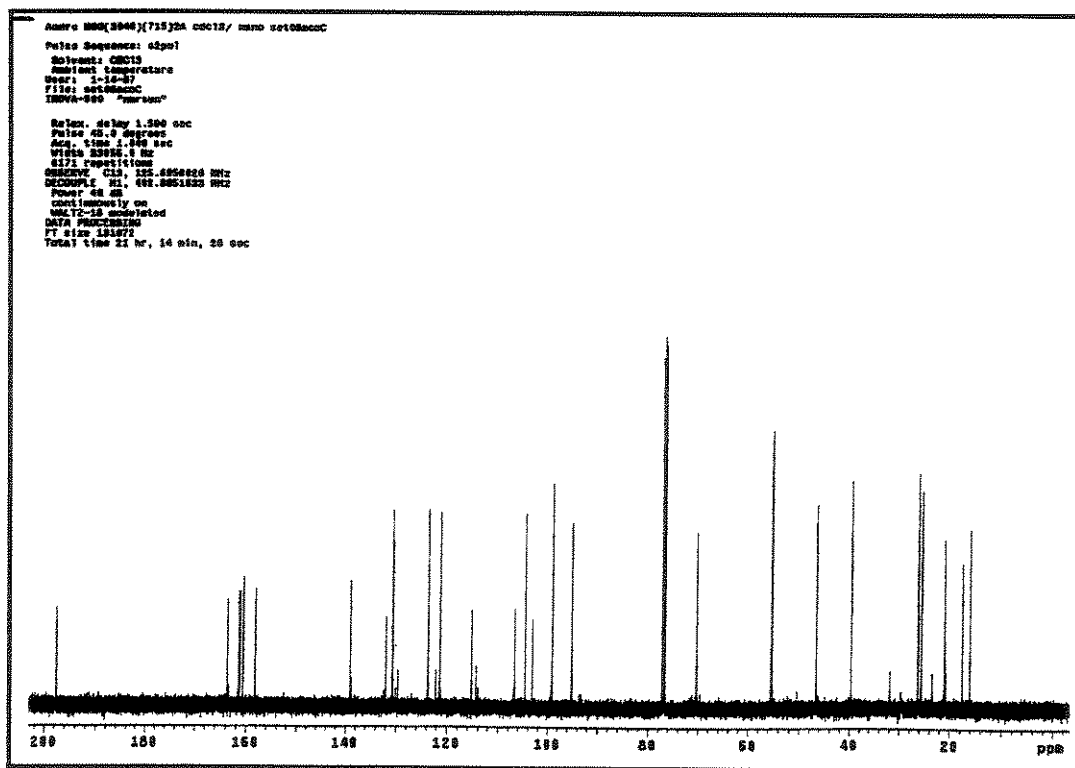
E.91- Espectro na região do I.V. para a isoflavanona 8.



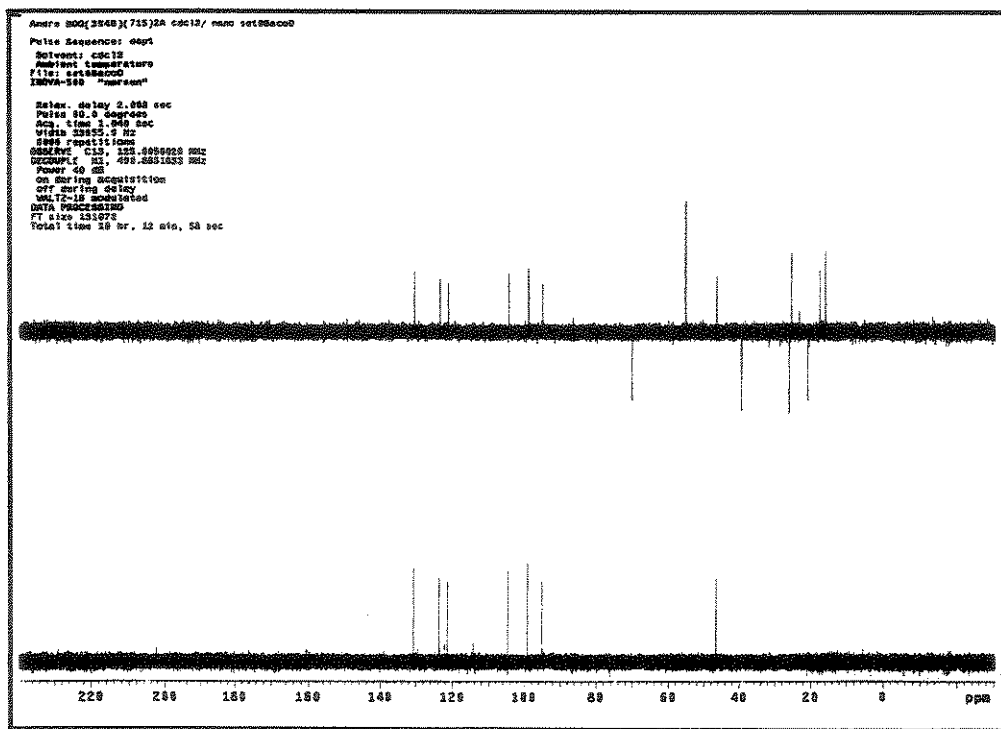
E.92- Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona 8.



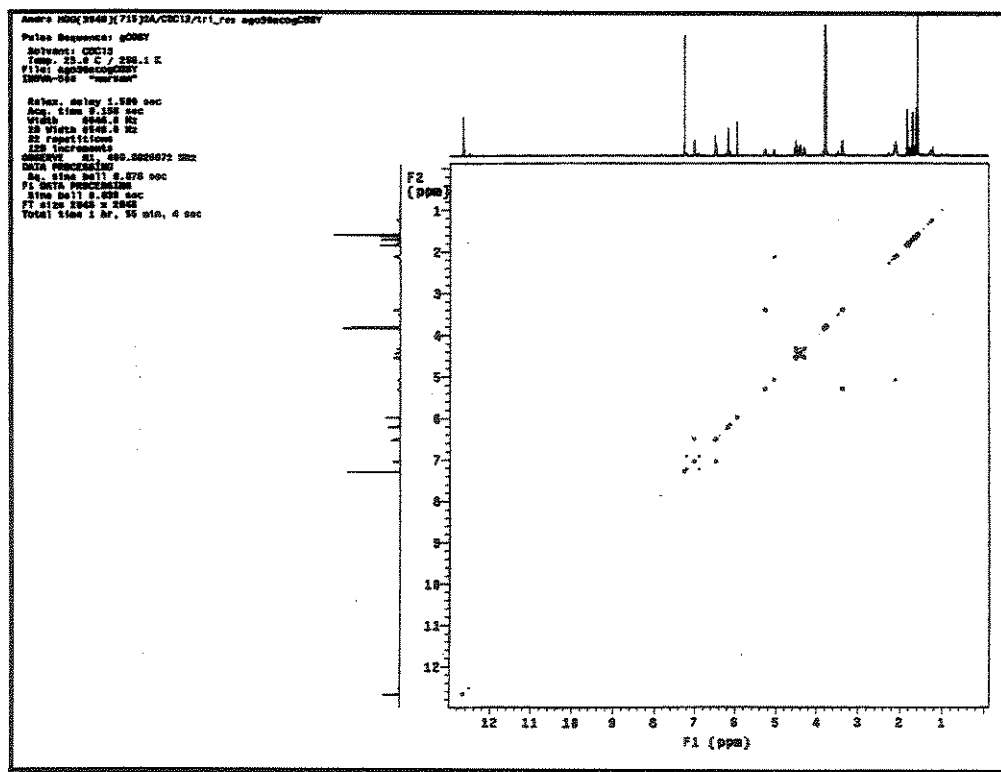
E.93- Expansão do espectro anterior.



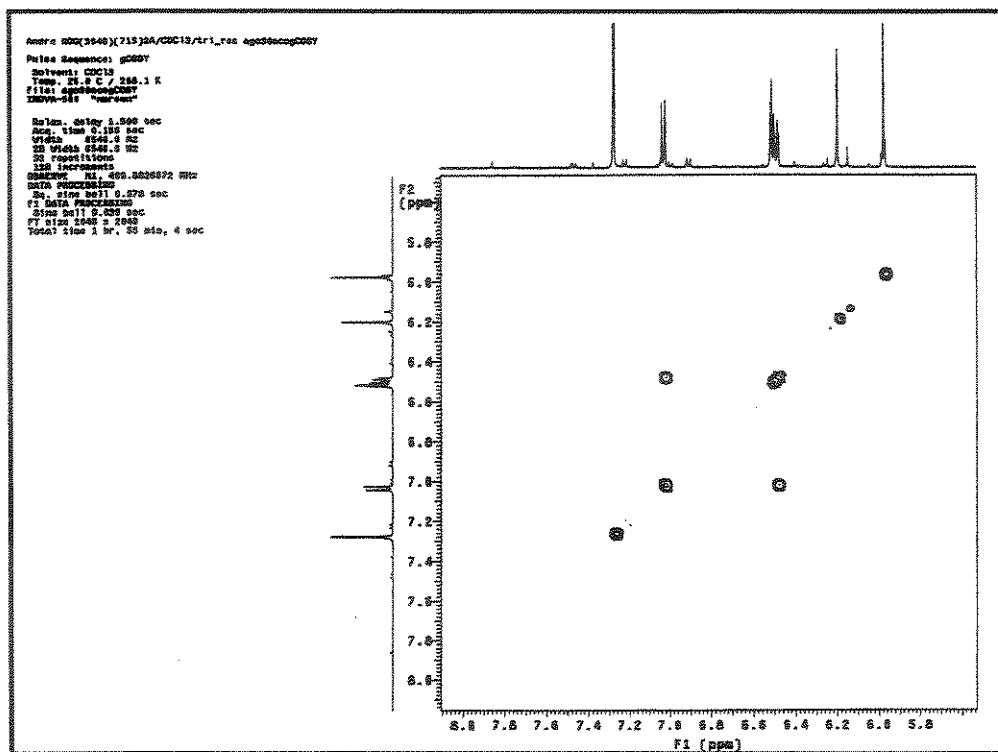
E.94- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 8.

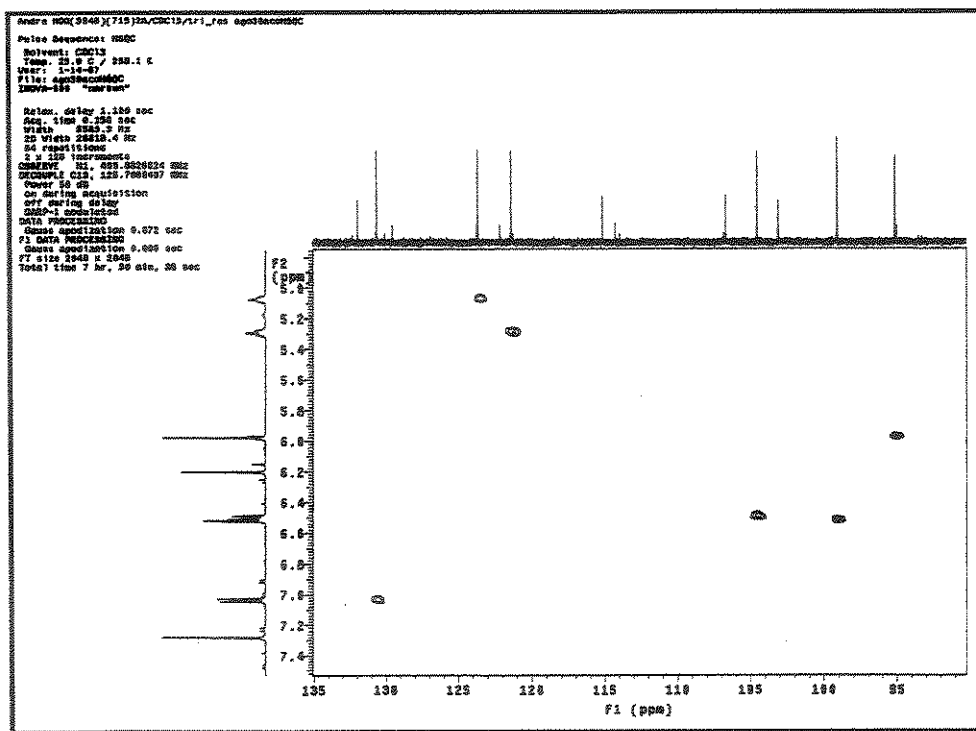


E.95- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona 8.

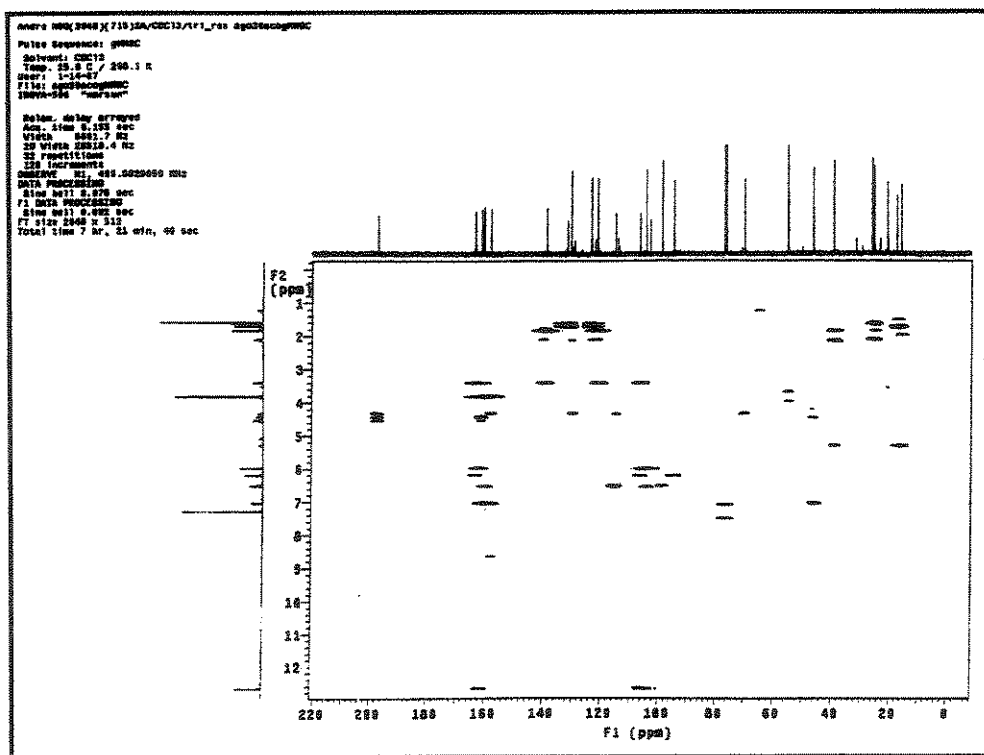


E.96- Mapa de contorno de RMN 2D (H,H-gCOSY) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona 8.

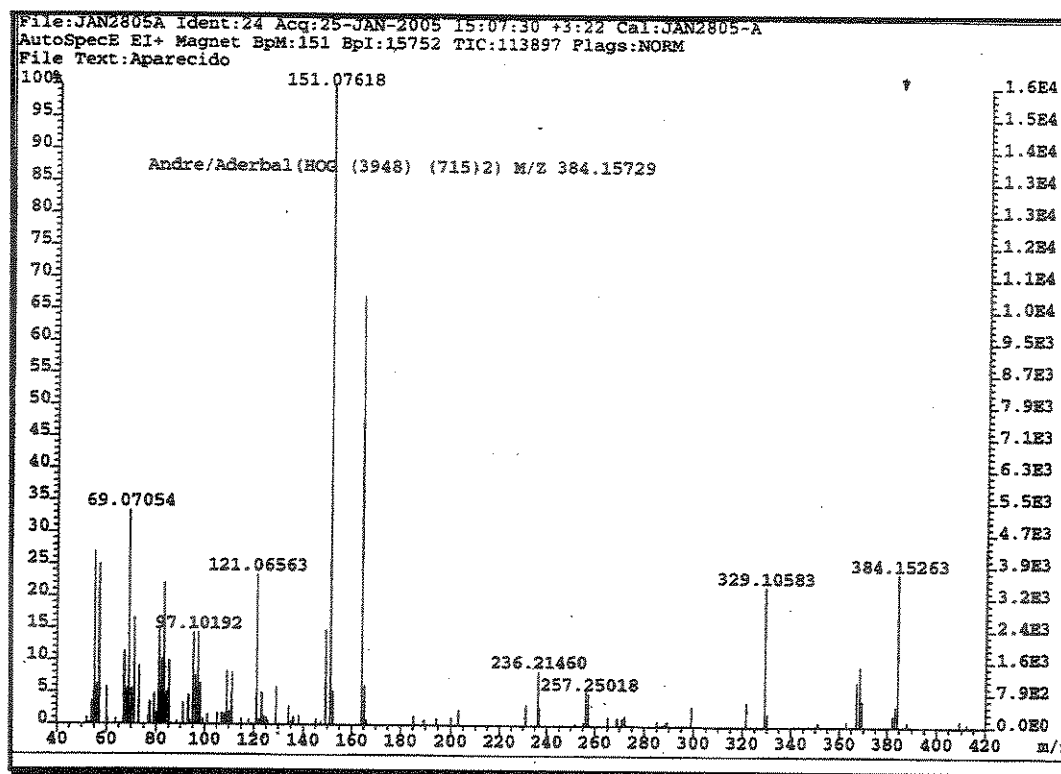




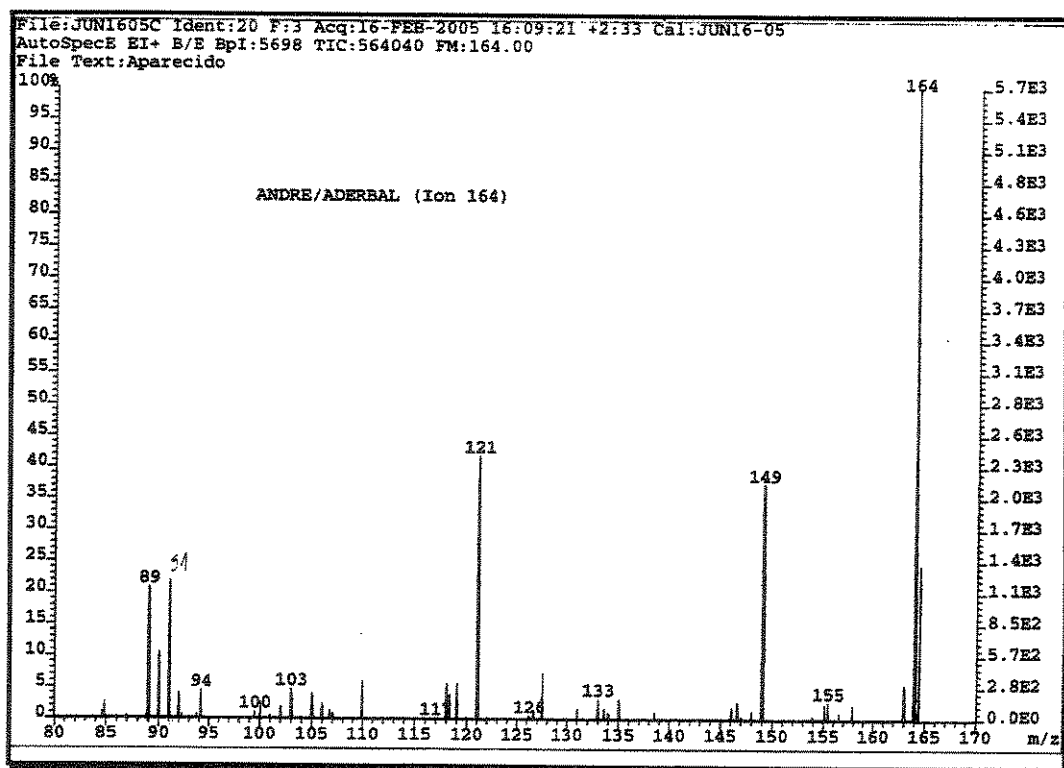
E.99- Expansão do espectro anterior.



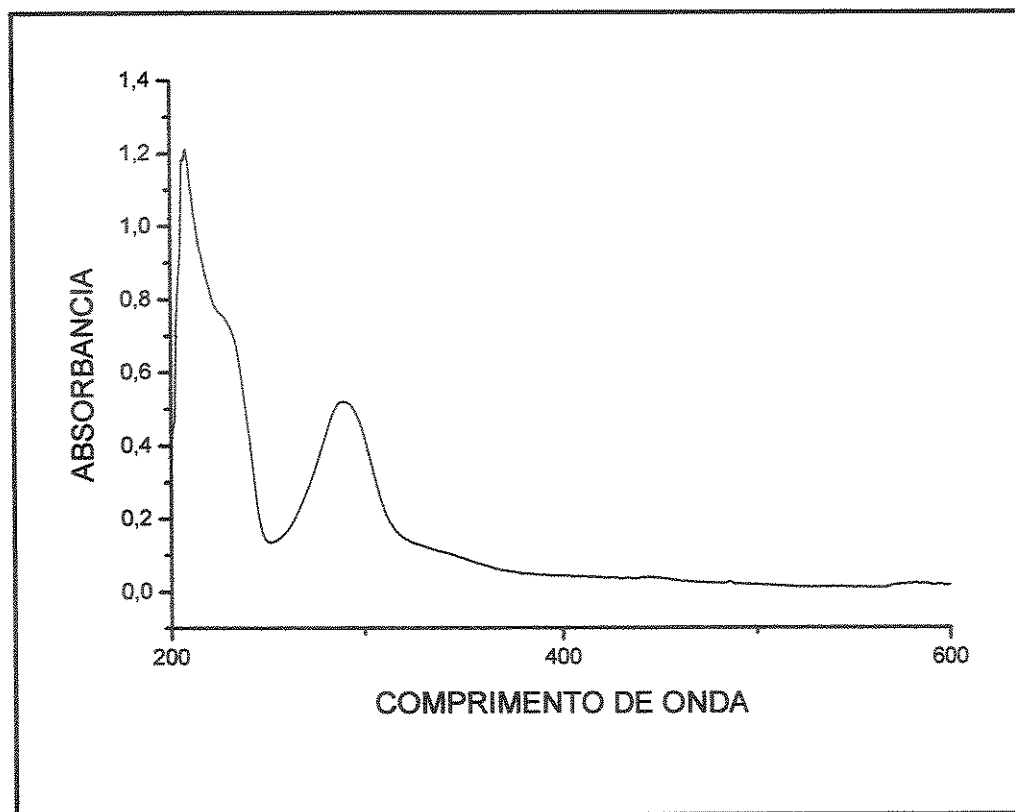
E.100- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 8.



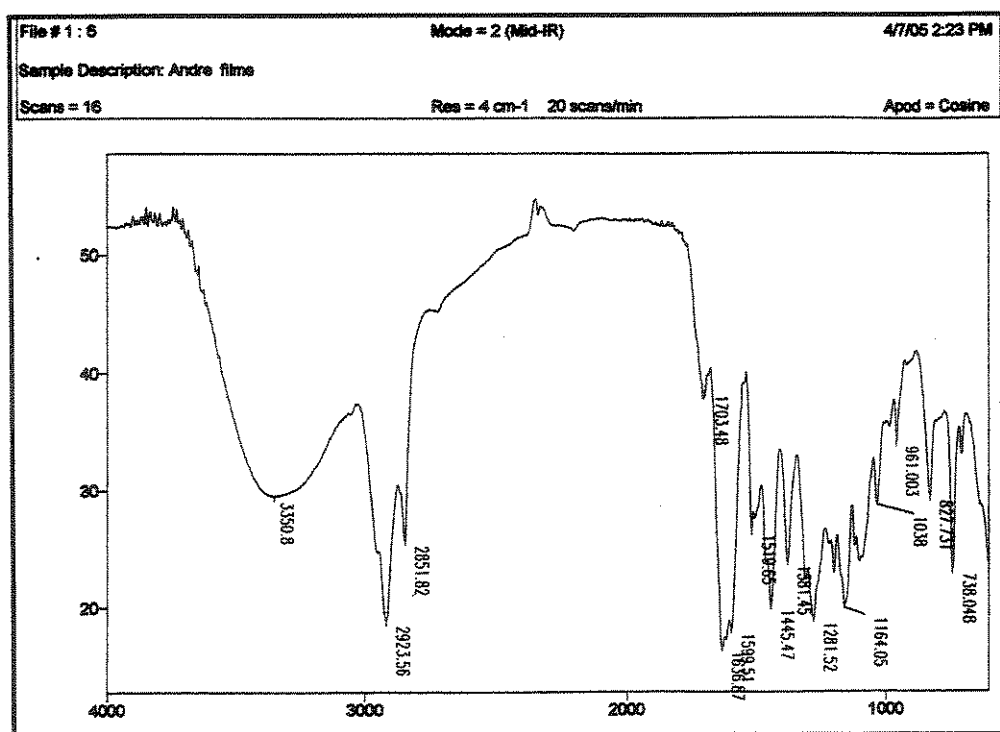
E.101- Espectro de massas de alta resolução para a isoflavanona 8.



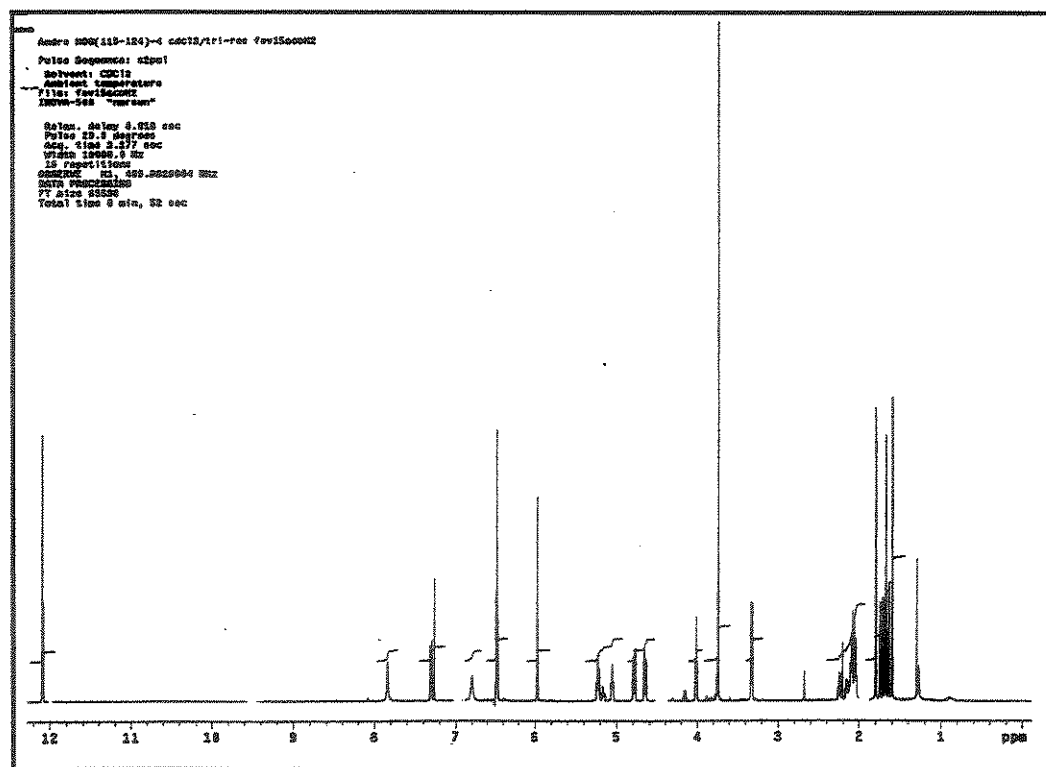
E.102- Espectro ms/ms para o íon 164.



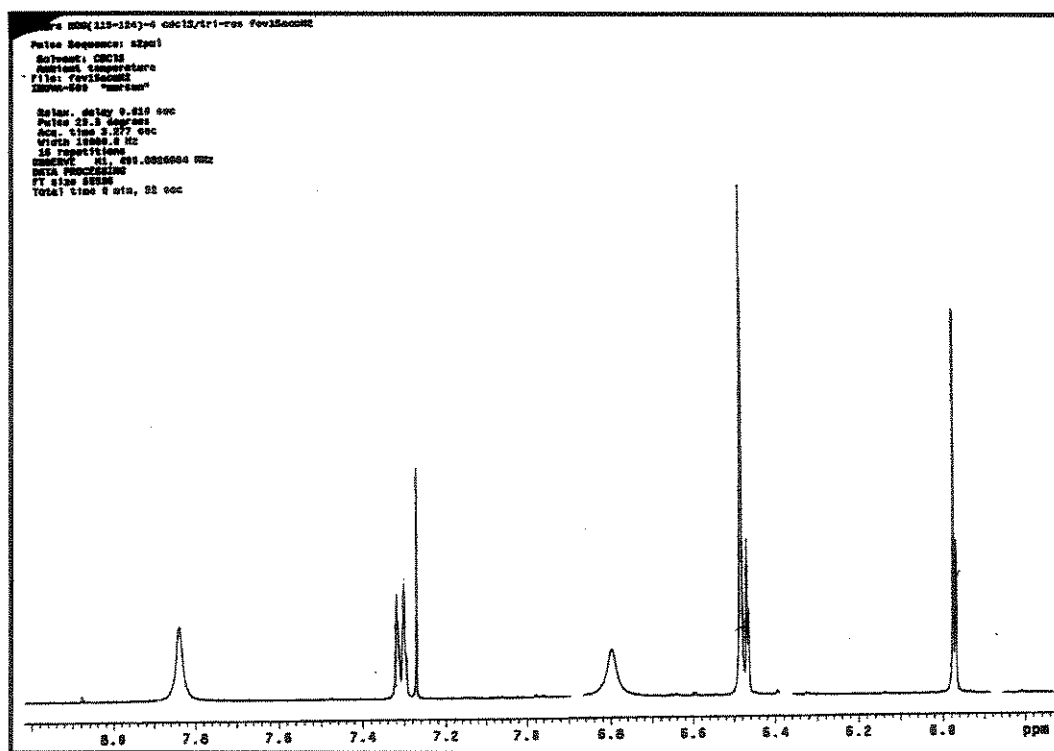
E.103- Espectro na região do U.V. para a isoflavanona 9.



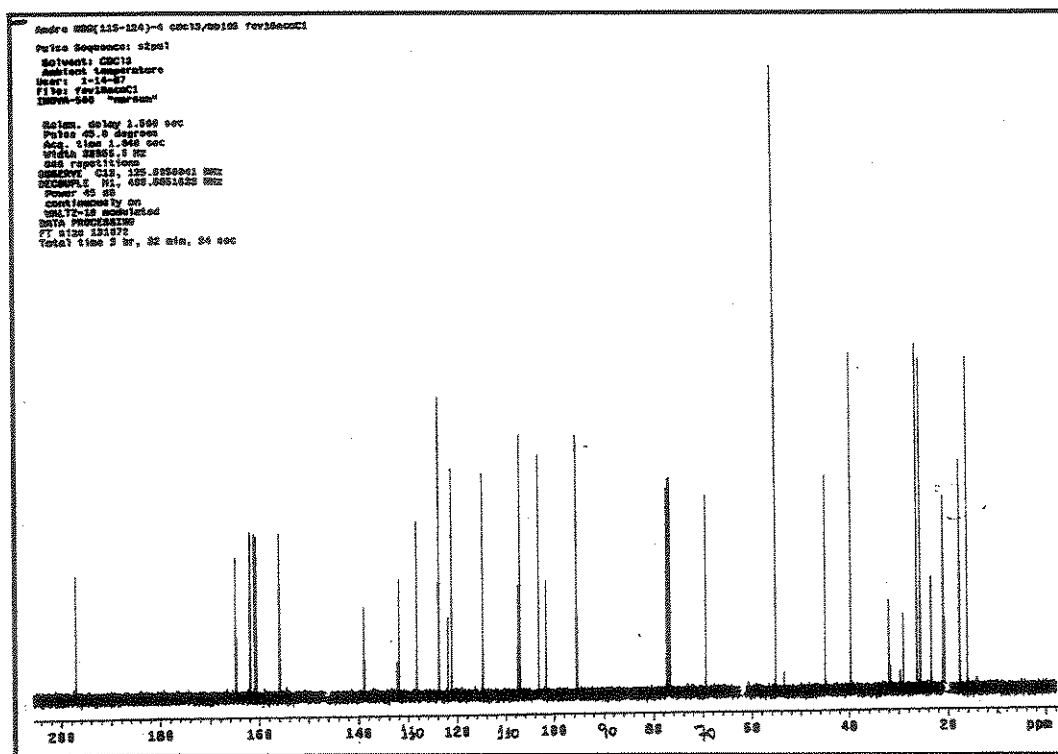
E.104- Espectro na região do I.V. para a isoflavanona 9.



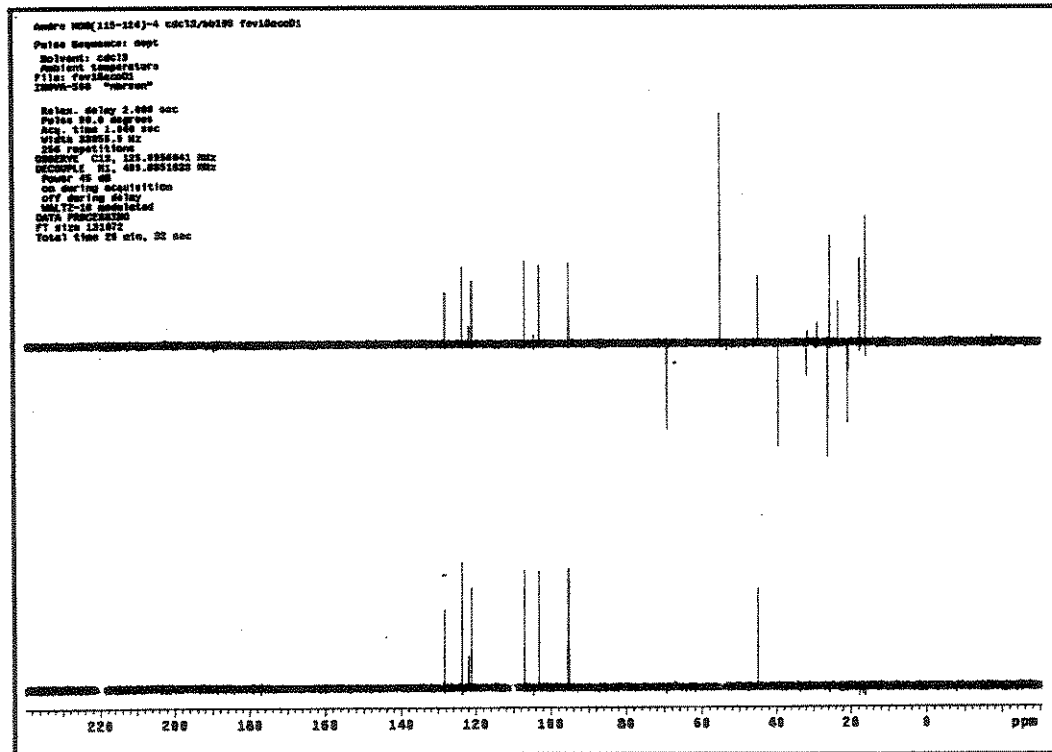
E.105- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 9.



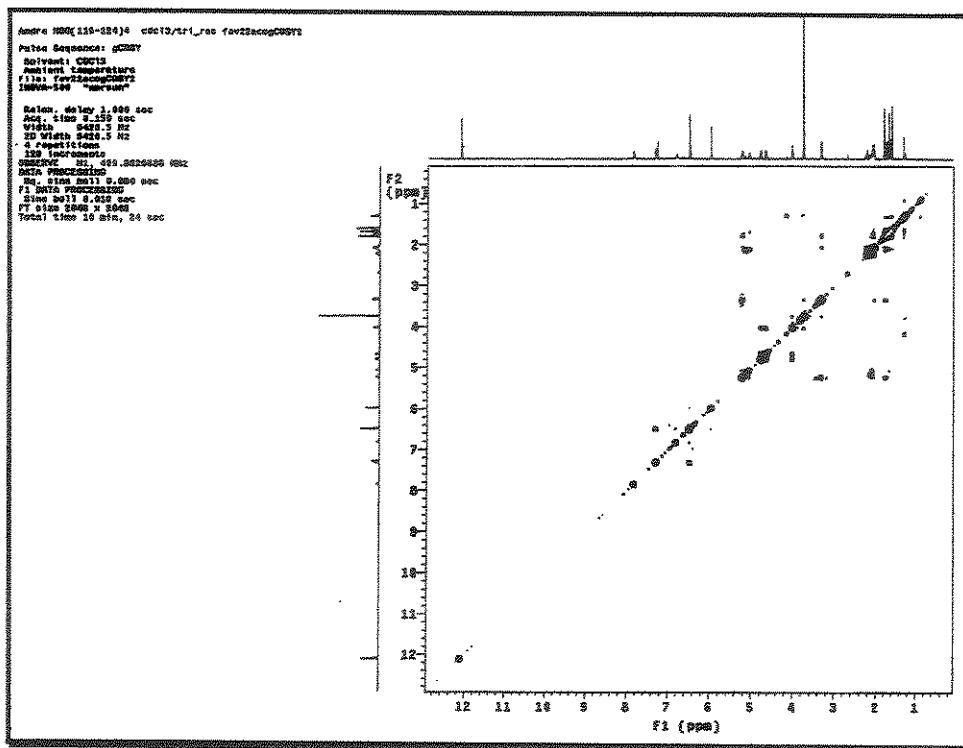
E.106- Expansão do espectro anterior.



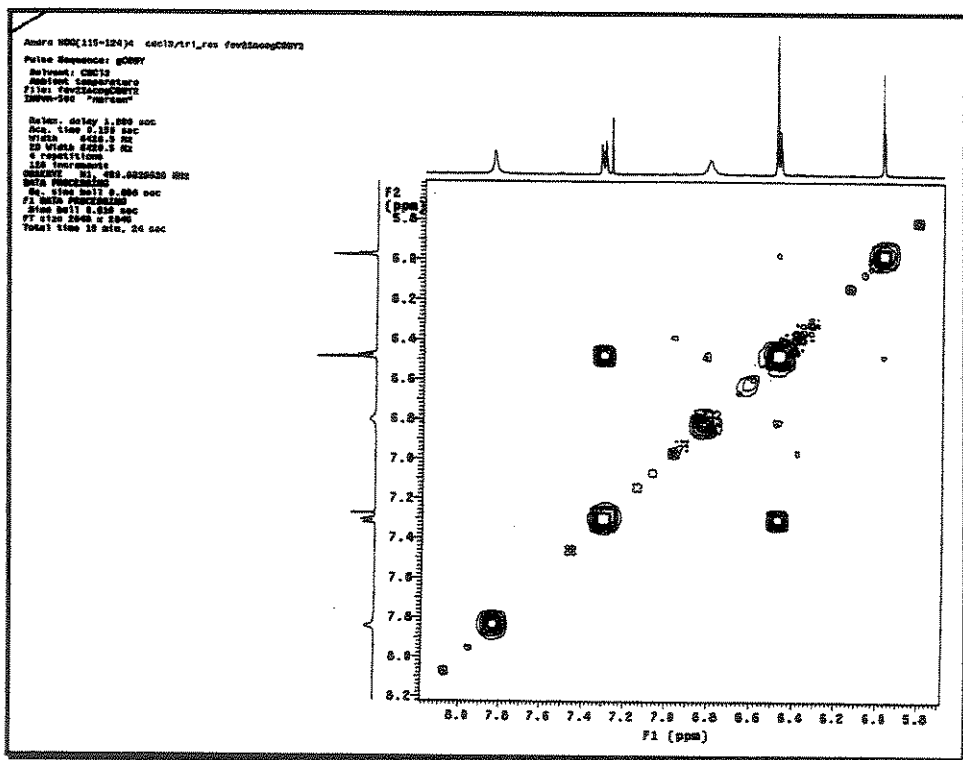
E.107- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 9.



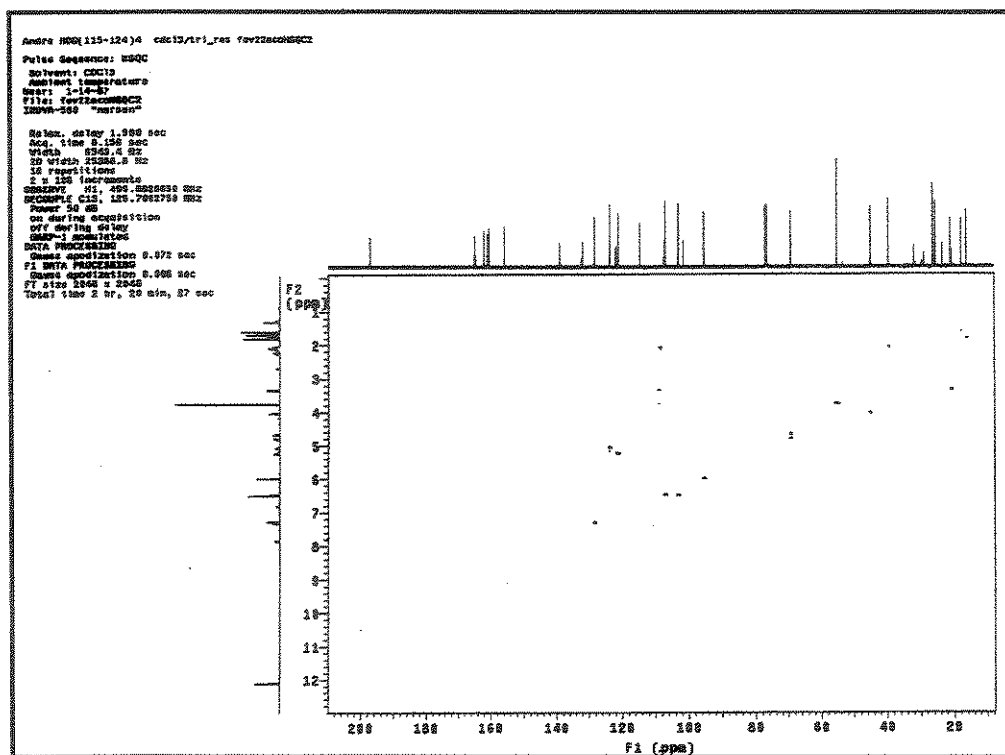
E.108- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 9.



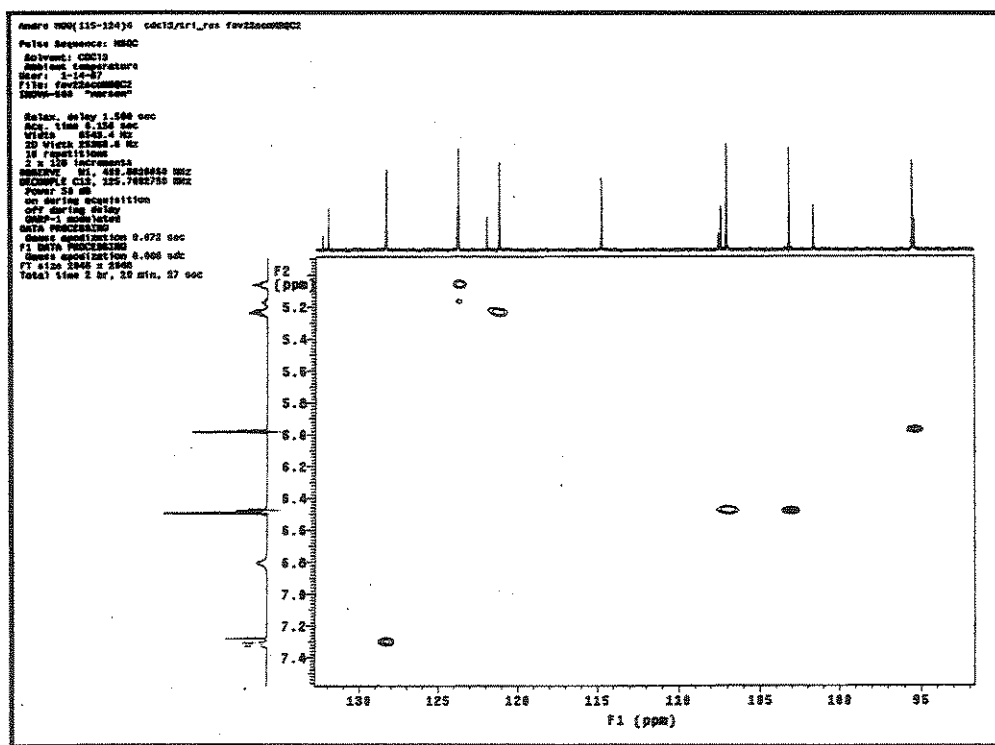
E.109- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^1H -gCOSY) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona **9**.



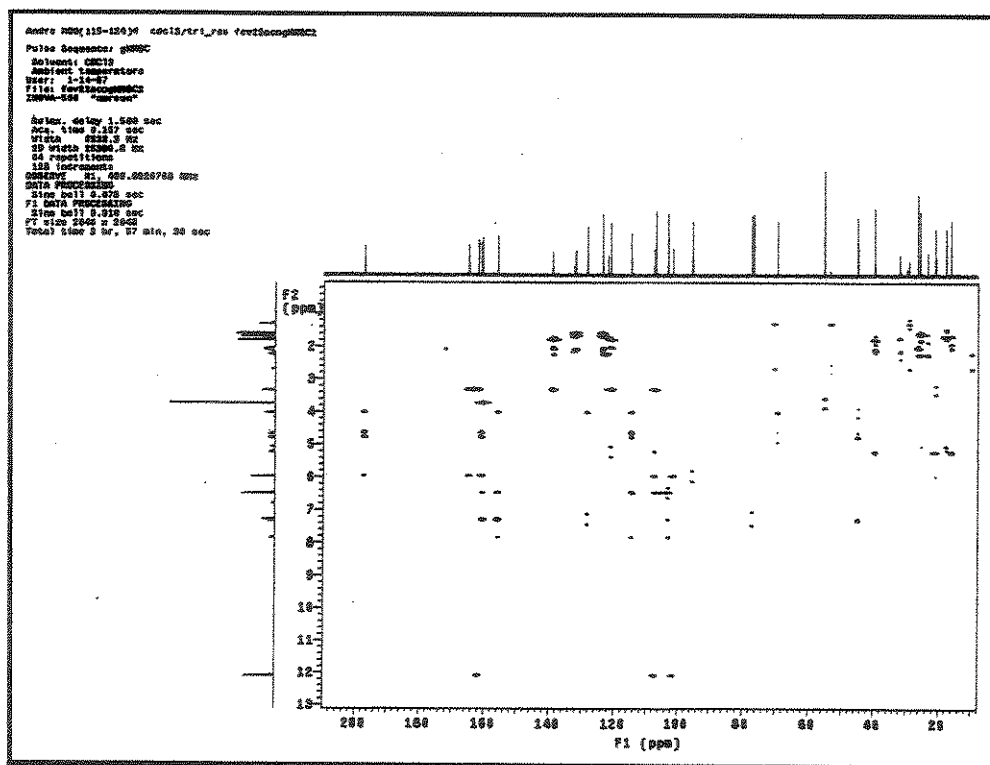
E.110- Expansão do espectro anterior.



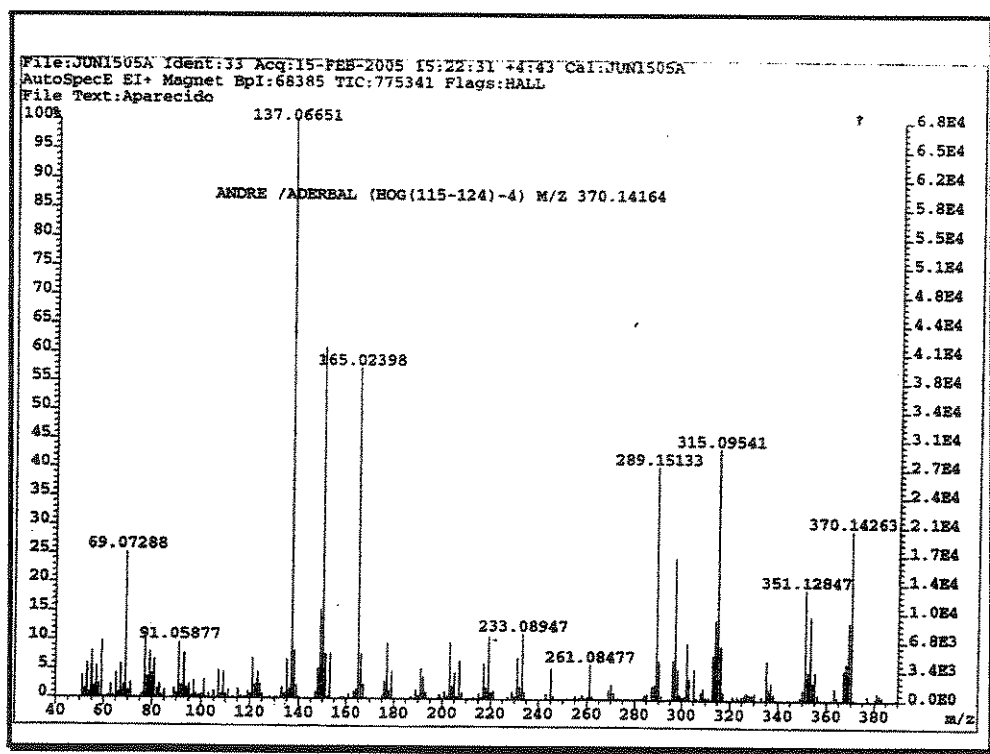
E.111- Mapa de contorno de RMN 2D (H,C-HSQC) (CDCl₃, 11,0 T) para a isoflavanona 9.



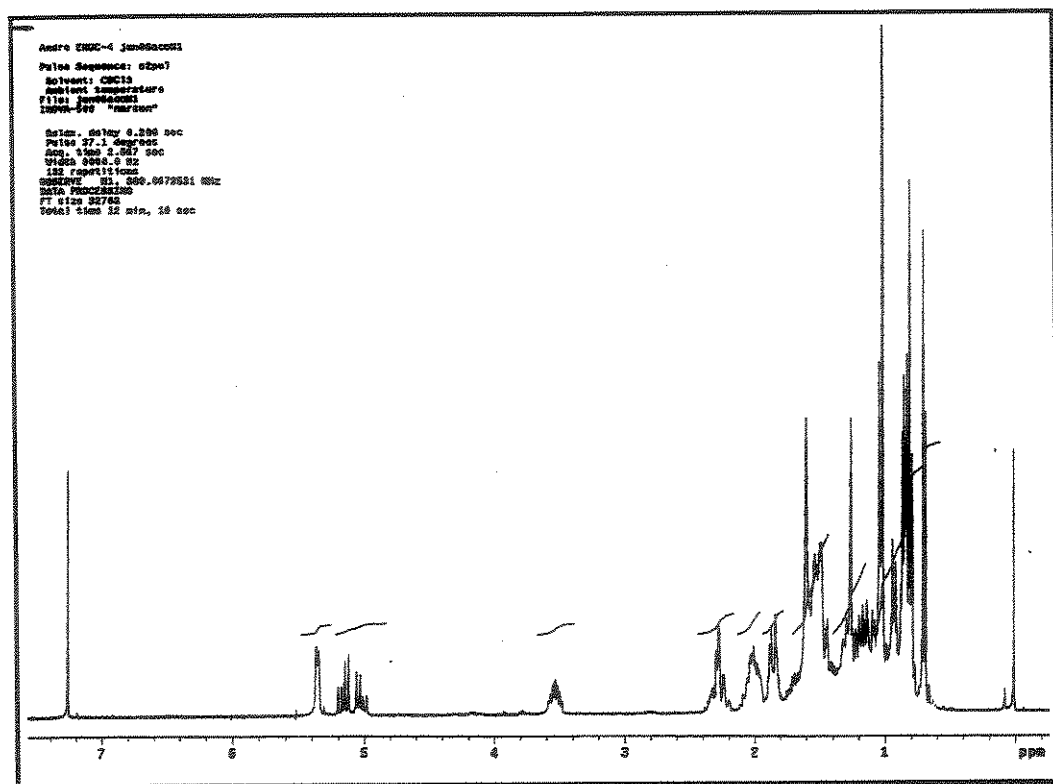
E.112- Expansão do espectro anterior.



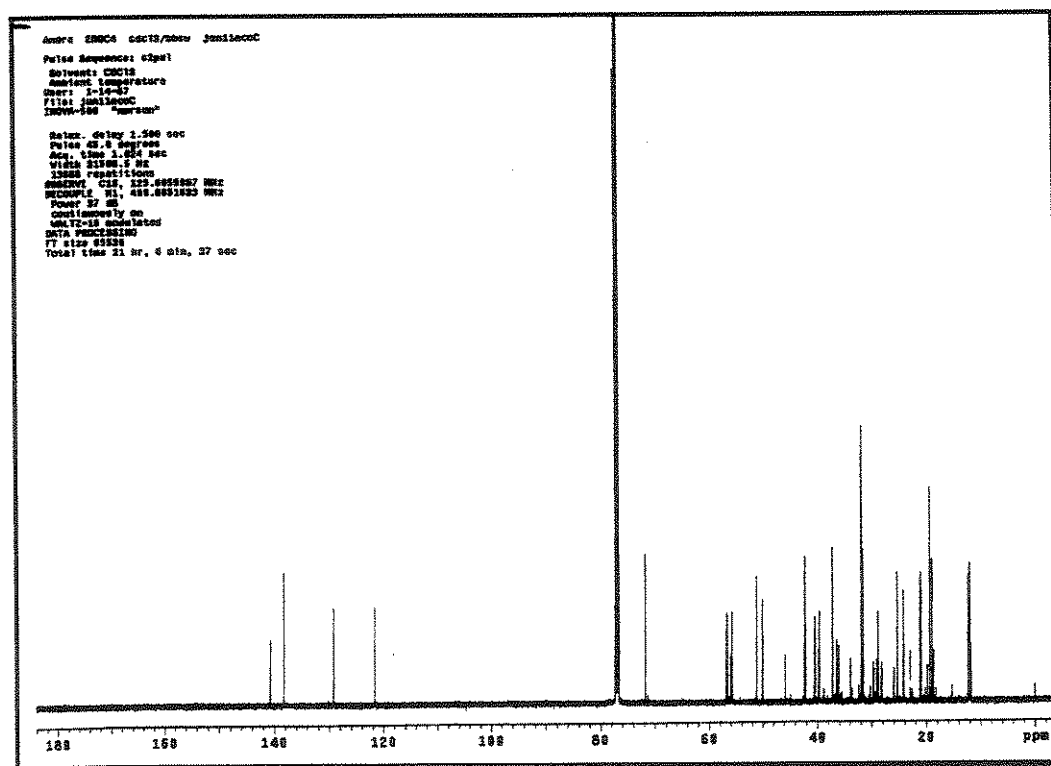
E.113- Mapa de contorno de RMN 2D (^1H , ^{13}C -gHMBC) (CDCl_3 , 11,0 T) para a isoflavanona 9.



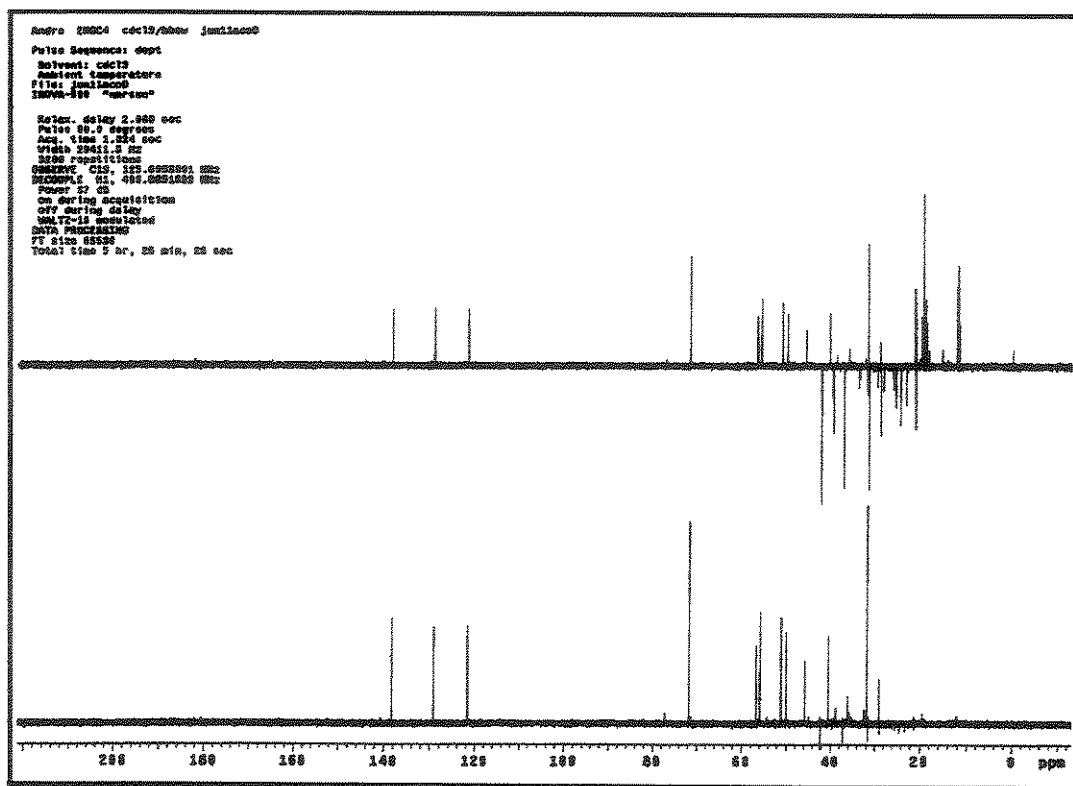
E.114- Espectro de massas de alta resolução para a isoflavana 9.



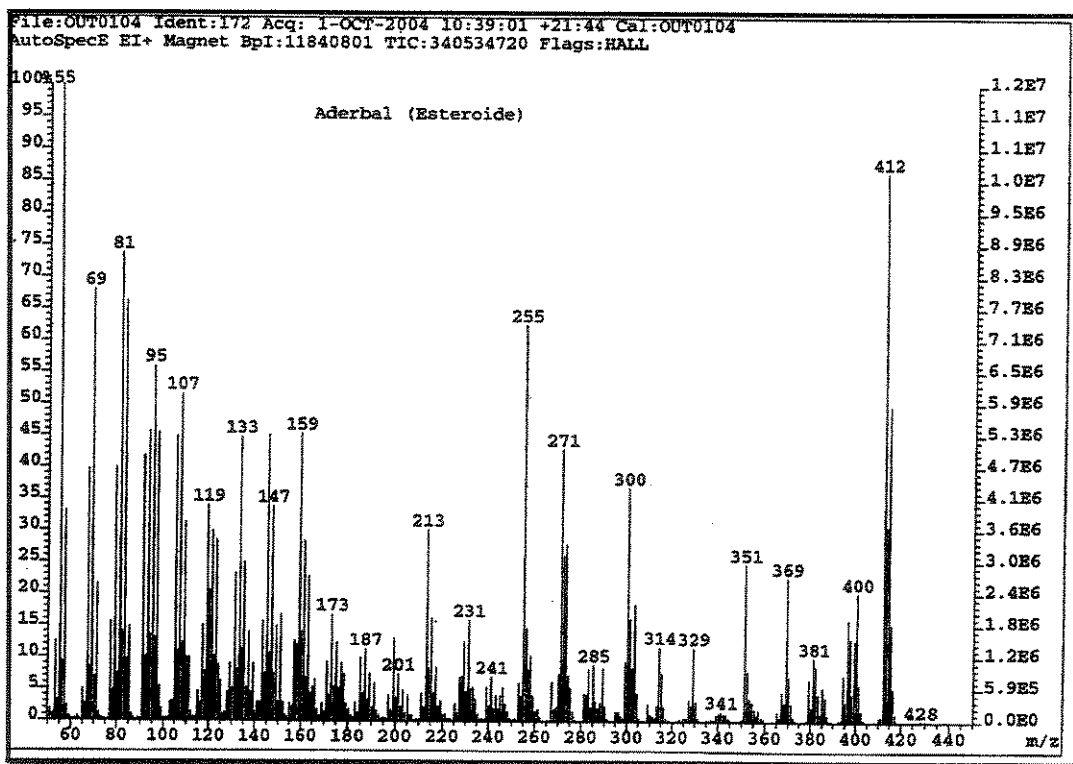
E.115- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 11,0 T) para o estigmasterol 10.



E.116- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 11,0 T) para o estigmasterol 10.



E.117- Experimento tipo DEPT 90° e 135° (CDCl₃, 11,0 T) para o estigmasterol 10.



E.118- Espectro de massas de baixa resolução para o estigmasterol 10.