



**Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC
Leguminosae-Isolamento, Determinação Estrutural, Atividade
Biológica e Análise Sazonal**

Marisa Alves Nogueira

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

Profa. Dra. Eva Gonçalves de Magalhães
Orientadora

Abril de 1998

Campinas, São Paulo - Brasil



N689F

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Biblioteca



RESUMO

Flavonóides de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae-Isolamento, Determinação Estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal. Marisa Alves Nogueira, Eva Gonçalves Magalhães.

Palavras Chaves: CLAE, Alelopatia, Bioautografia, Inseticida.

O estudo fitoquímico do extrato éter de petróleo das raízes de *Lonchocarpus latifolius* resultou no isolamento de doze flavonóides, *karanjacromeno*, *karanjina*, *lanceolata* B, *pongacromeno*, *pongaglabrona*, *ponganpina*, e os inéditos, 2'-metoxi-8-(α,α -dimetilalil)-furano-(2'',3'':4',3')-dibenzoilmetano, 3,5-dimetoxi-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':8,7)-flavona, 3,4-metilenodioxo-2'-metoxi-8-(α,α -dimetilalil)-furano-(2'',3'':4',5')-dibenzoilmetano, 3',4'-metilenodioxo-(2'',3'':7,8)-furanoflavanona, 3-metoxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavanona, (2,3-trans-3,4-trans)-3,4-dimetoxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavona. As estruturas foram determinadas por métodos espectrofotométricos (UV, IV, EM RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HETCOR, COLOC) Vale ressaltar que dentre as substâncias inéditas os dois derivados do dibenzoilmetano, pertencem a uma classe de flavonóides raramente encontrado na natureza além apresentarem um grupo alquil no carbono C-8, sem precedente na literatura. A análise qualitativa e quantitativa por CLAE dos extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico das raízes e dos extratos éter de petróleo da casca do caule, folhas e sementes, mostraram a predominância de um dos derivados inéditos do dibenzoilmetano (2'-metoxi-8-(α,α -dimetilalil)-furano-(2'',3'':4',3')-dibenzoilmetano), o que se confirmou na análise sazonal do extrato éter de petróleo das raízes. Foram feitos testes biológicos de bioautografia, toxicidade com *Artemia salina*, inibição da germinação de sementes de alface e atividade inseticida com os extratos e o derivado inédito do dibenzoilmetano. Verificou-se atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* e fungicida contra *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae* para os extratos éter de petróleo e diclorometânico. o derivado inédito do dibenzoilmetano também mostrou-se ativo contra *Bacillus subtilis*. O extrato éter de petróleo mostrou-se parcialmente ativo contra o fungo *Cladosporium cladosporioides* Os três extratos apresentaram atividade Para o teste de toxicidade com *Artemia salina*. Os extratos éter de petróleo e diclorometânico apresentaram atividade inseticida. Somente o extrato metanólico apresentou atividade para o teste de inibição da germinação de sementes de alface.

ABSTRACT

Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae-Isolation, Estructural Determination, Biological Activity and Seazonal Analysis Marisa Alves Nogueira, Eva Gonçalves Magalhães.

Key Words: HPLC, Alelopaty, Bioautography, Insecticide.

Light petroleum extracts from the roots of *Lonchocarpus latifolius* was submitted to chromatographic analysis and furnished twelve flavonoids *karanjachromene*, *karanjin*, *lanceolatin B*, *pongachromene*, *pongaglabrone*, *ponganpin*, 2'-methoxy-8-(α,α -dimethylalil)-furan-(2'',3'':4',3')-dibenzoilmethane, 3,5-dimethoxy-2'',2''-dimethylpirane-(5'',6'':8,7)-flavone, 3,4-methylenedioxy-2'-methoxy-8-(α,α -dimethylalil)-furan-(2'',3'':4',3')-dibenzoilmethane, 3',4'methylenedioxy-(2'',3'':7,8)-furanoflavanone, 3-methoxy-(2'',3'':7,8)-furanoflavanone, (2,3-*trans*-3,4-*trans*)-3,4-dimethoxy-(2'',3'':7,8)-furanoflavone. The molecular structures were determined by means of their respective spectral data (UV, IR, MS, MNR ^1H AND NMR ^{13}C) and bidimensional spectra (COSY, HETCOR, COLOC) and NOE. The new dibenzoylmetane derivative wich are of rare natural occurrence exhibit a C-8 substitution. The qualitative and quantitative analysis of light petroleum, dichrometane and methanol extracts of roots, stem, leaves and seeds by using HPLC in reverse phase showed that the new dibenzoylmetane derivative (2'-methoxy-8-(α,α -dimethylalil)-furan-(2'',3'':4',3')-dibenzoilmethane) is the most abundant compound, wich was confirmed by seazonal analysis of the light petroleum extract. The new dibenzoylmetane derivative was tested against same fungi and bacterials by bioautography method and showed activity anly against *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger*. It too showed activity by the bioassay Brine Shrimp. The extracts mentioned above showed activity by the bioassay Brine Shrimp, bioautography method against *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* and *Rhizopus oryzae* and showed activity by bioassay inhibition of sed's germination but only the methanol extract showed intense activity. The extracts light petrolium and methanol showed activity against *Aedes aegyti*.

Curriculum Vitae

1. GRADUAÇÃO:

Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais UFMG

2. MESTRADO

Universidade Federal de Viçosa UFV-MG

Tese: Estudo Químico de *Mucuna aterrima* e de sua Atividade Nematicida sobre o fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3.

3. TRABALHOS PUBLICADOS

- 3.1 Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Ferraz, S., Peternelli, L. A. Efeito *in vitro* da atividade de extratos obtidos de folhas e caules de *Mucuna aterrima* sobre *Meloidogyne incognita* raça 3. *Ceres*, **41** (237): 506- 513. 1994.
- 3.2 Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Ferraz, S. A nematicidal hydrocarbons from *Mucuna aterrima*. *Phytochemistry*, **42** (4): 997-998. 1996.
- 3.3 Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Ferraz, S., Santos, M. A. dos. Chemical Study of *Mucuna aterrima* and its nematicide activity upon the phytonematode *Meloidogyne incognita* race 3 *Nematol. Medit.* **24** (2): 249-252. 1996.
- 3.4 Nogueira, M. A., Oliveira, J. S. Ferraz, S., Santos, M. A. dos. The activity of *Mucuna deeringiana* and *Chenopodium ambrosioides* crude extrats upon *Meloidogyne incognita* raça 3 *Ceres*, **44** (251):124-127. 1997.
- 3.5 Magalhães, A. F.,Tozzi, A. M. A., Magalhães, E. G., Blanco, I. S. and Nogueira, M. A. Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus latifolius* and *Lonchocarpus muehlbergianus* *Phytochemistry*, **46** (6):1029-1033.1997.
- 3.6. Magalhães, A. F.,Tozzi, A. M. A., Magalhães, E. G., Nogueira, M. A. y Floréz-Roncancio, V. J. Ensayos Biológicos con Extractos Obtenidos de Raíces de *Lonchocarpus latifolius* y de un Nuevo Dibenzoilmetano Aislado. *Ceres* (No prelo).
- 3.7. Magalhães, A. F., Magalhães, E. G., Nogueira, M. A. and Queiroz, S. C. N. HPLC Quantification of Flavonoids in the Roots, Stem, Leaves and Seeds of *Lonchocarpus latifolius* and seasonal variations. *Journal of High Resolution Chromatography* (submetido).

4. RESUMOS PUBLICADOS

- 4.1 Nogueira, M. A. & Dantas, A. M. Dosagem de pilocarpina em extratos vegetais por volumetria. Suplemento do V Encontro de Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG. p. 68, 1987.
- 4.2 Dantas, A. M., Barbosa, M. C., Soares, H., Nogueira, M. A. Utilização de plantas medicinais em saúde coletiva. Suplemento do V Encontro de Pesquisa da faculdade de Farmácia da UFMG. p. 76, 1987.
- 4.3 Nogueira, M. A. & Duarte, D. S. Farmacoquímica de *Salvertia covallariodora* St. Hill *Vochysiaceae* Rev. Farm. Bioq. UFMG. 11(s): 70 1990.
- 4.4 Duarte, D. S. & Nogueira, M. A. Farmacoquímica de *Polygonum acre* HBK *Polygonaceae*. Rev. Farm. Bioq. UFMG 11(s): 73 1990.
- 4.5 Nogueira, M. A., Zani, C. L., Oliveira, A. B. Estudo Fitoquímico da Fração Moluscicida do Latex de *Euphorbia splendens* variedade Hislopia *Euphorbiaceae*. Suplemento do XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, III Simpósio Nacional de Química e Farmacologia de Produtos Naturais. p. 304, 1990.
- 4.6 Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Santos, J. M.; Ferraz, S., Freitas, E. O. Avaliação de Extratos *Mucuna* preta (*Mucuna aterrima*) sobre *Meloidogyne incognita* raça 3. Suplemento do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. p. 27, 1992.
- 4.7 Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Freitas, E. O., Santos, M. A. dos, Ferraz, S. Substância bionemática isolada da parte aérea de *Mucuna aterrima*. Fitop. Bras. 18(s): 302, 1993.
- 4.8 Freitas, E. O., Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Peternelli, L. A. Avaliação da Atividade de Extratos de Erva de Santa Maria (*C. ambrosioides* L.) sobre *Meloidogyne incognita* raça 3. Suplemento do III Simpósio de Iniciação Científica da UFV. p. 137, 1993.
- 4.9 Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Santos, M. A. dos, Ferraz, S. Substâncias Ativas Isoladas do Extrato de *Mucuna aterrima*. Suplemento do VII Encontro Regional da SBQ-MG. p. 28 1993.
- 4.10 Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Ferraz, S., Santos, M. A. dos. Avaliação da atividade de Extratos de *Mucuna deeringiana* (*Mucuna* Cinza) sobre *Meloidogyne incognita* raça 3. Suplemento do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 003, 1994.

- 4.11 Nogueira, M. A., Magalhães, G. E., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A., Sales, B. H. L. N., Blanco, I. S. Contribuição do estudo fitoquímico na classificação Infra-genérica de *Lonchocarpus* (Leguminosae-Papilionoideae). Suplemento da XVII Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares. p. 61, 1995.
- 4.12 Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F. Flavona Isolada das Raízes de *Lonchocarpus latifolius* Willd DC (Timborana). Suplemento da 18^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. PN 043, 1995.
- 4.13 Nogueira, M. A., Magalhães, A. F., Magalhães, E. G., Tozzi, A. M. de A., Blanco, I. S. Importância da fitoquímica na classificação de *Lonchocarpus* (Leguminosae-Papilionoideae) Suplemento da XVIII Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares. p. 135, 1996
- 4.14 Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. Flavonóides Isolados das Raízes de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae. Suplemento da 19^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. PN 023, 1996.
- 4.15 Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. 3,4-metoxi-flavanona isolada das raízes de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae. Suplemento do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 50, 1996.
- 4.16 Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. Flavonóides Isolados das Raízes de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae. Suplemento da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. PN 112, 1997.
- 4.17 Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. Floréz-Roncancio, V. J. Ensayos Biológicos con Extractos Obtenidos de Raíces de *Lonchocarpus latifolius* y de un Nuevo Dibenzoilmetano Aislado. Memórias do V Congresso Colombiano de Fitoquímica pg 70-75, 1997.
- 4.18 Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. Queiroz, S. C. N. Análises de Flavonóides de Raízes, Caule, Folhas e Frutos de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC por CLAE. Suplemento da 7^a Reunião Anual da Sociedade Latino Americana de Cromatografia, 118, 1998.
- 4.19 Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F. Aza-çúcares identificados no extrato metanólico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC. Suplemento do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1998.

Agradecimentos

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

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

À Profa. Dra Eva Gonçalves Magalhães pela orientação deste trabalho e ensinamentos ao longo deste tempo, amizade e compreensão.

Ao Prof. Aderbal Farias Magalhães pelas sugestões e amizade.

À Profa. Dra Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi, pela coleta do material botânico, discussão e amizade.

À Profa. Dra Anita J. Marsaioli pela oportunidade de montar o teste de bioautografia.

À Sônia Cláudia do Nascimento de Queiroz pela amizade paciência e ajuda no trabalho com CLAE.

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

Aos Colegas de grupo e amigos, Carlos, Giordano, Luíz Marcos, Ivani, Mirian, Valéria, Catarina e Rogers pela amizade e pelo convívio agradável, em especial à Ana Lúcia, Celira e Maria Del Pilar pelos bons conselhos, bate-papos e momentos de reflexão.

Aos colegas de laboratório pelo convívio amistoso.

Ao Renato pelo apoio, amizade e compreensão nas horas mais difíceis.

À Mariângela, pela solidariedade, carinho e amizade.

À Teresa e Patrícia que mesmo a distância me deram a força de sua amizade e carinho.

À Maria pela amizade e apoio técnico.

À minha mãe e irmãs pelo amor, incentivo e por sempre acreditaram em mim.

Ao Victor que durante algum tempo tornou a minha vida mais bonita.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que o presente trabalho se tornasse realidade. Em especial àqueles que souberam compreender os altos e baixos dessa convivência.

Este trabalho de pesquisa foi apresentado nos seguintes congressos:

- Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A., Sales, B. H. L. N., Blanco, I. S. Contribuição do Estudo Fitoquímico na Classificação Infra-genérica de *Lonchocarpus* (Leguminosae-Papilionoideae). Suplemento da XVIII Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares. p. 61, 1995.
- Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F. Flavona Isolada das Raízes de *Lonchocarpus latifolius* Willd DC (Timborana). Suplemento da 18^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. PN 043, 1995.
- Nogueira, Magalhães, E. G., M. A Tozzi, A. M. de A., Magalhães, A. F., Blanco, I. S. Importância da Fitoquímica na Classificação de *Lonchocarpus* (Leguminosae-Papilionoideae) Suplemento da XIX Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares.p. 135, 1996.
- Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. Flavonóides Isolados das Raízes de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae. Suplemento da 19^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. PN 023, 1996.
- Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. 3,4-Metoxi-flavana Isolada das Raízes de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae. Suplemento do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 50, 1996.
- Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A., Queiroz, S. C. Análise dos Extratos das Raízes de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC por CLAE Suplemento da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. PN 118, 1997.
- Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. Floréz-Roncancio, V. J. Ensayos Biológicos con Extractos Obtenidos de Raíces de *Lonchocarpus latifolius* y de un Nuevo Dibenzoilmetano Aislado. Memórias do V Congresso Colombiano de Fitoquímica pg 70-75, 1997.
- Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. de A. Queiroz, S. C. N. Análises de Flavonóides de Raízes, Caule, Folhas e Frutos de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC por CLAE. Suplemento da 7^a Reunião Anual da Sociedade Latino Americana de Cromatografia P 118, 1998.
- Nogueira, M. A., Magalhães, E. G., Magalhães, A. F. Aza-açúcares identificados no extrato metanólico de de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC. Suplemento do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1998.

Este trabalho de pesquisa gerou as seguintes publicações:

Trabalho publicado:

Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. A., Magalhães, E. G., Blanco, I. S. and Nogueira, M. A. Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus latifolius* and *Lonchocarpus muehlbergianus* **Phytochemistry**, **46** (6):1029-1033.1997.

Trabalho no prelo:

Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. A., Magalhães, E. G., Nogueira, M. A. y Floréz-Roncancio, V. J. Ensayos Biológicos con Extractos Obtenidos de Raíces de *Lonchocarpus latifolius* y de un Nuevo Dibenzoilmetano Aislado. **Ceres** 1998.

Trabalho submetido:

Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. A., Magalhães, E. G., Nogueira, M. A. and Queiroz, S. C. N. HPLC Quantification of Flavonoids in the Roots, Stem, Leaves and Seeds of *Lonchocarpus latifolius* and seasonal variations. **Journal of High Resolution Chromatography**.

Do conhecimento vem a compreensão; da compreensão vem aquela serenidade e paz que são imensuravelmente maiores do que todo conhecimento e toda a compreensão.... A emoção que nos leva a descobrir, a pesquisar, a pensar nos porquês de tudo, vai guiar nossos caminhos até que possamos entender os mecanismos da vida em toda sua plenitude !

Marisa

Conteúdo

	Páginas
LISTA DE QUADROS.....	XVI
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE FIGURAS.....	XX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXIV
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I	9
ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO ÉTER DE PETRÓLEO DE RAÍZES DE <i>Lonchocarpus latifolius</i>.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Isolamento, Purificação e Identificação dos Constituintes Químicos.....	15
2.1.1. Obtenção dos Extrato das Raízes de <i>Lonchocarpus latifolius</i>.....	15
2.2. Elaboração do Extrato Éter de Petróleo das Raízes.....	16
2.3. Metilação da substância 3.....	32
2.4. Hidrólise ácida da substância 3.....	32
2.5. Elaboração do Extrato Metanólico.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. Flavonas	
3.1.1. Pongaglabrona.....	34
3.1.2. Lanceolatina B.....	37
3.2. Flavonóis	
3.2.1. Ponganpina.....	39
3.2.2. Karangina.....	41

	Páginas
3.2.3. Karanjacromeno.....	43
3.2.4. Pongacromeno.....	45
3.2.5. Substância 7.....	47
3.3. Derivados de Dibenzoilmetano	
3.3.1. Substância 3.....	50
3.3.1. Substância 9.....	59
3.4. Flavanona	
3.4.1. Substância 10.....	61
3.5. Flavanonol	
3.5.1. Substância 11.....	64
3.6. 3,4-dimetoxi-flavana	
3.6.1. Substância 12.....	66
3.7. Aza-açúcares.....	71
Tabelas.....	77
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
CAPÍTULO II.....	83
ANÁLISE DOS EXTRATOS DE <i>Lonchocarpus latifolius</i> POR CLAE.....	83
1. INTRODUÇÃO.....	83
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1. Análise Qualitativa.....	85
2.1.1. Seleção da fase Móvel.....	85
2.1.2. Seleção do comprimento de Onda.....	85
2.2. Análise Quantitativa.....	85
2.2.1. Preparação das Soluções Padrões.....	86
2.2.2. Construção das Curvas de Calibração.....	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95

	Páginas
3.1. Análise Qualitativa.....	95
3.2. Análise Quantitativa.....	101
3.2.1. Extrato Éter de Petróleo das raízes.....	101
3.2.2. Extrato Diclorometânico e Metanólico das raízes.....	102
3.2.3. Extrato Éter de Petróleo de Folhas e Sementes.....	103
3.2.4. Extrato Éter de Petróleo de Casca do Caule.....	103
3.2.5. Análise Sazonal do Extrato Éter de Petróleo das Raízes.....	104
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
CAPÍTULO III	110
BIOENSAIOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS OBTIDOS DAS RAÍZES DE <i>Lonchocarpus latifolius</i>.....	110
1. INTRODUÇÃO.....	110
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	116
2.1. Bioensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> ("Brine Shrimp Letality Test).....	117
2.1.1. Avaliação da toxicidade dos extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico das raízes de <i>L. latifolius</i>	117
2.2. Bioensaio de Inibição de Germinação de sementes de alface.....	118
2.2.1. Avaliação da toxicidade dos extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico das raízes de <i>L. latifolius</i>	118
2.3. Bioensaio de Bioautografia.....	118
2.3.1. Avaliação da atividade bactericida e fungicida dos extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico das raízes de <i>L. latifolius</i>	118
2.3.1.1. Microorganismos utilizados.....	119
2.3.2. Bioensaio de Antibiógrama.....	120
2.4. Bioensaio para atividade larvicida com <i>Aedes aegypti</i>	120
2.4.1. Avaliação da atividade larvicida dos extratos éter de petróleo, e metanólico das raízes de <i>L. latifolius</i>	120
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121

Páginas

3.1. Bioensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> ("Brine Shrimp Letality Test).....	121
3.2. Bioensaio de Inibição de Germinação de sementes de alface.....	122
3.3. Bioensaio de Bioautografia.....	124
3.3.1. Bioensaio de Antibiógrama.....	126
3.4. Bioensaio para atividade larvicida com <i>Aedes aegypti</i>.....	132
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	138
APÊNDICES	
APÊNDICE A	
APÊNDICE B	

Lista de Quadros

CAPÍTULO I

	Páginas
1. Relação entre Fração Eluída/Concentração do Eluente do Extrato de <i>L. Latifolius</i>	16
2. Relação entre Grupo/Fração coletada do extrato de <i>Lonchocarpus latifolius</i> ...	17
3. Relação entre Grupo(fração)/Substância isolada de <i>Lonchocarpus latifolius</i> ...	18
4. Mecanismo para explicar a degradação da substância 3 em meio ácido.....	57
5. Proposta de fragmentação para DMJ e DNJ ($t_R = 22,94$ e $22,66$) peracetilada.	72
6. Proposta de fragmentação para DMDP ($t_R = 22,88$) peracetilada.....	73
7. Proposta de fragmentação para Fagonina ($t_R = 21,62$) peracetilada.....	74
8. Proposta de fragmentação para Homonijirimicina ($t_R = 21,82$) peracetilada....	76

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I

	Páginas
1. Hidrogênios irradiados no espectro de diferença de NOE para a substância 7.....	49
2. Correlações observadas nos espectros de COSY (H-H) e HETCOR (C-H vicinal) para a substância 3.....	55
3. Correlação observada entre C _o -H (J^3) no espectro COLOC para a substância 3.....	55
4. Hidrogênios irradiados no espectro de diferença de NOE para a substância 3.....	56
5. Hidrogênios irradiados no espectro de diferença de NOE para a substância 12.....	68

CAPÍTULO II

1. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de raízes <i>L. latifolius</i> coletadas em agosto de 1994 e 1996.....	87
2. Equações da reta para as substâncias isoladas do extrato éter de raízes de petróleo de <i>L. latifolius</i> coletado em agosto de 1994 e 1996.....	88

	Páginas
3. Dados utilizados para construção das curvas analíticas da substância 13 isolada dos extrato diclorometânico e metanólico das raízes de <i>L. latifolius</i> coletado em agosto de 1994.....	89
4. Equações da reta para a substância 13 isolada dos extratos diclorometânico e metanólico das raízes de <i>L. latifolius</i> coletado em agosto de 1994.....	89
5. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de folhas de <i>L. latifolius</i>	90
6. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de sementes de <i>L. latifolius</i>	90
7. Equações da reta para as substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de folhas e sementes de <i>L. latifolius</i>	91
8. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo da casca do caule de <i>L. latifolius</i>	91
9. Equações da reta para as substâncias isoladas do extrato éter de petróleo da casca do caule de <i>L. latifolius</i>	92
10. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de raízes de <i>L. latifolius</i> coletadas no na primavera (novembro) de 1996 e no verão (fevereiro) de 1997 (Análise sazonal).....	93
11. Equações da reta para as substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de raízes de <i>L. latifolius</i> coletadas na primavera (novembro) de 1996 e no verão (fevereiro) de 1997 (Análise sazonal).....	94

Páginas

12. Concentração das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo das raízes de <i>Lonchocarpus latifolius</i> coletadas no inverno de 1994 e inverno de 1996.....	101
13. Concentração da substância 13 isolada dos extratos diclorometânico e metanólico das raízes de <i>Lonchocarpus latifolius</i> coletadas em 1994.....	103
14. Concentração das substâncias isoladas dos extratos éter de petróleo de sementes e folhas de <i>L. latifolius</i> coletadas em fevereiro de 1997.....	103
15. Concentração das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo da casca do caule de <i>L. latifolius</i> coletadas em agosto de 1997.....	104
16. Análise sazonal das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo das raízes de <i>L. latifolius</i> coletadas no inverno (agosto) de 1996 na primavera (novembro) de 1996 e no verão (fevereiro) de 1997.....	106
17. Variações de temperatura e índice pluviométrico nos meses de agosto de 1996, novembro de 1996 e fevereiro de 1997. Dados fornecidos pelo CEPAGRI.....	106

CAPÍTULO III

1. Bactérias testadas nos extratos das raízes de <i>L. latifolius</i>	124
2. Fungos testados nos extratos das raízes de <i>L. latifolius</i>	126
3. Resultados obtidos do bioensaio de antibiograma para a substância 3.....	133
4. Resultados obtidos nos ensaios biológicos da atividade dos extratos MLR e EPLR de <i>Lonchocarpus latifolius</i> em larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i>	133
5. Resultados obtidos no teste para atividade larvicida com <i>Aedes aegypti</i>	134

Lista de Figuras

CAPÍTULO I

	Páginas
1. Ramos floridos de <i>Lonchocarpus latifolius</i>	12
2. Fluxograma de extração por solventes orgânicos das raízes de <i>L. latifolius</i>	15
3. Flavonóides isolados de <i>L. latifolius</i>	33
4. Proposta de fragmentação para as substâncias 1 e 8.....	35
6. Espectro de UV para a substância 1.....	36
8. Espectro de UV para a substância 8.....	38
11. Proposta de fragmentação para as substâncias 2 e 5.....	40
13. Espectro de UV para a substância 2.....	41
15. Espectro de UV para a substância 5.....	42
19. Proposta de fragmentação para as substâncias 4 e 6.....	44
21. Espectro de UV para a substância 4.....	45

	Páginas
23. Espectro de UV para a substância 6.....	46
25. Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de NOE para a substância 7.....	49
29. Proposta de fragmentação para as substâncias 3 e 9.....	53
30. Espectro de UV da substância 3.....	54
34. Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de NOE. para a substância 3.....	56
38. Espectro de UV para o Pongamol.....	58
49. Espectro de UV da substância 9.....	60
52. Proposta de fragmentação para a substância 10.....	62
53. Espectro de UV da substância 10.....	63
56. Proposta de fragmentação para a substância 11.....	65
57. Espectro de UV da substância 11.....	66
59. Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de NOE. para a substância 12.....	68
62. Proposta de fragmentação para a substância 12.....	69

	Páginas
63. Espectro de UV da substância 12.....	70

CAPÍTULO II

1. Extrato éter de petróleo de raízes (8 Lanceolatina B; 2 Ponganpina; 5 Karanjina; 11 Flavanonol inédito; 3 Dibenzoilmetano inédito).....	96
2. Extrato éter de petróleo de raízes (8 Lanceolatina B; 2 Ponganpina; 5 Karanjina; 11 Flavanonol inédito; 3 Dibenzoilmetano inédito) Condições de análise: Coluna Waters do tipo ODS 3,9x150mm, 4µm, fase móvel: gradiente 80:20 (ACN/H ₂ O)-100 (ACN) em 30min, volume de injeção: 2µL, comprimento de onda: 240nm e fluxo: 0,8mL/min.....	97
3. Extratos diclorometânico e metanólico de raízes (8 Lanceolatina B; 2 Ponganpina; 5 Karanjina; 11 Flavanonol inédito; 3 Dibenzoilmetano inédito) Condições de análise: Coluna Waters do tipo ODS 3,9x150mm, 4µm, fase móvel: gradiente 80:20 (ACN/H ₂ O)-100 (ACN) em 30min, volume de injeção: 2µL, comprimento de onda: 240nm e fluxo: 0,8mL/min.....	98
4. Extrato éter de petróleo de raízes, caule, folhas e sementes (8 Lanceolatina B; 3 Dibenzoilmetano inédito) Condições de análise: Coluna HP do tipo ODS 4,6x100mm, 5µm, fase móvel: gradiente 80:20 (ACN/H ₂ O)-100 (ACN) em 30min, volume de injeção: 2µL, comprimento de onda: 240nm e fluxo: 0,8mL/min.....	100
5. Medicarpina (substância 13).....	102

CAPÍTULO III

1. Efeito dos extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico sobre a germinação de sementes de alface cultivar "grand rapids". A = extrato éter de petróleo; B = extrato diclorometânico; C = extrato metanólico.....	123
--	-----

Páginas

2. Teste de bioautografia com <i>Bacillus subtilis</i>	125
3. Teste de bioautografia com <i>Aspergillus niger</i>	127
3A. Teste de bioautografia com <i>Aspergillus niger</i>	128
4. Teste de bioautografia com <i>Rhizopus orizae</i>	129
5. Teste de bioautografia com <i>Cladosporium cladosporioides</i>	130
6. Halos de inibição da substância 3 nas concentrações indicadas (µg/mL).....	131

Lista de Abreviaturas

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
COLOC	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (C x H) a três ligações
COSY	Espectro bidimensional de correlação homonuclear (H x H) a três ligações
DEPT	Espectro de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização
<i>d</i>	Dublete
<i>dd</i>	Duplo dublete
DLR	Extrato diclorometânico de raízes de <i>Lonchocarpus</i>
EM	Espectro de massas
EPLR	Extrato éter de petróleo de raízes de <i>Lonchocarpus</i>
eV	Eletron volts
HETCOR	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (C x H) a uma ligação
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hertz
<i>m/z</i>	Razão relação massa/carga
M^{+}	Íon molecular
MLR	Extrato metanólico de raízes de <i>Lonchocarpus</i>
<i>m</i>	Multiplete
NOE	Efeito nuclear Overhauser

ppm	Partes por milhão
P. F.	Ponto de fusão
RDA	Retro Diels Alder
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
t	Triplete
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
$[\alpha]_D$	Rotação ótica específica
UV	Ultravioleta

INTRODUÇÃO GERAL

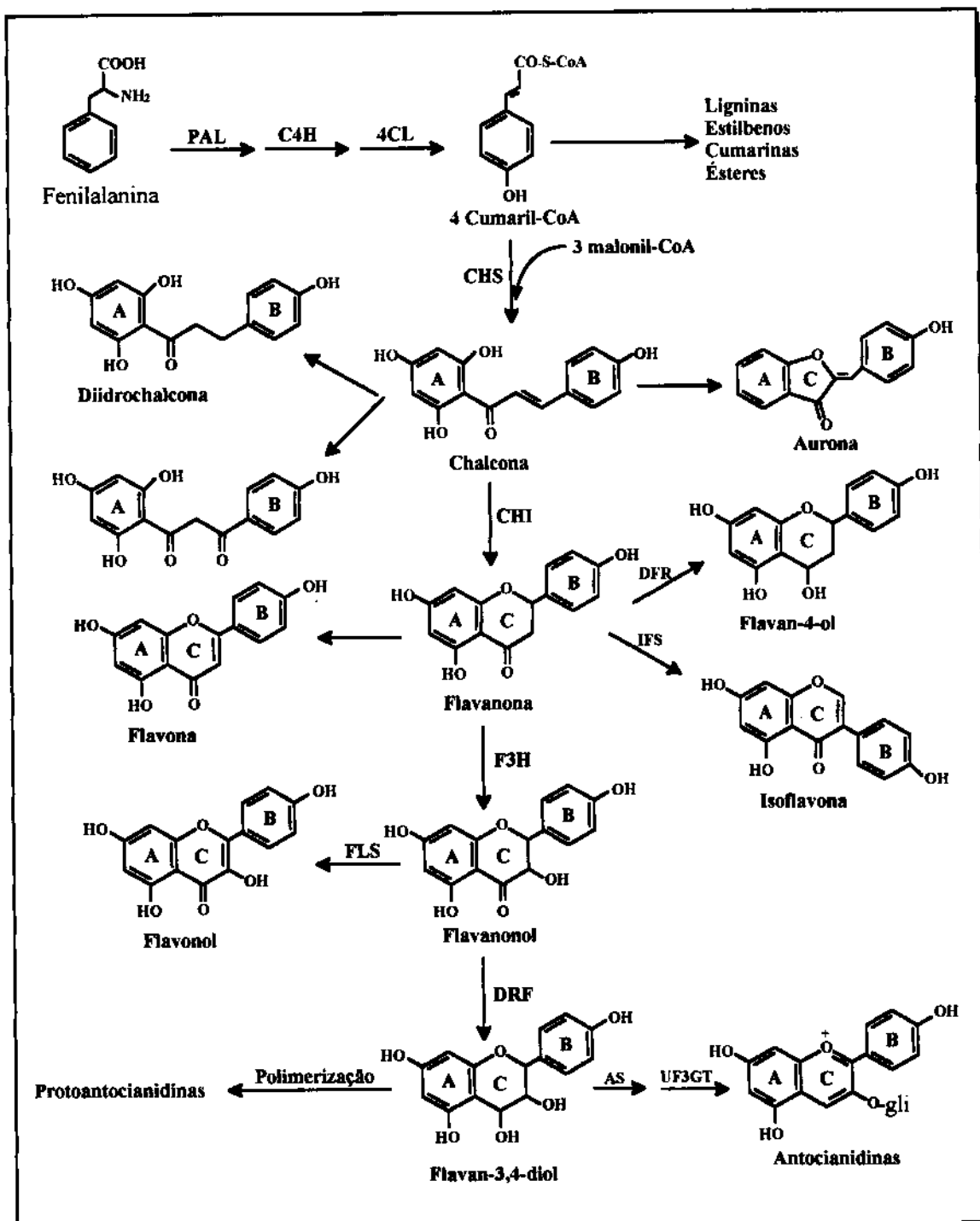
A família Leguminosae pertencente a ordem Rosales é a terceira maior família de plantas floríferas, depois de Asteraceae e Orchidaceae contendo 670 gêneros e aproximadamente 17.500 espécies. É dividida em 3 subfamílias: *Papilionoideae*, *Mimosoideae* e *Caesalpinoideae* e tem distribuição cosmopolita (LEWIS & OWEN, 1989¹).

Esta família é rica em flavonóides, uma das classes de metabólitos secundários mais abundantes em plantas superiores. Seu esqueleto é constituído de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade C3. Dependendo da estrutura desta unidade se é uma cadeia aberta ou cíclica (5 ou 6 membros), assim também como do seu grau de oxidação, eles são divididos em subclasses tais como chalconas, flavonas, flavonóis, flavanas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas auronas etc. Estas por sua vez podem sofrer hidroxilação, alquilação, acilação, glicosilação ou raminosilação, resultando daí a enorme variedade de flavonóides encontrados na natureza (KOES *et alii* 1994²).

A biossíntese dos flavonóides começa com a condensação de uma molécula de 4-cumaril-CoA e três moléculas de malonil-CoA, produzindo a chalcona (Quadro 1).

¹ LEWIS, G. P. e OWEN, P. E. Legumes of ilha de maracá Royal Botanic Gardens Kew 1989 95p.

² KOES, R. E., QUATTROCCHIO, F., MOL, J. M. N. The flavonoids biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* 16 (2):124-132, 1994.



Quadro 1. BIODÍNTISE DE FLAVONÓIDES²: PAL = Fenilalanina amônia-liase; C4H = Cinamato-4-hidroxilase; 4CL = 4-cumaroil-coenzima A ligase; CHS = chalcona.sintetase; CHI = chalcona flavanona isomerase; F3H = Flavanona 3 β -hidroxilase; DFR = Dihidroflavonol 4-redutase; IFS = Isoflavona sintetase; FLS = Flavonol sintetase; AS = Antocianina sintetase; UF3GT = Flavonóide 3-O-glicosiltransferase.

O gênero *Lonchocarpus* (fruto lanceolado) pertence à subfamília *Papilionoideae* e contém cerca de 150 espécies, distribuídas na América tropical, principalmente América do Sul e Central, Antilhas e África. No Brasil é conhecido popularmente por vários nomes tais como aquiui, embira-de-macaco, embira-de-sapo, embira-branca, embira-roxa, ipiá, quina-branca, rabo-mole, rabo-duro, rabo-de-bugio, rabo-de-macaco, timbó, timbó-carajuru, timbó-urucu e sucupira-preta (TOZZI, 1989³).

A importância econômica deste gênero, está no fato de muitas espécies possuírem um potente inseticida vegetal que é extraído das raízes, a rotenona (Figura 1). Este constituinte químico também é encontrado em outros gêneros tais como: *Derris*, *Tephrosia*, *Miletia* e *Mundulea*.

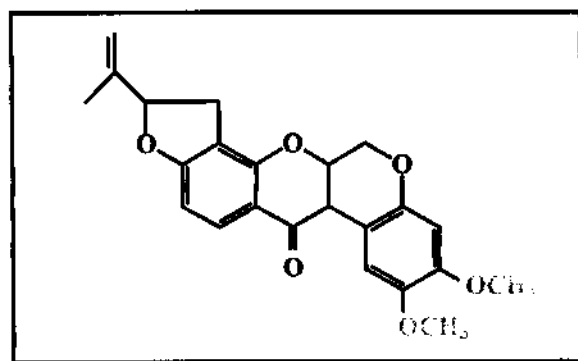


Figura 1. Rotenona substância extraída das raízes de algumas espécies de *Lonchocarpus*

Este gênero foi no passado uma fonte de divisas, pois as raízes eram exportadas para os Estados Unidos em grande quantidade, existindo na década de 30-40, só no Pará 40 indústrias que trabalhavam com a rotenona. Além da importância como inseticida, existem algumas espécies lenhosas que são boas para produção de madeira, dentre elas *Lonchocarpus campestris* Mart. ex Benth., que é

³ TOZZI, A. M. A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil. 1989 341p Tese (Doutor em Biologia). Instituto de Biologia UNICAMP.

recomendado para elaboração de papel jornal (TORTORELLI, 1943, *apud* TOZZI, 1989⁴), e *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassler, que fornece madeira para fabricação de carretas (BURKART, 1952 *ibid.*⁵).

Foi feita uma revisão bibliográfica minuciosa do gênero *Lonchocarpus* até o ano de 1994 (SALES, 1994⁶), onde se verificou que a espécie em estudo é inédita fitoquimicamente assim como as espécies pertencentes à seção na qual ela se inclui como: *L. hedyomus* Miq., *L. ernesti* Harms e *L. spiciflorus* Benth. A partir de 1995 se encontra descrito na literatura o estudo de *Lonchocarpus muehlbergianus* (BLANCO, 1995⁷), *Lonchocarpus subglaucescens* (SALES, 1994), estudados pelo nosso grupo de pesquisa, e *Lonchocarpus longystilus* (SOTELO *et alii*, 1995⁸). Além de flavonóides, foi descrito na literatura (EVANS *et alii* 1985⁹) a presença de aza-açúcares e aminoácidos não proteicos nas sementes de vários *Lonchocarpus* como: *L. subglaucescens*, *L. muehlbergianus*, *L. latifolius*, *L. dipteroneurus*, *L. atropurpureus*, *L. quilleminianus* e etc (Figura 2).

⁴ TORTORELLI, L. A. *apud* TOZZI, A. M. A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil. 1989 341p Tese (Doutor em Biologia). Instituto de Biologia UNICAMP

⁵ BURKART, A. 1952 *apud* TOZZI, A. M. A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil. 1989 341p Tese (Doutor em Biologia). Instituto de Biologia UNICAMP

⁶ SALES, B. H. N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth)- Leguminosae e síntese de β -hidroxichalconas 1994 198p Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Química UNICAMP

⁷ BLANCO, I. S. Flavonóides de *Lonchocarpus muehlbergianus* e síntese de flavanas 4-oxigenadas 1995 143p Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Química UNICAMP

⁸ SOLTELO, A., CONTRERAS, E., FLORES, S. Nutricional value and content of antinutritional compounds and toxics in ten wild legumes of Yucatan Peninsula. *Plant Foods Hum. Nutr.* 47 (2): 115-23, 1995.

⁹ EVANS, V.S. E. FELLOWS L. E. and BELL, A. Distribution and systematic significance of non-protein amino acids and amines in the *tephrosieae*. *Biochem. Syst. & Ecol* 13 (3): 271-302, 1985

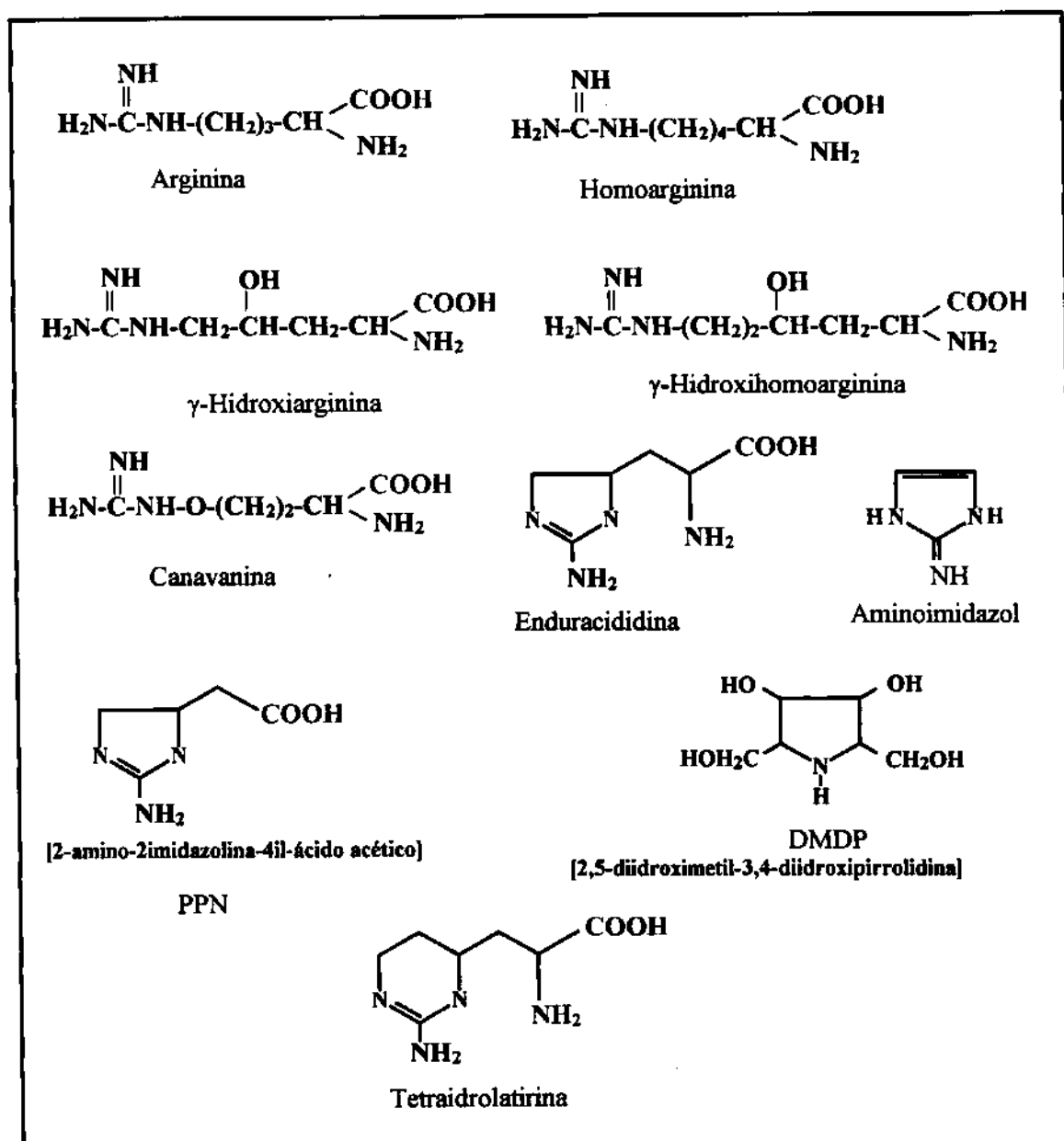


Figura 2. Aminoácidos livres e azo-açúcares presentes em sementes de *Lonchocarpus*

As diversas posições sistemáticas propostas para o gênero *Lonchocarpus* mostraram a ausência de consenso entre os diversos estudiosos do grupo, porque várias de suas características morfológicas intersectam com as de outros gêneros. As afinidades verificadas com gêneros próximos colocam-no numa posição transicional entre tribos, dificultando, portanto uma classificação satisfatória. O último trabalho realizado sobre a ocorrência de *Lonchocarpus* em território

brasileiro baseou-se numa série de caracteres morfológicos. A estrutura da inflorescência destacou-se como um excelente caracter diagnóstico, resultando na detecção de 23 espécies brasileiras e na divisão do gênero em *Lonchocarpus* subg. *Punctati* com 8 espécies e *Lonchocarpus* subg. *Lonchocarpus* com 15 espécies distribuídas em 5 seções, (TOZZI, 1989), onde foram levantadas duas hipóteses sobre a evolução das espécies no gênero *Lonchocarpus*, uma em que elas teriam se originado a partir de um ancestral paniculado e outra na qual a origem seria a partir de um ancestral pseudo racemoso com unidade (bi) triflora. Considerando a hipótese sobre a origem paniculata, as espécies do subgênero *Punctati* seriam mais primitivas do que as do subgênero *Lonchocarpus* onde, as espécies das seções *Unguiflori* e *Laxiflori* poderiam ser consideradas as mais evoluídas. Na outra hipótese, que se aceita como mais primitiva, a inflorescência pseudo-racemosa com duas ou três flores pseudo terminais e eixo de 2^a ordem indeterminado, a evolução ocorreu de um lado para a redução dos eixos (subg. *Lonchocarpus*), enquanto no subg. *Punctati* a evolução ocorreu para o seu desenvolvimento com gradual aumento do número de flores, sendo portanto considerado mais evoluído que subg. *Lonchocarpus*.

O grau de evolução de uma determinada espécie, também poderia ser avaliado pelo seu potencial redox que pode ser expresso indiretamente através dos valores médios da oxidação versus metilação (O/Me) dos seus metabólitos secundários, como proposto na análise quimiossistemática do complexo *Derris-Lonchocarpus* (GOTTLIEB, 1972¹⁰).

O estudo quimiossistemático de um determinado taxon entretanto é mais significativo quanto maior for o número de espécies investigadas seguindo-se a mesma metodologia de análise. Faz-se necessário também investigar a ocorrência

¹⁰ GOTTLIEB, O. R. Micromolecular evolution, systematics and ecology. New York: Spring-Verlag, 170p 1972.

dos marcadores taxonômicos em várias partes da planta como raízes, folhas, frutos e sementes em diferentes épocas (sazonalidade).

O uso terapêutico de flavonóides tem sido amplamente investigado, eles são conhecidos por suas atividades anti-inflamatória e anti-alérgica por suas propriedades antitrombose e vasoprotetora, por inibição da promoção de tumores e como protetores da mucosa gástrica. Também possuem acentuada atividade antitumoral, bactericida e fungicida (EVANS, 1996¹¹).

Considera-se que os flavonóides talvez sejam a classe de compostos mais utilizados para estudos de quimiotaxonomia (HARBONE, 1977¹²). Recentemente avaliou-se o significado da ocorrência de flavonóides para a quimiotaxonomia do gênero *Sophora* (OHYAMA *et alii*, 1995¹³).

Neste contexto o grupo de pesquisa trabalhando sob a orientação dos professores Dr Aderbal F. Magalhães e Dra. Eva G. Magalhães, no Instituto de Química da UNICAMP vem desenvolvendo o estudo sistemático de espécies inéditas de *Lonchocarpus* e gêneros afins com ênfase no isolamento, determinação estrutural e atividade biológica de flavonóides, a fim de reunir dados fitoquímicos que possam corroborar com a segunda hipótese postulada sobre a evolução de *Lonchocarpus* que é a mais aceita no momento, tendo como base a anatomia da estrutura secretora (TOZZI, 1989¹⁴) e ontogenia da inflorescência (TUCKER, 1989¹⁵ *loc. cit.*).

¹¹ EVANS, W. C. Trease and Evans' Pharmacognosy 40 ed. London: Saunders 613p.1996.

¹² HARBONE, J. B., Flavonoids and the evolution of the angiosperms, *Biochem. Syst. & Ecol.* 5, 7-22, 1977

¹³ OHYAMA, M. TANAKA, T. YOKOYAMA, J. INUMA, M. Occurrence of prenylated and oligostilbenes and its significance for chemotaxonomy of genus *sophora* (leguminosae). *Biochem. Syst. & Ecol.* 23 (6): 669-677, 1995.

¹⁴ TOZZI, A. M.A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil. 1989 341p Tese (Doutor em Biologia). Instituto de Biologia UNICAMP

¹⁵ TURCKER, *apud* TOZZI, A. M.A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil. 1989 341p Tese (Doutor em Biologia). Instituto de Biologia UNICAMP

Objetivo

- * Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* isolamento e determinação estrutural dos flavonóides do extrato éter de petróleo obtido das raízes (Capítulo I)
- * Análise qualitativa e quantitativa dos flavonóides isolados das raízes de *Lonchocarpus latifolius*; perfil cromatográfico e análise quantitativa dos flavonóides em folhas, casca do caule e sementes; análise sazonal dos flavonóides isolados das raízes coletadas no inverno, primavera e verão (Capítulo II)
- * Testes biológicos (toxicidade com *Artemia salina*, bioautografia, inibição da germinação de sementes de alface e larvicida com *Aedes aegypti*) com os extratos das raízes de *Lonchocarpus latifolius* e com a substância 3 (Capítulo III)

CAPÍTULO I

Isolamento e Determinação Estrutural dos flavonóides do Extrato Éter de Petróleo de Raízes de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC

1. INTRODUÇÃO

Lonchocarpus latifolius (Willd) D.C. (Figura 1) é uma arvoreta de 3-8 m de altura, muito raramente árvore de porte maior, corpulenta com tronco quase sempre inclinado e ramos compridos, escandentes oriundos deste a parte basal e relativamente esparsos no ápice da árvore, casca lisa ou com estrias longitudinais, marrom a cinza-amarelada; ramos lenhosos espessos, estriados, glabros com lenticelas pequenas, congestas marrons ou esbranquiçadas, quando novas pubérulos, com as terminações angulares e com os bordos arredondados, semelhantes ao osso fêmur; estipulas 2, opostas e caducas. Folhas 5 ou 7 folioladas, muito raramente 9 folioladas (Jamaica ou raro paripenados 4, 8 ou 10 folioladas), alterno espiculadas no ápice dos ramos jovens, congestos, às vezes aparecendo subpomos; pecíolo lenhoso, espesso, caniculado, glabrescente, de 4-8, 5-12 cm de comprimento ou mais, maior que 1,5 vezes o comprimento da raquis com pulvínulo rugoso, liso na região correspondente à face inferior do folíolo; raquis semelhante ao pecíolo, achatada ventualmente, de (2,5-) 5-8 cm de comprimento ou mais; peciólulo canaliculado, de 5-8 mm de comprimento; folíolos de aspecto variado dependendo da fenologia da planta, membranáceo, dicolores, ligeiramente lustrosos na face superior verde-amarelados, criso-seríceos na face

inferior, principalmente sobre as nervuras, que são muito evidentes quando as folhas são jovens, nas folhas adultas grandes, papiráceas a cartáceas, verde-brilhantes, com face superior verde mais escura e glabra, inferior glaucescentes com esparsos pêlos curtos e adpressos com nervuras principal e secundárias amareladas ou avermelhadas e oblíquos em ambas as faces e proeminente na inferior, margem resoluta dando aspecto de textura mais espessa, discolores, com 6-10 nervuras secundárias, ovais a oval lanceoladas, com ápice natural, acuminado e mucronado, depois mais longos, predominantemente subelípticos. Os basais ovais e os terminais oboval elípticos, com ápice obtuso e acuminado-mucronado, com acumem curto ou longo, de até 1,5 cm de comprimento, base subarredondada ou largo-cuneada, as vezes assimétrica, de 8-16 (-24) cm x 3-8 (-12) cm.

Inflorescência composta de 1-6 pseudo ráceno densifloros, muito próximos. Fruto curto-estipulado (estipe de 3 mm de comprimento) compresso, elíptico a semi elíptico, ápice e base atenuado, com 1-3 sementes, de 5-8 cm x 2-2,3 cm, semente marrom, subarredondada, compressa, com endosperma branco-esverdeado e cotilédones verdes. Infrutescência com 1-15 frutos desenvolvidos. O espécimen em estudo é classificado como:

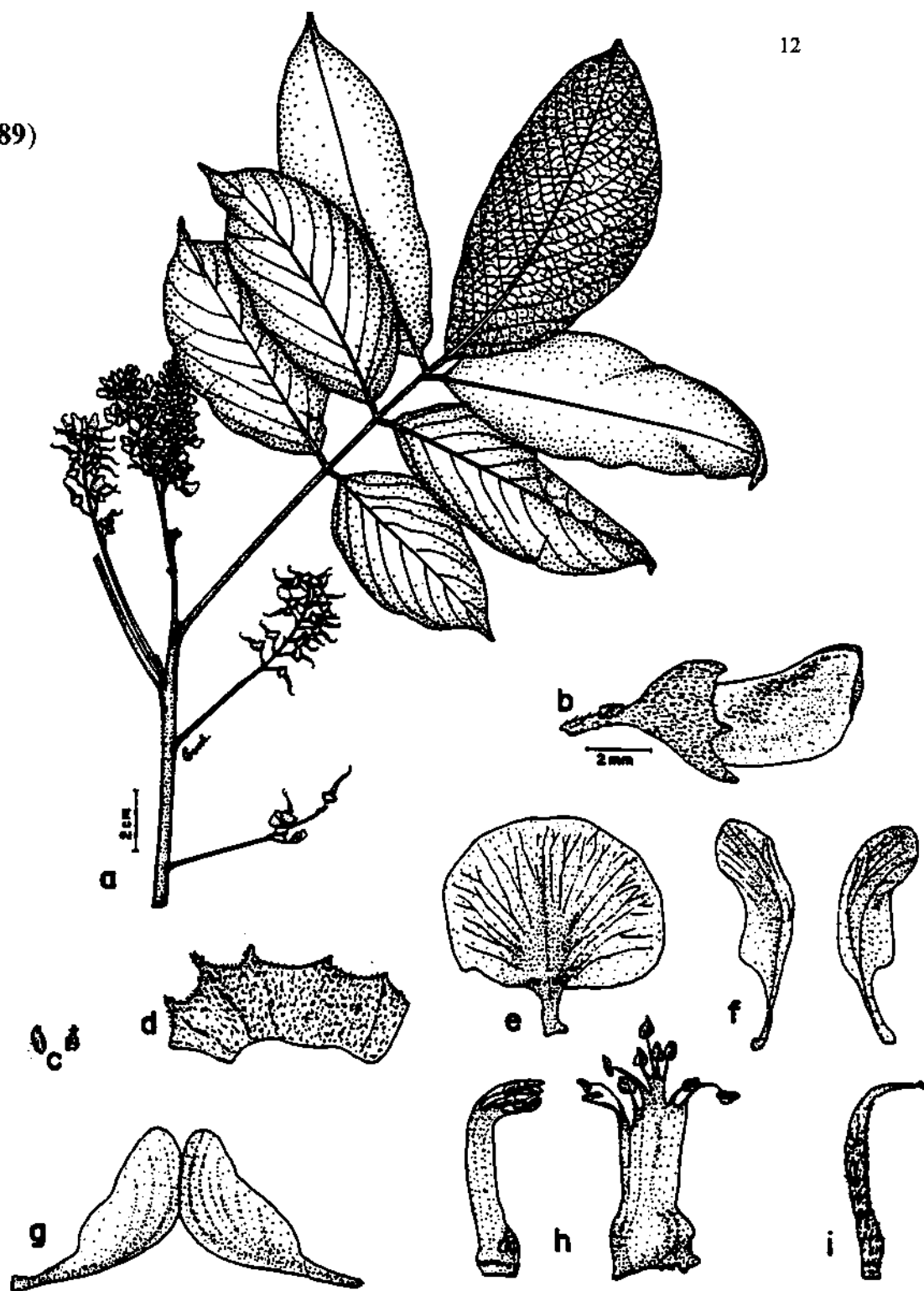
Família: Leguminosae
Subfamília: *Papilionoideae*
Tribo: *Mellettieae*
Sub-tribo: *Lonchocarpinae*
Gênero: *Lonchocarpus*
Sub-gênero: *Lonchocarpus*
Seção: *Densiflori*
Espécie: *latifolius*

É encontrado amplamente distribuído pelas Antilhas, tendo sido confirmado sua ocorrência nas grandes Antilhas (Cuba, Ilhas de Pinos, Jamaica, República Dominicana, Porto Rico) e nas Pequenas Antilhas (Guadalupe, Dominica, Martinica e Trinidad), América Central (Belize, Costa Rica, e Panamá) e no Norte da América do Sul (Colômbia e Venezuela, Guiana, Guiana Francesa e

Brasil). No Brasil a espécie foi encontrada nos Estados do Pará e São Paulo e cultivada em Minas Gerais e Rio de Janeiro. Ocorre em altitudes que variam desde o nível do mar até 800m.

Sinônima Científica: *Robinia nicou*, *Robinia scandens*, *Robinia sepium*, *Dalbergia pentaphylla*, *Dalbergia heptaphylla*, *Lonchocarpus pentaphyllus*, *Lonchocarpus heptaphyllus*, *Lonchocarpus swartzu*, *Lonchocarpus discolor*, *Lonchocarpus oxycarpus*, *Derris latifolia* (Willd), *Amerimnum latifolium*, *Dalbergia macrophylla*, *Myrospermum frutescens*. (TOZZI, 1989).

(TOZZI, 1989)

*Lonchocarpus latifolius* (Willd.) DC

(a) ramo com inflorescência; (b) flor; (c) bractéolas; (d) cálice;
 (e) estandarte; (f) asas; (g) quilha; (h) androceu; (i) gineceu.

Figura 1. Ramos floridos de *Lonchocarpus latifolius*

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico foi coletado e identificado pela profa. Dra Ana Maria de Azevedo Tozzi, na Fazenda Santa Elisa, Monjolinho no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), estando depositada uma excicata de nº 21974 no herbário UEC, da Universidade Estadual de Campinas.

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

Os espectros no ultravioleta foram obtidos em espectrômetro HP 8452A Hewlett Packard-Diode Array.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer modelo 1600 (FTIR) em pastilhas de KBr (para sólidos) ou em filme líquido de CH₂Cl₂.

Os valores de rotação óptica ($[\alpha]_D$) foram medidos em um polarímetro Carl Zeiss Jena Polamat A com lâmpada de mercúrio (546 nm) e posteriormente corrigidos para o sódio segundo as relações abaixo:

$$[\alpha]_{Hg} = \frac{[\alpha]_{obs}}{c \times l}$$

$$[\alpha]_{Hg} = 1,175 [\alpha]_{Na}$$

$$[\alpha]_{obs.} = [\alpha]_{20} [1 + 0,000143 (t - 20)]$$

onde : c = concentração da amostra (mg/mL)

l = comprimento da cela (0,1 dm)

$[\alpha]_{obs}$ = rotação óptica lida no aparelho

t = temperatura (°C)

Os espectros de massas foram obtidos nos espectrômetros HP 5988 Hewlett Packard (quadrupolo) operado a baixa resolução (1000), utilizando-se a técnica de impacto eletrônico a 70 eV e VG Autospec operado a alta resolução (10.000), utilizando-se a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

As análises por cromatografia gasosa foram obtidas em um cromatógrafo gasoso CG Hewlett-Packard HP 5890-série 2 acoplado a espectrômetro de massas HP 5970, usando-se coluna Ultra 2, capilar de 25 m x 0,2 mm (i.d.) x 0,33 μ m, com varredura de massa (m/z 40 a 500).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT, diferença de NOE, COSY, HETCOR e COLOC foram obtidos em espectrômetros Brucker AC-300/P e Varian (Gemini-300). Para o experimento COLOC foi utilizada uma constante de acoplamento $J = 8\text{-}10$ Hz. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido DMSO-d_6 , usando-se como referência interna tetrametilsilano (TMS) para espectros de RMN ^1H .

As colunas de cromatografia (CC) foram recheadas com sílicagel 60 (70-230 mesh) Merck

As cromatografias em camada delgada preparativa (CCP) foram feitas em sílicagel G e sílicagel GF₂₅₄ Merck na proporção de 2:1, sobre suporte de vidro (espessura de 1mm)

As cromatografia em camada delgada foram feitas em cromatofolhas de alumínio sílicagel G F₂₅₄ 0,2 nm Art. 1.05554 Merck

Reveladores: Lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e solução de Anisaldeído/ácido acético modificado (Reativos Merck, 1971), por nebulização em placa seguida de aquecimento.

2. 1. Isolamento, Purificação e identificação dos Constituintes Químicos de *Lonchocarpus latifolius*

2. 1. 1. Obtenção dos extratos das raízes de *Lonchocarpus latifolius*

Foram coletados 1,797 kg de raízes de *Lonchocarpus latifolius* no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), após a frutificação. O material foi seccionado e seco em estufa não ventilada, a 40 °C por 14 dias. As raízes foram pulverizadas em moinho de faca Wiley fornecendo 713,90 g de pó, que foi extraído sucessivamente com cada um dos seguintes solventes: éter de petróleo (EP), diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (MeOH). Os extratos foram obtidos à quente em soxhlet, e concentrados em evaporador rotatório até remoção completa dos solventes (Figura 2).

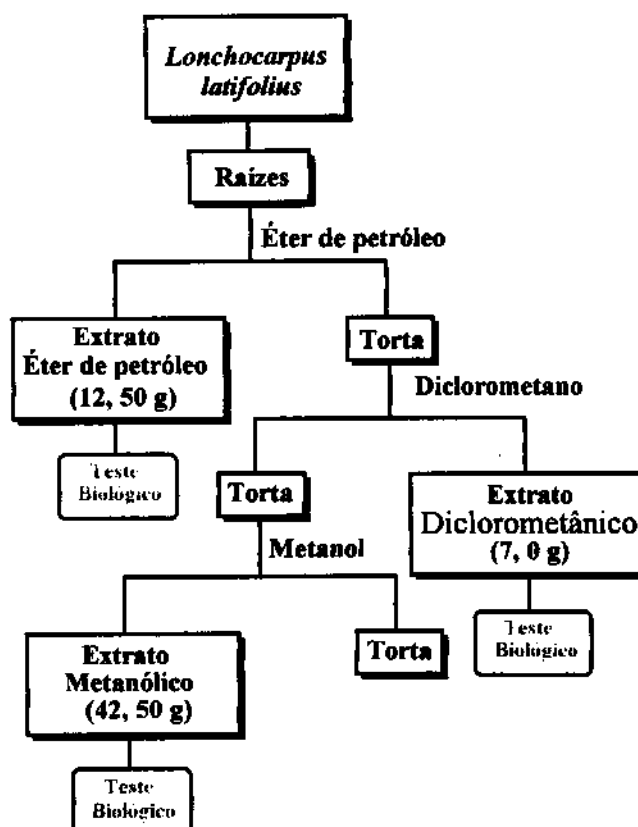


Figura 2. Fluxograma de Extração por Solventes Orgânicos das Raízes de *Lonchocarpus latifolius*

2.2. Elaboração do Extrato Éter de Petróleo das Raízes

Após a evaporação do solvente, o extrato (6,0 g) foi cromatografado em coluna de sílica-gel de 70-230 mesh (240 g), refrigerada com camisa de água a pressão ambiente, coletando-se 283 frações de 200 mL, utilizando-se como eluentes éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e metanol, conforme mostrado no Quadro 1.

Quadro 1. Relação entre Fração Eluída/Concentração do Eluente do Extrato de *L. Latifolius*.

Frações	Eluentes
1 a 25	Éter de Petróleo
26 a 45	Éter de Petróleo/Clorofórmio (50,0:50,0 v/v)
46 a 55	Éter de Petróleo/Clorofórmio (75,0:25,0 v/v)
56 a 83	Clorofórmio
84 a 116	Clorofórmio/Acetato de Etila (97,5:2,50 v/v)
117 a 142	Clorofórmio/Acetato de Etila (95,0:5,00 v/v)
143 a 156	Clorofórmio/Acetato de Etila (92,5:7,50 v/v)
157 a 185	Clorofórmio/Acetato de etila (90,0:10,0 v/v)
186 a 190	Clorofórmio/Acetato de Etila (87,5:12,5 v/v)
191 a 194	Clorofórmio/Acetato de Etila (85,0:15,0 v/v)
195 a 199	Clorofórmio/Acetato de Etila (75,0:25,0 v/v)
200 a 217	Clorofórmio/Acetato de etila (50,0:50,0 v/v)
218 a 233	Clorofórmio/Acetato de etila (25,0:75,0 v/v)
234 a 270	Acetato de etila
271 a 283	Acetato de etila/Metanol (75,0:25,0 v/v)

As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica e reunidas em 45 grupos (Quadro 2), sendo prioritariamente elaboradas de acordo com a quantidade de material contido e complexidade da mistura (Quadro 3).

Quadro 2. Relação entre Grupo/Fração coletada do extrato de *Lonchocarpus latifolius*.

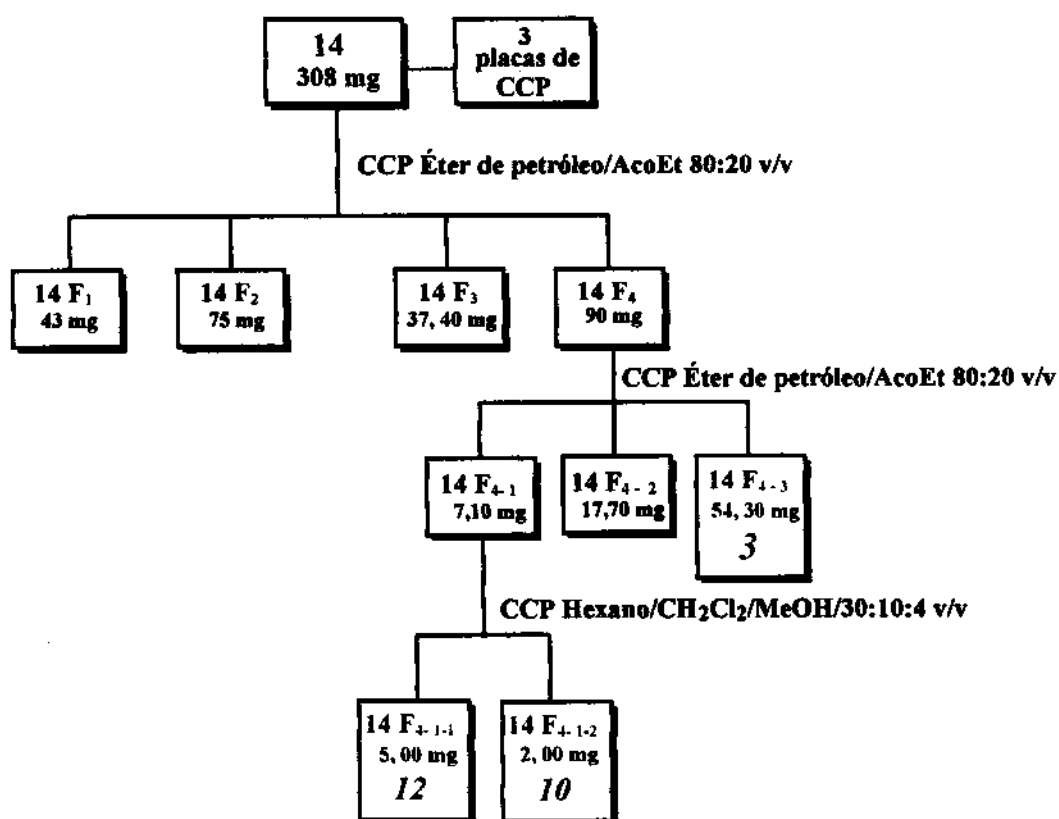
Grupos	Frações	Massa (mg)	Grupos	Frações	Massa (mg)
1	1 a 6	264,00	24	98 a 99	208,30
2	7 a 8	18,40	25	100 a 101	173,40
3	9 a 13	10,40	26	102 a 105	199,40
4	14 a 15	3,20	27	106 a 114	91,00
5	16 a 19	4,20	28	115 a 124	90,00
6	20 a 21	7,10	29	125 a 129	22,40
7	22 a 25	6,20	30	130 a 133	13,90
8	26 a 28	24,00	31	134 a 136	19,70
9	29	11,80	32	137 a 142	33,20
10	30 a 41	194,60	33	143 a 156	57,40
11	42 a 49	29,90	34	157 a 163	20,00
12	50	20,30	35	164 a 171	34,30
13	51 a 55	264,60	36	172 a 177	27,90
14	56 a 59	307,90	37	178 a 185	29,70
15	60 a 61	437,50	38	186 a 190	35,90
16	62 a 66	846,20	39	191 a 199	84,20
17	67 a 69	106,70	40	200 a 203	39,50
18	70 a 75	129,00	41	204 a 215	67,60
19	76 a 83	73,10	42	216 a 230	64,00
20	84 a 87	523,20	43	231 a 239	28,50
21	88 a 89	66,10	44	240 a 263	48,70
22	90 a 95	318,80	45	263 a 283	54,00
23	96 a 97	136,60	Total		5.246,80

Quadro 3. Relação entre Grupo(fração)/Substância isolada de *Lonchocarpus latifolius*.

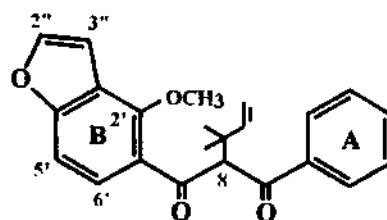
Grupo	Fração	Quantidade usada (mg)	Substâncias isoladas	Quantidade (mg)	Classe
14	56 a 59	307,90	3	54,50	Dibenzoilmetano
			10	2,00	Flavanona
			12	5,00	3,4 dimetoxiflavona
15	60 a 61	438,00	3	125,00	Dibenzoilmetano
			11	3,00	flavanonol
16	62 a 66	407,00	3	276,00	Dibenzoilmetano
17	67 a 69	87,00	3	12,00	Dibenzoilmetano
18	70 a 75	129,00	3	11,00	Dibenzoilmetano
			9	3,00	Dibenzoilmetano
21	88 a 89	66,10	5	7,00	Flavonol
22	90 a 95	318,80	5	154,80	Flavonol
			8	3,00	Flavona
23	96 a 97	102,70	8	32,00	Flavona
			4	6,00	Flavonol
25	100 a 101	173,40	2	5,00	Flavonol
			4	6,00	Flavonol
27	106 a 114	91,00	6	7,00	Flavonol
			8	3,00	Flavona
			4	2,00	Flavonol
28	115 a 124	90,00	1	8,00	Flavonol
33	143 a 156	57,40	7	3,00	Flavonol

A seguir se encontram os fluxogramas correspondentes às análises por cromatografia em camada preparativa de todos os grupos mostrados no quadro 3, seguido das estruturas das substâncias isoladas e dos respectivos dados físicos.

Grupo 14



2'-metoxi-8-(α,α -dimetilalil)-furano-(2'',3'':4',3')-dibenzoilmetano



Substância 3

Aspecto físico: Oleoso

$[\alpha]_D^{20}$: +28,3 (*c* 0,84, CH₂Cl₂).

UV: (*c* 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 239 (3,44).

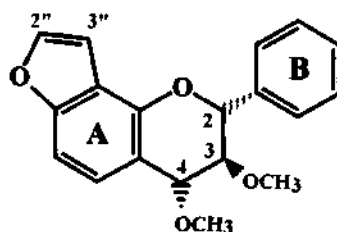
IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹(Filme CH₂Cl₂): 3055, 2957, 1698, 1597, 1355, 1265, 1074, 738.

EM alta resolução *m/z* (%): encontrado 362,14418 [M⁺] (calculado para C₂₃ H₂₂ O₄ 362,15180) 362 (12), 334 (8), 331(4), 319 (8), 263 (42), 175 (100), 160 (30), 132 (5), 105 (37), 77 (27).

RMN ¹H: Tabela 1D

RMN ¹³C: Tabela 2B

(2,3-*trans*-3,4- *trans*)-3,4-dimetoxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavana



Substância 12

Aspecto físico: Cristal (Solvente CH₂Cl₂).

$[\alpha]_D^{20}$: +21,15 (*c* 0,4, CH₂Cl₂).

PF: 81,9-82,2 °C

UV: (*c* 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 248 (4,43), 256 (4,44).

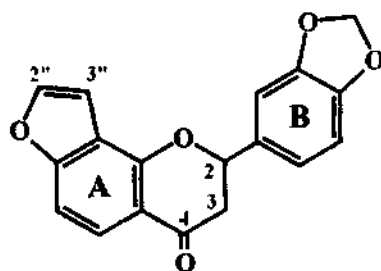
IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹(KBr): 2926, 2857, 1622, 1602, 1474, 1142, 1067, 1017.

EM alta resolução *m/z* (%): encontrado 310,11957 [M⁺] (calculado para C₁₉ H₁₈ O₄ 310,12051) 310 (23), 176 (100), 161 (64), 147 (47), 134 (68), 105 (15), 91 (85), 77 (38).

RMN ¹H: Tabela 1C

RMN ¹³C: Tabela 2A

3',4'-metilenodioxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavanona



Substância 10

Aspecto físico: Oleoso

$[\alpha]_D^{20}$: Não determinado.

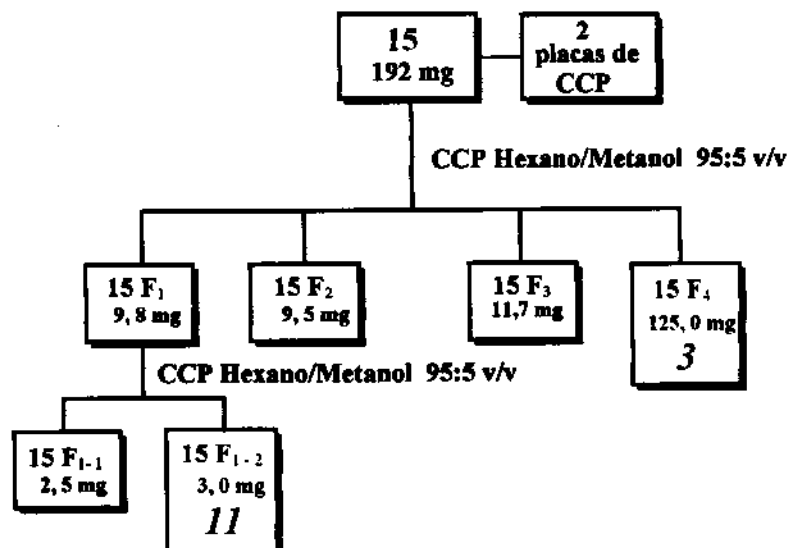
UV: (c. 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 238 (4,61).

IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 2922, 2852, 1678, 1459, 1089, 1033, 922.

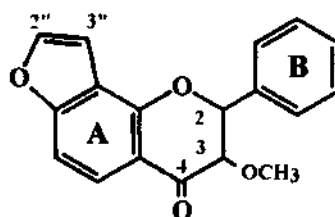
EM: m/z (%): 308 $[M^+]$ (20), 161 (12), 160 (27), 149 (45), 148 (100), 133 (14), 132 (6), 121 (7).

RMN ^1H : Tabela 1A

Grupo 15



3-metoxi-(2'',3'': 7,8)-furanoflavanona



Substância 11

Aspecto físico: Sólido amorfo incolor.

$[\alpha]_D^{20}$: Não determinado.

PF: Não determinado.

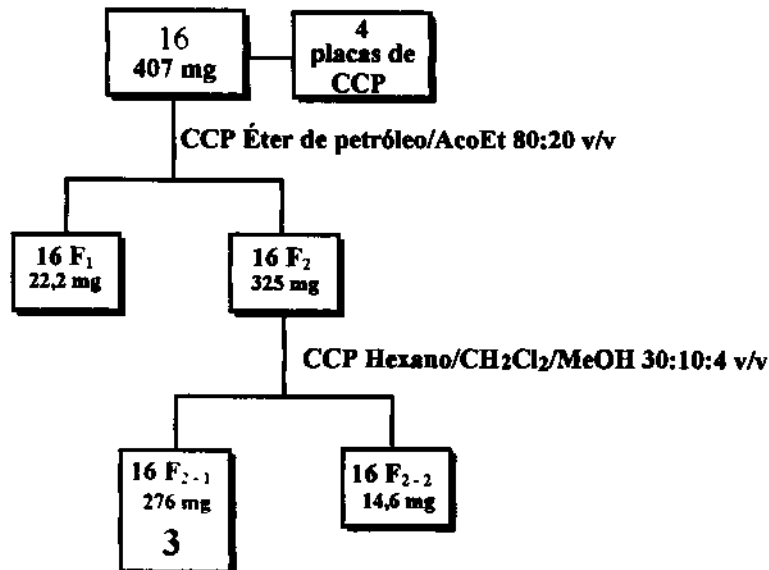
UV: (c 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm ($\log \epsilon$): 240 (4,74)

EM alta resolução: encontrado 294,08935 $[M^+]$ (calculado para $C_{18}H_{14}O_4$ 294,08921).

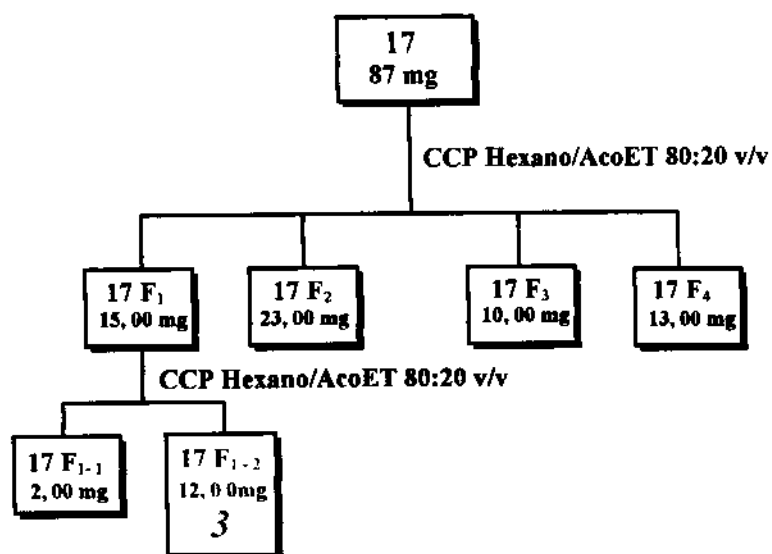
EM: m/z (%): 294 $[M^+]$ (9), 160 (16), 134 (100), 91 (30), 105 (4), 77 (9).

RMN 1H : Tabela 1C.

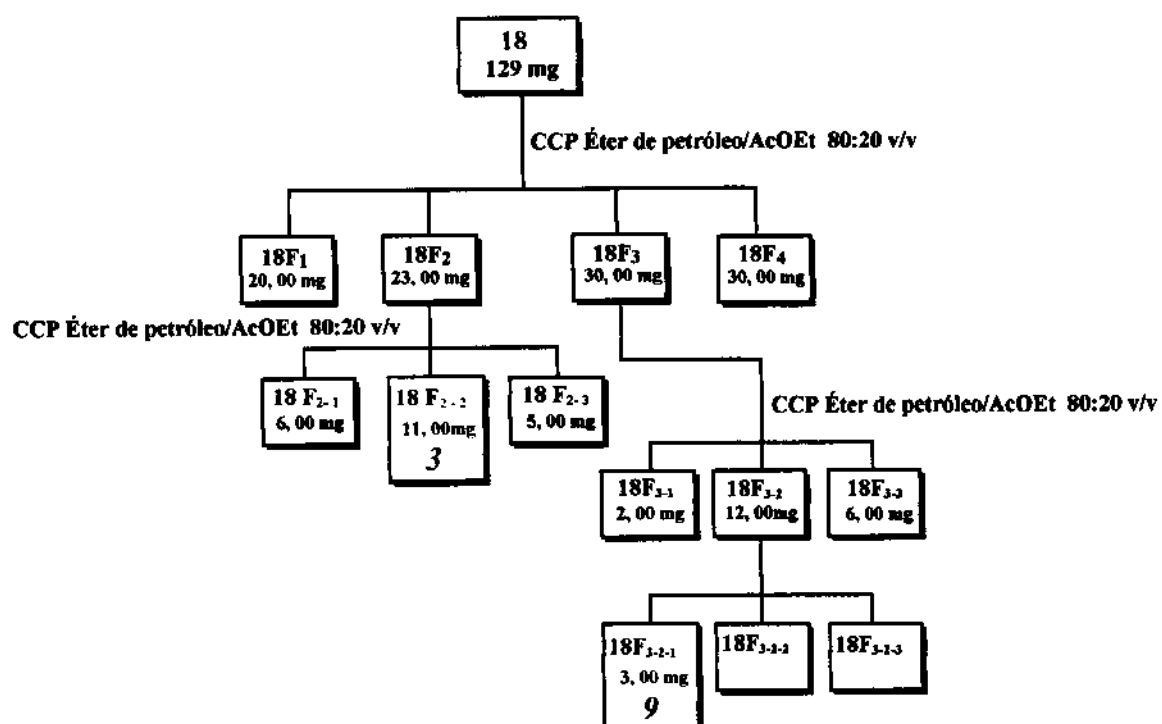
Grupo 16



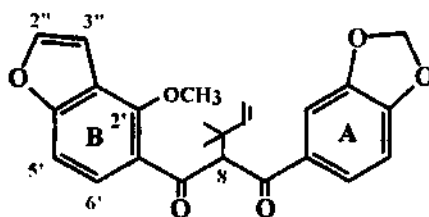
Grupo 17



Grupo 18



**3,4-metilenodioxi-2'-metoxi-8-(α,α -dimetilalil)-furano-(2'',3'':4',5')-
dibenzoilmetano**



Substância 9

Aspecto físico: Oleoso

$[\alpha]_D^{20}$: Não determinado.

UV: (c 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 236 (3,47).

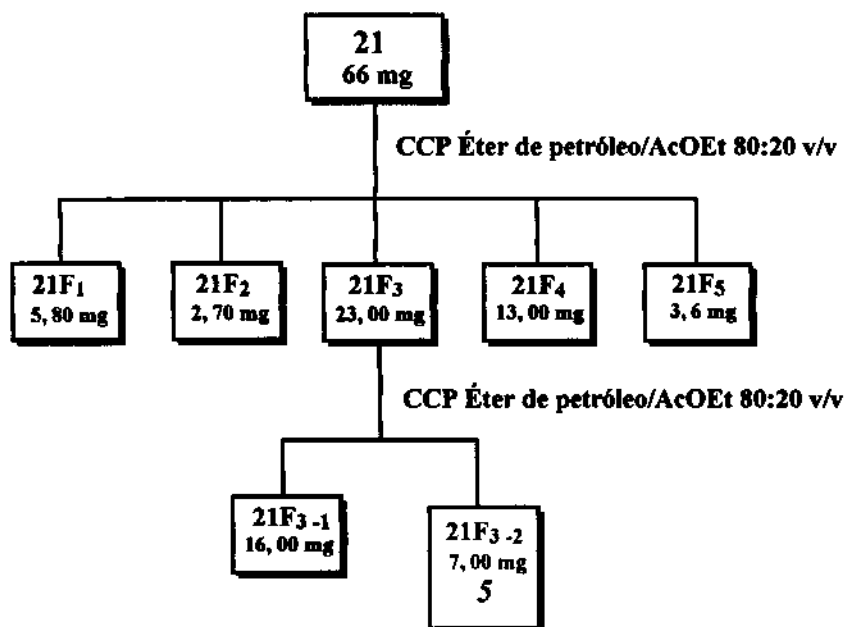
IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (Filme CH_2Cl_2): 2933, 2856, 1689, 1657, 1440, 1262, 1074, 1034, 922.

EM: m/z (%): 406 [M^+] (0,5), 307 (5), 175 (100), 160 (19), 149 (17), 132 (3), 121 (3).

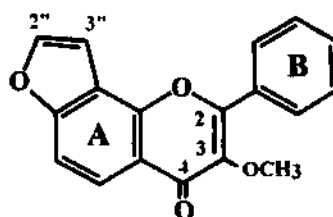
RMN ^1H : Tabela 1D

RMN ^{13}C : Tabela 2B

Grupo 21



3-metoxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavona
Karanjina



Substância 5

Aspecto físico: Sólido amorfo incolor.

PF: 154-157°C.

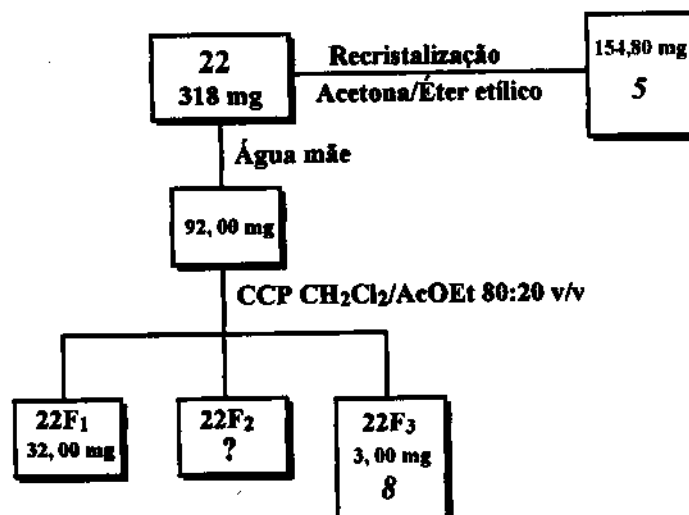
UV: (*c* 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm ($\log \epsilon$): 268 (3,16), 302 (3,24).

IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 2925, 2844, 1639, 1624, 1227, 1164, 1127 1035.

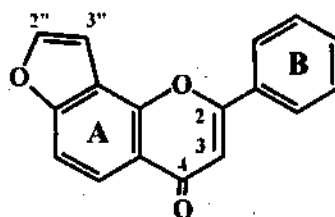
EM: m/z (%): 292 [M^+] (54), 291 (100), 160 (43), 132 (11), 105 (10), 77 (23).

RMN ^1H : Tabela 1C.

Grupo 22



(2'',3'':7,8)-furanoflavona
Lanceolata B



Substância 8

Aspecto físico: Sólido amorfo incolor

PF: 128-131 °C

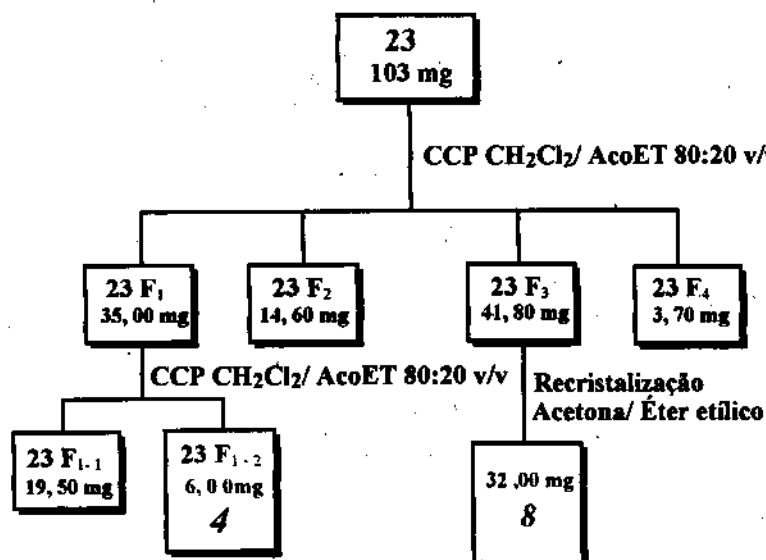
UV: (*c* 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm ($\log \epsilon$): 264 (3,40), 298 (3,52).

IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 3105, 2925, 2361, 1636, 1362, 1070.

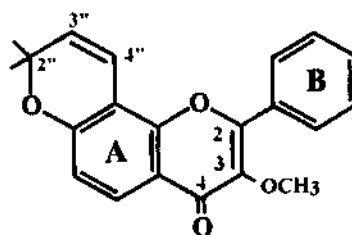
EM: m/z (%): 262 [M^+] (54), 160 (100), 132 (13), 105 (2), 102 (3), 77 (23).

RMN ^1H : Tabela 1C.

Grupo 23



3-metoxi-2",2"-dimetilpirano-(5",6":8,7)-flavona
karanjacromeno



Substância 4

Aspecto físico: Cristais (Solvente CH₂Cl₂).

PF: 146-147°C.

UV: (*c* 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 230 (5,79), 270 (3,49), 328 (3,15).

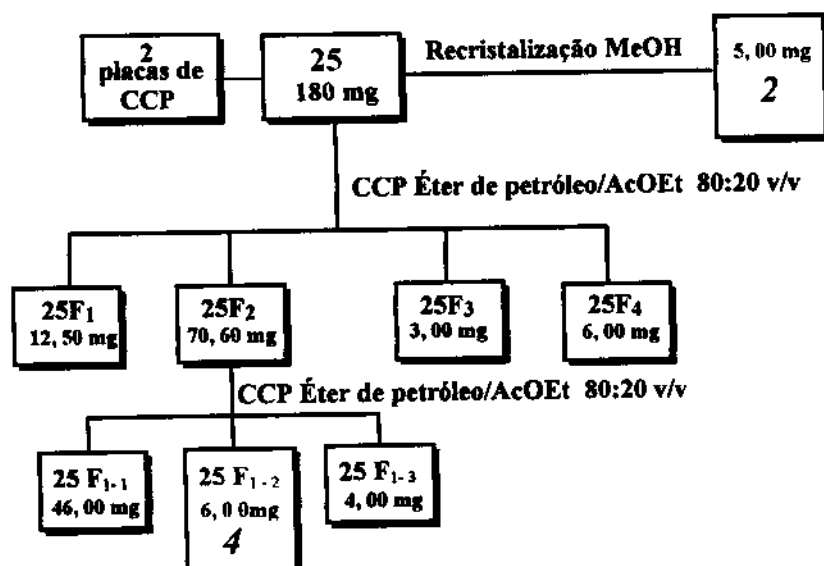
IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹(KBr): 2956, 2924, 2852, 1644, 1628, 1112, 1039.

EM: *m/z* (%): 334 [M⁺] (46), 333 (57), 319 (100), 187 (34), 159 (22), 105 (15), 77 (43).

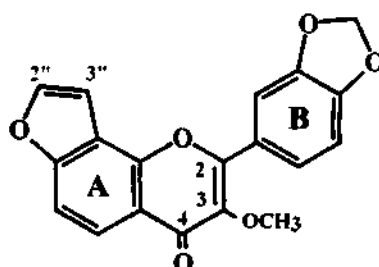
RMN ¹H: Tabela 1B

RMN ¹³C: Tabela 2A

Grupo 25



3-metoxi-3',4'-metilenodioxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavona
Pongapina



Substância 2

Aspecto físico: Cristal (Solvente CH₂Cl₂).

PF: 187-188 °C.

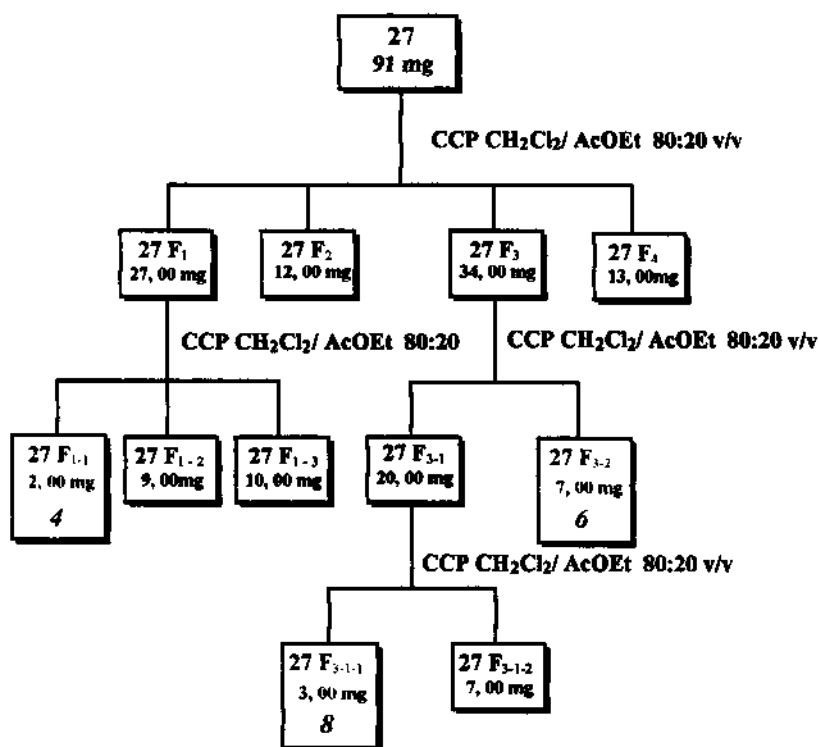
UV: (c 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 250 (5,19), 334 (5,34).

IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹(KBr): 2922, 2867, 1639, 1623, 1445, 1258, 1034, 952.

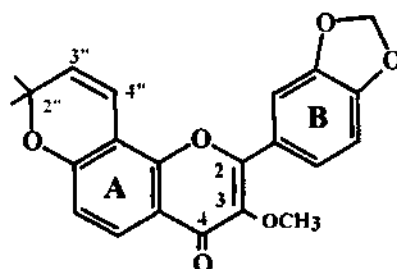
EM: m/z (%): 336 [M⁺] (11), 335 (12), 176 (2), 160 (100), 132 (13).

RMN ¹H: Tabela 1A

Grupo 27



3-metoxi-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':8,7)-3',4'-metilenodioxiflavona
Pongacromeno



Substância 6

Aspecto físico: Sólido amorfo incolor.

PF: 179-182 °C.

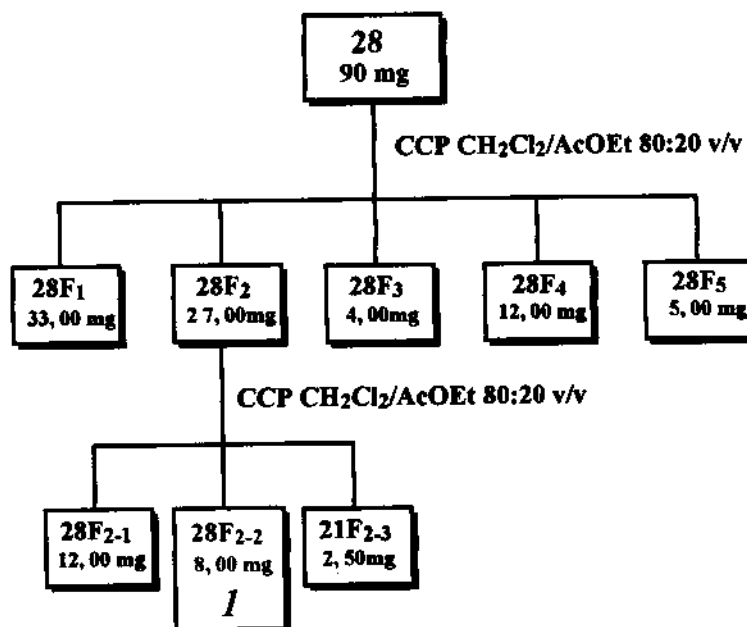
UV: (*c* 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 272 (3,36), 346 (3,19).

IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 2968, 2924, 2844, 1630, 1251, 1118, 1040, 957.

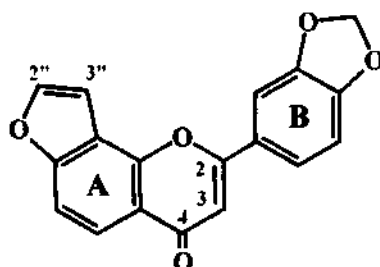
EM: m/z (%): 378 [M^+] (80), 377 (80), 363 (100), 187 (54), 159 (13), 149 (11), 121 (8%).

RMN ^1H : Tabela 1B.

Grupo 28



3',4'-metilenodioxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavona
Pongaglabrona



Substância 1

Aspecto físico: Cristais (Solvente CH₂Cl₂).

PF: 221-222 °C.

UV: (c 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 248 (5,39), 328 (3,33).

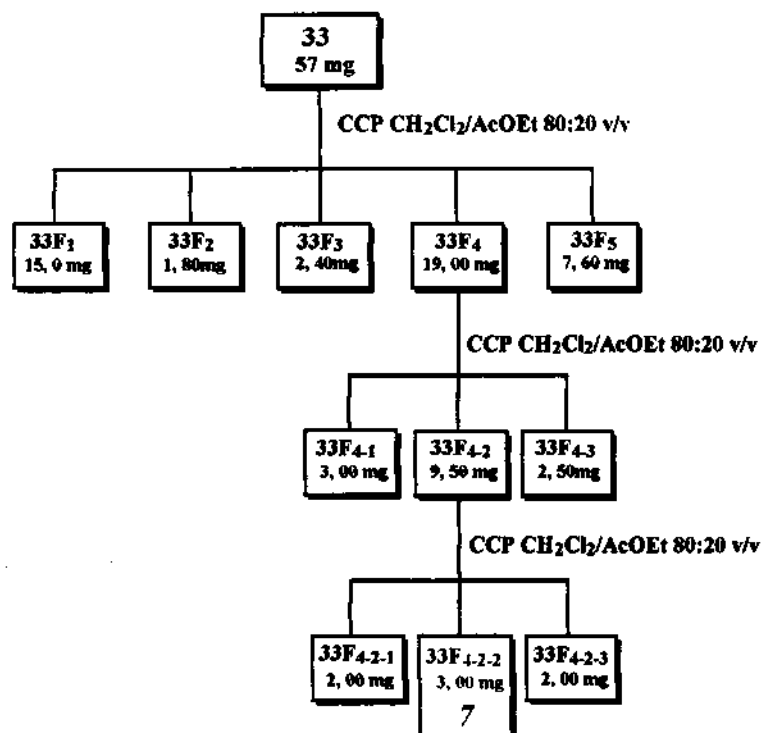
IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹(KBr): 2922, 2856, 1640, 1446, 1257, 1067, 1038, 906.

EM: m/z (%): 306 [M⁺] (95), 160 (80), 146 (100), 149 (5), 132 (16), 121 (3), 77 (28).

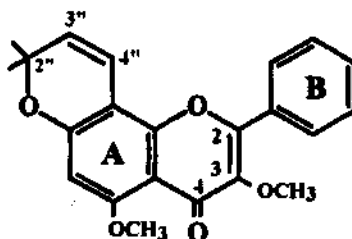
RMN ¹H: Tabela 1A.

RMN ¹³C: Tabela 2A.

Grupo 33



3,5-dimetoxi-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':8,7)-flavona



Substância 7

Aspecto físico: Oleoso.

PF: Não determinado.

UV: (*c* 0,01 MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm ($\log \epsilon$): Não determinado.

IV: $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): Não determinado.

EM: m/z (%): Não determinado.

RMN ^1H : Tabela 2A

2.2. Metilação da Substância 3

Num balão de fundo redondo (10 mL) contendo a substância 3 (12 mg) e éter etílico (2mL), adicionou-se diazometano até cessar o desprendimento de gás. A reação foi deixada sob agitação a temperatura ambiente por 4 horas e 30 minutos. Após este período foram feitas placas cromatográficas verificando-se que a substância 3 permaneceu inerte (MATOS, 1988).

2.3. Degradação da Substância 3 em meio ácido

Num balão de fundo redondo (10 mL), contendo a substância 3 (60 mg) adicionou-se dioxano (3 mL) e ácido clorídrico conc. (3 mL). O balão foi acoplado a um condensador e deixado em banho de óleo sob refluxo durante 4 horas. Após atingir a temperatura ambiente a mistura reacional foi diluída adicionando-se água (10mL) e extraída com CH_2Cl_2 (10 mL x 3), tratando-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro. Filtração e eliminação do solvente forneceram o produto reacional bruto (53,2 mg), que após análise por CCP (hexano /éter etílico 1:1 v/v) resultou no isolamento de 2 produtos majoritários cujos dados de RMN ^1H correspondem ao da lanceolatina B (substância 8; 5 mg isolada nesta planta como produto natural), e o pongamol (substância 14; 3 mg) (GARG *et alii*, 1978).

2.4. Elaboração do Extrato Metanólico das Raízes

Uma parte do extrato metanólico (500 mg) foi acetilado com uma mistura de piridina/anidrido acético 2:1 (10:5 mL v/v) durante 24 h, obtendo-se (380 mg) do extrato acetilado, que foi submetido a várias cromatografias preparativas, usando-se como solvente de desenvolvimento hexano/AcOEt 80:20 v/v (MATOS, 1988).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do extrato éter de petróleo das raízes de *Lonchocarpus latifolius* foram isolados 12 flavonóides (Figura 1), sendo 2 flavonas (1 e 8), 5 flavonóis (2, 4, 5, 6 e 7) 1 flavanona, (10) 1 flavanonol (11), 2 derivados de dibenzoilmetano (3 e 9) e uma 3,4-dimetoxiflavana (12) dos quais seis são inéditos (3, 7, 9, 10, 11 e 12). Os demais já foram isolados de outras espécies dos gêneros *Pongamia*, *Milletia*, *Dahlstedtia* e *Tephrosia*.

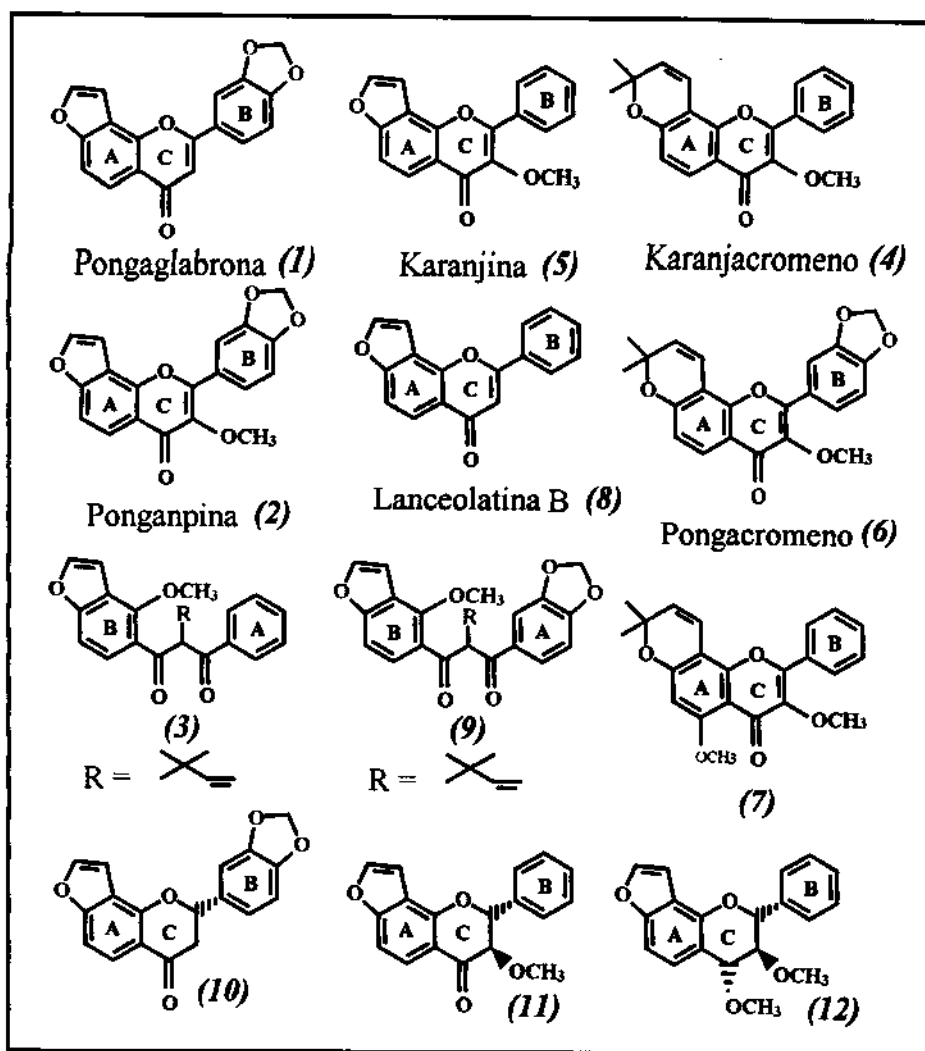


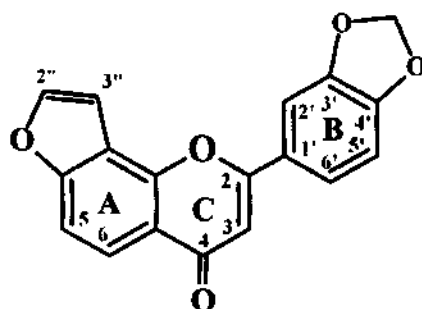
Figura 3. Flavonóides isolados de *L. latifolius*

As respectivas estruturas moleculares foram determinadas pelos dados espectroscópicos de RMN ^1H , diferença de NOE, RMN ^{13}C , EM, IV e UV. Quanto as propriedades espectrais de RMN explorou-se também a análise dos espectros bidimensionais (COSY, HETCOR e COLOC). As características espectrais dos flavonóides já estão bem documentadas na literatura (HARBONE, 1996 e AGRAWAL, 1989) e vem sendo amplamente exploradas pelo nosso grupo de pesquisa (SALES, 1994 e BLANCO, 1995). Os dados daqueles que não são inéditos foram comparados com os da literatura.

Os flavonóides isolados serão discutidos por classe.

3.1. Flavonas

3.1.1. Substância 1 - Pongaglabrona



Substância 1

No espectro de RMN ^1H (Figura 1-apêndice, Tabela 1A) da substância 1 foi observado um singlete intenso a 6,76 ppm (1H) sugerindo tratar-se da absorção do hidrogênio H-3 de uma flavona. Em 6,10 ppm (2H) observou-se outro singlete, sugerindo-se um grupo metilenodioxi. As absorções a 7,77 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz) e a 7,20 ppm (1H, *dd*, $J = 2$ e 1 Hz) referem-se aos hidrogênio H-2'' e H-3'', de um anel furano. Por outro lado o dubleto a 8,16 ppm (1H, *d*, $J = 9$ Hz) e o duplo dubleto a 7,56 ppm (1H, *dd*, $J = 9$ e 1 Hz), estão de acordo com o esperado para as absorções dos hidrogênios H-5 e H-6 do anel A, onde o anel furano está ligado

angularmente o que se confirma pelo dublete referente ao H-6 em consequência do acoplamento vicinal com H-5 e acoplamento a J^5 com H-3". A alternativa estrutural onde o anel A fosse (2",3": 5,6) foi facilmente descartada pelo deslocamento químico do hidrogênio H-5 que está de acordo com o esperado para hidrogênio *peri* a carbonila. As absorções a 6,97 ppm (1H, *d*, $J=8$ Hz), a 7,54 ppm (1H, *dd*, $J=8$ e 2 Hz) e a 7,40 ppm (1H, *d*, $J=2$ Hz), referem-se respectivamente aos hidrogênios H-5' H-6' e H-2' do anel B, onde também deve ser encontrado o grupo metilenodioxi ligado aos carbonos C-3' e C-4'.

No espectro de RMN ^{13}C (espectro totalmente desacoplado e DEPT 90° e 135°) os picos em 162,30 (C-2), 107,04 (C-3) e 178,13 (C-4) (Figura 2-apêndice, Tabela 2B) confirmam a estrutura de flavona. Os demais picos estão dentro do esperado para esta substância.

No espectro de massas (Figura 3-apêndice) os principais picos (Figura 4) referem-se ao íon molecular M^+ 306 (95%) e aos fragmentos da clivagem RDA, do anel C, sendo aquele com m/z 146 (100%), o pico base.

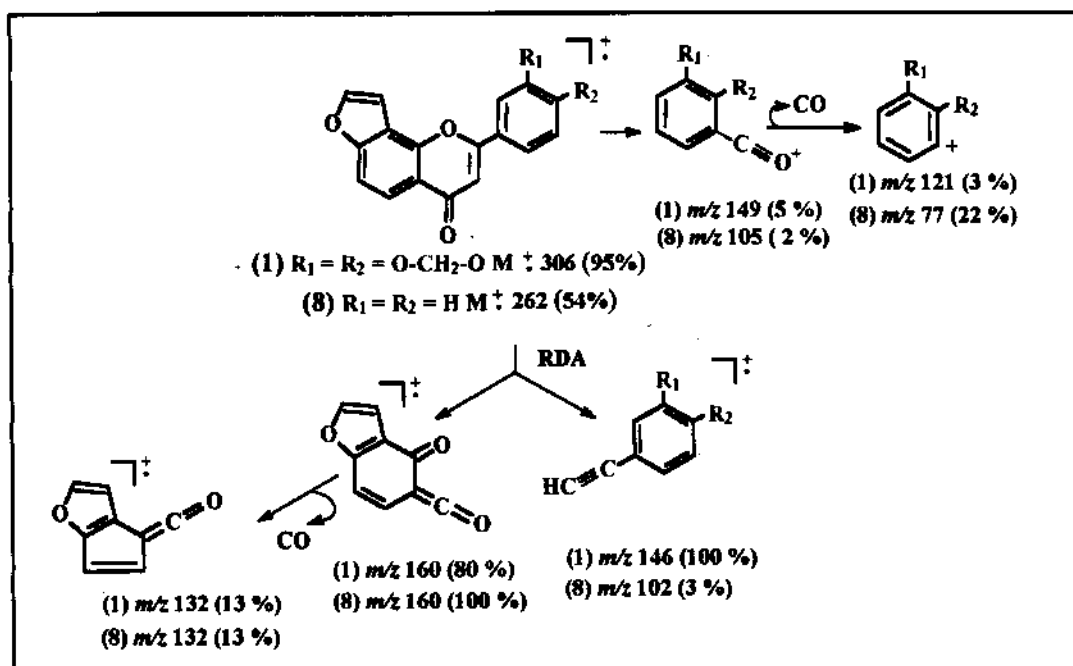


Figura 4. Proposta de fragmentação para as substâncias 1 e 8

No espectro de IV a banda intensa a 1640 cm^{-1} refere-se ao estiramento da carbonila e as bandas a 1067 e 1038 cm^{-1} referem-se às ligações C-O-C (Figura 5-apêndice).

No espectro de UV (λ_{max} nm log ϵ): 248 (5,39), 328 (3,33), (Figura 6) as duas bandas de absorção referem-se aos cromóforos benzoíla e cinamoíla presentes no esqueleto de uma flavona.

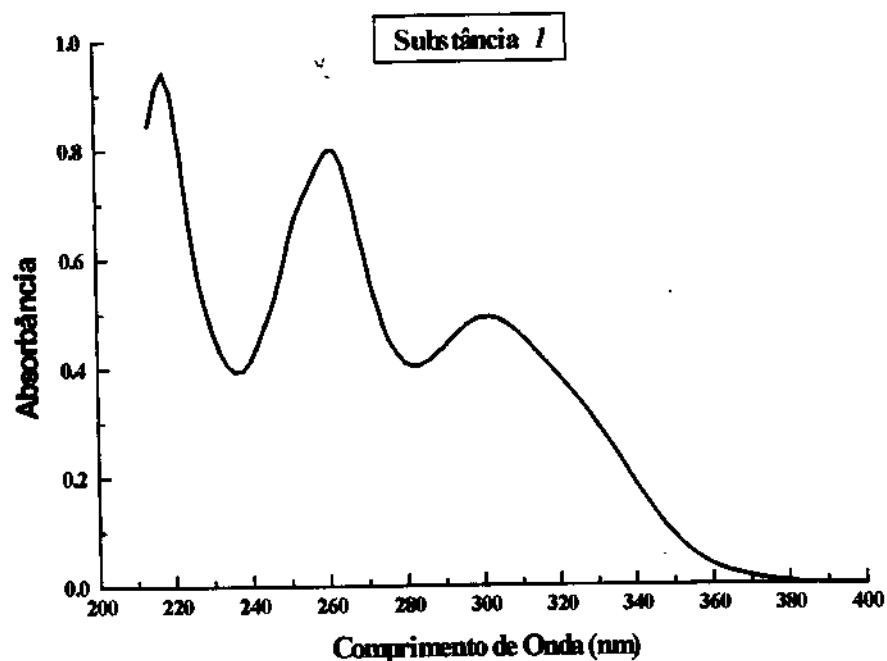
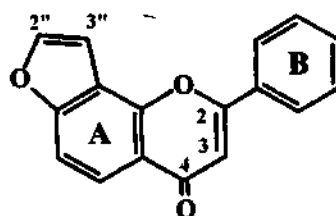


Figura 6. Espectro de UV para a substância 1

Todos os dados acima convergem para a substância identificada como sendo a **Pongaglabrona**, isolada anteriormente de *Derris mollis* (LYRA *et alii*, 1979) *Pongamia glabra* (TALAPATRA *et alii*, 1982) e *P. pinnata* (TANAKA, 1992).

3.1.2. Substância 8 - Lanceolatina B



Substância 8

O espectro de RMN ^1H desta substância (Figura 7-apêndice, Tabela 1C) é semelhante ao da substância 1 exceto pelas absorções a 7,99 ppm (2H, *m*) e 7,5-7,6

ppm (3H, *m*) referentes a cinco hidrogênios aromáticos, indicando a presença do anel B monosubstituído.

No espectro de massas (Figura 3-apêndice), as principais fragmentações (Figura 4) referem-se ao íon molecular M^+ 262 (54%) e aos picos resultantes da clivagem RDA do anel C, com m/z 160 (100%) e m/z 102(3%).

No espectro de IV a banda a 1636 cm^{-1} refere-se ao estiramento da carbonila e a banda a 1070 cm^{-1} refere-se à ligação C-O-C (Figura 5-apêndice).

No espectro de UV (λ_{max} nm log ϵ): 264 (3,40), 298 (3,52), (Figura 8) as duas bandas de absorção referem-se aos cromóforos benzoíla e cinamoíla, presentes no esqueleto de uma flavona. É interessante notar que a banda I não sofreu deslocamento batocrômico como observado no espectro da substância 1

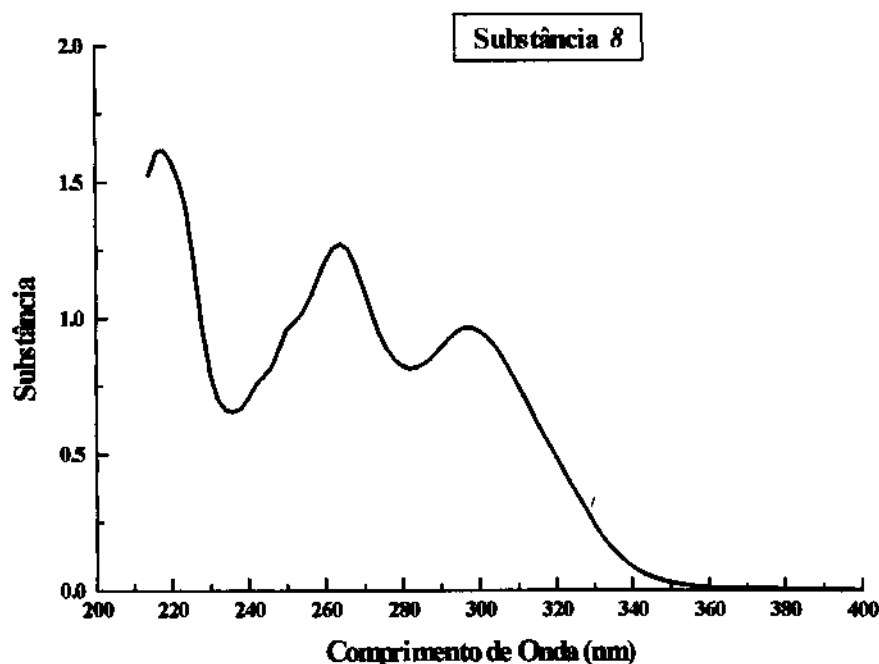


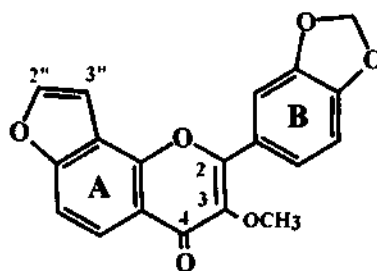
Figura 8. Espectro de UV da substância 8

Analogamente à substância 1 a substância 8 foi identificada com a **Lanceolatina B** isolada de *Dahlstedtia pinnata* (GARCEZ *et alii*, 1988) *Derris*

mollis, (LYRA *et alii*, 1979), *Milletia sanagana* (GARCEZ *et alii*, 1988), *Pongamia glabra* (TALAPATRA *et alii*, 1982), *Tephrosia lanceolata* (RANGASWAMI & SATRY, 1955) e *Tephrosia purpurea* (PELTER, 1981).

3.2 Flavonóis

3.2.1. Substância 2 - Ponganpina



Substância 2

O espectro de RMN ^1H (Figura 9-apêndice, Tabela 1A) é muito semelhante ao da substância 1 exceto pela ausência de absorção a 6,76 ppm relativa ao hidrogênio H-3. A presença de um singlete a 3,93 ppm (3H) sugere que uma metoxila esteja ligada nesta posição.

No espectro de massas (Figura 10-apêndice) as principais fragmentações (Figura 11) referem-se ao ion molecular M^{++} 336 (11%) e ao pico base m/z 160 (100%) originado da clivagem RDA.

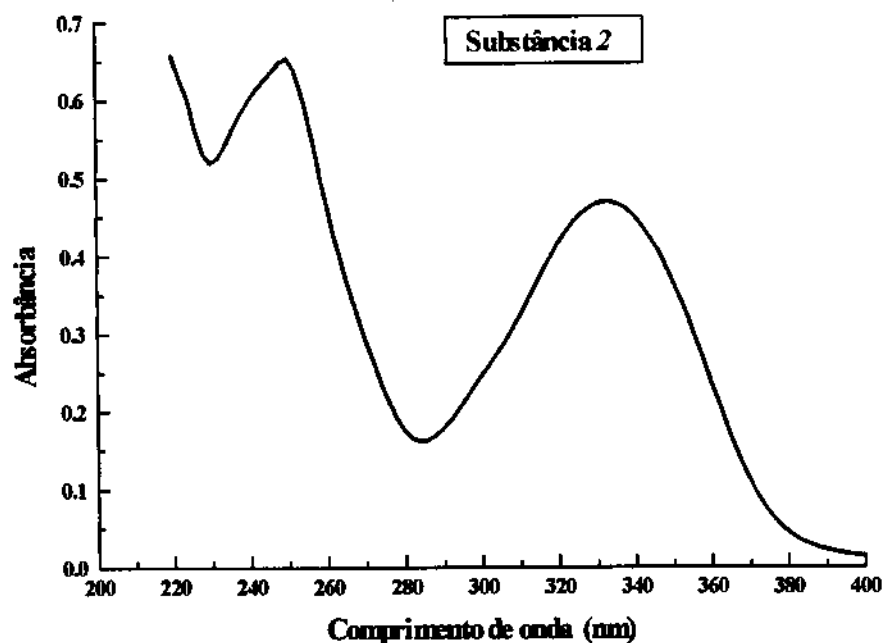
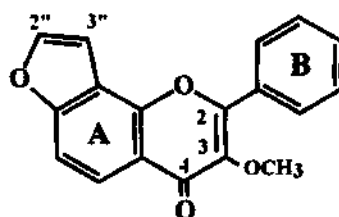


Figura 13. Espectro de UV para a substância 2

Esta substância foi identificada como **Ponganpina** e isolada anteriormente de *Derris mollis*, (LYRA *et alii*, 1979), *Pongamia glabra* (TALAPATRA, 1982) e *P. pinnata* (TANAKA, 1992).

3.2.2. Substância 5 - Karanjina



Substância 5

Com base na semelhança entre os espectros de RMN ¹H (Figura 14-
apêndice, Tabela 1C), desta substância, com o da substância 2 sugeriu-se que esta

substância seja mais um flavonol metilado devido a presença de um singlete a 3,93 ppm (3H). As absorções a 8,12 ppm (2H, *m*) e 7,5-7,6 ppm (3H, *m*) sugerem a presença do anel B monosubstituído.

No espectro de massas (Figura 10-apêndice) as principais fragmentações (Figura 11) referem-se ao íon molecular M^{+} 292 (54 %) e o pico base m/z 291 (100 %) refere-se a perda de hidrogênio.

No espectro de IV a banda intensa a 1639 cm^{-1} refere-se ao estiramento da carbonila e a banda 1035 cm^{-1} refere-se à ligação C-O-C (Figura 12-apêndice).

No espectro de UV (λ_{max} nm log ϵ): 268 (3,16), 302 (3,24), as duas bandas de absorção referem-se aos cromóforos benzoíla e cinamoíla presentes no esqueleto de um flavonol (Figura 15).

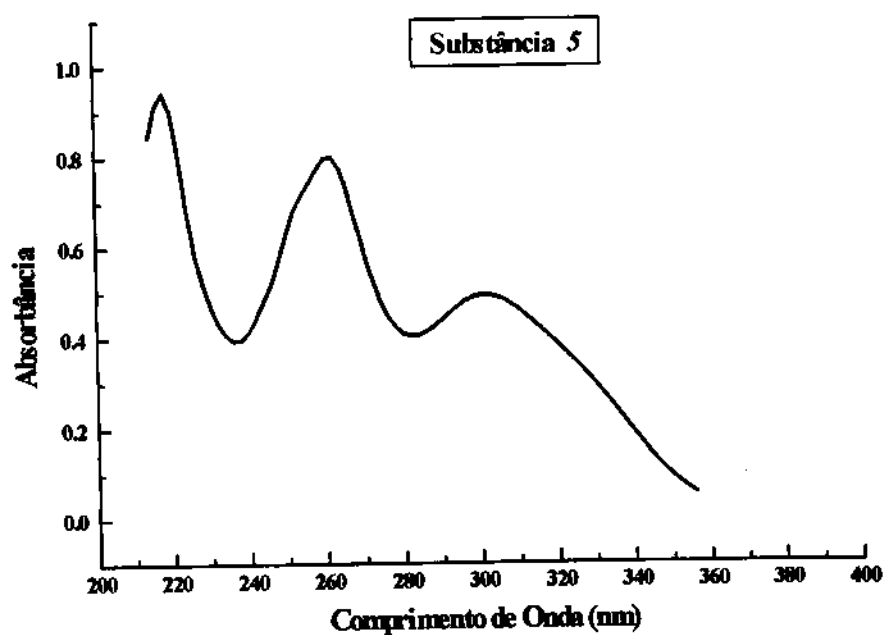
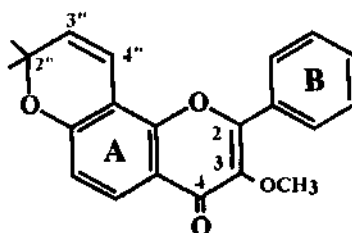


Figura 15. Espectro de UV da substância 5

Esta substância foi identificada como **Karanjina** e isolada anteriormente de *Derris mollis*, (LYRA *et alii*, 1979), *Pongamia glabra* (TALAPATRA, 1982) e *P. pinnata* (TANAKA, 1992).

3.2.3. Substância 4 - Karanjacromeno



Substância 4

No espectro de RMN ^1H (Figura 16-apêndice, Tabela 1B), desta substância, as absorções a 8,03 ppm (2H, *m*) e 7,52 ppm (3H, *m*) sugerem a presença do anel B monosubstituído. Os dois dubletes a 5,75 ppm (1H, *d*, $J=10$ Hz) e 6,85 ppm (1H, *d*, $J=10$ Hz) juntamente com um singleto a 1,51 ppm (6H), indicam a presença de um anel 2'',2''-dimetilpirano, angularmente ligado ao anel A, uma vez que a absorção a 8,03 ppm (1H, *d*, $J=8$ Hz) refere-se ao hidrogênio H-5, que está *peri* a carbonila e a absorção a 6,85 ppm (1H, *d*, $J=8$ Hz) ao hidrogênio H-6. Finalmente o singleto a 3,93 ppm (3H) sugere tratar-se de mais um flavonol metilado.

No espectro de RMN ^{13}C (espectro totalmente desacoplado e DEPT 90° e 135°) os valores dos carbonos C-2 (154,68 ppm), C-3 (141,30 ppm) e C-4 (174,67 ppm) (Figura 17-apêndice, Tabela 2B), confirmam a estrutura do flavonol. Os valores para os demais carbonos estão dentro do esperado para esta substância.

No espectro de massas (Figura 18-apêndice) as principais fragmentações (Figura 19) referem-se ao íon molecular M^{+} 334 (46%) e ao pico base m/z 319 (100 %) oriundo da clivagem RDA do anel C.

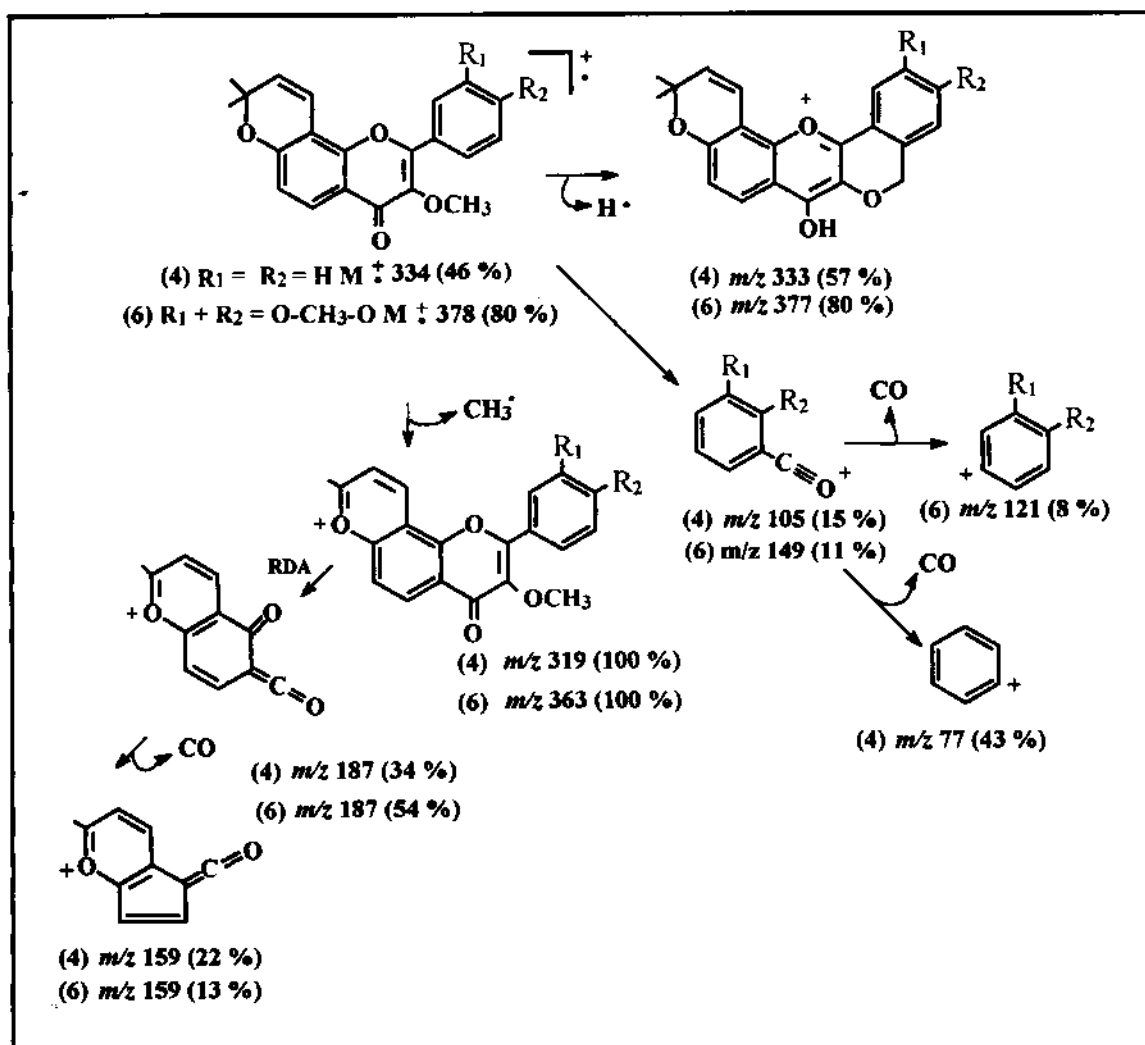


Figura 19. Proposta de fragmentação para as substâncias 4 e 6

No espectro de IV à banda a 1644 cm^{-1} refere-se ao estiramento da carbonila e as bandas 1112 e 1039 cm^{-1} referem-se às ligações C-O-C (Figura 20-apêndice).

No espectro de UV (λ_{max} nm log ϵ): 270 (3,49) 328 (3,15), as duas bandas de absorção referem-se aos cromóforos benzoila e cinamoila presentes no esqueleto de um flavonol (Figura 21).

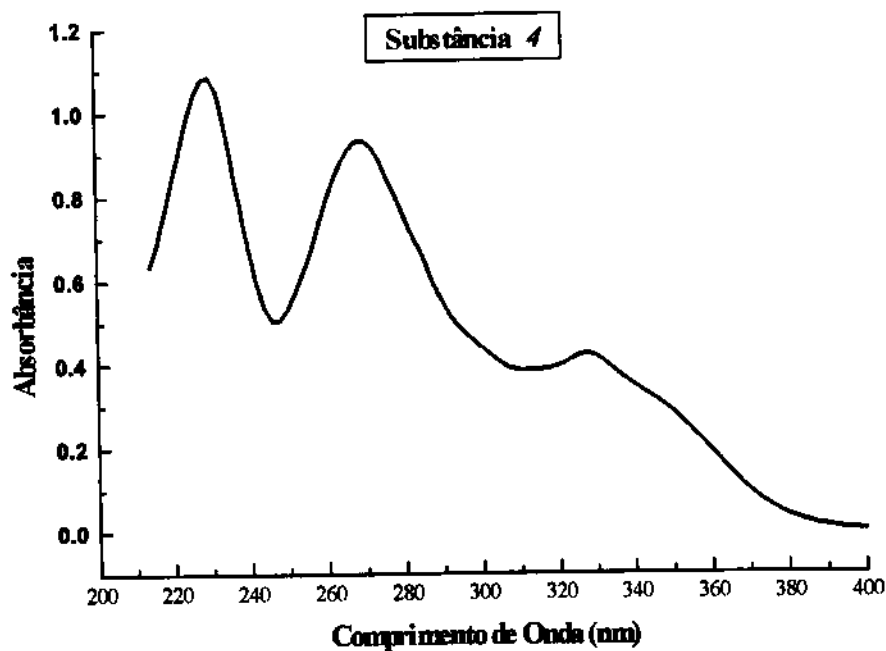
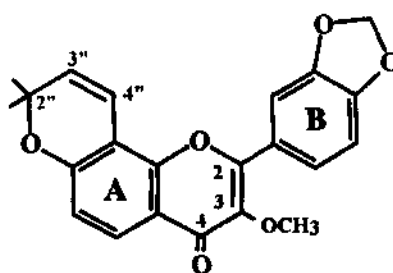


Figura 21. Espectro de UV da substância 4

Esta substância foi identificada como **Karanjacromeno** e isolada anteriormente de *Dahlstedtia pentaphylla* (GARCEZ *et alii*, 1988).

3.2.4. Substância 6 - Pongacromeno



O espectro de RMN ^1H (Figura 22-apêndice, Tabela 1B), desta substância é muito semelhante ao da substância 4 exceto pela presença de um singlete a 6,10 ppm (2H) relativo ao grupo metilenodioxido ligado aos carbonos C-3' e C-4' do anel

B, o que pode ser confirmado pelas absorções a 6,96 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz) 7,61 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz) e 7,69 ppm (1H, *dd*, $J = 8$ e 2 Hz), relativos aos hidrogênios H-5' H-2' H-6' respectivamente.

No espectro de massas (Figura 18 apêndice) as principais fragmentações (Figura 19) referem-se ao íon molecular M^{+} 378 (78%), seguida de perda do radical metil, que é o pico base m/z 363 (100 %) e o pico a m/z 187 resultante da clivagem RDA.

No espectro de IV à banda intensa a 1630 cm^{-1} refere-se ao estiramento da carbonila, as bandas a 1118 e 1040 cm^{-1} referem-se às ligações C-O-C (Figura 20-apêndice).

No espectro de UV (λ_{max} nm log ϵ): 272 (3,36), 346 (3,19), as duas bandas de absorção referem-se aos cromóforos benzoíla e cinamoíla presentes no esqueleto de um flavonol (Figura 23).

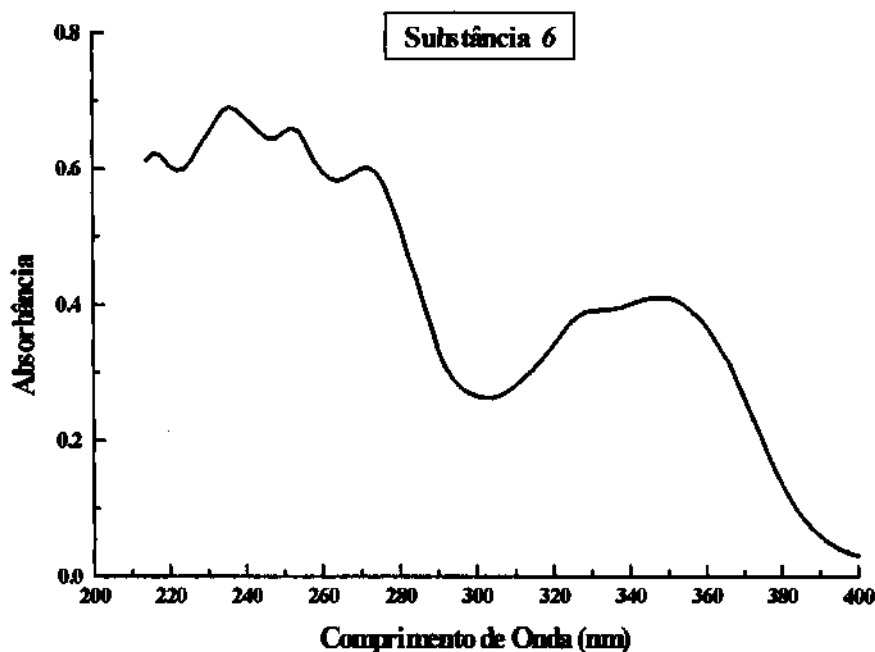
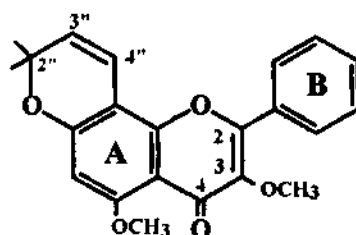


Figura 23. Espectro de UV da substância 6

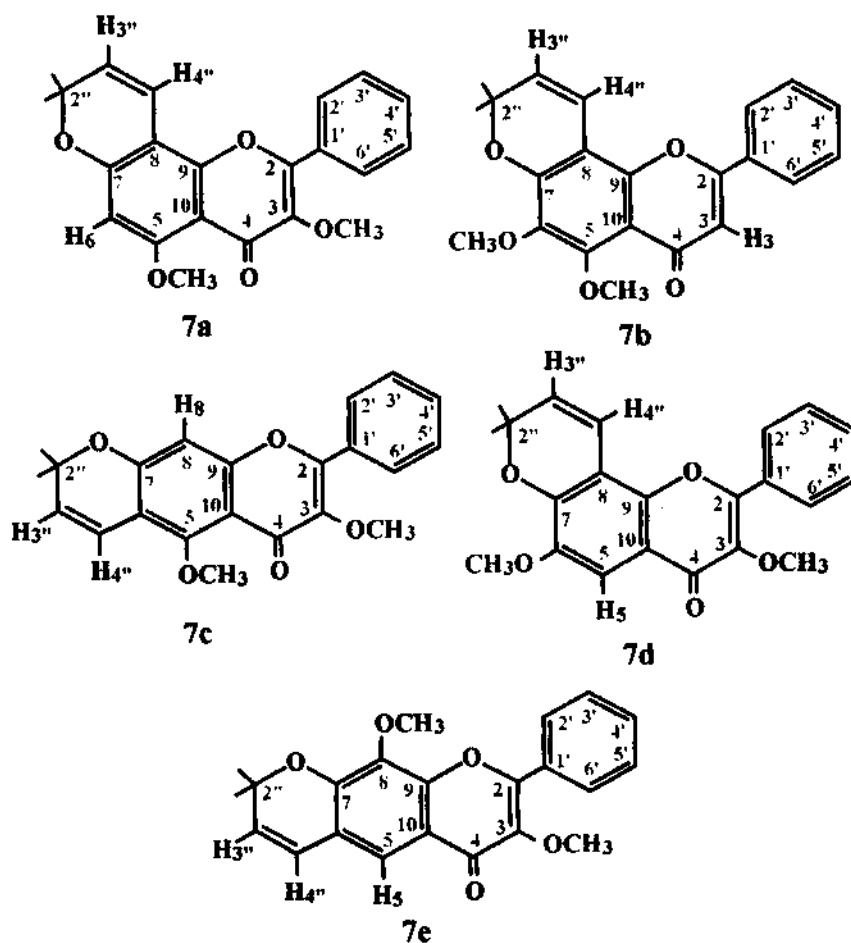
Esta substância foi identificada como **Pongacromeno** e isolada anteriormente de *Dahlstedtia pentaphylla* (GARCEZ *et alii*, 1988) e *P. pinnata* (TANAKA, 1992).

3.2.5. Substância 7 - Inédita



Substância 7

O espectro de RMN ^1H (Figura 24-apêndice, Tabela 1B) da substância 7 é muito semelhante ao da substância 4 também mostrando as absorções características de um anel 2'',2''-dimetilpirano e anel B monosubstituído. Um singlete agudo em 6,48 ppm (1H, s) e a presença de bandas de absorção referentes a duas metoxilas ligadas a carbono sp^2 , levam a cinco alternativas estruturais (7a-7e).



Através do espectro de diferença de NOE (Figura 25, Tabela 1), verificou-se que a irradiação do hidrogênio que absorve a 6,48 ppm causou incremento apenas no sinal da banda de uma das metoxilas, descartando-se as estruturas 7b e 7c. Irradiação do hidrogênio H-4'' causou incremento apenas no sinal do hidrogênio H-3'', assegurando que a estrutura não poderia ser a 7e. Restavam as estruturas 7a e 7d. A estrutura 7d corresponde a um flavonol anteriormente isolado de *L. muehlbergianus* (BLANCO, 1995) cujo espectro de RMN ¹H (CDCl₃), apresenta a absorção do hidrogênio aromático isolado H-5 em 7,52 ppm (s, 1H), uma diferença de deslocamento (1,04 ppm) muito grande para ser causada pela mudança de solvente, principalmente por que os demais sinais apresentam uma

diferença de deslocamento por volta de apenas 0,3 ppm. Restava apenas a estrutura 7a.

Tabela 1. Hidrogênios irradiados no espectro de diferença de NOE para a substância 7.

Hidrogênio irradiado ppm	Absorções com aumento de intensidade %
6,89 H-4''	H-3'' (19 %) 6,89 ppm
6,48 H-6	OCH ₃ (16 %) 3,87 ppm

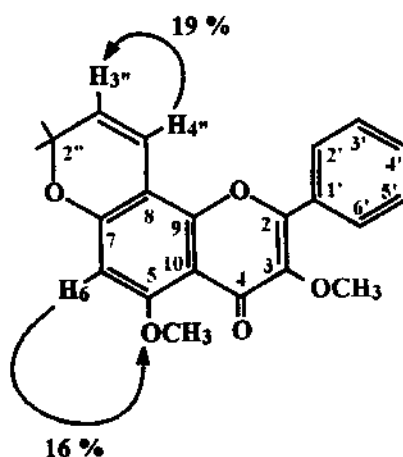
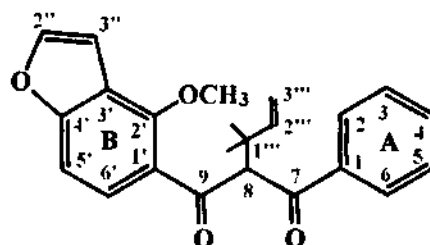


Figura 25. Atribuições do espectro de diferença de NOE para a substância 7

Não foram obtidos os demais espectros, porque houve perda completa do material.

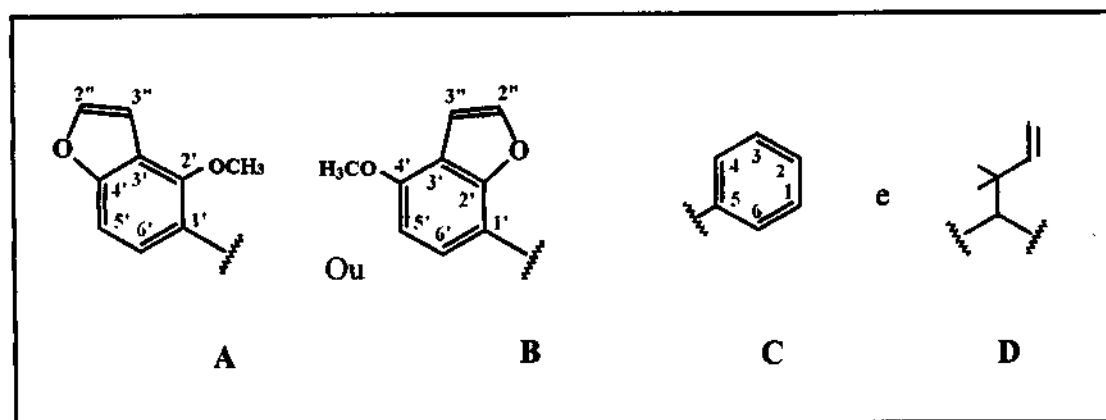
3.3. Derivados de Dibenzoilmetano

3.3.1. Substância 3 - Inédita

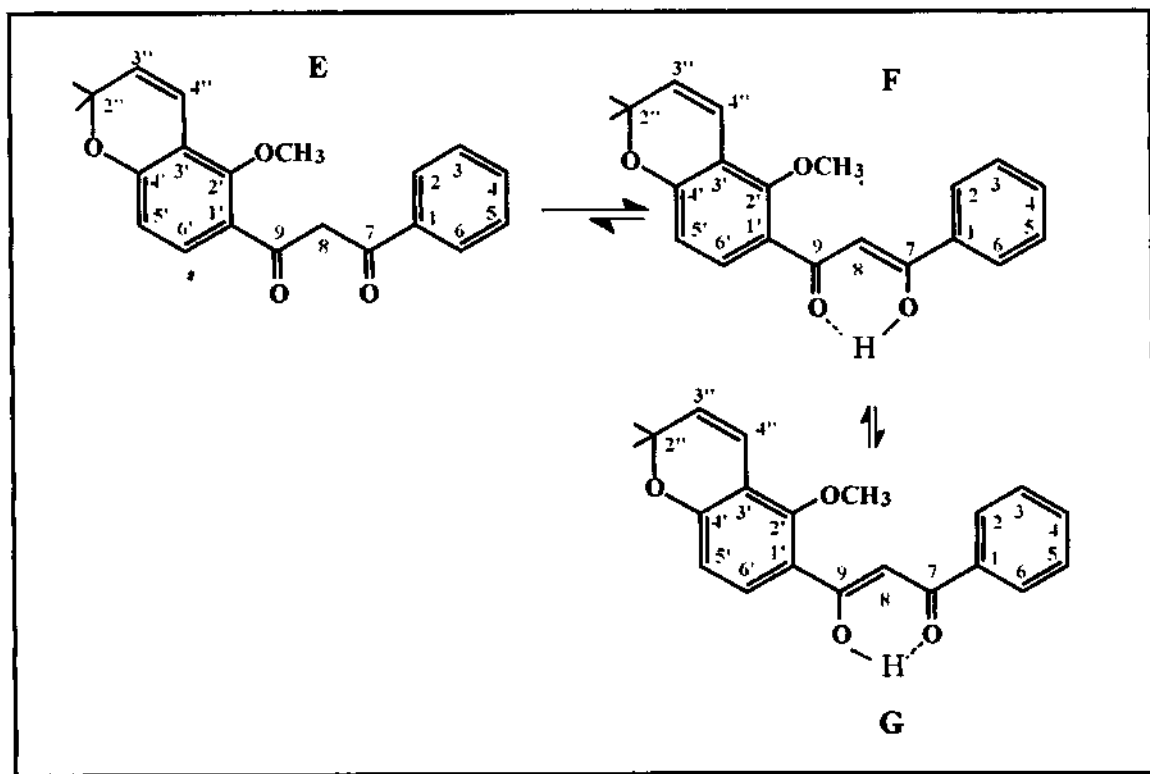


Substância 3

O espectro de RMN ^1H (Espectro 26-apêndice, Tabela 1D) mostra absorções referentes a um anel aromático monossustituído [8,02 ppm (2H, *m*), 7,45 ppm (3H, *m*)]; um grupo metínico não acoplado [5,74 ppm (1H, *s*)]; dois hidrogênios aromáticos vicinais, sendo um hidrogênio *peri* a carbonila [7,17 ppm (1H, *dd*, $J = 9$ e 1 Hz) e 8,00 ppm (1H, *d*, $J = 9$ Hz)]; um anel furano [7,58 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz) e 6,93 ppm (1H, *dd*, $J = 2$ e 1 Hz)]; um grupo α,α -dimetilalil [6,10 ppm (1H, *dd*, $J = 17$ e 11 Hz), 4,87 ppm (1H, *dd*, $J = 11$ e 1 Hz), 4,92 ppm (1H, *dd*, $J = 17$ e 1 Hz), 1,21 ppm (3H, *s*) e 1,23 ppm (3H, *s*) e uma metoxila aromática [3,84 ppm (3H, *s*). Estes dados permitem delinear os seguintes fragmentos estruturais:



Os espectros de RMN¹³C e DEPT 90° e 135° (Espectros 27-apêndice, Tabela 2B) mostram picos referentes às absorções de oito C_o, onze CH, um CH₂ e três CH₃, sendo que dois C_o apresentaram deslocamentos químicos de 195,4 e 197,6 ppm tal como observado anteriormente para os carbonos carbonílicos da forma β-dicetônica da purpurenona (E), que no entanto ocorre em equilíbrio ceto-enólico (E-G) conforme indicado no respectivo espectro de RMN ¹H através da absorção característica da hidroxila quelatogênica [17 ppm (1H, s)] (MAGALHÃES *et alii*, 1996).



Por outro lado o espectro de massas de alta resolução (Figuras 28, -apêndice) mostra o pico do íon molecular $M^{+•} = 362,144183$ (2,8%) de acordo com a fórmula $C_{23}H_{22}O_4$ (362, 151809). O pico base com $m/z = 175,029770$ (100%) e aquele com $m/z = 105,028434$ (23,5%) podem ser racionalizados através de

clivagens α às carbonilas de um dibenzoilmetano, onde o grupo α,α -dimetilalil só pode estar ligado ao carbono C-8, bem no meio da molécula.

De acordo com a proposta de fragmentação verificou-se que o fragmento com m/z 160 (37%) poderia se originar de dois caminhos de fragmentação um partindo do ion molecular com a perda de dois radicais e o outro na qual este fragmento seria gerado a partir da perda do radical metila proveniente do fragmento com m/z 175 (100 %), contrariando a regra do emparelhamento de eletrons. A fim de se verificar qual o caminho mais provável para gerar este fragmento, fêz-se espectros de massas de massas dos fragmentos a m/z 263, 175, 160 e 105 (Figuras 28A, 28B, 28C e 28D). Verificando-se que de fato o fragmento a m/z 160 é proveniente do fragmento a m/z 175, conforme verificado pela proposta de fragmentação (Figura 29).

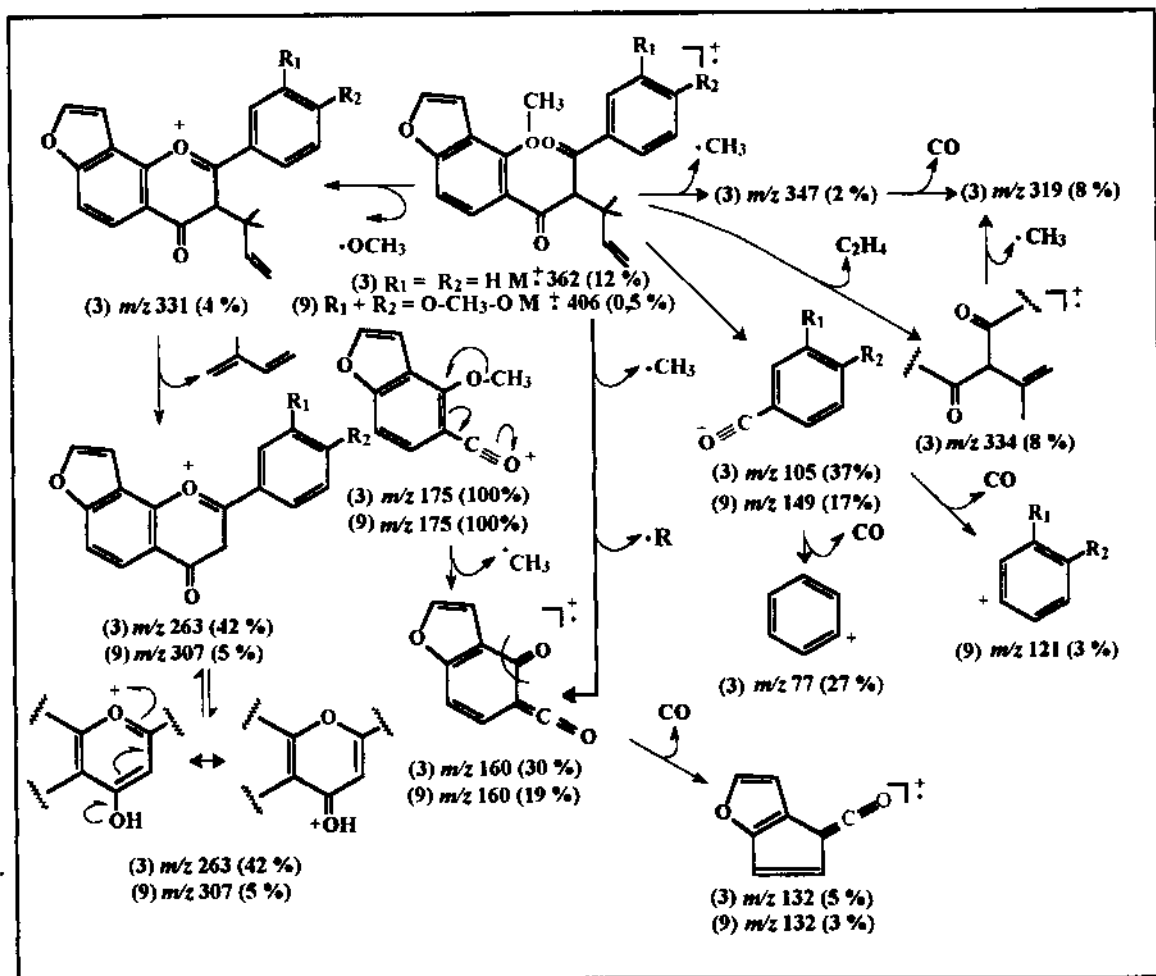


Figura 29. Proposta de fragmentação para as substâncias 3 e 9.

A ausência de um singlete agudo por volta de 12-18 ppm no espectro de RMN ^1H , da substância 3, ao lado da absorção típica de cromóforo benzoíla no respectivo espectro de UV [$\lambda_{\text{Max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) nm: 239 (3,44)], (Figura 30) indicam que esta substância não sofre enolização. A estabilização do enol implica na formação de ponte de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio da hidroxila e o oxigênio da carbonila em β quando ambos estão no mesmo plano e direcionados no mesmo sentido. No caso da substância 3, o modelo de um β -cetoenol estabilizado mostra um grande impedimento espacial entre o grupo α,α -dimetilalil e os substituintes dos anéis aromáticos, concluindo-se que o grupo alquil ligado ao

carbono C-8 está impedindo a enolização. Neste caso o carbono C-8 deve ser um centro estereogênico que não sofre racemização. De fato constatou-se que a substância 3 é opticamente ativa apresentando $[\alpha]_{20}^D = +28,31^\circ$ ($c = 0,84$, CH_2Cl_2).

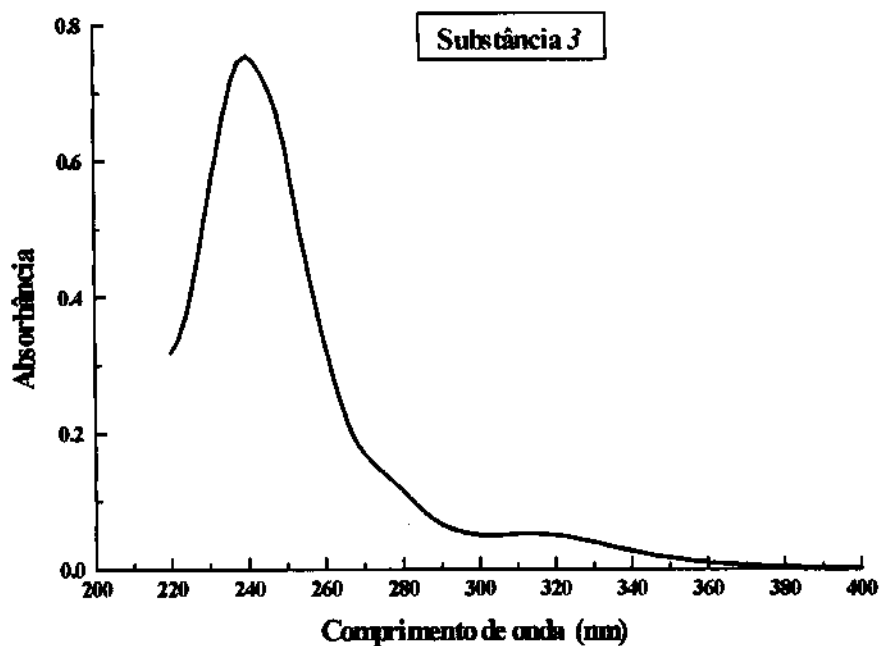


Figura 30. Espectro de UV para a substância 3

Os espectros de RMN bidimensionais tais como COSY (Figuras 31-apêndice); HETCOR (Figura 32-apêndice, Tabela 2) e COLOC (Figura 33-apêndice, Tabela 3) estão de acordo com a estrutura proposta para a substância 3, merecendo destaque a correlação observada no espectro HETCOR entre os sinais a 5,74 ppm (1H, *s*, H-8) e 66,8 ppm (CH; C-8), comprovando que o sinal a 5,74 ppm refere-se a um hidrogênio ligado a carbono sp^3 .

Tabela 2. Correlações observadas nos espectros de COSY (H-H) e HETCOR (C-H vicinal) para a substância 3.

$\delta^1\text{H}$ (posição)	HETCOR (carbono ligado)	COSY (Hidrogênio acoplado)
8,02 (H-2; H-6)	128,9 (C2-C6)	7,45 (H-3 ; H-5)
7,59 (H-2'')	144,7 (C2'')	6,87 (H-3'')
7,45 (H-6')	126,7 (C6')	7,18 (H-5')
7,45 (H-3; H-5)	128,4 (C3; C5)	muito perto
7,53 (H-4)	132,7 (C4)	muito perto
7,18 (H-5')	106,6 (C5')	7,26-7,54 (H-6')
6,93 (H-3'')	105,5 (C2'')	7,59 (H-2'')
		7,18 (H-5')
6,10 (H-2'')	146,1 (C2'')	4,87-4,99(H-3'''a ; H-3'''b)
5,74 (H-8)	66,8 (C8)	-
4,88 (H-3'''a)	111,6 (C3''')	6,10 (H-2'')
4,92 (H-3'''b)	111,6 (C3''')	6,10 (H-2'')
3,84 (-OCH ₃)	60,0 (-OCH ₃)	-
1,21	26,4 (-CH ₃)	-
1,23	26,8 (-CH ₃)	-

Tabela 3. Correlação observada entre C_o-H (J^3) no espectro COLOC para a substância 3.

$\delta^{13}\text{C}_o$	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	carbono assinalado
197,57	7,45 (H-6')	C-9
195,41	8,20 (H-2 ; H-6)	C-7
158,75	7,45 (H-6')	C-4'
152,34	3,84 (-OCH ₃)	C-2'
	7,45 (H-6')	
138,73	8,20 (H-2 ; H-6)	C-1
127,15	7,18 (H-5')	C-1'
117,43	7,59 (H-2'')	C-3'
41,65	5,74 (H-8)	C-1''
	4,92 (H-3''')	
	4,87 (H-3''')	
	1,23 (CH ₃)	
	1,21 (CH ₃)	

No espectro de diferença de NOE, a irradiação da metoxila aromática causou incremento somente do sinal referente ao hidrogênio H-3'' o que está de acordo com o fragmento estrutural A. Irradiação de H-8 (5,74 ppm, s) causou um

grande aumento do sinal em 8,02 ppm (H-2 e H-6) sugerindo que a molécula assume uma conformação preferencial tal que a ligação C-8/H-8 e a porção benzoíla contendo o anel A, ficam no mesmo plano. (Figura 34, Tabela 4).

Tabela 4. Hidrogênios irradiados no espectro de diferença de NOE para a substância 3.

Hidrogênio irradiado ppm	Hidrogênio com aumento de intensidade %
3,84 OCH ₃	H-3'' (4,6 %)
1,21 CH ₃	H-8 (2,8 %); H-c (2,3 %)
5,74 H-8	H-c (3,9 %); CH ₃ (5,9 %); H-2 e H-6 (31,7)
4,88 H-a e 4,92 H-b	H-c (4,5 %); CH ₃ (2,6 %)

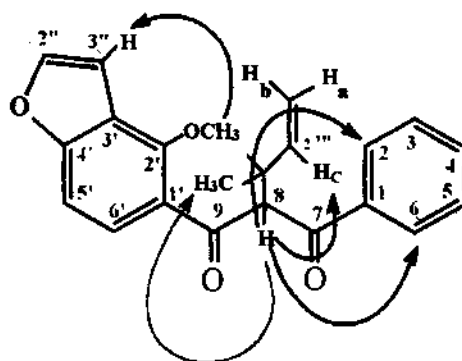
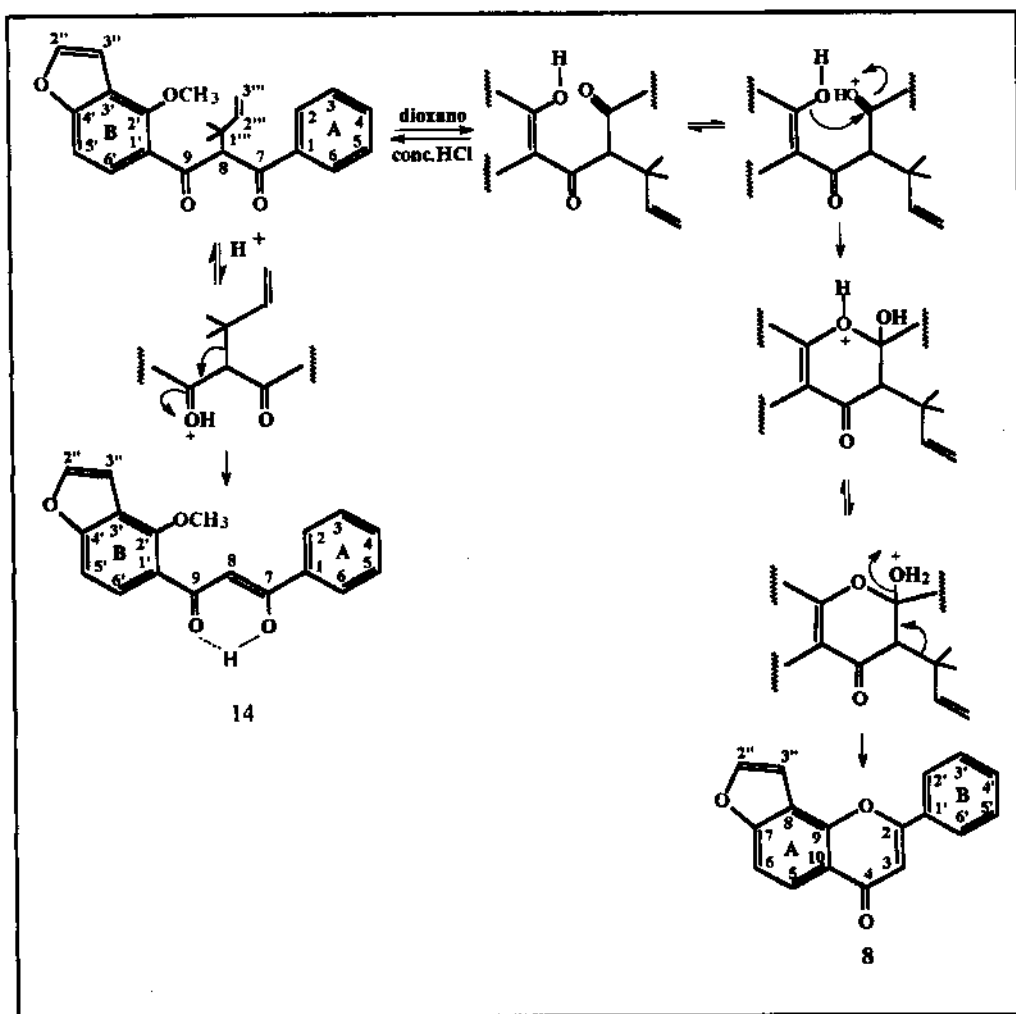


Figura 34. Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de NOE para a substância 3

Os dibenzoilmetanos enolizáveis (ex.: purpurenona) são facilmente metilados com diazometano fornecendo os respectivos metilenol-éteres (MAGALHÃES *et alii*, 1996). A substância 3 foi totalmente recuperada quando submetida as mesmas condições de metilação, mostrando mais uma vez que não sofre enolização. No entanto, ao ser deixada sob refluxo em meio ácido (dioxano; HCl; 40 h), a substância 3 forneceu vários produtos que foram detectados em CCD. Através da análise cromatográfica do produto de reação bruto por CCP, isolou-se a lanceolatina B (substância 8, 5 mg) e o pongamol (substância 14, 3 mg)

que foram identificados por comparação dos respectivos espectros de RMN ^1H (Figura 35-apêndice) com o da lanceolatina B isolada do extrato éter de petróleo e dos dados publicados para o pongamol (Figuras 36 e 37-apêndice). O quadro 4 mostra uma proposta de mecanismo de degradação da substância 3 em meio ácido.

Quadro 4. Mecanismo para explicar a degradação da substância 3 em ácido



O espectro de UV do pongamol (Figura 38) é típico de um β -cetoenol como observado para todos os dibenzoilmetanos naturais isolados anteriormente, por isso mesmo também denominados de β -OH-chalconas.

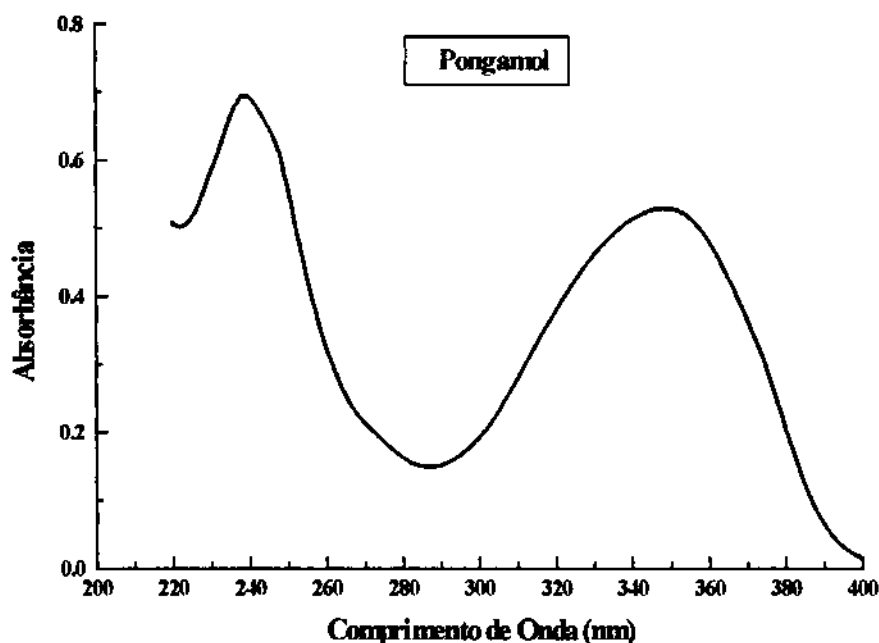


Figura 38. Espectro de UV do Pongamol.

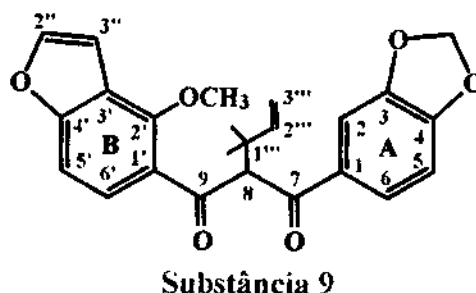
Após uma extensa revisão bibliográfica verificou-se que a substância 3 trata-se do primeiro dibenzoilmetano natural substituído no carbono C-8 e o 8-alil-dibenzoilmetano, foi o único modelo sintético encontrado (ANTONIOLETTI *et alii*, 1992), sendo que os dados espectrais (UV, IV, EM e RMN) não foram publicados.

Visando então, estudar qual é o efeito de um grupo R em C-8 sobre a enolização preparou-se o 8-metil-dibenzoilmetano (MAGALHÃES & COIMBRA dados não publicados, 1997) cujos espectros de RMN ^1H e RMN C^{13} (Figura 39-apêndice), HETCOR (Figura 40-apêndice), espectro de massas (Figura 41-apêndice) e UV (Figura 41-apêndice), apresentaram algumas características comuns às da substância 3 comprovando, que de fato o grupo alquil em C-8 impede a enolização. É interessante comparar as propriedades espectrais dos pares: substância 3/pongamol e 8-metildibenzoilmetano/dibenzoilmetano. Os dados do

dibenzoilmetano (reagente Aldrich) encontram-se anexados (Figuras 43, 44 e 45 apêndice)

A substância 3 é o principal flavonóide contido nos extratos de *L. latifolius* constituído por cerca de 50% do extrato éter de petróleo das raízes conforme os resultados obtidos através das análises por CLAE descritas no capítulo II. Esta substância também foi submetida a testes biológicos quando constatou-se que possui atividade citotóxica, larvica (contra *Aedes aegyti*) e bactericida (*Bacillus subtilis*) conforme descrito no capítulo III.

3.3. 2 Substância 9 - Inédita



De acordo com espectro de RMN ^1H (Figura 46-apêndice, Tabela 1D) conclui-se que esta substância também seja um derivado do dibenzoilmetano devido a semelhança com o espectro de RMN ^1H da substância 3, exceto pela presença de um singlete a 6,02 ppm (2H) relativo a um grupo metilenodioxí ligado ao anel A, cujos hidrogênios absorvem em a 6,84 ppm (1H, *d*, *J* = 8 Hz), 7,66 ppm (1H, *dd*, *J* = 8 e 2 Hz), e 7,50 ppm (1H, *d*, *J* = 2 Hz).

No espectro de RMN ^{13}C (espectro totalmente desacoplado e DEPT 90° e 135°) as absorções esperadas para os carbonos C-9 (197,62 ppm), C-8 (66,61 ppm) e C-7 (193,30 ppm) confirmam a estrutura do derivado de dibenzoilmetano (Figura 47-apêndice, Tabela 2B).

No espectro de massas (Figura 48-apêndice) o principal fragmento com $m/z = 175$ (100%) origina-se da clivagem α à carbonila em C-9 (Figura 29).

No espectro de IV (Figura 48-apêndice) a banda intensa a 1689 cm^{-1} refere-se ao estiramento da carbonila e as banda a 1074 e 1034 cm^{-1} referem-se às ligações C-O-C.

No espectro de UV (λ_{max} nm log ϵ): 236 (3,47) a absorção refere-se ao cromóforo benzoila (Figura 49) e também pode ser interpretado como uma evidência de que neste caso a molécula também se encontra deslocado para a forma da β -dicetona.

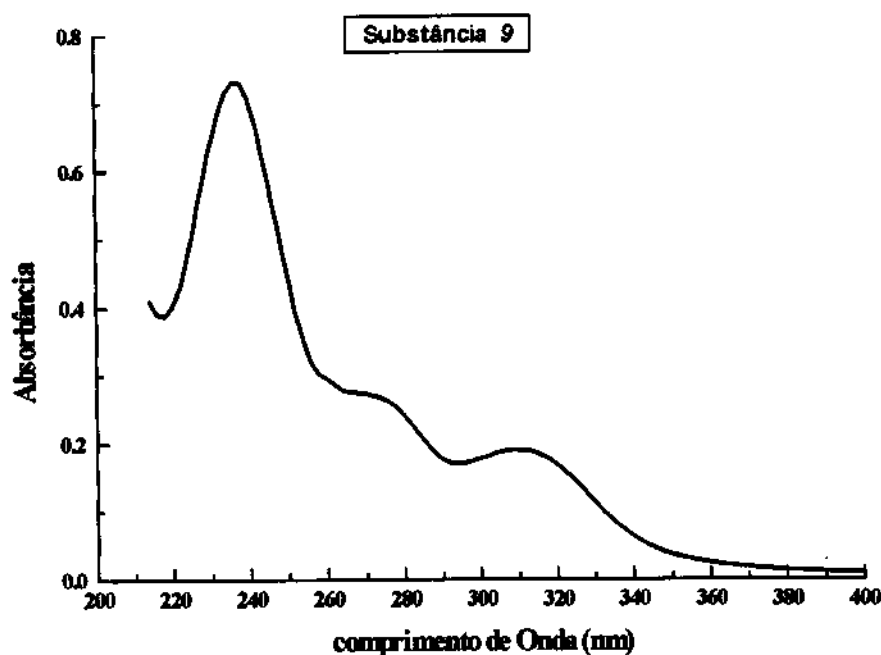
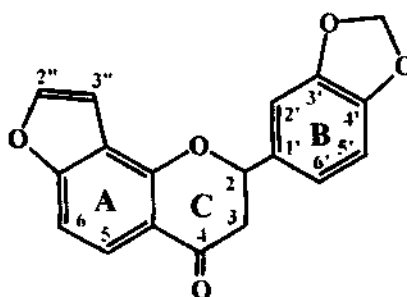


Figura 49. Espectro de UV para a substância 9

Após levantamento bibliográfico minucioso verificou-se que a **substância 9** é inédita na literatura.

3.4. Flavanona

3.4.1. Substância 10 - Inédita



Substância 10

As flavanonas apresentam bandas de absorção características relativas aos hidrogênios H-2 e H-3 do anel C.

No espectro de RMN ^1H (Figura 50-apêndice, Tabela 1A) as absorções a 2,93 ppm (1H, *dd*, $J = 17$ e 3 Hz), 3,10 ppm (1H, *dd*, $J = 17$ e 13 Hz) e 5,53 ppm (1H, *dd*, $J = 13$ e 3 Hz) são bem característicos dos hidrogênios do anel C de uma flavanona. A presença de um anel furano é constatada através das absorções a 7,60 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz) e 6,93 ppm (1H, *dd*, $J = 2$ e 1 Hz). A posição angular deste anel está evidenciada pelas absorções a 7,89 ppm (1H, *d*, $J = 9$ Hz) relativo ao hidrogênio H-5, que está de acordo com o esperado para hidrogênio *peri* a carbonila e 7,20 ppm (1H, *dd*, $J = 9$ e 1 Hz) relativas ao hidrogênio H-6 acoplado a J^5 com o H-3'' do anel furano.

O anel B encontra-se substituído nas posições H-3' e H-4' pelo grupo metilenodioxí 6,03 ppm (2H, *s*) conforme indicado pelas absorções em 6,87 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz), 6,97 ppm (1H, *dd*, $J = 8$ e 2 Hz) e 7,05 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz).

No espectro de massas (Figura 51-apêndice) os principais fragmentações (Figura 52) referem-se ao íon molecular M^+ 308 (20 %) e aos fragmentos da clivagem RDA do anel C, sendo aquele com m/z 146 (100%), o pico base.

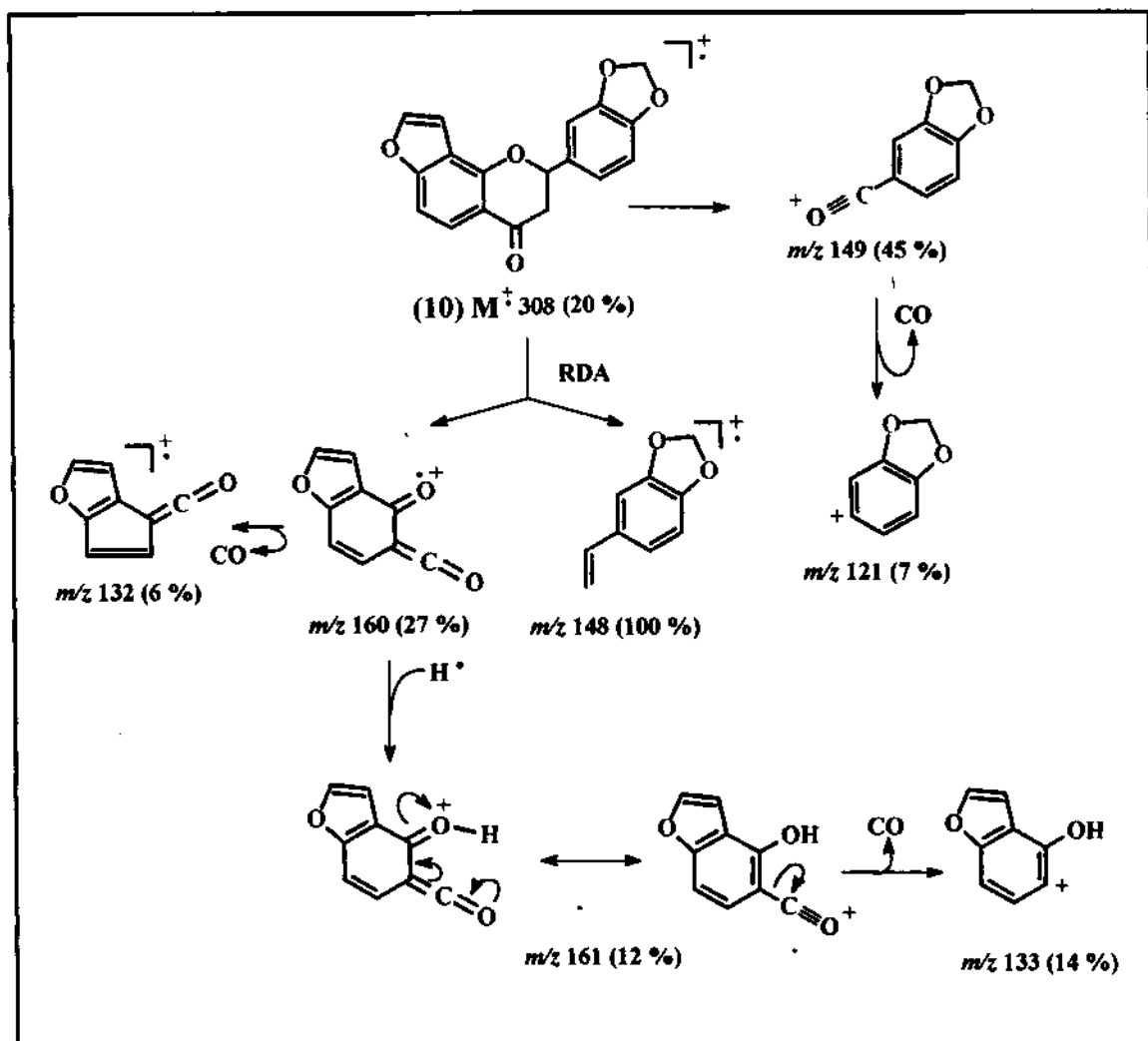


Figura 52. Proposta de fragmentação para a substância 10

No espectro de IV (Figura 51-apêndice) a banda a 1678 cm^{-1} refere-se ao estiramento da carbonila, as bandas a 1089 e 1033 cm^{-1} referem-se às ligações C-O-C.

No espectro de UV (λ_{max} nm log ϵ): 238 (4,61), a banda de absorção refere-se ao cromóforo benzoila presente no esqueleto de uma flavanona (Figura 53).

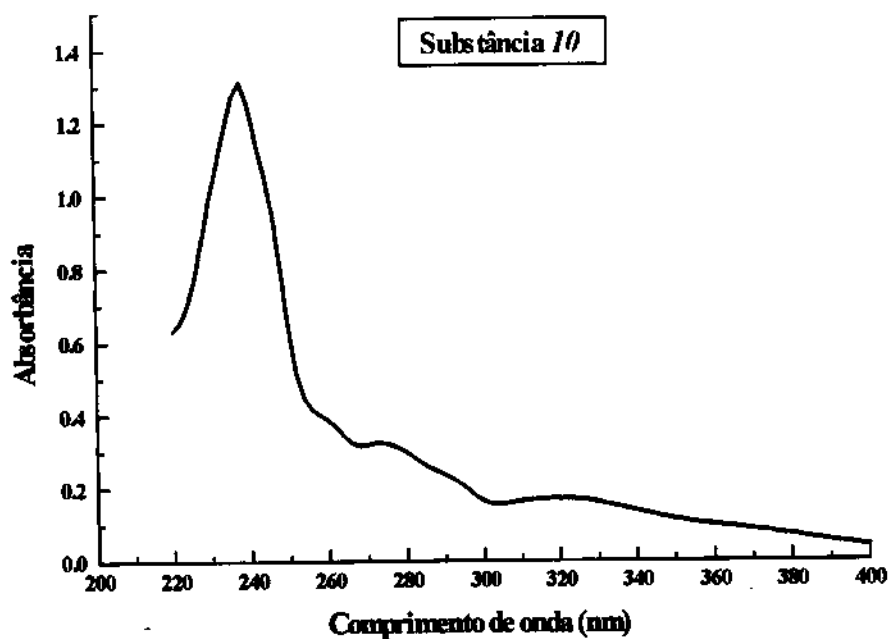
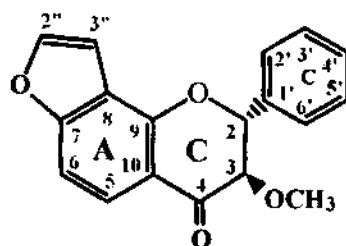


Figura 53. Espectro de UV da substância 10

Após um levantamento bibliográfico minucioso verificou-se que a **substância 10** é inédita na literatura.

3.5. Flavanonol

3.5.1. Substância 11 - Inédita



Substância 11

No espectro de RMN ^1H (Figura 54-apêndice, Tabela 3A) observa-se um duplete em 4,20 ppm (1H, *d*, $J = 10$ Hz) e um duplete em 5,50 ppm (1H, *d*, $J = 10$ Hz) característicos das absorções de H-2 e H-3 um flavanonol. A presença de um singleto em 3,42 ppm (3H) relativo a uma metoxila alifática sugere tratar-se do éter metílico correspondente. No anel A a presença de um anel furano é constatada através das absorções em 7,62 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz) e 6,93 ppm (1H, *dd*, $J = 2$ e 1 Hz). A posição angular deste anel está evidenciada pelas absorções a 7,88 ppm (1H, *d*, $J = 9$ Hz) relativo ao hidrogênio H-5, que está de acordo com o esperado para hidrogênio *peri* a carbonila e 7,23 ppm (1H, *dd*, $J = 9$ e 1 Hz), relativas ao hidrogênio H-6 acoplado a J^5 com o H-3'' do anel furano.

O anel B encontra-se monosubstituído conforme constatado através das absorção a 7,40-7,50 ppm (3H, *m*) e 7,54 ppm (2H, *m*).

No espectro de massas (Figura 55-apêndice) os principais fragmentos (Figura 56) referem-se ao íon molecular M^{+} 294 (9 %), e aos fragmentos da clivagem RDA do anel C, sendo aquele com m/z 134 (100%), o pico base.

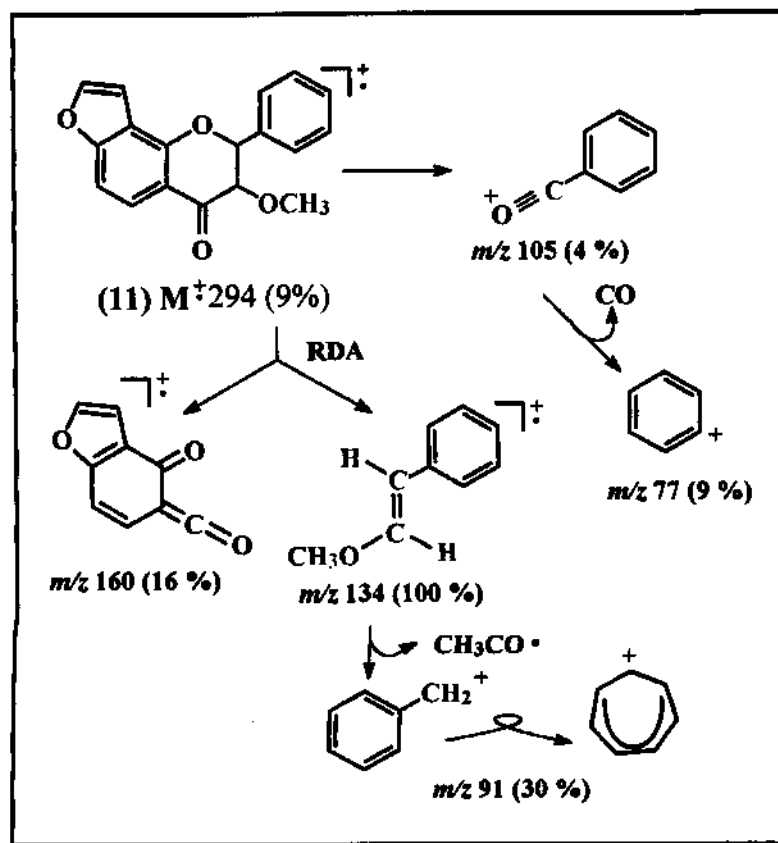


Figura 56. Proposta de fragmentação para a substância 11.

No espectro de UV ($\lambda_{\max}$ nm log ϵ): 240 (4,74) a banda de absorção refere-se ao cromóforo benzoila presente no esqueleto de um flavanonol (Figura 57).

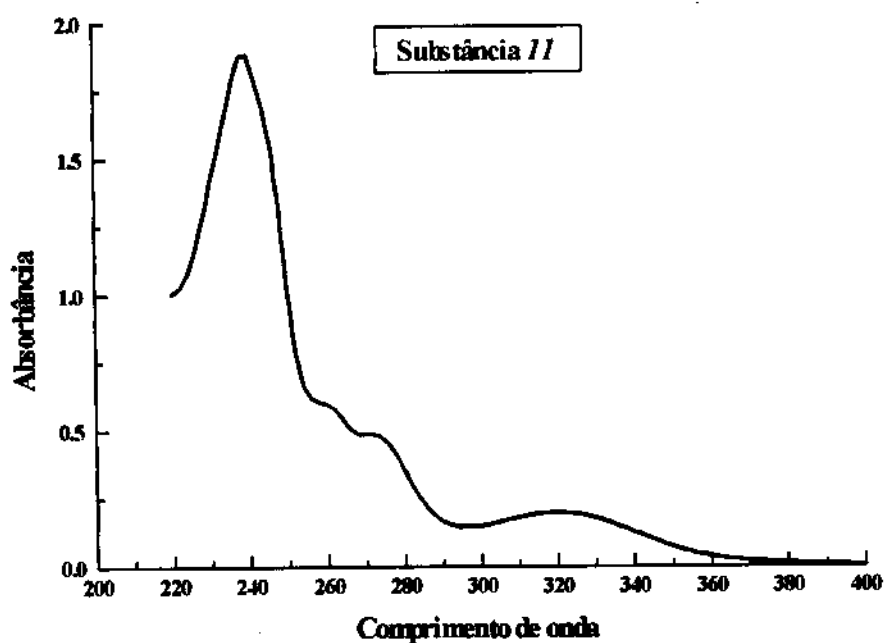
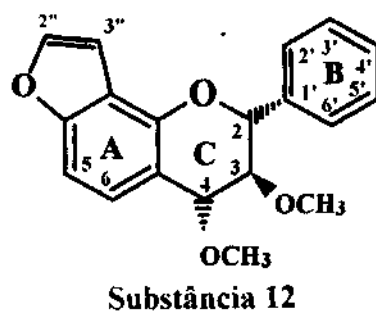


Figura 57. Espectro de UV da substância 11

Após um levantamento bibliográfico minucioso verificamos que a substância 11 é inédita na literatura.

3.6. 3,4-dimetoxi-flavana

3.6.1. Substância 12 - Inédita



No espectro de RMN ¹H (Figura 58-apêndice, Tabela 3A) a observa-se absorções a 4,73 ppm (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz), 3,71 ppm (1H, *dd*, *J* = 9,3 e 7,5 Hz) e

5,02 ppm (1H, *d*, $J = 9,3$ Hz), que são características para os hidrogênios H-4, H-3 e H-2 do esqueleto de uma flavana 3,4 dioxigenada.

No anel A a presença de um anel furano é constatada através das absorções a 7,56 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz) e 6,81 ppm (1H, *dd*, $J = 2$ e 1 Hz). A posição angular deste anel está evidenciada pelas absorções a 7,34 ppm (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz) relativo ao hidrogênio H-5, que está de acordo com o esperado para hidrogênio *peri* a carbonila e 7,18 ppm (1H, *dd*, $J = 8$ e 1 Hz) relativas ao hidrogênio H-6 acoplado a J^5 com o H-3" do anel furano.

O anel B encontra-se monosubstituído com absorção a 7,40-7,50 ppm (5H, *m*). Absorções a 3,0 ppm (3H, *s*) e 3,60 ppm (3H, *s*) referem-se a metoxila ligadas a carbono alifático.

A configuração relativa do anel C dever ser 2:3-*trans*-3:4-*trans* porque as constantes de acoplamento $J_{2/3} = 9,3\text{Hz}$ e $J_{3/4} = 7,5\text{Hz}$ estão de acordo com os dados da literatura $J_{2/3} = 10\text{Hz}$ e $J_{3/4} = 7,5\text{Hz}$ (HARBONE, 1975). O espectro de diferença de NOE confirmou a configuração relativa do anel C, através dos incrementos observados pela irradiação dos hidrogênios H-2 e H-4, conforme indicado na Tabela 5 e Figura 59.

Tabela 5. Hidrogênios irradiados no espectro de diferença de NOE para a substância 12.

Hidrogênio irradiado ppm	Hidrogênio com aumento de intensidade %
5,02 H-2	H-4 (6%), H-2' e H-6' (10%)
4,73 H-4	OCH ₃ (11%), H-5 (4%) e H-2 (5%)

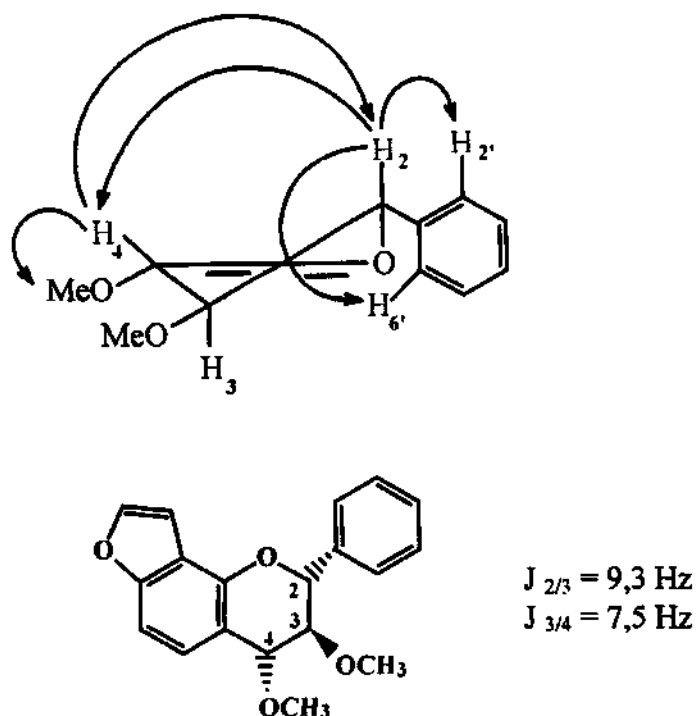


Figura 59. Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de NOE para a substância 12

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 60-apêndice, Tabela 2A) mostra valores coerentes com a estrutura proposta, onde os sinais dos carbonos a C-2 (80,50 ppm), C-3 (81,98 ppm) e C-4 (79,86 ppm) aparecem com os deslocamentos esperados para uma flavana 3,4 dimetoxilada.

O espectro de massas (Figura 61-apêndice) apresenta o íon molecular $\text{M}^+ = 310$ (9%), e aqueles gerados pela fragmentação retro Diels-Alder do anel C, sendo aquele com $m/z = 176$ (100 %), o pico base (Figura 62).

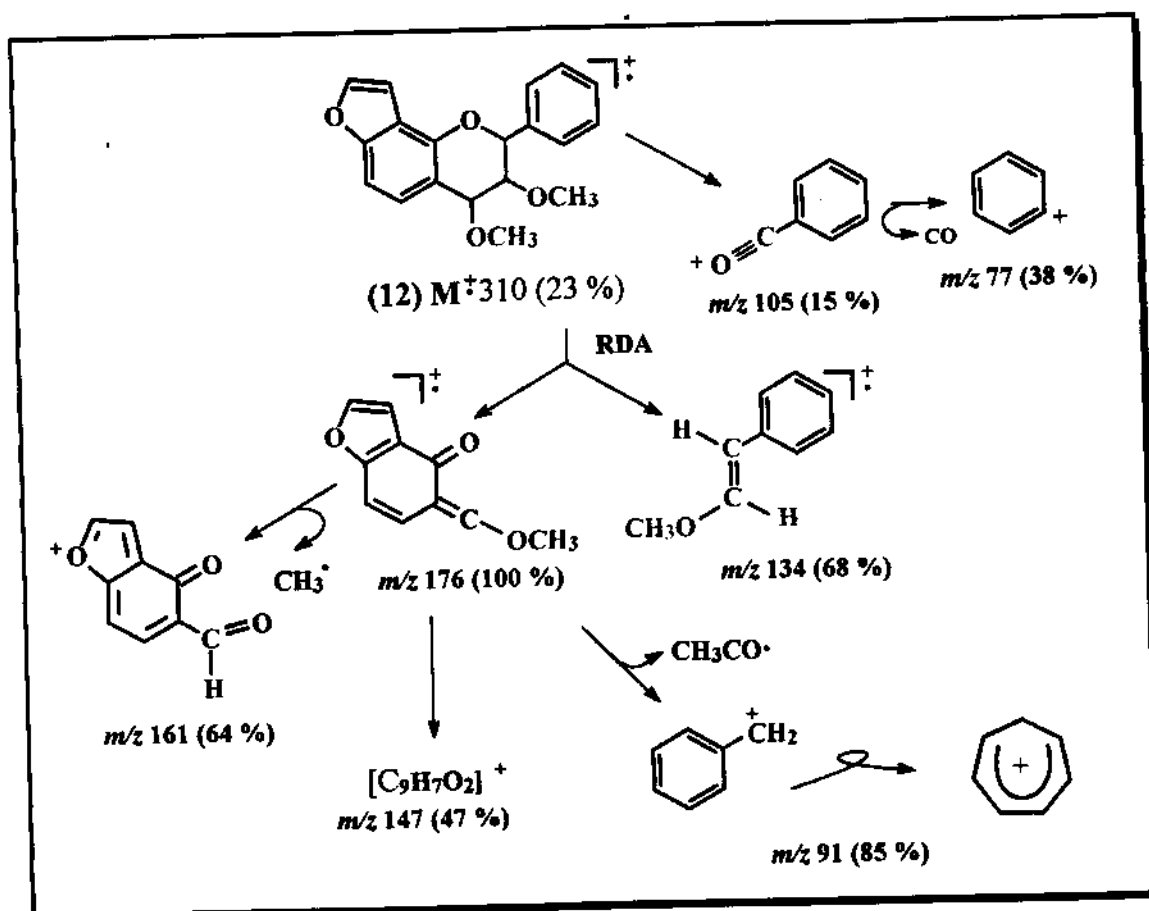


Figura 62. Proposta de fragmentação para a substância 12.

No espectro de IV (Figura 61-apêndice) as bandas 1142, 1067 e 1017 cm^{-1} referem-se às ligações C-O-C.

No espectro de UV (λ_{max} nm log ϵ): 248 (4,43), e 280 (3,75 ombro), referem-se aos cromóforo benzoíla característico para uma flavana (Figura 63).

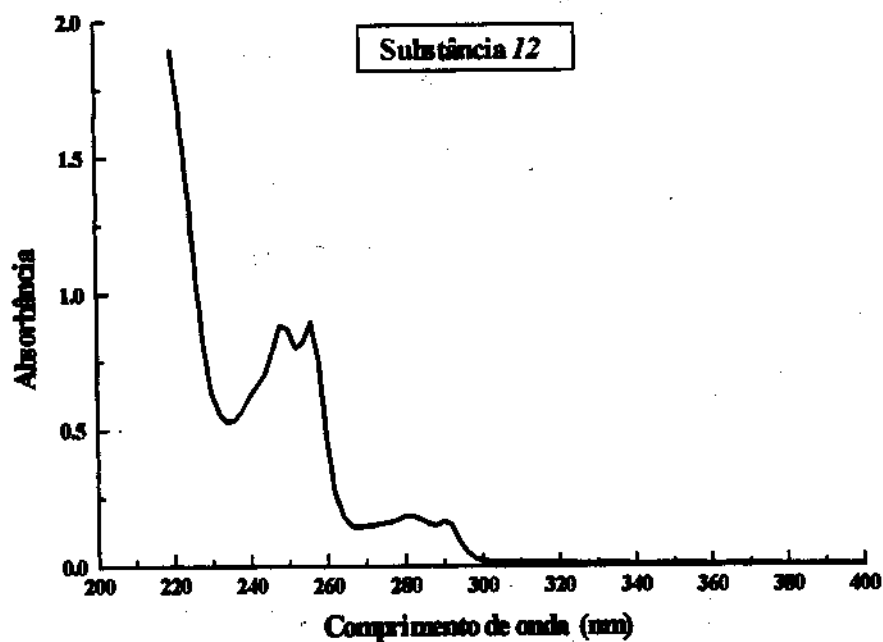


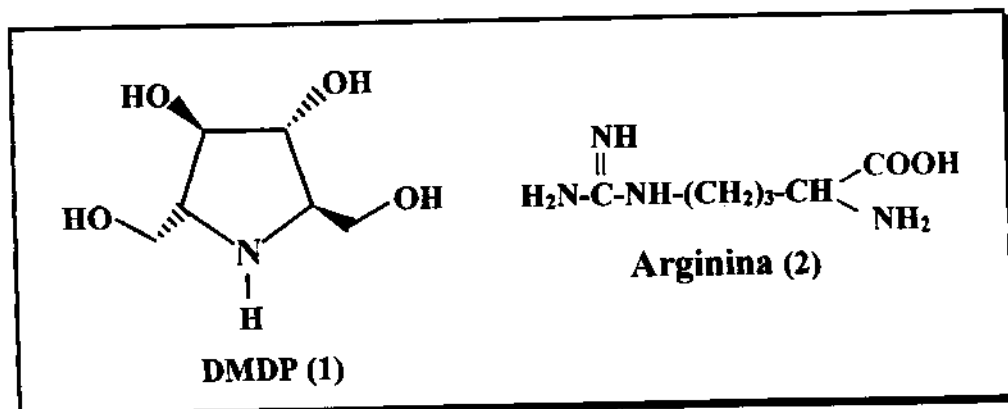
Figura 63. Espectro de UV da substância 12

O valor da rotação ótica é $[\alpha]_D^{20} = +21,15^\circ$ (c 0,4, CH_2Cl_2).

Após um levantamento bibliográfico minucioso constatou-se que a substância 12 é inédita na literatura.

3.7. Aza-Açúcares

Como as sementes de diversas espécies de *Lonchocarpus* possuem aza-açúcares e aminiácidos não proteicos tais como 2,5-dihidroimetil-3,4-diidroxipirrolidona (DMDP, 1) e arginina (2), os quais foram detectados inclusive nas sementes de *L. latifolius* (EVANS *et alii*, 1985), e sabendo-se que estas substâncias apresentam algumas atividades biológicas interessantes como inibição do crescimento do vírus HIV (*in vitro*) [NAOKI ASANO *et alii*, 1997]. Elaborou-se uma pequena quantidade do extrato metanólico para verificar a presença destas substâncias.

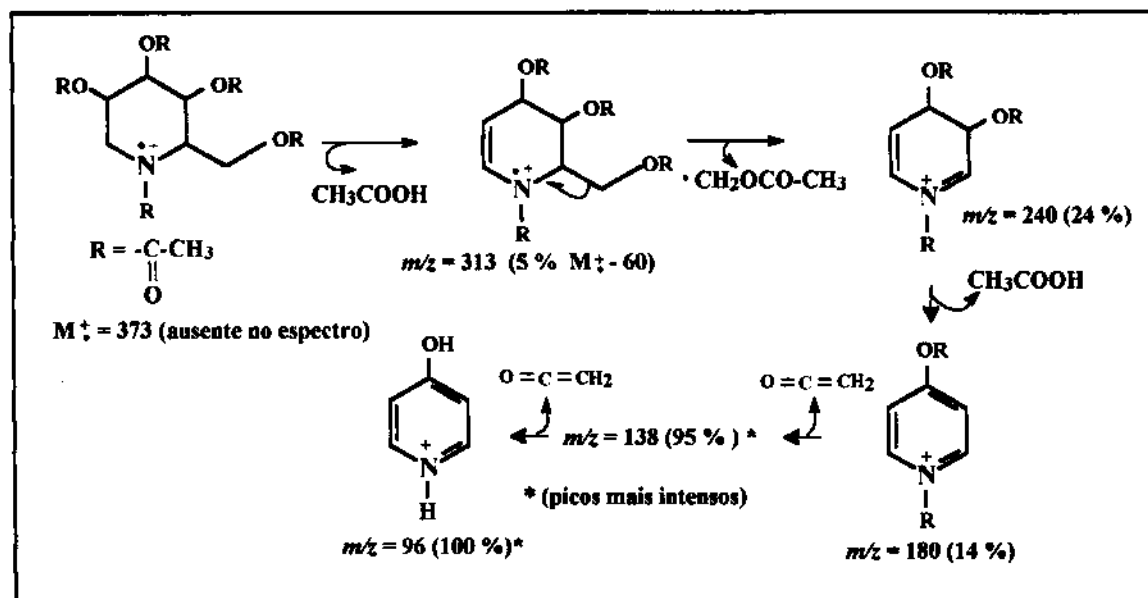


O extrato metanólico das raízes foi analisado em CCD desenvolvido com BAW (ácido acético:butanol:água 1:4:5 v/v) e revelado com ninidrina, quando se constatou a presença de manchas avermelhadas sugerindo-se a ocorrência de aza-açúcares e, ou aminoácidos.

Uma parte do extrato foi acetilada com piridina e anidrido acético. O produto acetilado desta reação foi submetido a CCP (hexano:acetato de etila 80:20 v/v) revelando-se uma estreita faixa lateral da placa com solução de anisaldeído modificado, o que permitiu a visualização de uma faixa principal de onde se extraiu o material acetilado que foi subsequentemente analisado por CG-EM.

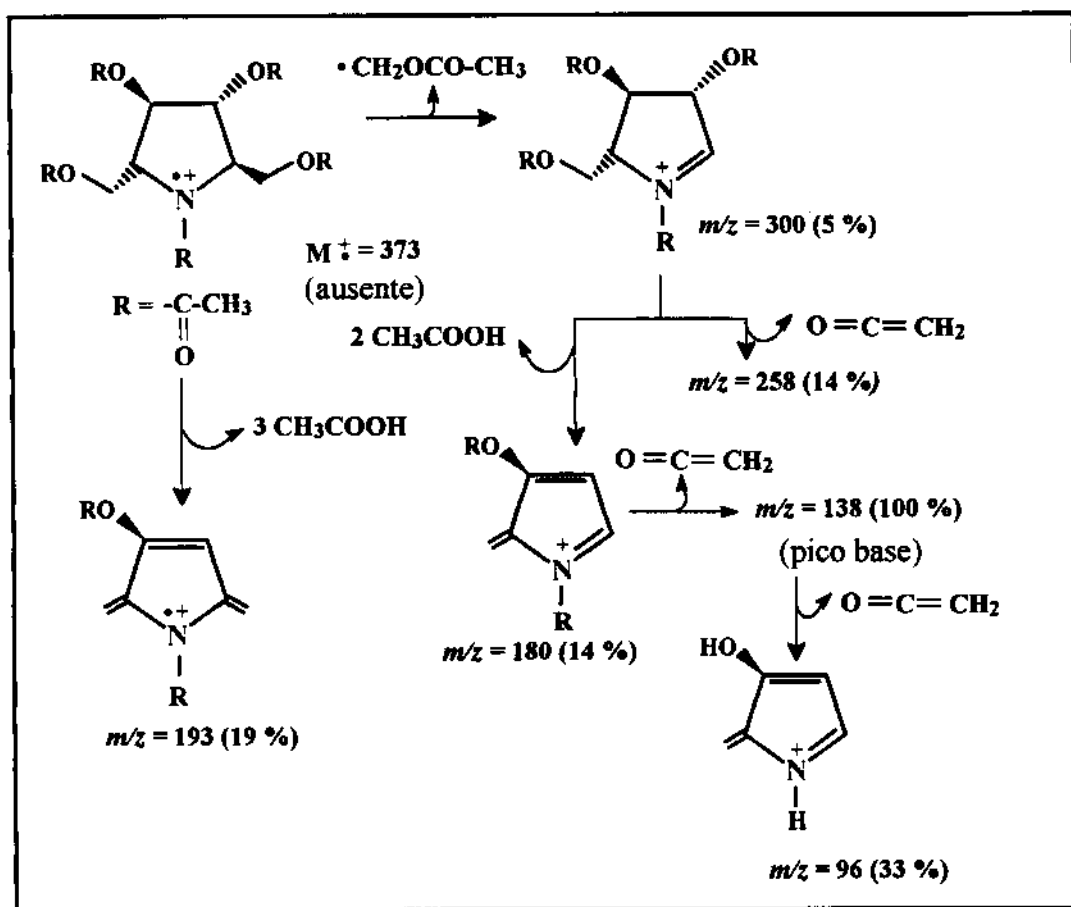
Pelo cromatograma (Figura 64-apêndice) constatou-se a presença de pelo menos vinte compostos entre os quais se destacam aqueles com tempo de retenção na faixa de 21,6-23,0 min, correspondendo a cinco picos. Os picos com $t_R = 22,94$ min (mais intenso do cromatograma) e $t_R = 22,66$ min correspondem a dois compostos cujos espectros de massas são idênticos (Figura 65-apêndice). O pico de maior massa em ambos aparece com uma relação $m/z = 313$, o que está de acordo com o esperado pensando-se em DMJ ou DNJ peracetilados ($M^+ - 373$) perdendo uma molécula de ácido acético ($M^+ - 60$), os picos mais intensos com $m/z = 138$ e 96 estariam representando cátions piridínicos conforme racionalizado através de um provável caminho de fragmentação (Quadro 5) em relação a fragmentação proposta para a glicose peracetilada (BUDZIKIEWICS *et alii*, 1964). DMJ e DNJ possuem a mesma fórmula constitucional e tratam-se de diastereoisômeros.

Quadro 5. Proposta de fragmentação para a DMJ e DNJ ($t_R = 22,94$ e $22,66$ min) peracetilada



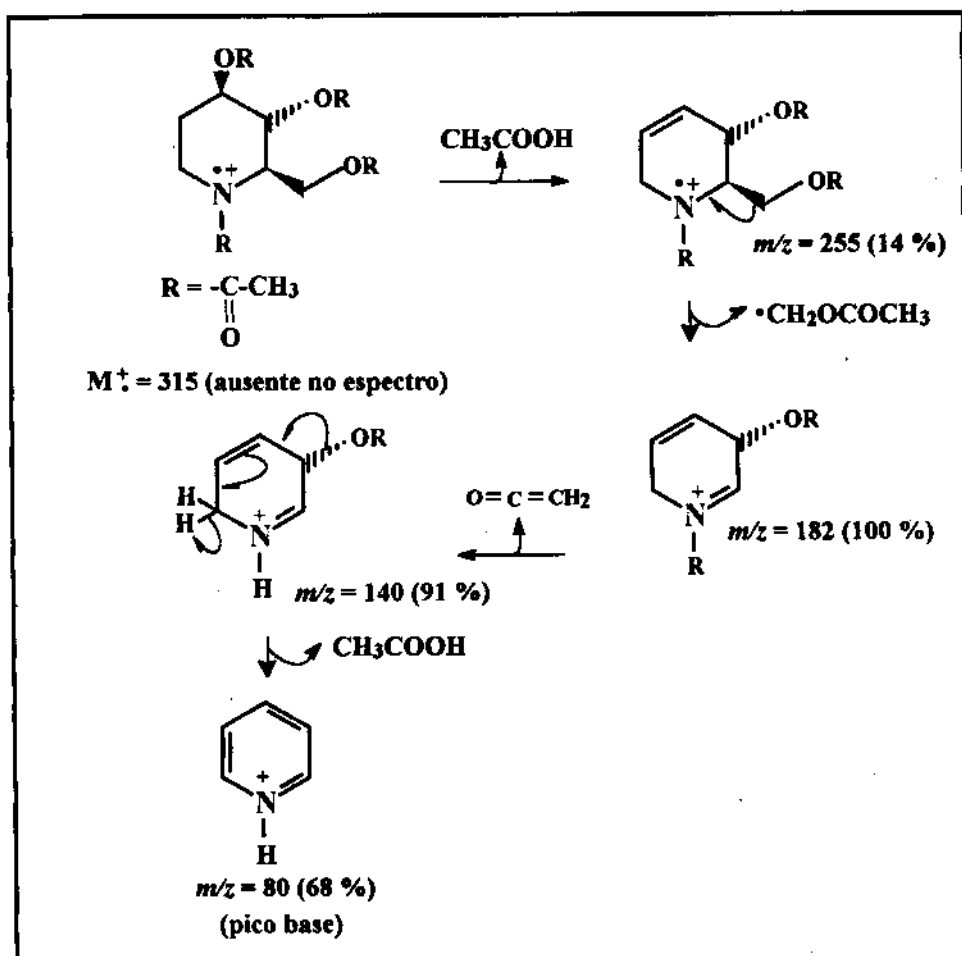
O composto com espectro de massa com $t_R = 22,88$ min (Quadro 6) é idêntico ao do DMDP peracetilado, isolado anteriormente do extrato metanólico de *L. subglaucescens* (SANTOS, 1998) que foi identificado através dos respectivos dados espectroscópicos de RMN ^1H , RMN ^{13}C e HMQC.

Quadro 6. Proposta de fragmentação para a DMDP ($t_R = 22,88$ min) peracetilada

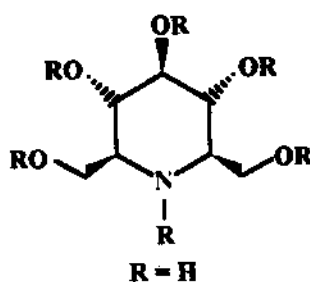


O espectro de massas do composto com $t_R = 21,62$ min (maior massa com $M^+ - 255$) pode ser interpretado supondo tratar-se de fagonina peracetilada (Figura 65-apêndice) conforme ilustrado através da racionalização de um caminho de fragmentação provável (Quadro 7).

Quadro 7. Proposta de fragmentação para a fagonina ($t_R = 21,62$ min) peracetilada



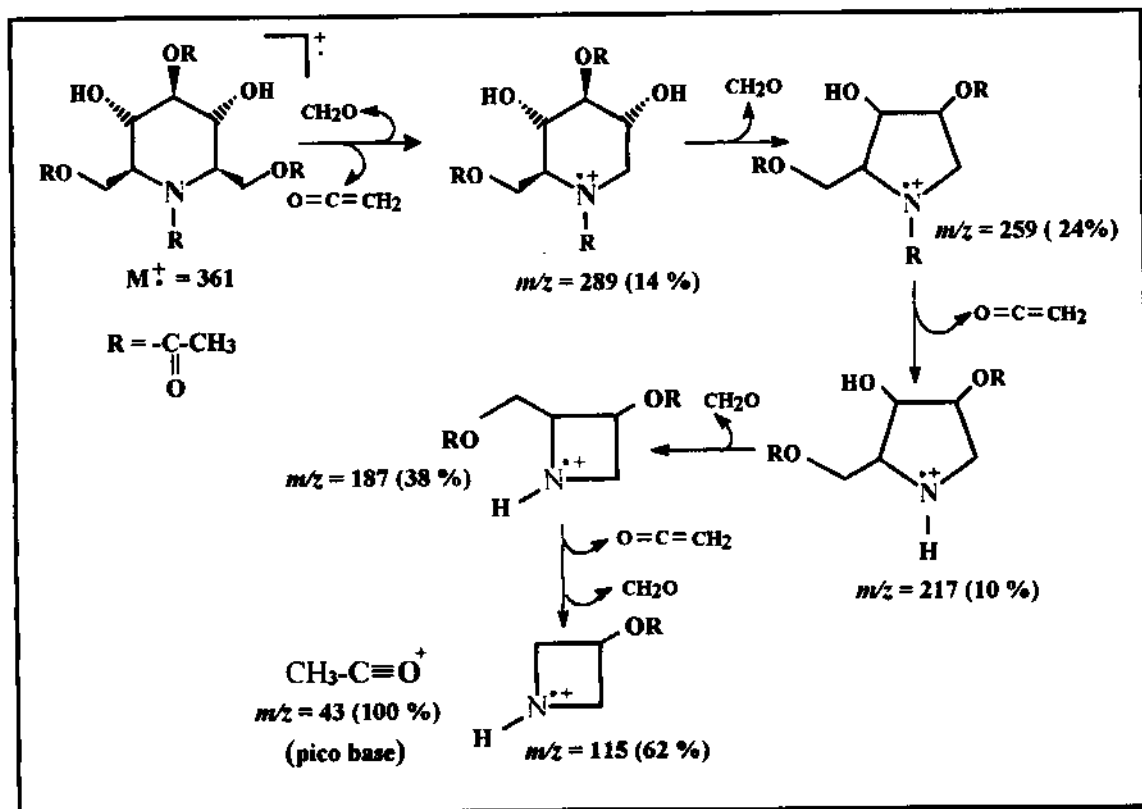
Finalmente o espectro de massas do composto com $t_R = 21,82$ (com maior massa com $m/z = 361$) pode ser interpretado supondo tratar-se de um derivado tetracetilado de homonojirimicina, pois sabendo que cada unidade acetil ($-\text{COCH}_3$) correspondendo a 43 u.m.a. tem-se:



		M^+
Monoacetilado	192 + 43	235
Diacetilado	191 + 86	277
Triacetilado	190 + 129	319
Tetracetilado	189 + 172	361

Pela sequência dos principais fragmentos observam-se duas perdas de 72 u.m.a., uma perda de 42 u.m.a. e duas perdas de 30 u.m.a. que podem ser racionalizadas através do caminho de fragmentação indicado (Quadro 8). É estranho não se observar a perda do radical $-\text{CH}_2\text{O}-\text{COCH}_3-$ (73 u.m.a.), nem de ácido acético (60 u.m.a.) como no espectro de DMDP, DMJ/DNJ e fagonina pentacetilado.

Quadro 8. Proposta de fragmentação para a Homonijirimicina ($t_R = 21,82$ min) peracetilada



Todos os espectros de massas acima mencionados apresentam um pico com $m/z = 43$ que corresponde ao fragmento CH_3-CO^+ característico do grupo acetil.

Tabela 1A. Dados dos espectros de RMN¹H (CDCl₃) das substâncias 1, 2 e 10.

	1	2	10
Hidrogênios (ppm int. muti. J (Hz))			
OCH ₃	-	3,93 (3H, s)	-
H-2	-	-	5,53 (1H, dd, 3 e 13)
H-3	6,78 (1H, s)	-	2,90 eq (1H, dd, 3 e 17) 3,10 ax (1H, dd, 13 e 17)
H-5	8,16 (1H, d, 9)	8,19 (1H, d, 9)	7,89 (1H, d, 9)
H-6	7,56 (1H, dd, 1 e 9)	7,55 (1H, dd, 1 e 9)	7,20 (1H, dd, 1 e 9)
H-2'	7,40 (1H, d, 2)	7,68 (1H, d, 2)	7,05 (1H, d, 2)
H-5'	6,97 (1H, d, 8)	6,97 (1H, d, 8)	6,87 (1H, d, 8)
H-6'	7,54 (1H, dd, 2 e 8)	7,76 (1H, dd, 2 e 8)	6,97 (1H, dd, 2 e 8)
H-2''	7,77 (1H, d, 2)	7,77 (1H, d, 2)	7,60 (1H, d, 2)
H-3''	7,20 (1H, dd, 1 e 2)	7,18 (1H, dd, 1 e 2)	6,93 (1H, dd, 1 e 2)
H-1'''	6,10 (2H, s)	6,10 (2H, s)	6,03 (2H, s)

Tabela 1B. Dados dos espectros de RMN¹H (CDCl₃) das substâncias 4, 6 e 7.

	4	6	7 (DMSO)
Hidrogênios (ppm int. muti. J (Hz))			
CH ₃	1,51 (6H, s)	1,51 (6H, s)	1,45 (6H, s)
OCH ₃	3,89 (3H, s)	3,88 (3H, s)	3,87 (3H, s)
OCH ₃	-	-	3,88 (3H, s)
H-5	8,10 (1H, d, 9)	8,01 (1H, d, 9)	-
H-6	6,85 (1H, d, 9)	6,86 (1H, d, 9)	6,48 (1H, s)
H-2'	8,03 (2H, d, 8)	7,61 (1H, d, 2)	8,03 (2H, d, 8)
H-3'	7,50-7,55 (3H, m)	-	7,5-7,6 (3H, m)
H-4'	7,50-7,55 (3H, m)	-	7,5-7,6 (3H, m)
H-5'	7,50-7,55 (3H, m)	6,96 (2H, d, 8)	7,5-7,6 (3H, m)
H-6'	8,03 (2H, d, 8)	7,69 (1H, dd, 2 e 8)	8,03 (2H, d, 8)
H-3''	5,73 (1H, d, 10)	5,74 (1H, d, 10)	5,79 (1H, d, 10)
H-4''	6,89 (1H, d, 10)	6,88 (1H, d, 10)	6,89 (1H, d, 10)
H-1'''	-	6,08 (2H, s)	-

Tabela 1C. Dados dos espectros de RMN ^1H (CDCl_3) das substâncias 5, 8 11 e 12.

	5	8	11	12
Hidrogênios (ppm int. muti. J (Hz))				
$\text{OCH}_3(\text{C-3})$	-	-	-	3,00 (3H, s)
$\text{OCH}_3(\text{C-4})$	3,93 (3H, s)	-	3,42 (3H, s)	3,60 (3H, s)
H-2	-	-	5,5 (1H, d, 10)	5,02 (1H, d, 9,3)
H-3	-	6,9 (1H, s)	4,20 (1H, d, 10)	3,71 (1H, dd, 7,5 e 9,3)
H-4	-	-	-	4,73 (1H, dd, 7,5 e 10)
H-5	8,21 (1H, d, 9)	8,19 (1H, d, 9)	7,88 (1H, d, 9)	7,34 (1H, d, 9)
H-6	7,5-7,6 (m)	7,57 (1H, d, 9)	7,23 (1H, dd, 1 e 9)	7,18 (1H, dd, 1 e 8)
H-2' e 6'	8,12 (2H, dd, 2 e 11)	7,99 (2H, dd, 2 e 9)	7,54 (2H, dd, 2 e 8)	7,4-7,5 (5H, m)
H-3', 4' e 6'	7,5-7,6 (3H, m)	7,5-7,6 (3H, m)	7,4-7,5 (3H, m)	7,4-7,5 (5H, m)
H-2''	7,77 (1H, d, 2)	7,79 (1H, d, 2)	7,62 (1H, d, 2)	7,56 (1H, d, 2)
H-3''	7,19 (1H, d, 2)	7,23 (1H, dd, 1 e 2)	6,93 (1H, dd, 1 e 2)	6,81 (1H, dd, 1 e 2)

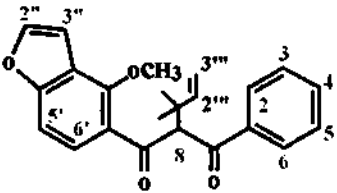
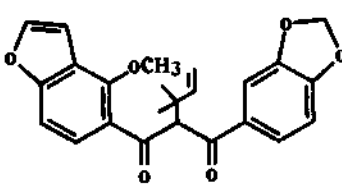
Tabela 1D. Dados dos espectros de RMN ^1H (CDCl_3) das substâncias 3 e 9.

	3	9
Hidrogênios (ppm int. muti. J (Hz))		
CH_3	1,21 (3H, s)	1,21 (3H, s)
CH_3	1,23 (3H, s)	1,23 (3H, s)
OCH_3	3,84 (3H, s)	3,94 (3H, s)
H-5'	7,18 (1H, dd, 1 e 9)	7,19 (1H, dd, 1 e 9)
H-6'	7,45 (1H, d, 9)	7,42 (1H, d, 9)
H-2	8,02 (2H, m)	7,60 (1H, d, 2)
H-3	7,40-7,56 (3H, m)	-
H-4	7,40-7,56 (3H, m)	-
H-5	7,40-7,56 (3H, m)	6,84 (1H, d, 8)
H-6	8,02 (2H, m)	7,66 (1H, dd, 2 e 8)
H-2''	7,58 (1H, d, 2)	7,60 (1H, d, 2)
H-3''	6,93 (1H, dd, 1 e 2)	6,95 (1H, dd, 1 e 2)
H-8	5,74 (1H, s)	5,64 (1H, s)
H-2'''	6,10 (1H, dd, 17 e 11)	6,10 (1H, dd, 17 e 11)
H-3,'''	4,92 (1H, dd, 1 e 17)	4,92 (1H, dd, 2 e 17)
H-3,'''	4,87 (1H, dd, 11 e 1)	4,88 (1H, dd, 11 e 2)
H-1'''	-	6,0 (2H, s)

Tabela 2A. Dados dos espectros de RMN¹³ C (CDCl₃) das substâncias 1, 4 e 12.

	1	4	12
Carbonos (ppm)			
C-2	162,30	154,68	80,50
C-3	107,04	141,30	81,96
C-4	178,13	115,14	79,86
C-5	121,28	126,14	105,15
C-6	110,06	130,21	124,19
C-7	158,31	157,39	156,04
C-8	117,04	109,22	116,70
C-9	150,60	151,43	147,90
C-10	119,26	118,13	115,36
C-1'	127,72	128,38	138,13
C-2'	106,20	128,28	127,19
C-3'	148,51	128,60	128,36
C-4'	150,55	128,87	128,44
C-5'	108,83	128,60	128,36
C-6'	121,73	128,28	127,19
C-2''	145,75	77,78	144,00
C-3''	104,13	131,24	104,09
C-4''	-	130,53	-
O-CH ₂ -O	101,93	-	-
CH ₃	-	28,13	-
OCH ₃	-	60,13	57,79 59,53

Tabela 2B. Dados dos espectros de RMN ^{13}C (CDCl_3) das substâncias 3 e 9.

	3	9
Carbonos (ppm)		
C-1'	127,15	126,7
C-2'	152,34	152,2
C-3'	117,4	118,0
C-4'	158,8	158,7
C-5'	106,6	106,7
C-6'	126,7	126,8
C-7	195,4	193,3
C-8	66,8	66,6
C-9	197,6	197,6
C-1	138,7	133,5
C-2	128,9	107,7
C-3	128,4	148,0
C-4	132,7	151,5
C-5	128,4	108,7
C-6	128,9	125,2
C-2''	144,7	144,7
C-3''	105,5	105,5
C-1'''	41,7	41,5
C-2'''	146,1	146,1
C-3'''a	111,7	111,5
C-3'''b	111,7	111,5
OCH ₃	60,0	60,4
CH ₃	26,4	25,8
	26,8	26,4
O-CH ₂ -O	-	101,8

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam: Elsevier, 564 p. 1989.
- ANTONIOLETTI, R. BONADIES, F. ORELLI, L. R. & SCETTRI, A. **Gazzeta Chimica Italiana** 122: 237, 1992.
- BLANCO, I. S. Flavonóides de *Lonchocarpus muehlbergianus* e síntese de flavanas 4-oxigenadas 1995 143p Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Química UNICAMP.
- BUDZIKIEWICS, H., DEJERASSI, C., WILLIAMS, D. H. Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. São Francisco: Holden-Day, 1964. v. 2, 360p.
- EVANS, V.S. E. FELLOWS L. E. & BELL, A. Distribution and systemitic significance of non-protein amino acids and amines in the *tephrosieae*. **Biochemical Systematic and Ecology** 13(3): 271-302, 1985.
- GARCEZ, F. R., SCRAMIN, S. NASCIMENTO, M. C. do, MORS, W. B. Prenylated flavonoids as evolutionary indicators in genus *Dahlstedtia* **Phytochemistry** 27(4): 1079, 1988.
- GARG, G. P., SHARMA, N. N. & KHANNA, R. N. Two new furano compounds, glabra-I & glabra-II from the stem-bark of *Pongamia glabra* **Indian Journal of chemistry** 16 B: 658-661, 1978.
- HARBONE, J. B. The flavonoids advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1996.
- LYRA, D. A., MELLO, J. F. de & MONACHE, G. D. Flavonoids from *Derris mollis* **Gazzetta Chimica italiana**. 109 : 93-94, 1979.
- MAGALHÃES, A. D., TOZZI, A. M. A., MAGALHÃES, G. E., BLANCO, I. S., NOGUEIRA, M. A. Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species. **Phytochemistry**, 46 (6): 1029-1033, 1997.

- MAGALHÃES, A. F., MAGALHÃES, E. G., COIMBRA, F. T. Síntese de dibenzoilmetanos alquilados no carbono C-8. Suplemento da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. QO 050, 1997.
- MAGALHÃES, A. F., TOZZI, A. M. A., SALES, B. H. L. N. and MAGALHÃES, E. G. Twenty three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. **Phytochemistry** 42 (5): 1459-1471, 1996.
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC 126p. 1988.
- MERCK Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E. Merck, Darmstadt, 118p. 1971.
- NAOKI, A. Homonojirimycin isomers and glycosides from *Aglaohema treubii* **Journal of Natural Product** 60 (2): 98-101, 1997.
- PELTER, A., WARD, R. S., VENKATA, E. & RAJU, R. N. 8-substituted flavonoids and 3'-substituted 7-oxygenated chalcones from *Tephrosia purpurea*. **J. C. S. Perkin I** 9: 2491-2498, 1981.
- RANGASWAMI, S. & SASTRY, B. V. **Curr. sci.** 24:12, 1955.
- SALES, B. H. N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth)-Leguminosae e síntese de β -hidroxichalconas 1994 198p Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Química UNICAMP.
- SANTOS, C. C. Tese de doutorado em andamento 1998, Instituto de Química-UNICAMP
- TALAPATRA, S. K., MALLIK, A. K. & TALAPATRA, B. Isopongaglabrol and 6 methoxyisopongaglabrol two new hydroxyfuranoflavones from *Pongamia glabra* **Phytochemistry** 21(3):761-766, 1982.
- TANAKA, T., LINURA, M. & KAORU, Y. E. Flavonoids in roots bark of *Pongamia pinnata*. **Phytochemistry** 31(3): 993-998, 1992.

CAPÍTULO II

Análise dos Extratos de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC por CLAE

1. INTRODUÇÃO

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação muito usada para compostos como terpenóides, todos os tipos de fenóis, alcalóides, lípides e açúcares em misturas complexas, também tem sido usada para análises qualitativas e quantitativas. Como técnica para separação de flavonóides e compostos correlatos tem sido usada para separação de antocianidinas, xantonas, isoflavonas, procianidinas e taninos, sendo que a coluna cromatográfica mais amplamente empregada é C-18, fase reversa, usando-se como fase móvel misturas de metanol/água acidificada ou acetonitrila/água. (ASSHAUER & ULLNER, 1986)

Na literatura encontram-se diversos exemplos de condições e de uso desta técnica para separação e quantificação de flavonóides (CHAVES *et alii*, 1997, MARKHAM *et alii*, 1996). A quantificação também pode servir como ferramenta no auxílio para estudos de quimiotaxonomia, pois dá uma visão da distribuição dos flavonóides ao longo da planta (HEGNAUER & BARKMEIJER, 1993).

Neste capítulo procurou-se estudar o perfil cromatográfico de *Lonchocarpus latifolius*, através da análise das raízes, casca do caule, folhas e sementes, o que contribuiu para uma avaliação da distribuição dos flavonóides nesta da planta. Assim também como a variação sazonal dos flavonóides isolados e a quantificação destes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As análises qualitativas e quantitativas dos extratos foram feitas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Hewlett Packard, modelo 1090, série II/M com:

Detector: Espectrofotométrico UV/VIS, arranjo de diodos.

Coluna: Waters do tipo ODS 3,9 x 150mm, Novapack, 4 μ m, e coluna HP do tipo ODS 4,6 x 100mm, 5 μ m.

Fase móvel: Gradiente 80:20 (H₂O/ACN)-100 (ACN) em 30 min e gradiente 97:3 (H₂O/MeOH)-100 (MeOH) em 30 min.

Volume de injeção: 2 μ L

Comprimento de onda de detecção: 240nm

Fluxo: 0,8mLmin⁻¹

Como padrões utilizaram-se os flavonóides isolados do extrato éter de petróleo das raízes de *L. latifolius*, após terem sido purificados por cromatografia de camada preparativa CCP e por CLAE semi-preparativa, cujas análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido da Waters modelo 600E com:

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

Coluna: Regis do tipo ODS, 10x250mm, 5 μ m.

Fase móvel: Gradiente linear H₂O/ACN 0-100% (ACN) em 60 min.

Volume de injeção: 250 μ L

Comprimento de onda de detecção: 240nm

Fluxo: 1,0mLmin⁻¹

As condições para análise sazonal foram idênticas às da análise quantitativa, sendo a análise efetuada com as raízes coletadas nos períodos de inverno, primavera e verão entre 1996 e 1997.

2.1 Análise Qualitativa

As análises qualitativas dos extratos de éter de petróleo, diclorometânico e metanólico obtidos das raízes e extratos de éter de petróleo de folhas, sementes e caule foram feitas para verificar o perfil cromatográfico de cada extrato frente as substâncias isoladas, baseando-se na co-injeção de cada padrão isolado do extrato de éter de petróleo. Para identificação dos picos nos cromatogramas além do tempo de retenção, compararam-se também os espectros de UV correspondente a cada pico com o do padrão isolado e determinou-se a pureza de cada substância através da varredura dos espectros de UV correspondente a cada pico do cromatograma.

2.1.1. Seleção da Fase Móvel

A fase móvel escolhida foi a mistura de acetonitrila e água pois de acordo com dados da literatura (KINGSTON, 1979), ela separa bem flavonóides. Iniciou-se a eluição com um gradiente 50:50 de acetonitrila:água aumentando-se a concentração de água até 20:80 quando se-obteve uma melhor separação dos compostos.

2.1.2. Seleção do Comprimento de Onda

A escolha do comprimento de onda que detectasse um maior número de compostos do extrato, baseou-se no comportamento dos flavonóides que apresentam bandas de absorção relativas aos sistemas cinamoila (banda I $\lambda = 300$ a 380 nm) e benzoila (banda II $\lambda = 240$ a 280 nm), aumentando-se o comprimento de onda gradativamente de $\lambda = 220$ até 340 nm. O comprimento de onda escolhido foi o $\lambda = 240$ nm porque permitiu a detecção de um maior número de compostos.

2.2. Análise Quantitativa

O método de avaliação utilizado foi o de calibração externa, obtendo-se curvas analíticas com coeficientes de correlação de no mínimo 0,999. A seleção da fase móvel, do comprimento de onda e as demais condições de análises

utilizadas na construção das curvas analíticas, foram as mesmas empregadas na análise qualitativa dos extratos.

2.2.1. Preparação das soluções padrões

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

2.2.2. Construção das curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas com base na seguinte equação:

$$y = a + b x$$

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

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

As curvas analíticas foram obtidas medindo-se as áreas dos picos no comprimento de onda máximo específico para cada padrão utilizado, sendo que para tal foram feitos espectros de UV de cada uma das substâncias isoladas da planta.

Os respectivos dados estão apresentados nas tabelas de 1 a 9. Analogamente procedeu-se à análise sazonal cujos dados se encontram nas tabelas 10-11.

Tabela 1. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de raízes *L. latifolius* coletadas em agosto de 1994 e 1996

Padrão	Concentração mg/mL	Área	Área do pico Agosto de 1994	Área do pico Agosto de 1996
1	2,70	1184	99,70	260,47
	1,30	581		
	0,675	251		
	0,3375	86		
2	2,40	5447	1936	1485
	1,20	2758		
	0,60	1404		
	0,30	830		
	0,15	372		
3	2,70	7941	2699	1948
	1,35	4033		
	0,675	1964		
	0,3375	958		
	0,16875	475		
4	3,00	4645	1772	1480
	1,50	2324		
	0,75	1177		
5	3,20	5299	4164	2651
	1,60	2575		
	0,80	1332		
	0,40	633		
6	2,00	3405	685	516
	1,00	1641		
	0,50	766		
	0,25	341		
8	8,00	22865	6736	4519
	4,00	11555		
	2,00	5418		
	1,00	2800		
	0,50	1322		
12	1,00	1025	253	136
	0,50	533		
	0,25	259		
	0,125	172		
	0,0625	69		

Tabela 2. Equações da reta para as substâncias isoladas do extrato éter de raízes de petróleo de *L. latifolius* coletado em agosto de 1994 e 1996

Padrões	Equação da reta $Y = a + b x$	Coefficiente de correlação
1	$Y = -53,17 + 460,65 x$	0,9996
2	$Y = 85,71 + 2232,79 x$	0,9998
3	$Y = -20,51 + 2957,78 x$	0,9999
4	$Y = 16,50 + 1542,19 x$	1
5	$Y = -30,61 + 1660,24 x$	0,9998
6	$Y = -105,99 + 1753,68 x$	0,99999
8	$Y = -138,08 + 2880,67 x$	0,9999
12	$Y = 5,25 + 1026,49 x$	0,999

Tabela 3. Dados utilizados para construção das curvas analíticas da substância 13 isolada dos extrato diclorometânico e metanólico das raízes de *L. latifolius* coletado em agosto de 1994.

Extratos	Substância 13		
	Concentração mg/mL	Área	área do pico 1994
Diclorometânico	4,50	4387	490,12
	2,25	2138	
	1,125	1023	
	0,56	513	
	0,28	288	
Metanólico	1,50	1180	928
	0,75	618	
	0,375	319	
	0,1875	162	

Tabela 4. Equações da reta para a substância 13 isolada dos extratos diclorometânico e metanólico das raízes de *L. latifolius* coletado em agosto de 1994.

Extratos	Substância 13	
	Equação da reta $Y = a + b x$	Coefficiente de correlação
Diclorometânico	$Y = -36,34 + 978,17 x$	0,9997
Metanólico	$Y = 26,43 + 772,86 x$	0,9998

Tabela 5. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de folhas de *L. latifolius*.

Padrão	Concentração mg/mL	Área	Área do pico 1996
3	3,00	8465	2122
	1,50	4316	
	0,75	2182	
	0,375	1118	
	0,1875	562	
8	4,50	4599	552
	2,25	2458	
	1,125	1115	
	0,56	557	
	0,28	271	

Tabela 6. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de sementes de *L. latifolius*.

Padrão	Concentração mg/mL	Área	Área do pico 1996
3	3,00	8465	1003
	1,50	4316	
	0,75	2182	
	0,38	1118	
	0,19	562	
8	0,44	1115	239
	0,22	557	
	0,11	271	
	0,055	140	
	0,0275	85	

Tabela 7. Equações da reta para as substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de folhas e sementes de *L. latifolius*.

Padrões	Equação da reta $Y = a + b x$	Coefficiente de correlação
3	$Y = 57,46 + 2810,19 x$	0,9998
8	$Y = 4,53 + 2529 x$	0,9998

Tabela 8. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo da casca do caule de *L. latifolius*.

Padrão	Concentração mg/mL	Área	Área do pico
2	1,20	2035	980
	0,60	1093	
	0,30	532	
	0,15	230	
3	2,70	6316	5955
	0,675	1903	
	0,3375	1012	
	0,16875	463	
4	3,00	1328	519
	1,50	643	
	0,75	295	
5	1,20	5996	1141
	0,60	3069	
	0,30	1567	
	0,15	755	
	0,075	402	
6	2,00	3921	519
	1,00	1720	
	0,50	694	
	0,25	366	
8	4,00	12247	1536
	2,00	6212	
	1,00	3170	
	0,50	1632	
	0,25	780	
	0,125	405	

Tabela 9. Equações da reta para as substâncias isoladas do extrato éter de petróleo da casca do caule de *L. latifolius*.

Padrões	Equação da reta $Y = a + b x$	Coefficiente de correlação
2	$Y = 12,81 + 1706,21 x$	0,999
3	$Y = 222,40 + 2268,54 x$	0,999
4	$Y = -47,44 + 458,74 x$	0,99999
5	$Y = -13,51 + 5127,03 x$	0,9999
6	$Y = -264,75 + 2069,34 x$	0,998
6	$Y = 67,46 + 3052,89 x$	0,9999

Tabela 10. Dados utilizados para construção das curvas analíticas das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de raízes de *L. latifolius* coletadas no na primavera (novembro) de 1996 e no verão (fevereiro) de 1997 (Análise sazonal).

Padrão	Concentração mg/mL	Área	Área do pico Primavera 1996	Área do pico Verão 1997
1	0,50	499	152	78
	0,25	246		
	0,125	123		
	0,0625	61		
	0,03125	33		
2	0,50	1937	900	373
	0,25	943		
	0,125	503		
	0,0625	240		
	0,03125	125		
3	3,00	8465	6492	6683
	1,50	4316		
	0,75	2182		
	0,375	1118		
	0,1875	562		
4	2,00	2505	720	294
	1,00	1305		
	0,50	646		
	0,25	320		
	0,125	169		
5	1,25	3187	1365	287
	0,625	1612		
	0,3125	822		
	0,1563	412		
	0,078	207		
6	1,00	2000	270	99
	0,50	937		
	0,25	424		
	0,125	215		
	0,0625	94		
8	0,44	1115	680	348
	0,22	557		
	0,11	271		
	0,055	140		
	0,0275	85		
12	1,00	1025	142	45
	0,50	533		
	0,25	259		
	0,055	172		
	0,0275	69		

Tabela 11. Equações da reta para as substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de raízes de *L. latifolius* coletadas na primavera (novembro) de 1996 e no verão (fevereiro) de 1997 (Análise sazonal).

Padrões	Equação da reta $Y = a + b x$	Coefficiente de correlação
1	$Y = -0,54 + 796,75 x$	0,9999
2	$Y = -2,89 + 3853,61 x$	0,9998
3	$Y = 57,46 + 2810,19 x$	0,9999
4	$Y = 19,99 + 1250,25 x$	0,9998
5	$Y = 18,34 + 2538,83 x$	0,9999
6	$Y = -60,63 + 2044,47 x$	0,999
8	$Y = 4,53 + 2529 x$	0,9999
12	$Y = 5,25 + 1026,49 x$	0,999

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise Qualitativa

Das 12 substâncias isoladas no extrato éter de petróleo das raízes, coletadas na fazenda Santa Elisa (IAC) em agosto de 1994 apenas 11 puderam ser identificadas no cromatograma fornecido por CLAE (Figura 1), onde se destaca o pico correspondente ao novo derivado de dibenzoilmetano (substância 3), que de fato foi o componente mais abundante obtido por cromatografia de adsorção (CCD e CCP) do mesmo extrato. Dois anos depois, isto é em agosto de 1996, repetiu-se a coleta de raízes na fazenda Santa Elisa e nos arredores do Campus da Universidade, constatando-se mais uma vez que os respectivos extratos éter de petróleo mantiveram o mesmo perfil cromatográfico (Figura 2).

Análise comparativa por CCD dos extratos éter de petróleo e diclorometânico das raízes coletadas em 1994 mostrou uma grande semelhança entre eles, também verificou-se esta semelhança em CLAE (Figura 3) exceto pela presença de dois picos com tempo de retenção menor ($t_R = 10,965$ e $11,278$) de acordo com o esperado para as substâncias mais polares, onde o pico com $t_R = 11,278$ foi posteriormente isolado e identificado como medicarpina (substância 13). Entretanto o cromatograma do extrato diclorometânico de raízes coletadas em 1996, além de não apresentar os picos correspondentes às duas substâncias mais polares, mostra picos mais intensos correspondentes às de substâncias com maior tempo de retenção ($t_R = 20,251$ e $20,604$).

Para melhor visualização das substâncias polares presentes no extrato metanólico das raízes coletadas em 1994 (Figura 3), o gradiente acetonitrila:água foi alterado para metanol: água (3:97) eluindo substâncias com tempo de retenção menor do que observados nos extratos éter de petróleo e diclorometânico.

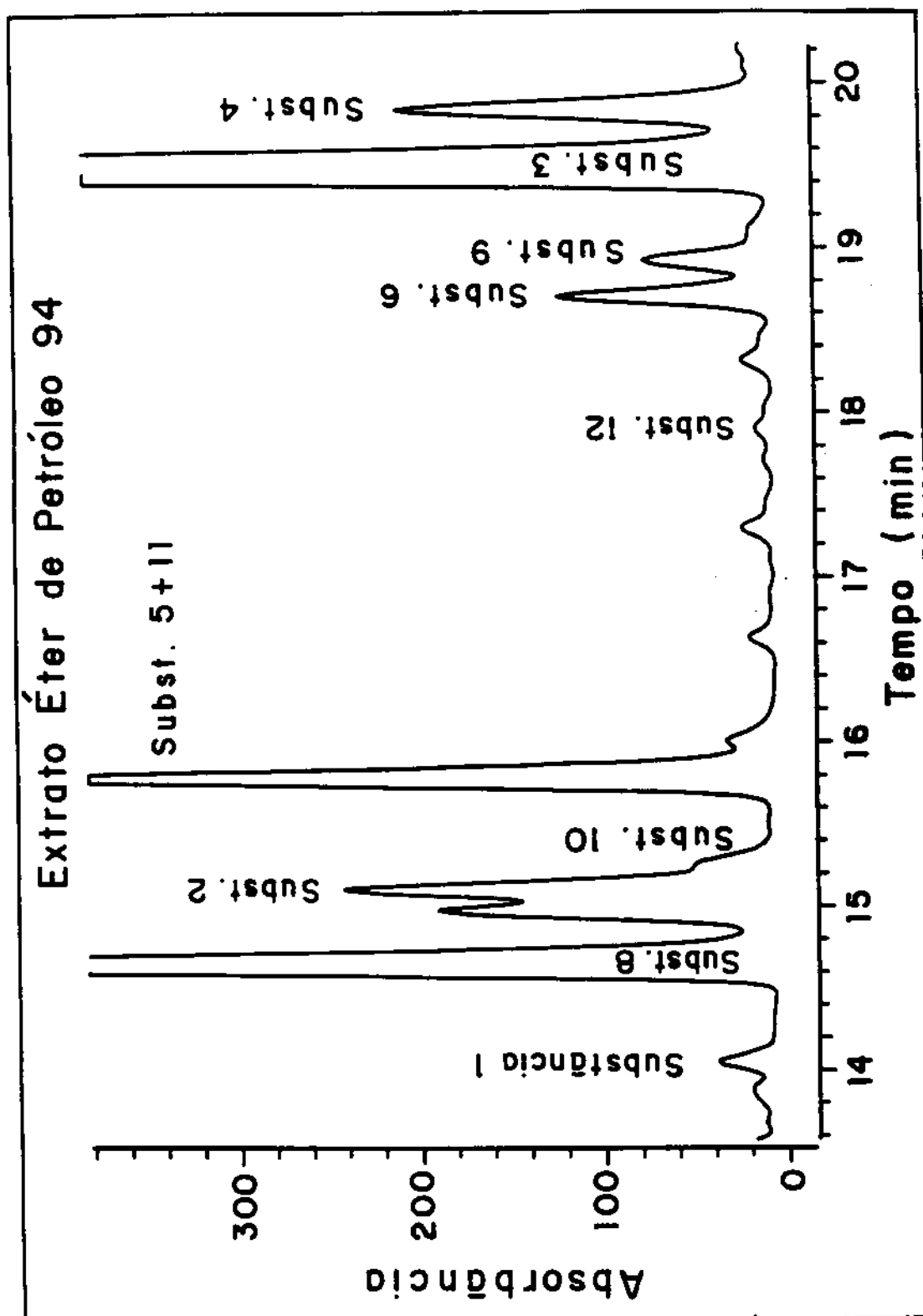


Figura 1. 1 pongaglabrona, 8 lanceolatina B, 2 ponganpina, 10 Flavanona inédita 5 Karanjina, 11 Flavanonol inédito, 12 flavana inédita, 6 pongacromeno, 3 e 9 Dibenzoilmetano inédito, 4 karanjacromeno.

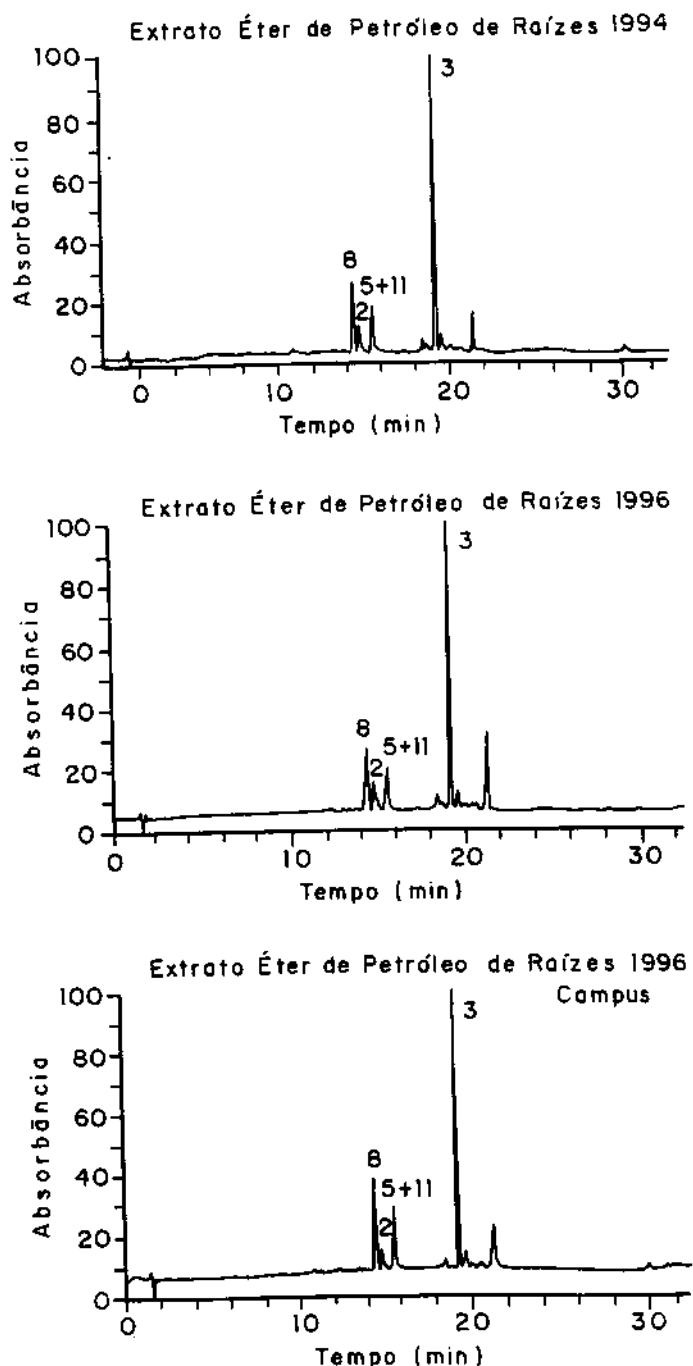


Figura 2. Extrato éter de petróleo de raízes (8 Lanceolata B; 2 Ponganpina; 5 Karanjina; 11 Flavanonol inédito; 3 Dibenzoilmetano inédito) Condições de análise: Coluna Waters do tipo ODS 3,9x150mm tamanho da partícula, 4 μ m, fase móvel: gradiente 80:20 (ACN/H₂O)-100 (ACN) em 30min, volume de injeção: 2 μ L, comprimento de onda detecção: 240nm e fluxo: 0,8mLmin⁻¹.

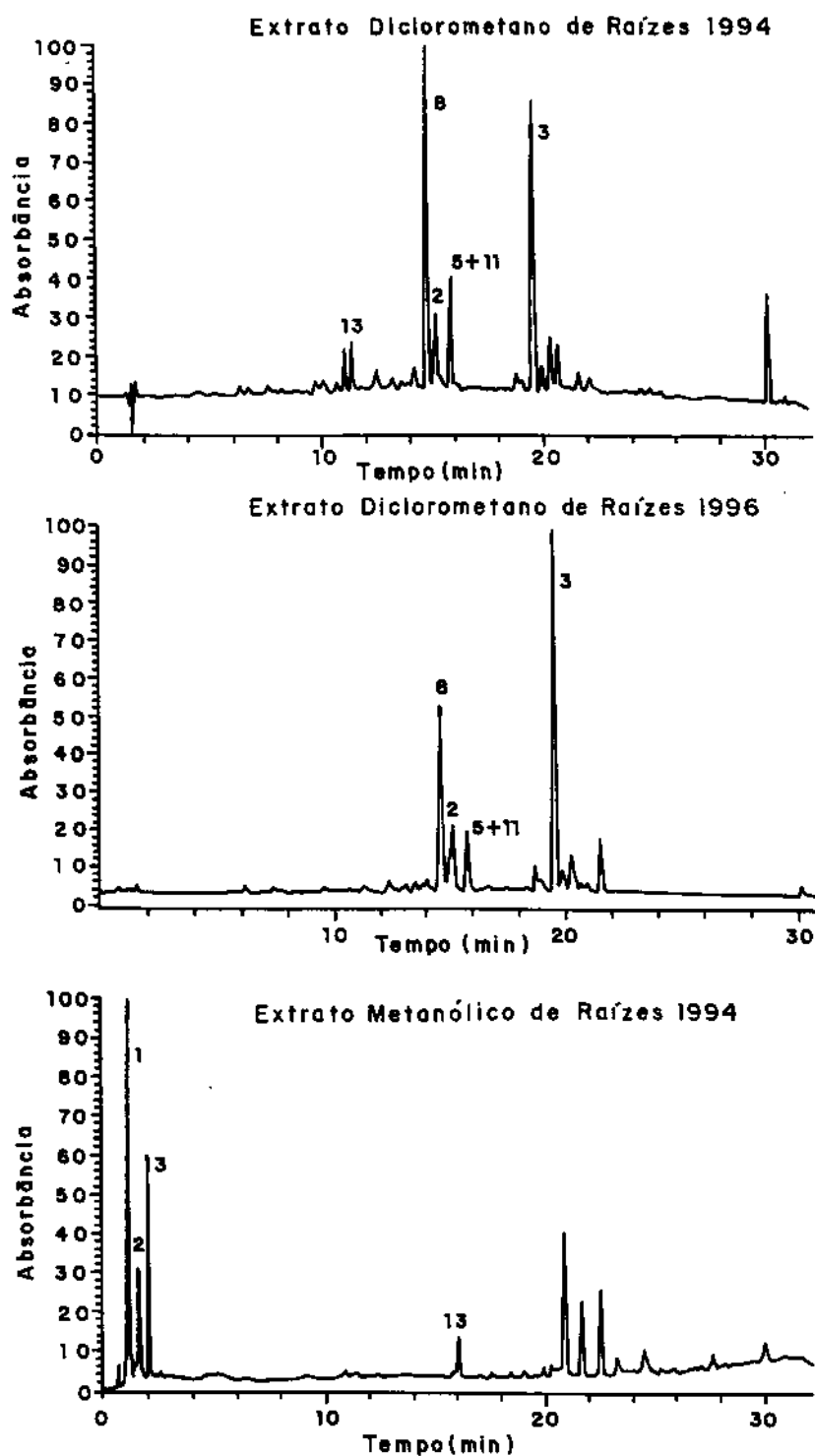


Figura 3. Extrato diclorometânico de raízes (8 Lanceolata B; 2 Pongapina; 5 Karanjina; 11 Flavanonol inédito; 3 Dibenzoilmetano inédito) Condições de análise: Coluna Waters do tipo ODS 3,9x150mm tamanho da partícula, 4µm, fase móvel: gradiente 80:20 (ACN/H₂O)-100 (ACN) em 30min, volume de injeção: 2µL, comprimento de onda: 240nm e fluxo: 0,8mLmin⁻¹. Extrato metanólico de raízes (1, 2 e 3 substâncias não identificadas, 13 medicarpina) Condições de análise: Coluna, volume de injeção, fluxo e comprimento de onda de detecção idem, gradiente 3:97 (MeOH/H₂O)-100 (MeOH) em 30min.

Observou-se também a presença de medicarpina (substância 13) e a ausência do derivado do dibenzoilmetano (substância 3).

Os extratos éter de petróleo de folhas e sementes coletados em fevereiro de 1997 (Figura 4) apresentaram um perfil cromatográfico muito pobre em relação ao extrato éter de petróleo de raízes coletados na mesma época, destacando-se a presença das substâncias 3 e 8.

O extrato éter de petróleo da casca do caule (Figura 4) coletado em agosto de 1997 apresentou um perfil cromatográfico muito semelhante ao extrato éter de petróleo das raízes, coletadas em fevereiro de 1997 (Figura 4).

Uma das observações mais importantes com relação ao perfil cromatográfico dos extratos éter de petróleo das raízes, casca do caule, folhas e sementes de *Lonchocarpus latifolius* é a predominância da substância 3 evidenciando a sua distribuição por toda a planta.

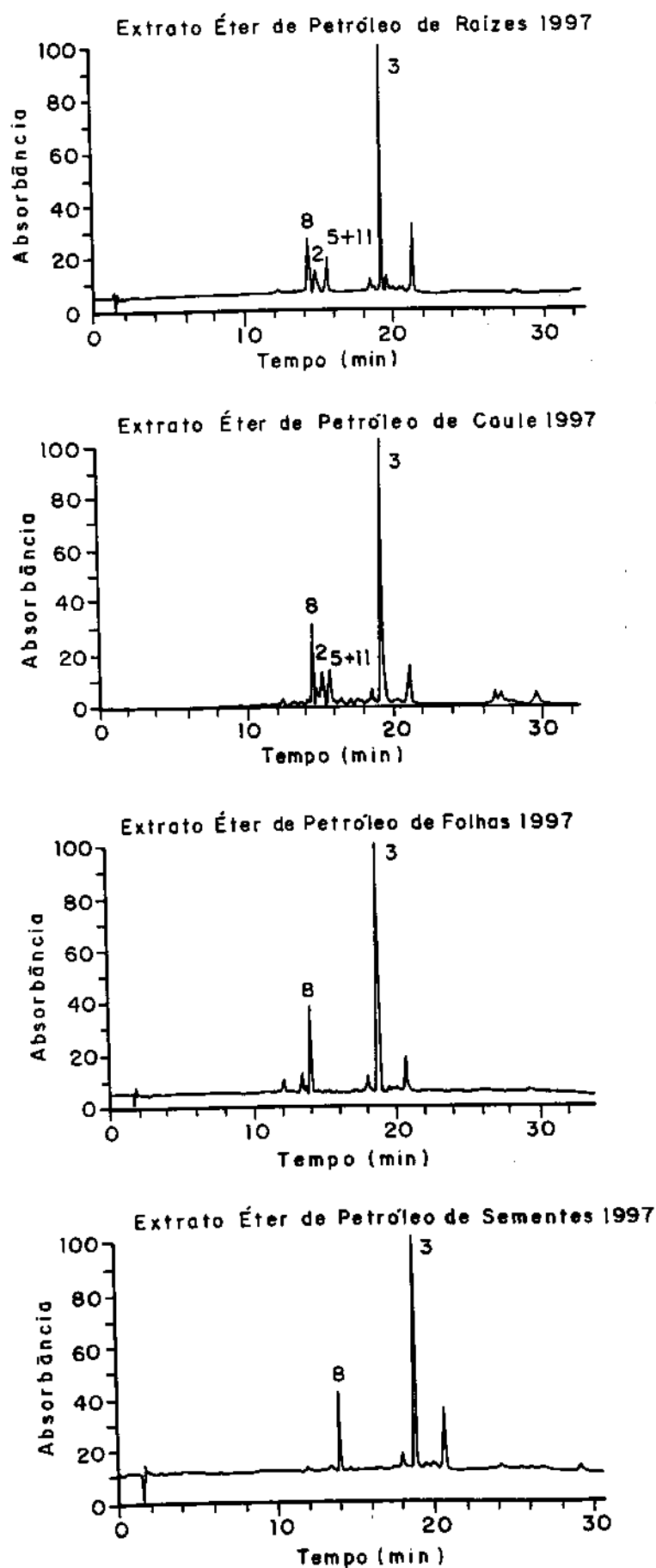


Figura 4. Extrato éter de petróleo de raízes, caule, folhas e sementes (8 Lanceolatina B; 3 Dibenzoilmetano inédito) Condições de análise: Coluna HP do tipo ODS 4,6x100mm, tamanho da partícula 5 μ m, fase móvel: gradiente 80:20 (ACN/H₂O)-100 (ACN) em 30min, volume de injeção: 2 μ L, comprimento de onda de detecção: 240nm e fluxo: 0,8mLmin⁻¹.

3.2. Análise Quantitativa

3.2.1. Extrato éter de petróleo de raízes

Das 12 substâncias isoladas do extrato éter de petróleo de raízes, apenas 8 puderam ser quantificadas por estarem disponíveis em maior quantidade (Tabela 12).

Tabela 12. Concentração das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo das raízes de *Lonchocarpus latifolius* coletadas no inverno de 1994 e inverno de 1996.

Substâncias	Quantidade de substâncias em mg/g de raiz	
	Inverno 1994	Inverno 1996
1	0,723	0,196
2	0,700	0,182
3	8,053	1,860
4	0,891	0,273
5	2,126	0,467
6	0,387	0,001
8	2,020	0,461
12	0,153	0,0352

De acordo com os dados observados na tabela acima verificou-se uma queda no teor de todas as substâncias no ano de 1996. Esta variação poderia estar associada a vários fatores ambientais tais como: deficiência mineral, aeração, temperatura, índice pluviométrico, radiação UV, ataque por microrganismos etc.

Segundo dados fornecidos pelo CEPAGRI*, as temperaturas média máxima e média mínima diárias no mês de agosto de 1994 variaram em torno de 27 °C e 13 °C. No ano de 1996 nesta mesma época variaram respectivamente em torno de 27,2 °C e 12,5 °C, não sendo portanto a temperatura a responsável pela variação quantitativa das substâncias, como verificado na tabela acima.

Quanto ao índice pluviométrico em agosto de 1994 a precipitação foi de 0,0 mm e na mesma época em agosto de 1996 a precipitação foi de 30,6 mm.

* Centro de Pesquisa em Agricultura da UNICAMP

Analisando-se estes dados não se pode inferir que variações climáticas sejam responsáveis pelo aumento da concentração das substâncias cerca de 4 vezes mais em 1994 em relação ao ano de 1996.

3.2.2. Extratos diclorometânico e metanólico de raízes

O extrato diclorometânico de raízes coletadas em 1994 apresenta um perfil diferente em relação ao extrato diclorometânico de raízes coletadas em 1996. Do extrato diclorometânico de raízes de 1994 foi isolado um pterocarpano identificado como medicarpina (Figura 5, substância 13) (AFZAL & AL-ORQUAT, 1986) que foi encontrado também no extrato metanólico de raízes desse mesmo ano em grande quantidade (Tabela 13). Esta substância está ausente no extrato éter de petróleo de raízes de 1994 e no extrato diclorometânico de raízes de 1996.

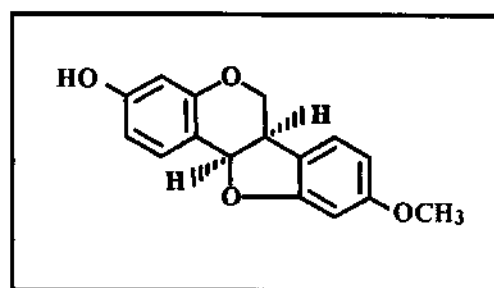


Figura 5. Medicarpina (substância 13)

Tabela 13. Concentração da substância 13 isolada dos extratos diclorometânico e metanólico das raízes de *Lonchocarpus latifolius* coletadas em 1994.

Substância	Quantidade da substâncias em mg/g de raiz	
	Diclorometânico	Metanólico
13	1,6	7,0

3.2.3. Extratos éter de petróleo de folhas e sementes

Das 12 substâncias isoladas do extrato éter de petróleo das raízes, apenas as substâncias 3 e 8 foram detectadas nos extratos das folhas e de sementes, sendo que o teor da substância 3 é maior nas folhas e o da substância 8 maior em sementes (Tabela 14).

Tabela 14. Concentração das substâncias isoladas dos extratos éter de petróleo de sementes e folhas de *L. latifolius* coletadas em fevereiro de 1997.

Substâncias	Quantidade de substâncias em mg/g	
	Folhas	Sementes
3	3,673	1,201
8	0,657	1,082

3.2.4. Extrato éter de petróleo da casca do caule

No extrato éter de petróleo da casca do caule encontraram-se seis das oito substâncias quantificadas nas raízes, as substâncias 1 e 12, não foram encontradas neste extrato o que se levou a supor que estão em pequenas quantidades (Tabela 15).

Tabela 15. Concentração das substâncias isoladas do extrato éter de petróleo da casca do caule de *L. latifolius* coletadas em agosto de 1997.

Substâncias	Quantidade de substâncias em mg/g de caule
2	0,316
3	1,480
4	0,672
5	0,399
6	0,206
8	0,285

3.2.5. Análise sazonal do extrato de éter de petróleo de raízes de *L. latifolius*

A variação do teor de metabólitos secundários em plantas, está sujeita a diversos fatores. Dentre eles se encontra a composição genética da planta (BOWERSAND & STAMP, 1993 *apud* DARROW, 1997), podendo o genótipo variar de acordo com fatores bióticos e abióticos. A variação sazonal dos metabólitos secundários pode ser causada por demandas fisiológicas como crescimento, defesa e reprodução (WILKENS *et alii*, 1996 *ibid*), por outro lado também pode ser causada por diversidades no meio ambiente como stress hídrico, luz, deficiência de nutrientes, temperaturas extremas, poluição e a presença e/ou ausência de microrganismo patogênicos (WILKENS *et alii*, 1996, COLEMAN & JONES, 1991 *ibid*). O estudo desta variação é muito importante pois permite conhecer a época exata ou quase exata em que alguns constituintes estão em maior proporção, podendo estar relacionado com a resistência ou susceptibilidade a ataques por microrganismos ou insetos herbívoros (ZANGERL & BERENBAUM, 1996 *ibid*).

Como os flavonóides possuem diversas atividades e tendo em vista o isolamento em grande quantidade de um derivado inédito de dibenzoilmetano (substância 3) em agosto de 1994, período da primeira coleta, partiu-se para a variação sazonal tendo como principal objetivo acompanhar a variação desta

substância ao longo das quatro estações, sempre coletando a raiz do mesmo espécimen e 56 dias após o início de cada estação (16 de agosto e 16 de novembro, de 1996, 16 de fevereiro e 16 de maio de 1997). O resultado da análise do outono de 1997 (16 de maio) ficou prejudicada, pois o técnico do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, encarregado da coleta do material, coletou a raiz errada, de uma planta sem identificação, cujo padrão cromatográfico é diferente daquele apresentado para raízes de *L. latifolius*.

De acordo com os dados em relação ao teor da substância 3 nos anos 1994 e 1996, supos-se inicialmente, que esta substância estivesse atuando como uma fitoalexina que são muito comuns em plantas da família Leguminosa. Algumas espécies dessa família produzem fitoalexinas independentemente do agente causador, que pode ser infestação por microrganismo ou outros agentes como temperatura ou radiação UV (BRAGA, 1987). De acordo com a Tabela 16 verificou-se que ocorre uma variação pouco significativa quanto ao teor da substância 3 nas três estações analisadas, ocorrendo porém, uma variação significativa em relação às outras substâncias isoladas.

A substância 3 seguida das substâncias 5 e 8 são as mais abundantes no outono. Na primavera as substâncias 3 e 8 são as mais abundantes seguidas das substâncias 4 e 5 e no verão as substâncias 3 e 8 são as mais abundantes. Nas três estações a substância com teor mais baixo foi a 12.

Tabela 16. Análise sazonal das substâncias isoladas do extrato. éter de petróleo das raízes de *L. latifolius* coletadas no inverno (agosto) de 1996 na primavera (novembro) de 1996 e no verão (fevereiro) de 1997.

Substâncias	Quantidade de substâncias em mg/g de raiz		
	Inverno 1996	Primavera 1996	Verão 1997
1	0,196	0,313	0,115
2	0,182	0,386	0,115
3	1,860	2,295	1,615
4	0,273	0,923	0,257
5	0,467	0,873	0,124
6	0,001	0,264	0,089
8	0,461	1,946	0,655
12	0,040	0,131	0,027

De imediato não se pode atribuir razão específica para esta variação, já que os metabólitos secundários variam sua concentração conforme a necessidade da planta ao longo do ano. Também não se pode atribuir este aumento a uma causa específica tal como ataque de microrganismo, por ausência de evidências mais contundentes.

Quanto ao fator climático como temperatura e índice pluviométrico, segundo dados fornecidos pelo CEPAGRI, (Tabela 17) estes têm pouca influência em relação ao teor das substâncias isoladas e sua variação ao longo das estações.

Tabela 17. Variações de temperatura e índice pluviométrico nos meses de agosto de 1996, novembro de 1996 e fevereiro de 1997. Dados fornecidos pelo CEPAGRI.

Mes/Ano	Temperaturas (°C)		Índice Pluviométrico (mm)	
	Máxima	Mínima	Total	Dias
Inverno (Agosto 1996)	27,2	12,5	30,6	31
Primavera (Novembro 1996)	28,1	18,5	198,4	30
Verão (fevereiro 1997)	30,7	20,4	169,8	28

Um outro fator importante a ser observado quanto ao teor das substâncias nas três estações analisadas, está no fato de que na primavera ocorre um aumento significativo em relação ao inverno e ao verão. Segundo DARROW & BOWERS, (1997) um dos fatores que podem influir na sazonalidade é a reprodução e em *L. latifolius* o mês de novembro, coincidentemente mês de coleta de dados da análise sazonal, corresponde ao mês de floração, período no qual a planta se encontra em toda a sua exuberância.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FZAL, M. & AL-ORQUAT, G. Proton magnetic resonance spectra of pterocarpan and related phytoalexins. **Heterocycles** 24 (10): 2911-2941, 1986.
- ASSHAUER, J. & ULLNER, H. Quantitative analysis in HPLC In: ENGELHARDT, H. Practice of High Performance Liquid Chromatography. Berlin: Springer-Verlag. p.65-108, 1986.
- BOWERSAND, M. D. & STAMP, N. E. 1993 *apud* DARROW, K. & BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 24 (1): 1-11, 1997.
- BRAGA, M. R. & DIETRICH, S. M. C. Defesa química de plantas: Fitoalexinas. **Acta Bot. Bras.** 1 (1):3-16, 1987.
- CHAVES, N., ESCUDERO, J. C., MERINO, G. C. Quantitative variation of flavonoids among individuals of a *Cistus landanifer* population. **Biochemical Systematics and Ecology** 25 (5): 429-435, 1997.
- COLEMAN & JONES, 1991 *apud* DARROW, K. & BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 24 (1): 1-11, 1997.
- DARROW, K. & BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 24 (1): 1-11, 1997.
- HEGNAUER, R. & GRAYER-BAKMEIJER, R. J. Relevance of seeds polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry** 34 (1): 3-16, 1993.
- KINGSTON, D. G. I. High performance liquid chromatography of natural products. **Journal of Natural Products** 42 (3):237-260, 1979.
-

MARKHAM, K. R., MITCHELL, K. A., WILKINS, A. L., DALDY, J. A., LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42 (1): 205-211, 1996.

WILKENS *et alii*, 1996 *apud* DARROW, K. & BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 24 (1): 1-11, 1997.

ZANGERL & BERENBAUM, 1996 *apud* DARROW, K. & BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 24 (1): 1-11, 1997.

CAPÍTULO III

Bioensaios Realizados com Extratos Obtidos das Raízes de *Lonchocarpus latifolius*

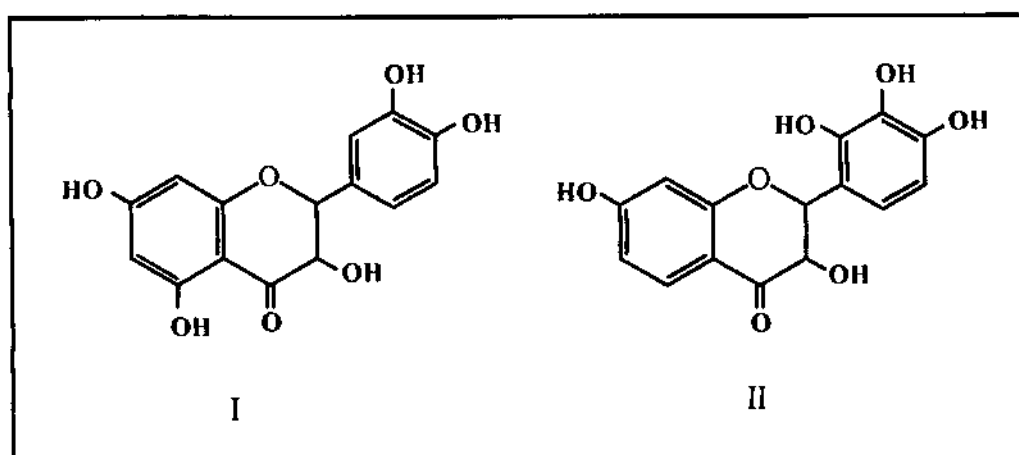
1. INTRODUÇÃO

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

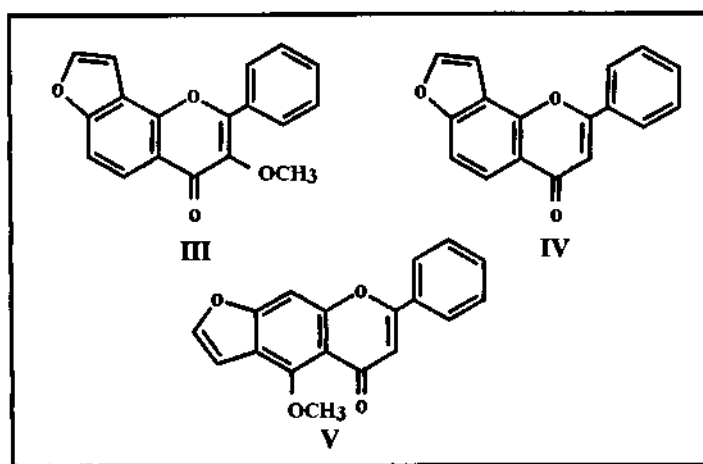
Os Flavonóides são responsáveis por um amplo espectro de funções biológicas, atuando como um fator de integração entre a planta e o meio ambiente, indo desde a proteção contra raios UV (SHMELZER *et alii*, 1988 *apud* KOES *et alii* 1994), até a participação no processo de reprodução sexual (VANDER DER MEER *et alii* 1992 *ibid.*). Muitas atividades biológicas lhes têm sido atribuídas tais como: fungicida, bactericida, anti-viral, inseticida, alelopática etc. O uso terapêutico de flavonóides tem sido amplamente investigado, eles são conhecidos por suas atividades anti-inflamatória e anti-alérgica, por suas propriedades antitrombose e vasoprotetora, por inibição da promoção de tumores e como protetores da mucosa gástrica. (EVANS, 1996)

Há muito tempo demonstrou-se que a grande resistência apresentada por certos tipos de madeira se devia à presença de componentes tóxicos aos microrganismos que as atacam. Vários destes componentes foram identificados como sendo flavonóides, destacando-se a diidrorobinetina (I), que inibe o crescimento dos

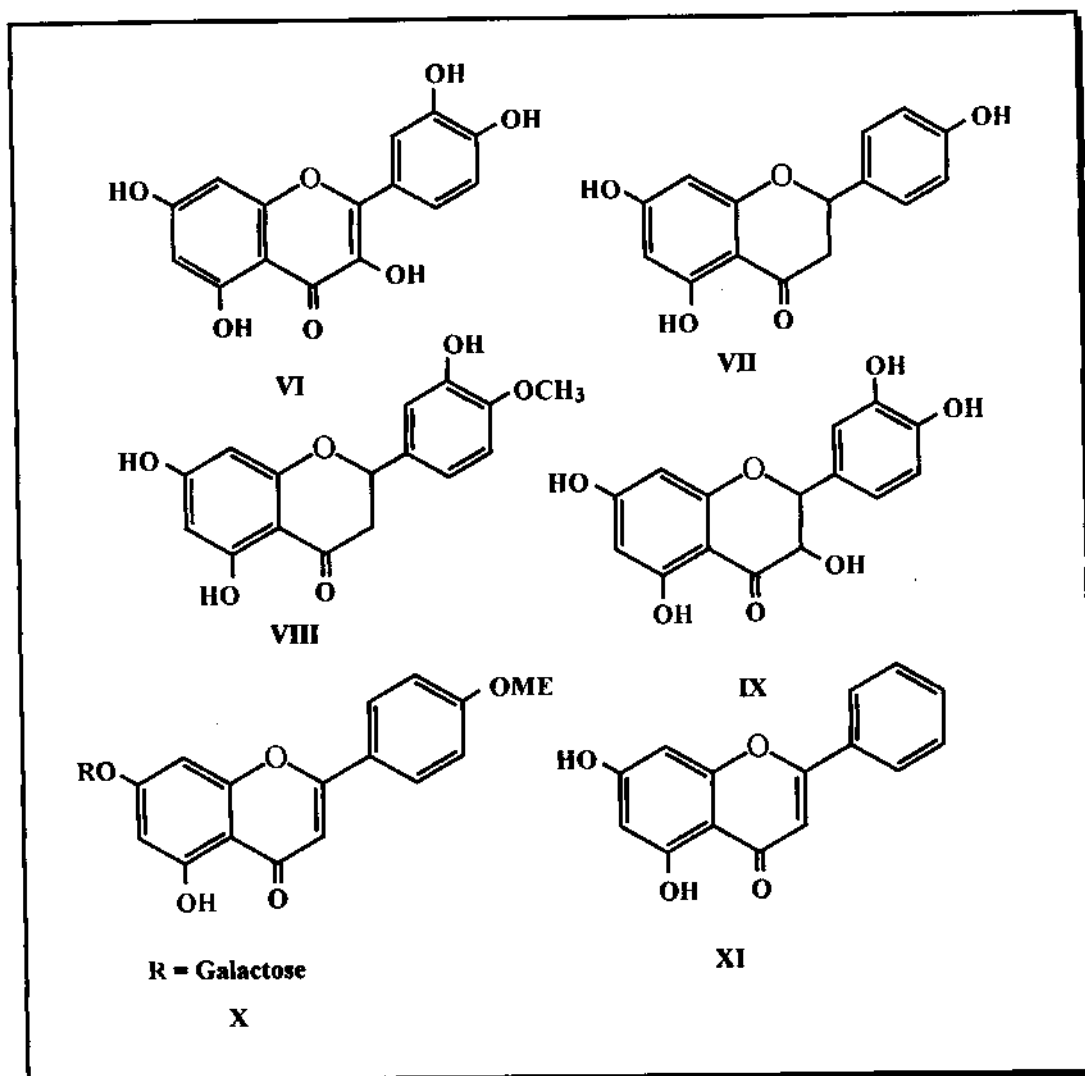
fungos *Poria vaporea* e *Coniophora cerebella* (KENNEDY, 1956 *apud* GEISSMAN, 1962), a diidroquercetina (II) que inibe o crescimento dos fungos *Poria vaporea* e *Polystictus sanguinens* (FRAUDEMBERG & HARTMAN, 1953 *ibid.*).



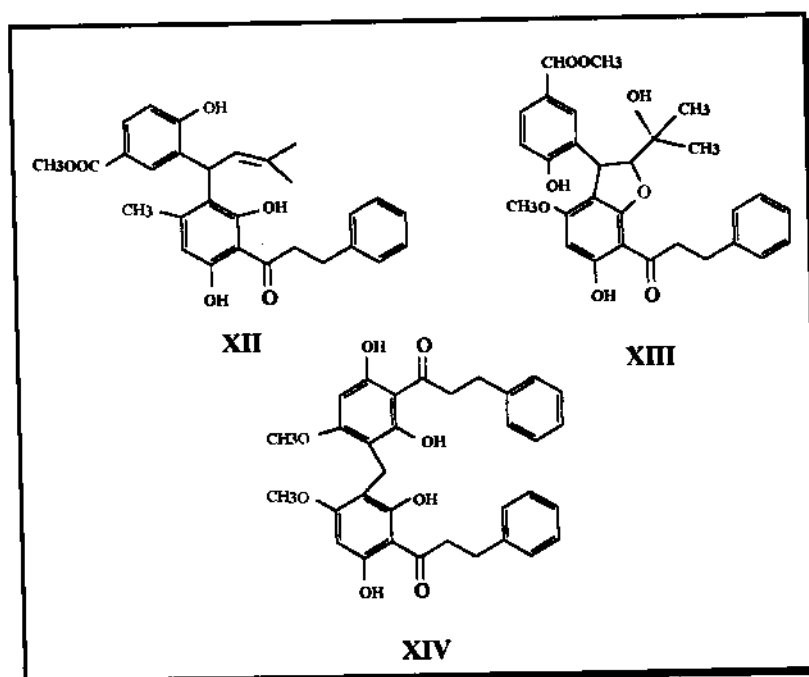
Os furanoflavonóides tais como karanjina (III), lanceolatina B (IV) e pinatina (V), se mostraram muito ativos contra o *Alternaria solani* fungo fitopatogênico, que ataca as folhas de batatas.



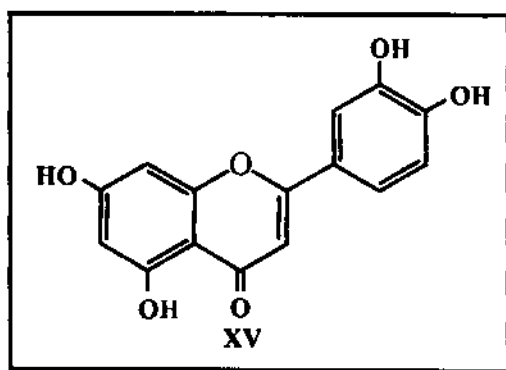
A atividade anti-viral dos flavonóides têm sido investigada desde a década de 40 sabendo-se por exemplo que quercetina (VI), narigenina (VII), hesperidina (VIII) e catequina (IX) são ativos contra os vírus da herpes tipo 1 (HSV-1), parainfluenza tipo 3 (PF-3), (KAUL *et alii*, 1985 *apud* CHANG-QI HU *et alii*, 1994), e pólio tipo 1 (VRIJSEN, *et alii*, 1987 *ibid.*) Mais recentemente encontram-se dados na literatura da atividade anti-viral de flavonóides contra o vírus HIV 1, destacando-se acacetina-7-O- β -O-galactopiranosidio (X), e a flavona chrisina (XI) com alto índice terapêutico (CHANG-QI HU *et alii*, 1994).



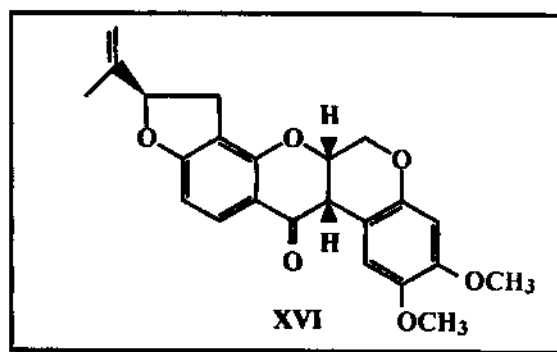
Quanto a atividade bactericida, tem-se que por exemplo as diidrochalconas, piperaduncinas A (XII), B (XIII) e C (XIV), isoladas de *Piper aduncum* (ORJALA *et alii*, 1994), são ativas contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*.



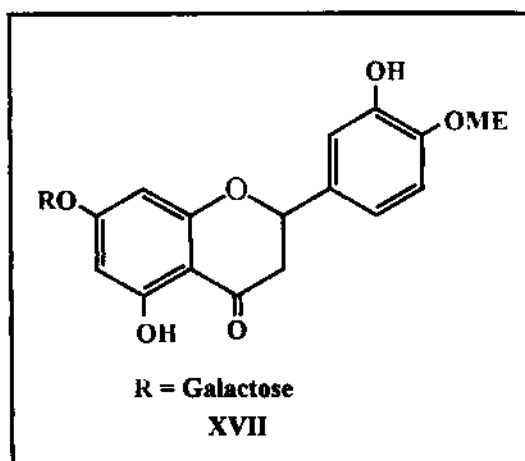
A atividade anti-tumoral da quercetina (XV) têm sido constatada através de vários estudos, sabendo-se que inibe a atividade mutagênica (OGAWA *et alii*, 1985 *apud* HARBONE, 1996), os efeitos bioquímicos da proteína Kinase C (GSCHWENDT *et alii* *ibid*), a incorporação de ^{32}P em membranas (NISHINO *et alii*, 1983 *ibid*) e a atividade de lipoxigenase (NAKADATE *et alii*, 1983 *ibid*).



Como inseticida os isoflavonóides tipo rotenona (XVI) têm sido os mais investigados por serem tóxicos para muitos insetos e besouros (HARBONE, 1996).



A vitamina P, que consiste de uma mistura de flavonóides que inclui a hesperidina (XVII) age sobre a fragilidade capilar, reduzindo sinais de hipovitaminose C em animais de laboratório (CLEMETSON, 1989 *ibid*).



Considerando a grande variedade de atividades biológicas dos flavonóides descritas na literatura, decidiu-se implantar alguns bioensaios no laboratório para verificar o comportamento dos extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico das raízes de *Lonchocarpus latifolius* e da substância 3, o principal flavonóide isolado. Foram escolhidos os testes de bioautografia, toxicidade com *Artemia salina*, inseticida e inibição da germinação de sementes de alface, visando testar respectivamente as atividades antimicrobianas (fungicida e bactericida), antitumoral, larvicida e alelopática. Tratam-se também de bioensaios suficientemente sensíveis para permitir o uso de pouca quantidade de amostra cujas metodologias são facilmente aplicáveis num laboratório de fitoquímica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Bioensaio de Toxicidade com *Artemia salina* (Brine Shrimp Letality Test)

Este bioensaio foi realizado de acordo com protocolo desenvolvido pelo Prof. Jerry L. McLaughlin (MEYER, 1982) e adaptado para as condições do nosso laboratório.

A ED₅₀ a 95 % de intervalo de confiança foi determinado pela análise de Probit (FINNEY, 1971).

Bioensaio de Germinação

Este bioensaio foi realizado de acordo com protocolo descrito na literatura (WEBB & WAREING, 1972) em câmara de germinação com temperatura controlada e luz contínua no laboratório de Fisiologia Vegetal do IB UNICAMP.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, após análise de variância as médias dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Bioensaio de Bioautografia

Este bioensaio foi realizado com base na literatura (SAXENA, 1995) introduzindo-se algumas modificações.

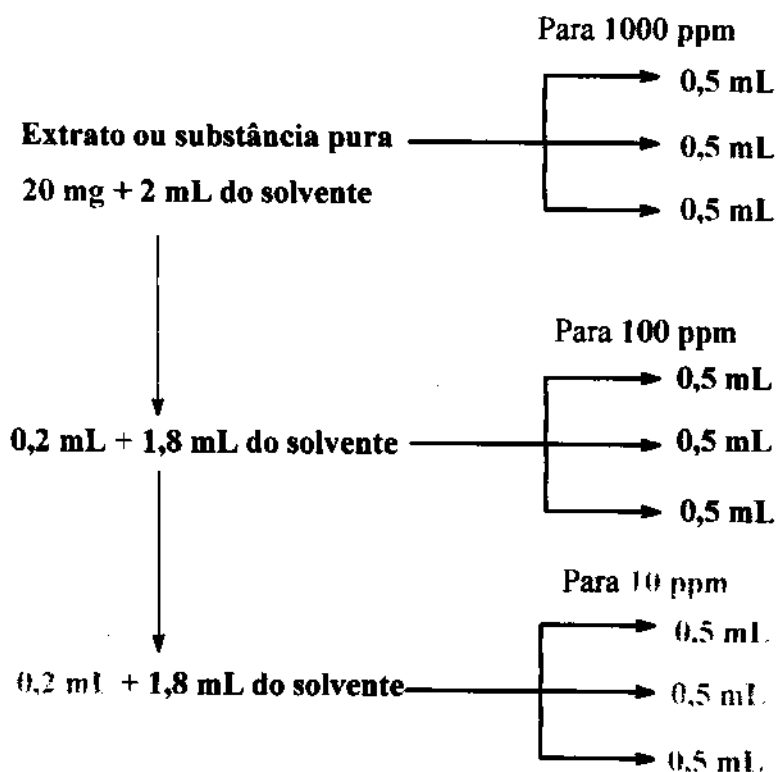
Bioensaio para atividade Larvicida

Este bioensaio foi realizado pela Dra Marli Teles de Oliveira do Laboratório de Biologia CCS-NPPN, UFRJ. de acordo com protocolo adaptado da publicação "*Insecticide Resistance and Vector Control*" World Health Organization.

2.1 Bioensaio de Toxicidade com *Artemia salina* (Brine Shrimp Letality test)

2.1.1. Avaliação da Toxicidade dos Extratos Éter de petróleo, Diclorometânico e Metanólico das raízes de *Lonchocarpus latifolius*.

Os extrato e a substância 3 foram pesados e diluídos nos respectivos solventes de acordo com esquema abaixo:



Após este procedimento prepararam-se dez frascos com as amostras e o branco, evaporou-se o solvente e adicionou-se aproximadamente 50µL de DMSO, 3mL de água salgada e 10 larvas de *Artemia salina* completando-se o volume para 5mL. Os frascos foram deixados descobertos e após 24 horas foram contados os sobreviventes.

2.2 Bioensaio de inibição de germinação de sementes de alface

2.2.1 Avaliação da Toxicidade dos Extratos Éter de petróleo, Diclorometânico e Metanólico das raízes de *Lonchocarpus latifolius*.

O bioensaio da germinação de sementes de alface foi realizado de acordo com a literatura (WEEB & WAREING 1972). Numa placa de Petri de 90mm de diâmetro, forrada com papel de filtro, foram adicionados os extratos a serem testados (2,5; 5,0; 10,0; e 12,5mg/mL), água destilada (5mL) e por ultimo as sementes de alface do cultivar “Grand Rapids” (20 sementes por placa). Foram montados quatro repetições por tratamento. As placas foram colocadas na câmara de germinação a 25 °C e luz branca contínua ($18,2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Após 24 e 48 h foi contado o número de sementes germinadas.

As sementes utilizadas neste bioensaio foram fornecidas pela secção de sementes do Instituto Agronômico de Campinas IAC.

2.3. Bioensaio de Bioautografia

2.3.1. Avaliação da atividade bactericida e fungicida dos extratos Éter de petróleo, Diclorometânico e Metanólico das raízes de *L. latifolius*

Os extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico e as substâncias puras, (20 μg) e o antibiótico (2 μg) foram aplicados em duas placas de CCD (Merck Sílica gel G F₂₅₄ 6 x 6cm) e desenvolvidas com Hexano/AcOEt 80:20. O solvente foi evaporado e as placas observadas sob lâmpadas de UV ($\lambda = 254$ e 365nm). As manchas reveladas nesses comprimentos de onda, foram marcadas na placa controle, que em seguida foi pulverizada com revelador específico (anisaldeído modificado) e aquecidas revelando manchas coloridas. A placa teste foi colocada dentro de uma placa de Petri de 90mm de diâmetro, contendo o meio de cultura (20mL) específico para cada microrganismo. Com auxílio de uma alça de Drigalski, foi então aplicado

cerca de 100µL da suspensão de microrganismo contendo aproximadamente 10^6 células/mL. Foram preparadas duas placas de Petri uma contendo a placa de CCD, e a outra contendo apenas o meio de cultura com o microrganismo (placa branco) para avaliar o seu crescimento. As placas (CCD e branco), foram incubadas (24 h para bactéria e 7 dias para fungos) em temperatura específica para cada microrganismo (cerca de 37 °C para bactéria e 25 °C para fungo) sendo após observados os halos de inibição e comparados com a placa de CCD controle.

Os meios de cultura utilizados foram: NA (Agar Nutriente) para bactérias, constituídos de peptona (5,0g) + extrato de carne (3,0g) + agar (15,0g) + água destilada (1000mL) e MA (Agar Malte) para fungos constituídos de extrato de malte (20,0g) + agar (20,0g).

As culturas utilizadas neste bioensaio foram fornecidas pela Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”.

2.3.1.1. Microrganismos utilizados

Bactérias: *Escherichia coli* (gram -); *Bacillus subtilis* (gram +); *Rhodococcus equi* (gram +); *Staphylococcus aureus* (gram +); *Micrococcus luteus* (gram +); *Salmonella typhimurium* (gram -).

Fungos filamentosos: *Aspergillus niger*; *Penicillium funiculosum*; *Fusarium oxysporum*; *Rhizopus oryzae*; *Alternaria alternata*; *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium cladosporioides*.

Levedura: *Candida albicans*.

2.3.2. Bioensaio de Antibiograma

O bioensaio para antibiograma foi feito de acordo com a metodologia da USP XXIII (United States Pharmacopea), realizadas no laboratório da Coleção de Culturas Tropical, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.

2.4. Bioensaio para atividade larvicida com *Aedes aegypti*

2.4.1. Avaliação da atividade larvicida dos dos extratos Éter de petróleo, e Metanólico das raízes de *L. latifolius*

Adicionou-se 1mL da solução contendo o extrato na dose a ser testada nos recipientes de teste (copos contendo 199mL de água) e no controle acetona ou álcool acrescentou-se o mesmo volume (1mL em 199mL de água) misturou-se com auxílio de um bastão de vidro, após 30 minutos acrescentou-se um copo com 50mL de água contendo as 25 larvas de terceiro estágio (separadas com auxílio de uma pipeta “Pasteur”, peneira ou papel de filtro, estes dois últimos processos necessitam do auxílio de um pincel para a contagem das larvas). No controle sem tratamento (branco) colocou-se 200mL de água (receptiente teste) e 50mL de água contendo as 25 larvas do mosquito. após 24 h observou-se e anotou-se o número de larvas vivas [quando sobem à superfície para respirar movimentando-se (serpenteando)] e mortas (quando permanecem no fundo do receptiente ou na superfície do mesmo, não conseguindo movimentar-se rapidamente, isto é serpentear quando tocadas com auxílio de um estilete). O ensaio só terá validade se os valores da porcentagem de mortalidade encontrados nos controles estiverem entre 5 e 20 % e devendo ser corrigido através da fórmula de Abbot:

$$\frac{\% \text{ de mortalidade do teste} - \% \text{ de mortalidade do controle}}{100 - \% \text{ de mortalidade do controle}} \times 100$$

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Bioensaio de Toxicidade com *Artemia salina* (Brine Shrimp Letality test)

Os bioensaios feitos com as larvas do crustáceo *Artemia salina* (MCLAUGHLIN, 1991), têm sido usados como indicador de toxicidade tanto para screening de substâncias com atividade anti-tumoral, como para substâncias com atividade pesticida. Também vem sendo aplicado no biomonitoramento para frações ativas de extratos vegetais. Este bioensaio apresenta uma correlação positiva com os ensaios sobre células 9kb (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 LC_{50} encontrados nos bioensaios com *Artemia salina*.

O extrato éter de petróleo mostrou-se bastante ativo com uma dose letal (DL_{50}) igual a $0,1\mu\text{g/mL}$, sendo submetido novamente a diluições mostrando uma dose letal (DL_{50}) igual a $17,9\mu\text{g/mL}$.

O extrato diclorometânico também mostrou-se bastante ativo com uma dose letal (DL_{50}) igual a $6,98\mu\text{g/mL}$.

O extrato metanólico também mostrou-se bastante ativo com uma dose letal (DL_{50}) igual a $9,25\mu\text{g/mL}$.

Como o extratos éter de petróleo e diclorometânico contém a substância 3, e sabendo-se que cerca de 50 % do extrato éter de petróleo é constituído por esta substância fez-se o bioensaio com a substância 3, que apresentou uma dose letal (DL_{50}) igual a $2,68\mu\text{g/mL}$ sendo muito ativa.

3.2. Bioensaio de inibição de germinação des sementes de alface

O bioensaio de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) têm sido usado como um indicador de toxicidade, considerando-se que as plantas produzem inibidores e outros alomônios com a finalidade de preservar seu espaço vital. Muitos inibidores de origem vegetal são conhecidos como antibióticos, mutagênicos, fitocidas, inseticidas e drogas usadas na medicina por causa de suas atividades fisiológicas especiais (BASTA & BASTA, 1984).

Os três extratos possuem atividade inibitória sobre a germinação de sementes de alface (MAGALHÃES *et alii*, 1998) sendo esta atividade mais acentuada no extrato metanólico nas concentrações 5, 10 e 12,5mg/mL, seguido do extrato diclorometânico nas concentrações 5, 10 e 12,5mg/mL e éter de petróleo na concentração 10mg/mL. O efeito sobre a germinação de sementes de alface foi mais acentuado na primeira leitura após 24 h para os extratos éter de petróleo e diclorometânico, pois, 48 h após a exposição aos extratos testados, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle. No extrato metanólico houve inibição significativa da germinação em ambas leituras, porém, com menor intensidade na segunda leitura nas 48h após o início do bioensaio

De acordo com os dados observados verificou-se a presença de substâncias que retardam a germinação das sementes de alface, principalmente no extrato metanólico, sendo que esta inibição não está associada a presença dos flavonóides isolados, já que no extrato éter de petróleo a inibição não foi significativa. Em *Lonchocarpus sericeus* uma espécie que pertence ao mesmo subg. de *L. latifolius*, a atividade está associada a presença do aminoácido não essencial (3-[2-amino-2-imidazolin-4-il]alanina), (WILSON & BELL, 1978). Supondo-se que a atividade alelopática de *L. latifolius* também poderia estar associada a presença de tais substâncias.

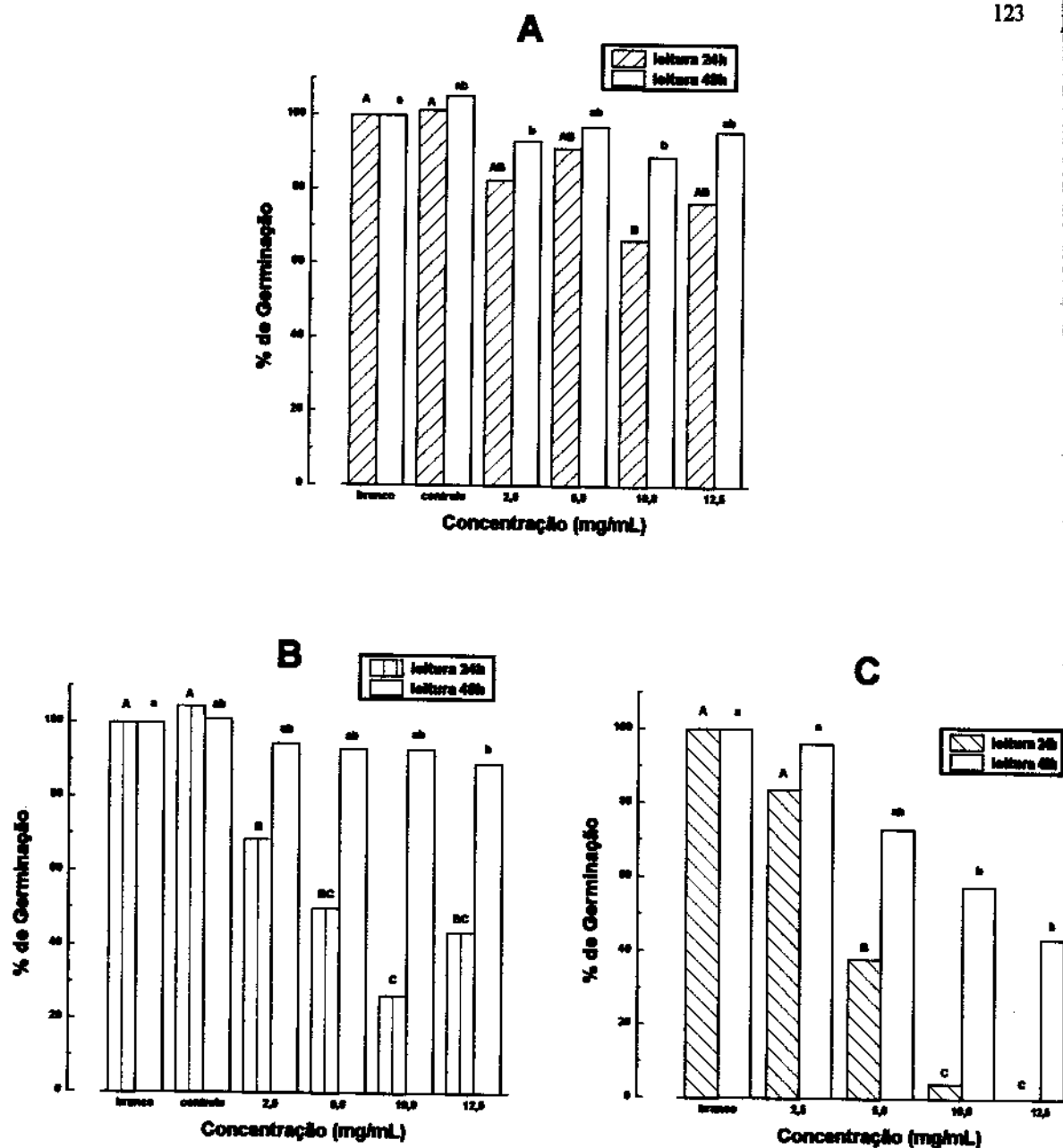


Figura 1. Efeito dos extratos éter de petróleo, diclorometânico e metanólico sobre a germinação de sementes de alface cultivar “grand rapids”.

A = extrato éter de petróleo; B = diclorometânico; C = extrato metanólico.

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

3.3. Bioautografia

A atividade bactericida e fungicida de várias plantas vem sendo investigada ao longo dos anos com a finalidade de se descobrir novas drogas para uso farmacêutico, veterinário e agrícola.

Dentre as várias classes de flavonóides algumas são mais promissoras que outras para atividade antifúngica como as chalconas, dihidrochalconas e flavanonas (CHOUDHURY *et alii* 1974 e BISWAS *et alii* 1981 *apud* SITANSU, 1985).

Foram feitos os bioensaios de bioautografia com alguns fungos e bactérias de cepas mais conhecidas (MAGALHÃES *et alii*, 1998), levando-se em conta que isoflavonóides e flavonóides são seletivamente tóxicos para bactérias gram-positivas, sendo as gram-negativas bem menos sensíveis (GNANAMANICKMAN & MANSFIELD, 1981).

Os extratos éter de petróleo e diclorometânico apresentaram atividade somente para a bactéria *Bacillus subtilis* (gram +). Das 11 substâncias isoladas somente a substância 3 se mostrou ativa (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1. Bactérias testadas nos extratos das raízes de *L. latifolius*.

Bactérias	Extratos		
	Éter de petróleo	Diclorometânico	Metanólico
<i>E. coli</i> ^a	-	-	-
<i>Rodococcus equi</i> ^b	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ^c	+	+	-
<i>S. aureus</i> ^d	-	-	-
<i>M. luteus</i> ^e	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> ^f	-	-	-

a CCT 5050 b CCT 0541 c CCT 0089 d CCT 4295 e CCT 2720 f CCT 0528.

bactéria: *Bacillus subtilis*
 A: cloranfenicol
 1: extrato éter de petróleo
 3: dibenzoilmetano (substância 3)
 12: flavana (substância 12)

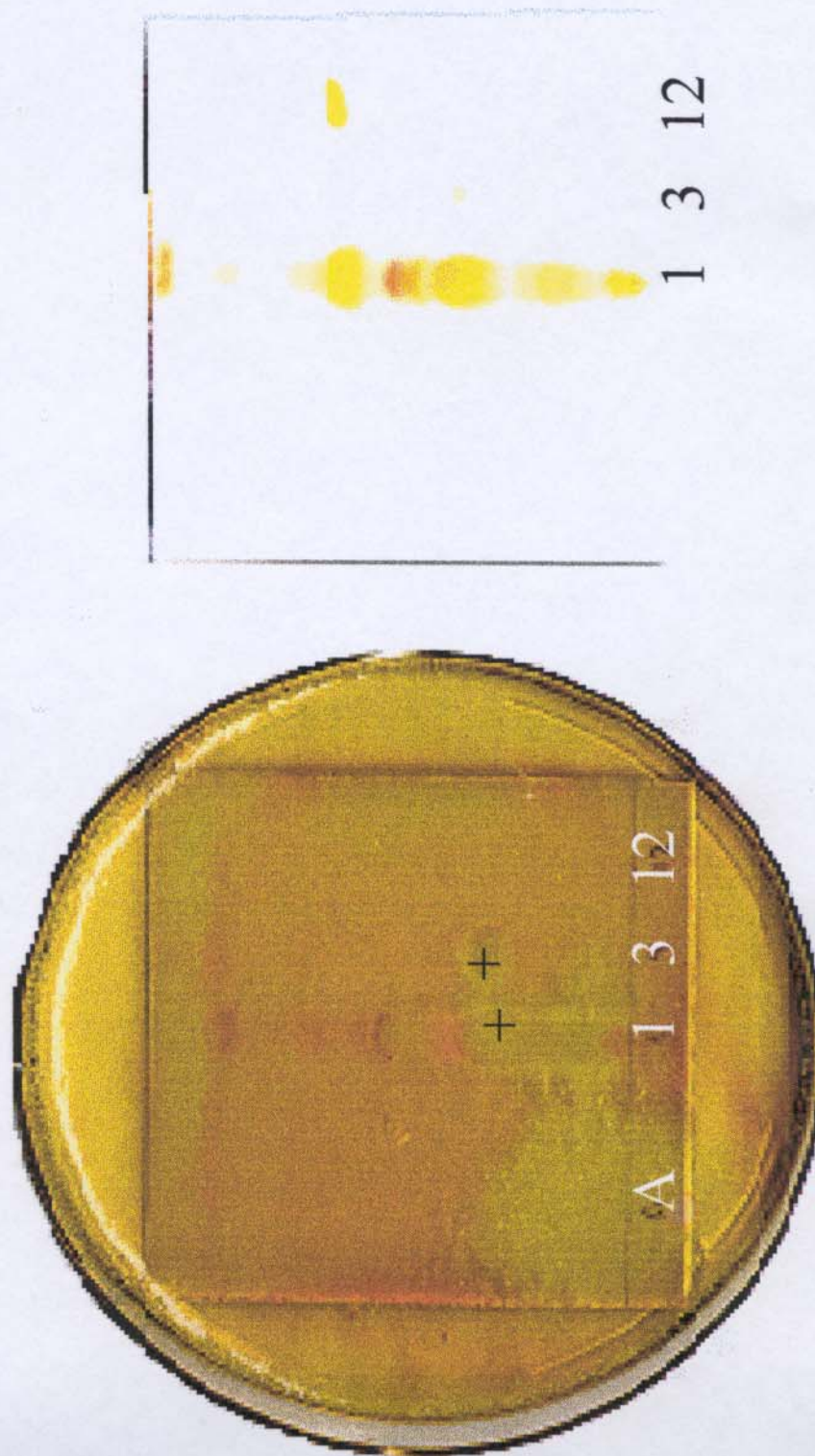


Figura 2

Os extratos éter de petróleo e diclorometânico apresentaram atividade para os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae* sendo que apenas a substância 3 apresentou atividade o fungo *Aspergillus niger*. O extrato éter de petróleo mostrou-se apenas parcialmente ativo para o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Tabela 2 e Figuras 3, 3A, 4 e 5).

Tabela 2. Fungos testados nos extratos das raízes de *L. latifolius*.

Fungos	Extratos		
	Éter de petróleo	Diclorometânico	Metanólico
<i>C. albicans</i> ^a	-	-	-
<i>A. niger</i> ^b	++++	++++	-
<i>P. funiculosum</i> ^c	-	-	-
<i>F. oxysporum</i> ^d	-	-	-
<i>R. oryzae</i> ^e	++++	++++	-
<i>A. alternata</i> ^f	-	-	-
<i>A. fumigatus</i> ^g	-	-	-
<i>C. cladosporioides</i> ^h	+	-	-

a CCT 0776 b CCT 1435 c CCT 0490 d CCT 3244 e CCT 4964 f CCT 1250

g CCT 01277 h CCT 5039.

++++ atividade positiva

+ atividade moderada

3.3.1 Bioensaio Antibiograma

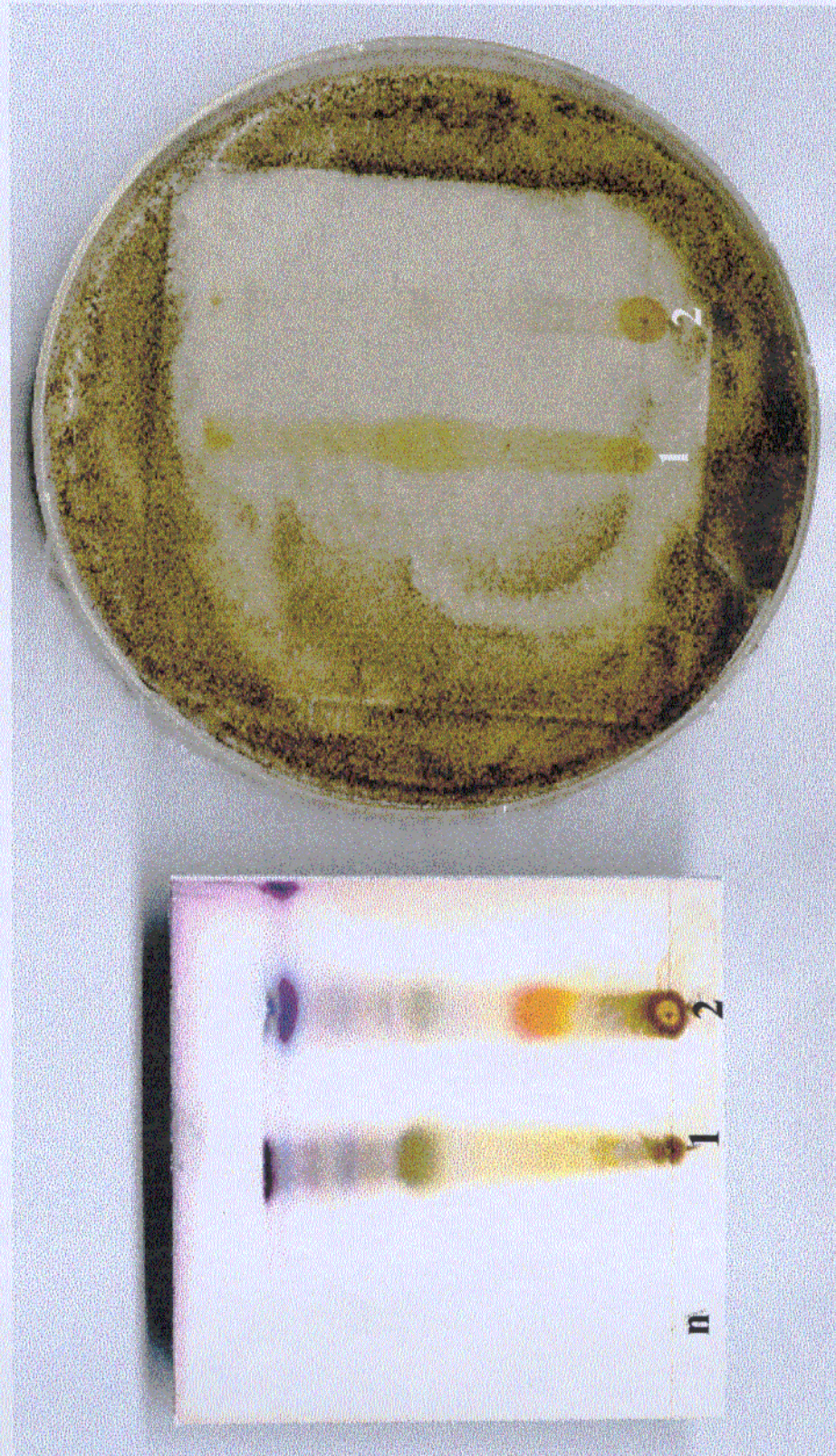
De acordo com dados da Tabela 3, a substância 3 apresenta atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, a partir da concentração de 10 µg, tornando-se constante a partir de 20µg (Figura 6).

I este bioautografa
fungo : *Aspergillus niger*

N: nistatina

1: extrato éter de petróleo

2: extrato diclorometânico



Teste bioautografia
fungo: *Aspergillus niger*
N: nistatina
3: extrato metanólico
4: dibenzoilmetano

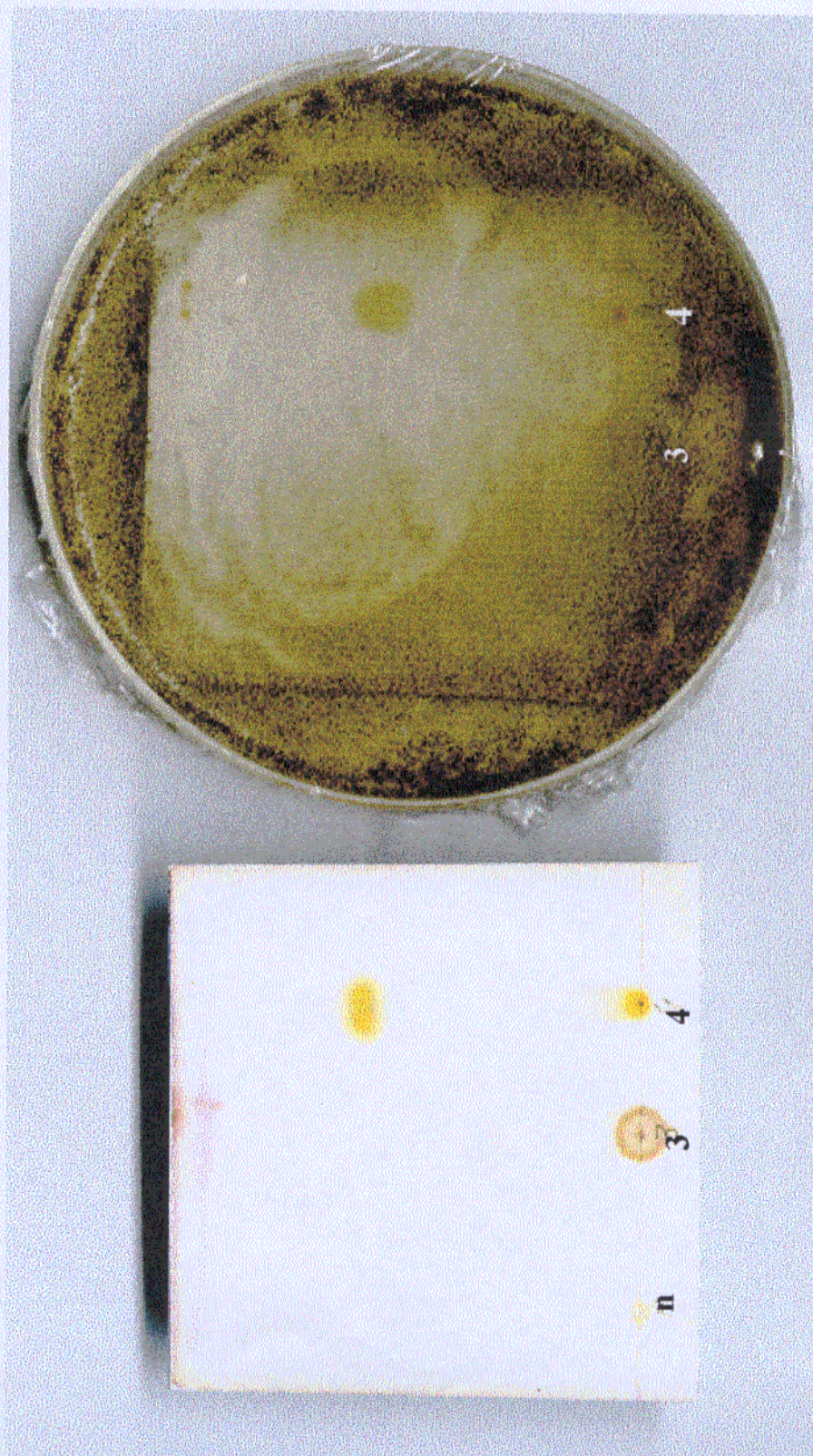


Figura 3A

Teste bioautografia
fungo: *Rhizopus orizae*
A: nistatina
1: extrato éter de petróleo
2: extrato diclorometânico

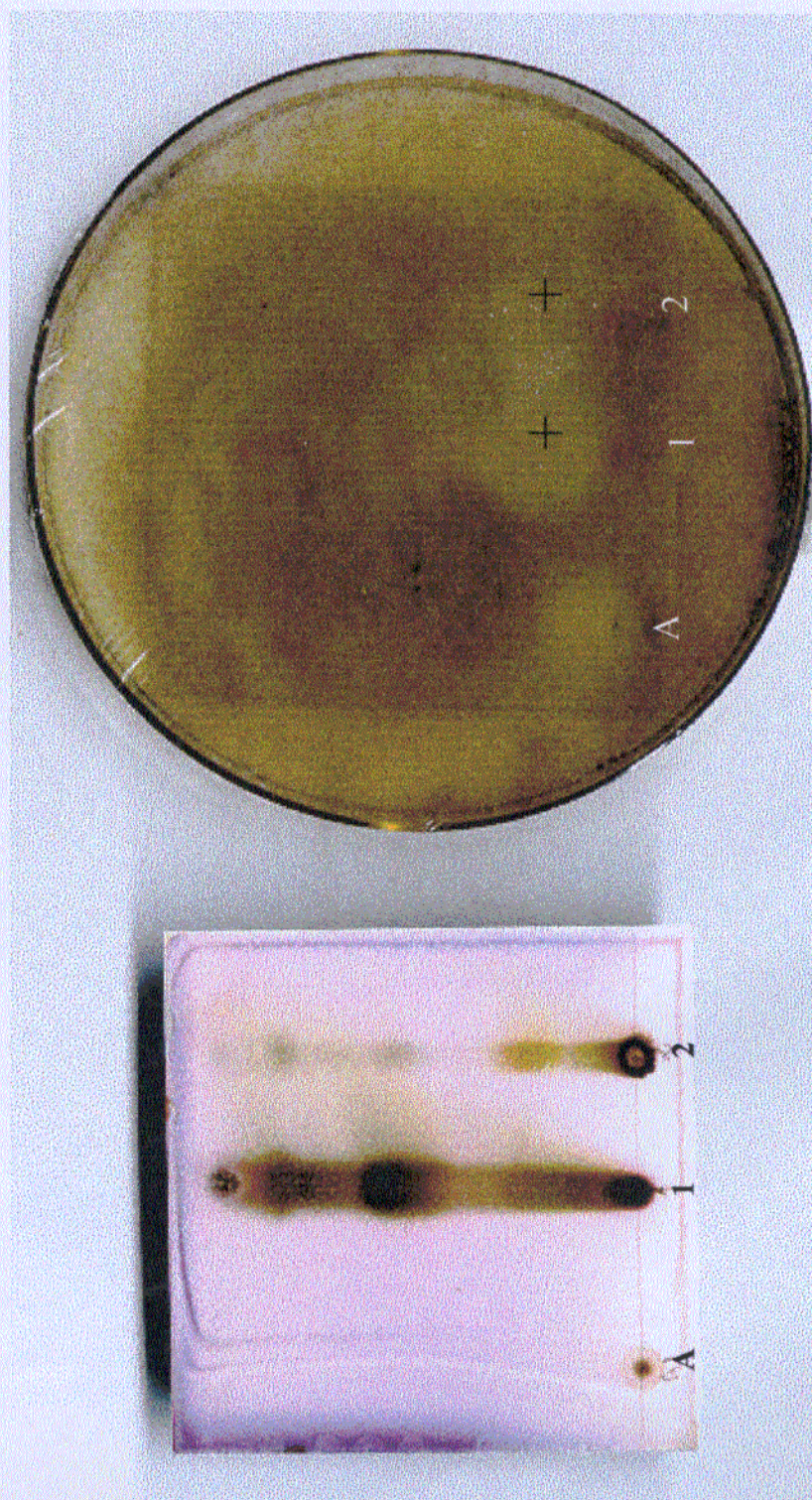


Figura 4

Teste bioautografia
fungo: *Cladosporium cladosporioides*
A: nistatina
1: extrato éter de petróleo
2: extrato diclorometânico

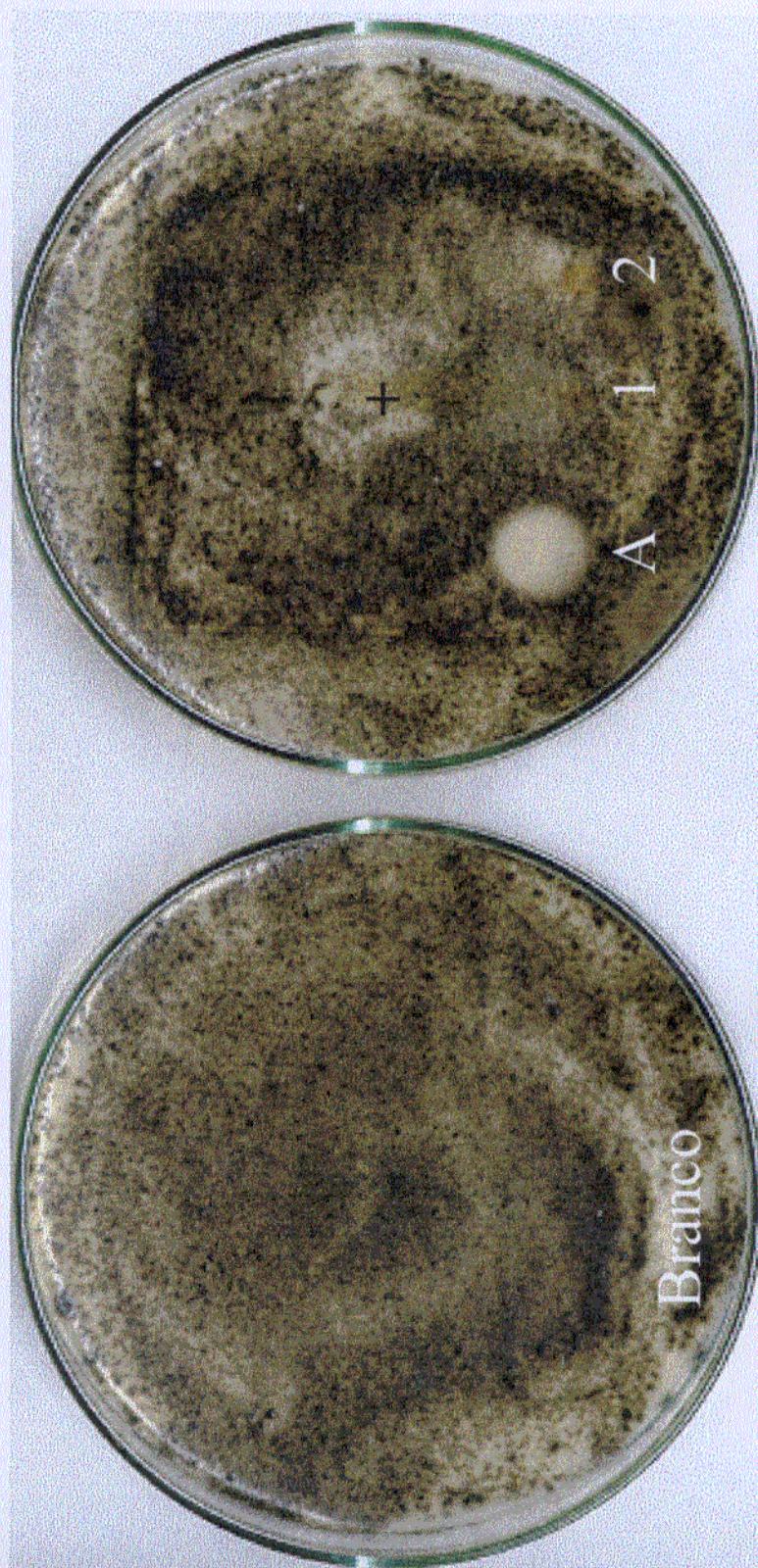


Figura 5

Teste Antibiograma
Bactéria: *Bacillus subtilis*

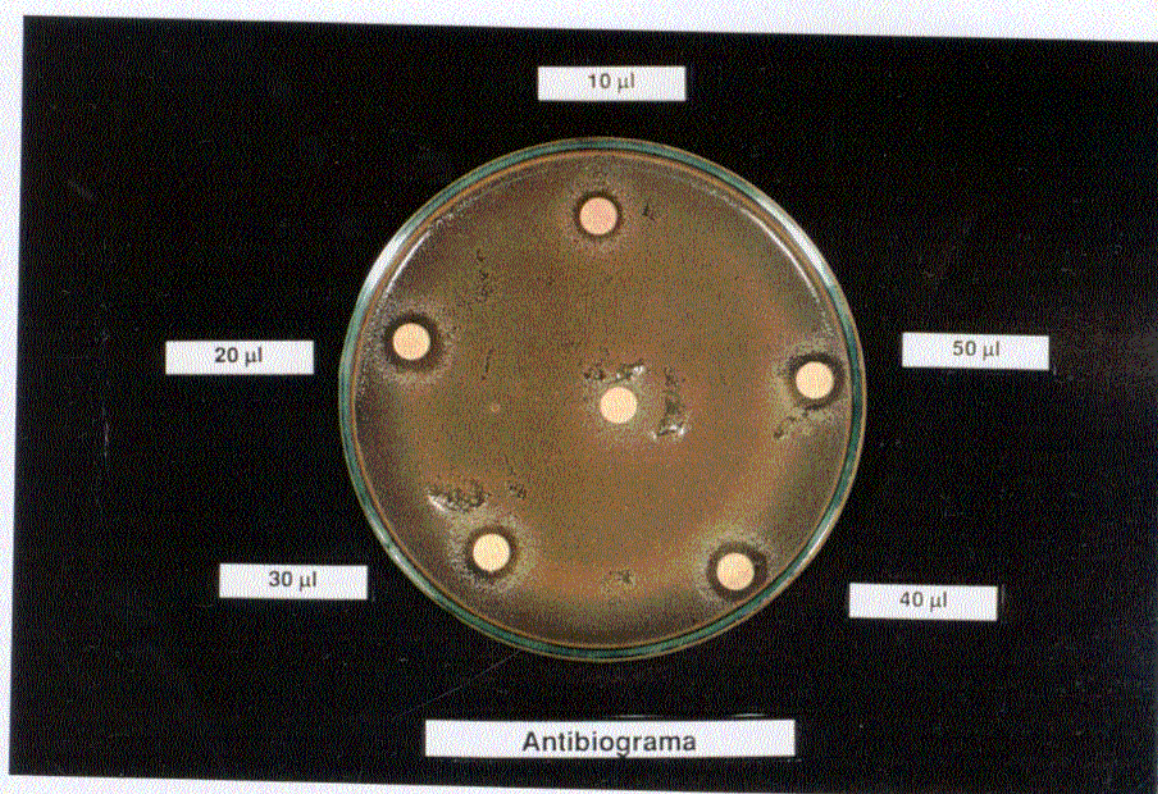


Figura 6. Halos de inibição da substância 3 nas concentrações indicadas ($\mu\text{g/mL}$)

Tabela 3. Resultados obtidos do bioensaio de antibiograma para a substância 3.

Dosagem ($\mu\text{g}/\text{disco}$)	Replicatas (halos em mm)				Médias
	1	2	3	4	
0	0	0	0	0	0
10	8	9	10	10	9,25
20	10	10	11	11	10,50
30	10	11	10	11	10,50
40	11	11	11	11	11,00
50	12	11	12	11	11,50

Foram feitos outros testes de antibiograma com *Bacillus* de outras linhagens como: *B. megaterium* (CCT 3026); *B. licheniformis* (CCT 2473); *B. macerans* (CCT 2475); *B. coagulans* (CCT 2467); *B. cereus* (CCT 1436) nas mesmas concentrações para *Bacillus subtilis*, onde se verificou que a substância 3 apresenta certa seletividade, pois o teste foi negativo para estes *Bacillus*.

3.4. Bioensaio para atividade larvicida com *Aedes aegypti*

O ensaio foi desenvolvido de acordo com a metodologia adaptada da publicação "*Insecticide Resistance and Vector Control*" *World Health Organization*. O extrato éter de petróleo nas concentrações a 1 e 10ppm foi o que apresentou melhor atividade com 75 e 96 % de mortalidade respectivamente e o extrato metanólico nas concentrações a 13 e 56ppm com 57 e 87 % de mortalidade respectivamente, para larvas de 3º estágio de *Aegides aegypti* (Tabelas 4 e 5). O extrato foi testado juntamente com o inseticida temefós, na dose diagnóstico de 0,012ppm, isto é, para se ter certeza de que a população do mosquito utilizada não é

resistente ao inseticida e com isso eliminar variáveis que pudessem mascarar o ensaio e também por se tratar de um produto comercial cuja atividade contra o mosquito é conhecido e eficaz.

Tabela 4. Resultados obtidos nos ensaios biológicos da atividade larvicida dos extratos MLR e EPLR de *Lonchocarpus latifolius* em larvas de 3^o estágio de *Aedes aegypti*.

Extrato	Solvente	Concentração (ppm)	Nº de larvas testadas	Nº de larvas mortas	% de mortalidades
MLR	metanol (1mL)	5,6	200	45	8
		13	200	118	57
		24	250	202	87
EPLR	acetona (1mL)	0,001	75	26	34,7
		0,1	125	73	58,4
		1	175	144	82,6
Controle	acetona (1mL)	-	475	3	0,6
Controle	metanol (1mL)	-	225	2	0,9
Controle	Sem tratamento	-	375	3	0,8

Tabela 5. Resultados obtidos no teste para atividade larvicida com *Aedes aegypti*

Extratos	Concetrção Letal CL	
	50	99
EPLR	0,0043 ppm	13,3 ppm
MLR	10,86 ppm	86,88 ppm

De acordo com os dados observados na tabela podemos dizer que o extrato éter de petróleo é mais ativo como larvicida para *Aedes aegypti* que o extrato metanólico, pois uma dose de mais ou menos 2500 vezes menor, consegue matar 50% das larvas desta espécie. Para o calculo da CL 50 e 90 utilizamos concentrações em ppm que consigam matar entre 10 e 90 % das larvas. Para o calculo da CL 90 foi feita uma extropolação, pois este dado serve como parâmetro na escolha da dose de campo, visando o controle químico das larvas de *Aedes aegypti*

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTA, S. B. D. & BASTA, F. Inibidores de germinação e de crescimento em plantas usadas na medicina popular. *Ciência e Cultura*, 36 (9): 602-06. 1984.
- FINNEY, 1971 *apud* CEPLEANU, F. Validation and application of three benth-top biossays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation Lausanne Universidade de Lausanne, 1993, 259p. Tese (Doutorado).
- CHANG-QI-HU, KECHEN QIAN SHI, KILKUSKIE, R. E. Anti AIDS agents, 10 Acacetin-7-o- β -Dgalactopyranoside, an anti HIV principle from *Chysanthemum marifolium* and a struture activity correlation with some related flavonoids. *Journal of Natural Products* 57 (1): 42-51, 1994.
- CHOUDHURY *et alii* 1974 e BISWAS *et alii* 1981 *Apud* SITANSU, P., MUKHERJEE, B., GANGULY, A., MIRTA, R. S., ANJAN, B. Antifungal activity of same naturally occurring flavonoids. *Journal of Plant Diseases and Protection* 92 (4):392-395, 1985.
- CLEMETSON, 1989 *apud* MIDDLETON, E. & KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology IN: HARBONE, J. B. The Flavonoids advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1996. cap.15. p. 619-645.
- EVANS, W. C. Trease and Evans' Pharmacognosy 40 ed. London: Saunders 613p.1996
- FREUDEMBERG, K. & HARTMAN, L. 1953 *apud* HERGERT, H. L. Economic importance of flavonoids compounds wood and bark In: GEISSMAN, T. A. The chemistry of flavonoid compounds. New York: The Macmillam Company, 1962. cap.17. p. 553-592.
- GNANAMANICKMAN, S. S. & MANSFIELD, J. W. Seletive toxicityof wyerane and otherphytoalexins to gran-positive bacteria *Phytochemistry* 20 (5): 997-1000, 1981.

- GSCHWENDT *et alii* 1983 apud MIDDLETON, E. & KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology IN: HARBONE, J. B. The Flavonoids advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1996. cap.15. p. 619-645.
- HARBONE, J. B. The Flavonoids advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1996. cap.15. p. 619-645.
- KAUL, T. N., MIDDLETOWN Jr., E. & OGRA, P. L. 1985 *apud* CHANG-QI-HU, KECHEN QIAN SHI, KILKUSKIE, R. E. Anti AIDS agents, 10 Acacetin-7-o- β -D-galactopyranoside, an anti HIV principle from *Chysanthemum marifolium* and a struture activity correlation with some related flavonoids. **Journal of Natural Products**, 57(1): 42-51, 1994.
- KENNEDY, R. W. 1956 *apud* HERGERT, H. L. Economic importance of flavonoids compounds wood and bark In: GEISSMAN, T.A. The chemistry of flavonoid compounds. New York: The Macmillam Company, 1962. cap.17. p. 553-592.
- MAGALHÃES, A. F., TOZZI, A. M. A., MAGALHÃES, E. G., NOGUEIRA, M. A. Y FLORÉZ-RONCANCIO, V. J. Ensayos Biológicos con Extractos Obtenidos de Raíces de *Lonchocarpus latifolius* y de un Nuevo Dibenzoilmetano Aislado. **Rev. Ceres** 1998 (No prelo).
- MCLAUGHLIM, J. L. Grow gall tumors on potato disc and brine shrimp lethality: two simple bioassay for higher plant screening and fractionation In: HOSTETTMANN, K. Methods in plant biochemistry. London: Academic v.6 p. 1-32, 1991.
- MEYER, B. N. Brine shrimp: a convenient bioassay for active plant constituents **Planta Médica** 45: 31-34, 1982.
- NAKADATE, *et. alii*, 1983 *apud* MIDDLETON, E. & KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology IN: HARBONE, J. B. The flavonoids advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1996. cap.15. p. 619-645.
- NISHINO *et. alii*, 1983 apud MIDDLETON, E. & KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology IN: HARBONE, J. B. The flavonoids advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1996. cap.15. p. 619-645.

- OGAWA *et alii*, 1985 apud MIDDLETON, E. & KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology IN: HARBONE, J. B. The flavonoids advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1996. cap.15. p. 619-645.
- ORJALA, J., WRIGHT, A. D., BEBREND, H. Cytotoxic and anty bacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products** 57 (1): 18-26, 1994.
- SAXENA, G., FARNER, S., TOWERS, G. H. N., HANCOCK, R. E. W. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts a thin layer chromatography agar overlay technique. **Phytochemical Analysis** 6 (3): 125-129, 1995.
- SHMELZER *et alii*, 1988 apud KOES, R. E., QUATTROCCHIO, F., MOL, J. M. N. The flavonoids biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **BioEssays** 16 (2):124-132, 1994.
- VANDER DER MEER *et alii*, 1992 apud KOES, R. E., QUATTROCCHIO, F., MOL, J. M. N. The flavonoids biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **BioEssays** 16 (2):124-132, 1994.
- VRIJSEN, R., EVERAERT, L., VAN HOOFF, A. J. 1987 apud CHANG-QI-HU, KECHEN QIAN SHI, KILKUSKIE, R. E. Anti AIDS agents, 10 Acacetin-7-o- β -Dgalactopyranoside, an anti HIV principle from *Chysanthemum marifoliu* and a struture activity correlation with some related flavonoids. **Journal of Natural Products**, 57 (1): 42-51, 1994.
- WEBB, D. P. & WAREING, P. F. Seed dormancy in *Acer*: endogenous germinating inhibitors and dormancy in *Acer pseudoplatanus* L. **Planta** 104:115-25, 1972.
- WILSON, M. F. & BELL, A. Amino acids and β -aminopropionitrile as inhibitors of seeds germination and growth. **Phytochemistry**, 17 (3):403-406, 1978.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Seguindo a mesma metodologia de análise tem-se que praticamente todos os flavonóides isolados de *L. latifolius* (Figura 3 Capítulo I) exceto medicarpina a substância 13 junto aos de mais quatro espécies brasileiras de *Lonchocarpus* estudados até agora, possuem um anel 2",2" dimetilpirano ou um anel furano ligado ao anel A, uma característica unificadora observada na subfamília *Papilionoideae*. Entretanto, a presença de um anel A totalmente substituído contendo mais duas metoxilas se restringe aos flavonóides isolados das três espécies pertencentes ao subg. *Punctati* (Figura 1), podendo ser interpretado como uma característica classificadora, corroborando com a proposta de classificação botânica anterior.

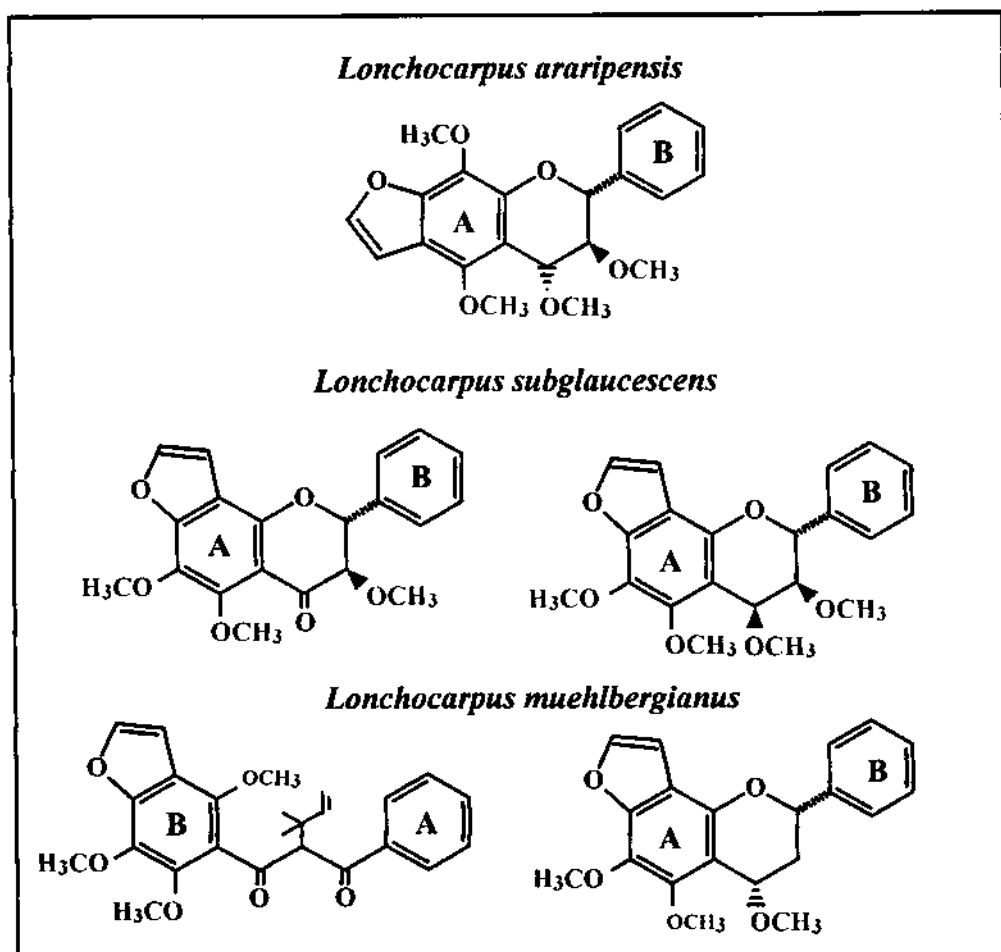


Figura 1. Flavonóides isolados de *Lonchocarpus* subg. *Punctati*.

Por outro lado admitindo-se que o valor médio da razão de oxidação versus metilação(O/Me) dos flavonóides isolados possa indiretamente expressar o potencial redox das espécies (GOTTLIEB, 1972¹), conclui-se que em *Lonchocarpus* o subg. *Punctati* é mais evoluído como proposto por TOZZI (1989²), através da análise de vários caracteres morfológicos das espécies envolvidas (Figura 2).

¹ GOTTLIEB, O. R. Micromolecular evolution, systematics and ecology. New York: Springer-Verlag, 170p 1972.

² TOZZI, A. M. A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil. 1989 341p Tese (Doutor em Biologia). Instituto de Biologia UNICAMP.

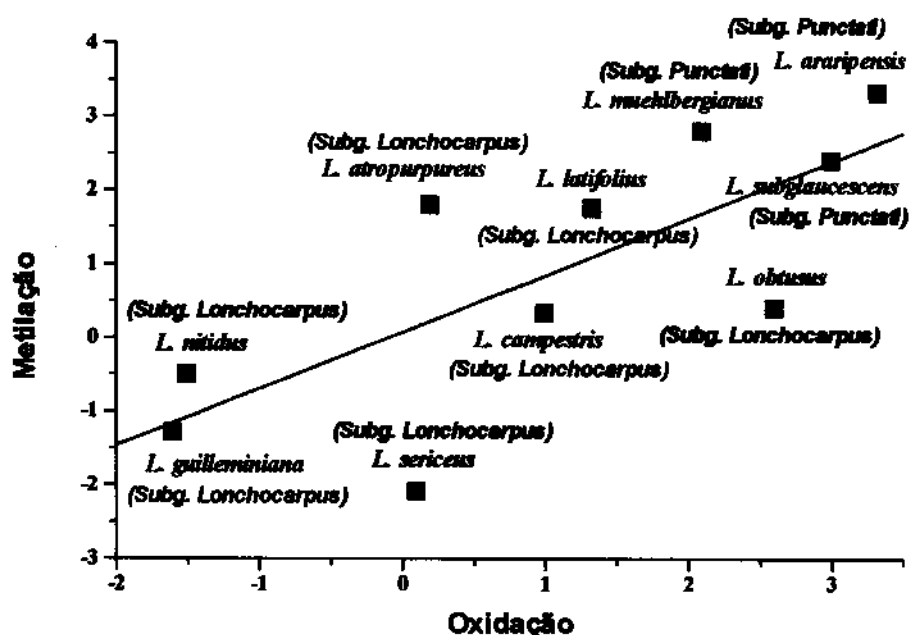


Figura 2. Gráfico mostrando o grau de oxidação/metilação de algumas espécies do gênero *Lonchocarpus*, as espécies escritas de vermelho são as estudadas pelo nosso grupo de pesquisa.

O principal flavonóide isolado de *L. latifolius* foi a substância 3, devido a sua concentração elevada nos extratos de várias partes da planta (raiz, caule, folha e fruto) que foram analisados por CLAE. A substância 3 é um novo derivado de dibenzoilmetano, classe de flavonóides raramente encontrado na natureza, além disso trata-se do primeiro dibenzoilmetano natural que possui um substituinte no carbono C-8, sendo de fato um derivado do pongamol (substância 14) isto é 8-[α,α -dimetilalil]-pongamol. Sua biossíntese pode ser racionalizada imaginando-se o rearranjo (tipo rearranjo de Claisen) de um precursor O-prenilado (Figura 3 GRUNDON, 1969¹).

¹ GRUNDON, M. F. Claisen rearrangement in the biosynthesis of 1,1-and 1,2-dimethylallyl derivatives. the biosynthesis of the quinoline alkaloid ravenoline *Chem. Comm.* 1269, 1969.

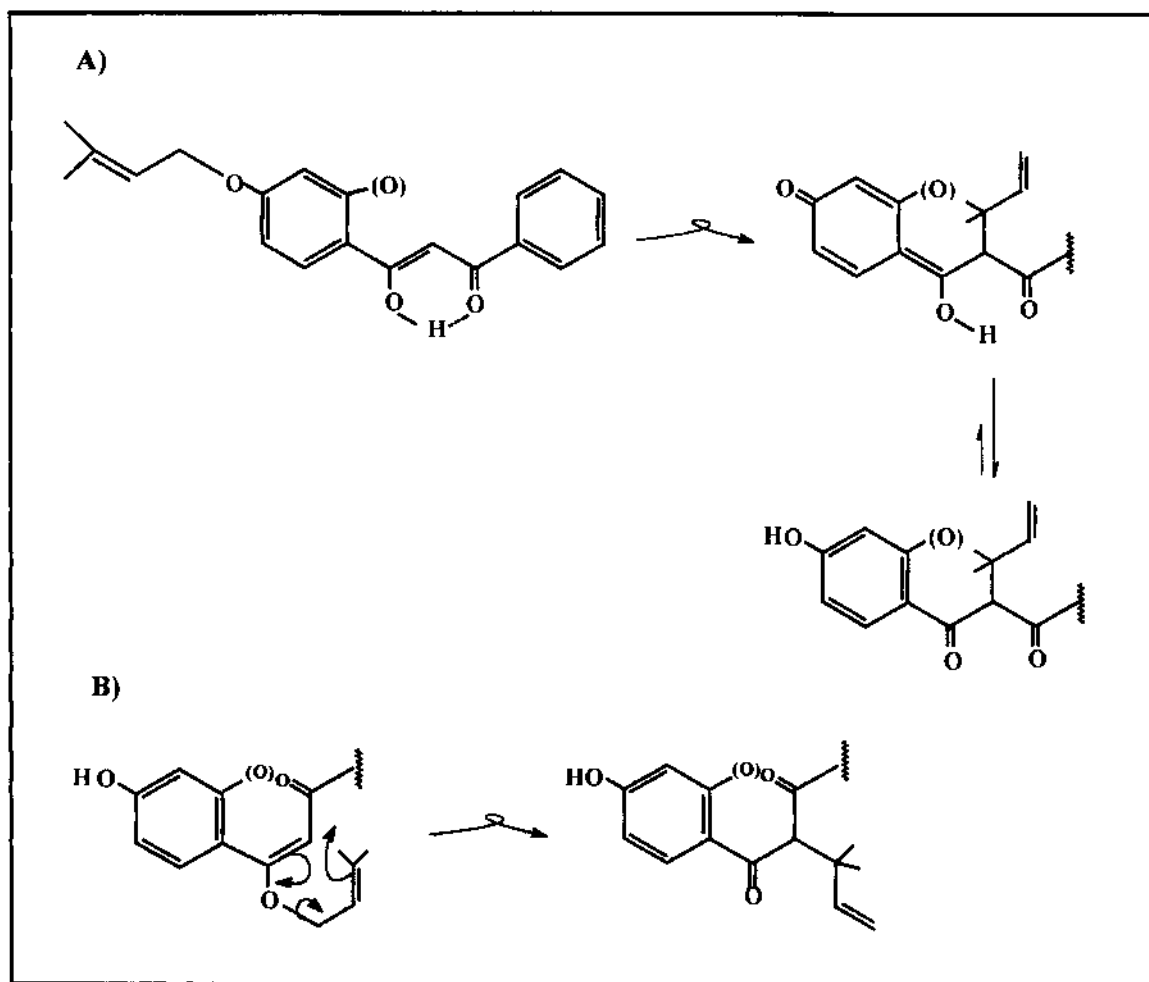


Figura 3. Proposta de biossíntese para a substância 3

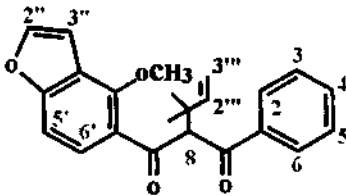
Os resultados das análises por CLAE forneceram alguns dados bastante interessantes a começar pelo perfil cromatográfico dos extratos de cada parte da planta, mostrando que as raízes contém maior variedade e maior concentração de flavonóides e que apenas as substâncias 3 e 8 ocorrem em todas as partes da planta que foram analisadas.

A análise sazonal mostrou que a melhor época para extrair os flavonóides de *L. latifolius* é a primavera quando a concentração destes metabólitos é mais elevada, destacando-se o pongacromeno (substância 6) cuja concentração na primavera é por volta de duzentas vezes mais do que no inverno e três vezes maior que no verão. O novo derivado do dibenzoilmetano (substância 3) é o flavonóide

mais abundante em todos os extratos que foram analisados por CLAE e praticamente mantém a mesma concentração no extrato éter de petróleo das raízes coletadas ao longo do ano de 1996. Chama atenção ainda a sua concentração no extrato éter de petróleo das raízes coletadas em agosto de 1994 (inverno), que é quatro vezes mais elevada do que no extrato das raízes coletadas em agosto de 1996, sugerindo que a substância 3 possa funcionar como agente de defesa da planta. A ocorrência de medicarpina (substância 13) uma conhecida fitoalexina, somente nos extratos diclorometânico e metanólico das raízes coletadas em agosto de 1994 sugere a possibilidade de um mecanismo de defesa contra ataques de microrganismos sendo portanto razoável supor que a substância 3 também estaria atuando na mesma direção.

Aplicando-se os testes de bioautografia verificou-se que a substância 3 é ativa contra *Bacillus subtilis* (uma bactéria do solo) Tabela 1.

Tabela 1. Bioensaios realizados com a substância 3.

Bioensaios	Sustância 3 
Citotoxicidade com <i>Artemia salina</i>	2,68 µg/mL
Inibição de germinação de alface	negativo
Bioautografia	<i>Bacillus subtilis</i> MIC a partir de 9 µg
Inseticida	<i>Aedes aegypti</i>

Esta substância é a responsável por estas atividades no extrato éter de petróleo e diclorometânico das raízes. O extrato metanólico foi o que apresentou maior inibição da germinação de sementes de alface. Este teste além de detectar substâncias com atividade alelopática pode ser usado segundo BASTA & BASTA (1984⁴) como *prescreening* para atividade anti-tumoral. No caso do extrato metanólico esta atividade pode ser devido a presença de aza-açúcares (DMDP, DNJ e DMJ etc) detectados por análise com CG-EM. O resultado do teste de *Artemia salina* também pode sugerir uma possível atividade anti-tumoral além da atividade inseticida comprovada pelo teste com *Aedes aegypti* (Tabela 2).

Tabela 2. Bioensaios realizados nos extratos de *L. latifolius*

Extratos	Bioensaios			
	<i>Artemia salina</i>	Inibição de germinação	Bioautografia	Inseticida
Éter de petróleo 1ª diluição: 2ª diluição:	0,1mg/mL 17,9mg/mL	pouco significativo	<i>B. subtilis</i> <i>A. niger</i> <i>R. orizae</i> <i>C. cladosporioides</i>	<i>Aedes aegypti</i> .
Diclorometânico	6,98mg/mL	pouco significativo	<i>Bacillus subtilis</i> <i>A. niger</i> <i>R. orizae</i>	não testado
Metanólico	9,25mg/mL	4% de germinação a 10mg/mL sem germinação a 12,5mg/mL	negativo	<i>Aedes aegypti</i> .

⁴ BASTA, S. B. D. & BASTA, F. Inibidores de germinação e de crescimento em plantas usadas na medicina popular. *Ciência e Cultura*, 36 (9): 602-06 1984.

O extrato metanólico foi muito pouco explorado e diante dos testes positivos nos ensaios biológicos preliminares merece ser investigado quanto a ocorrência de flavonóides glicosidados o que exigirá uma metodologia de análise diferente da empregada atualmente neste trabalho pesquisa.

Apêndice A

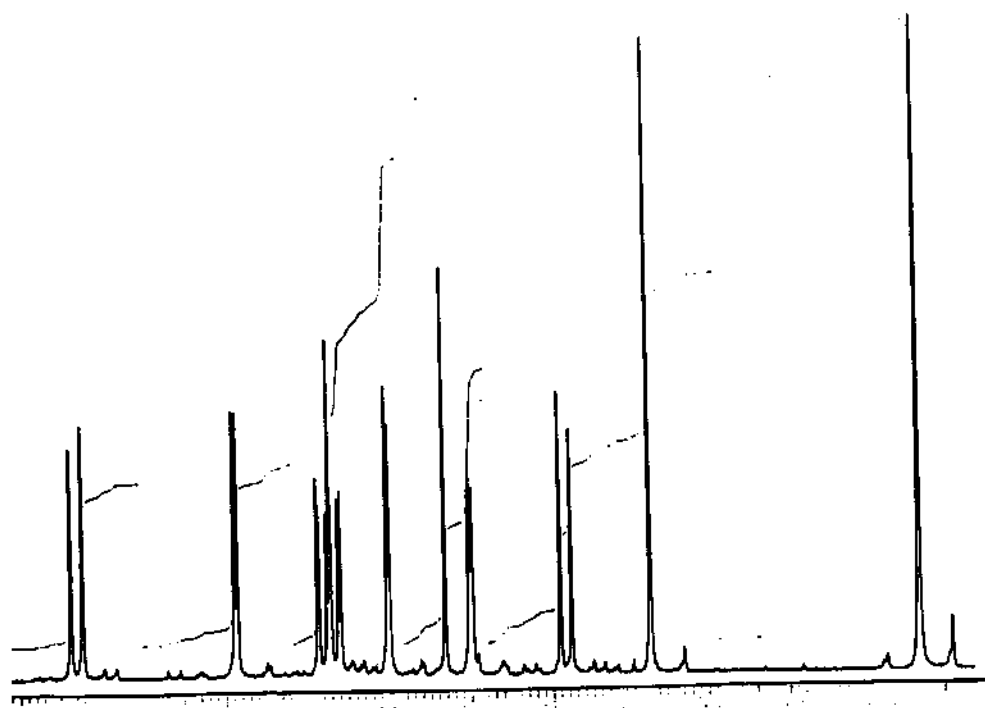
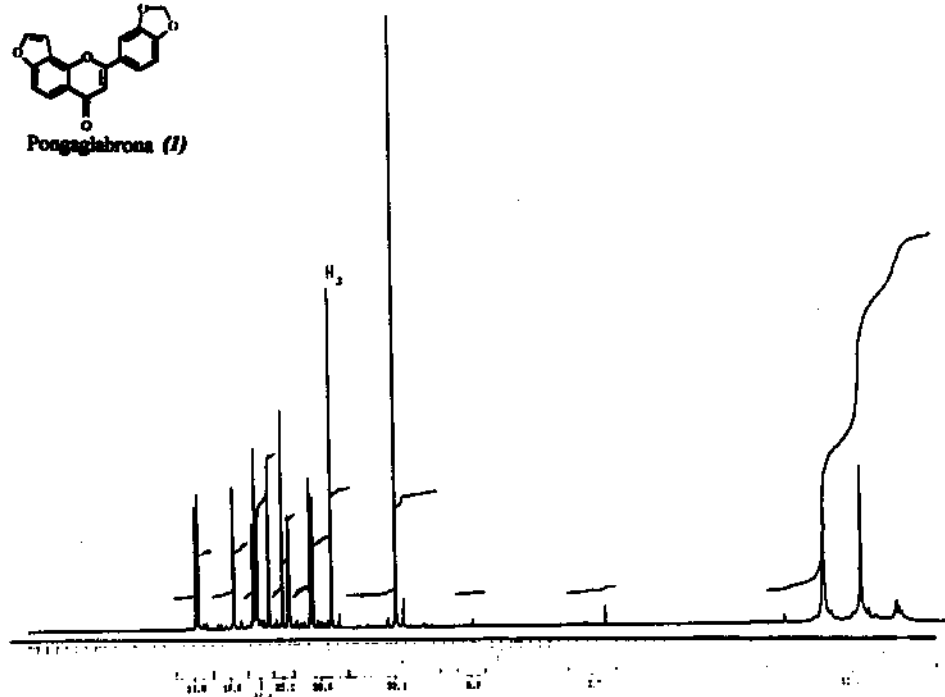
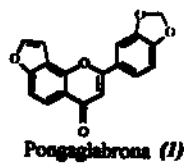


Figura 1. Espectro de RMN ¹H da substância 1

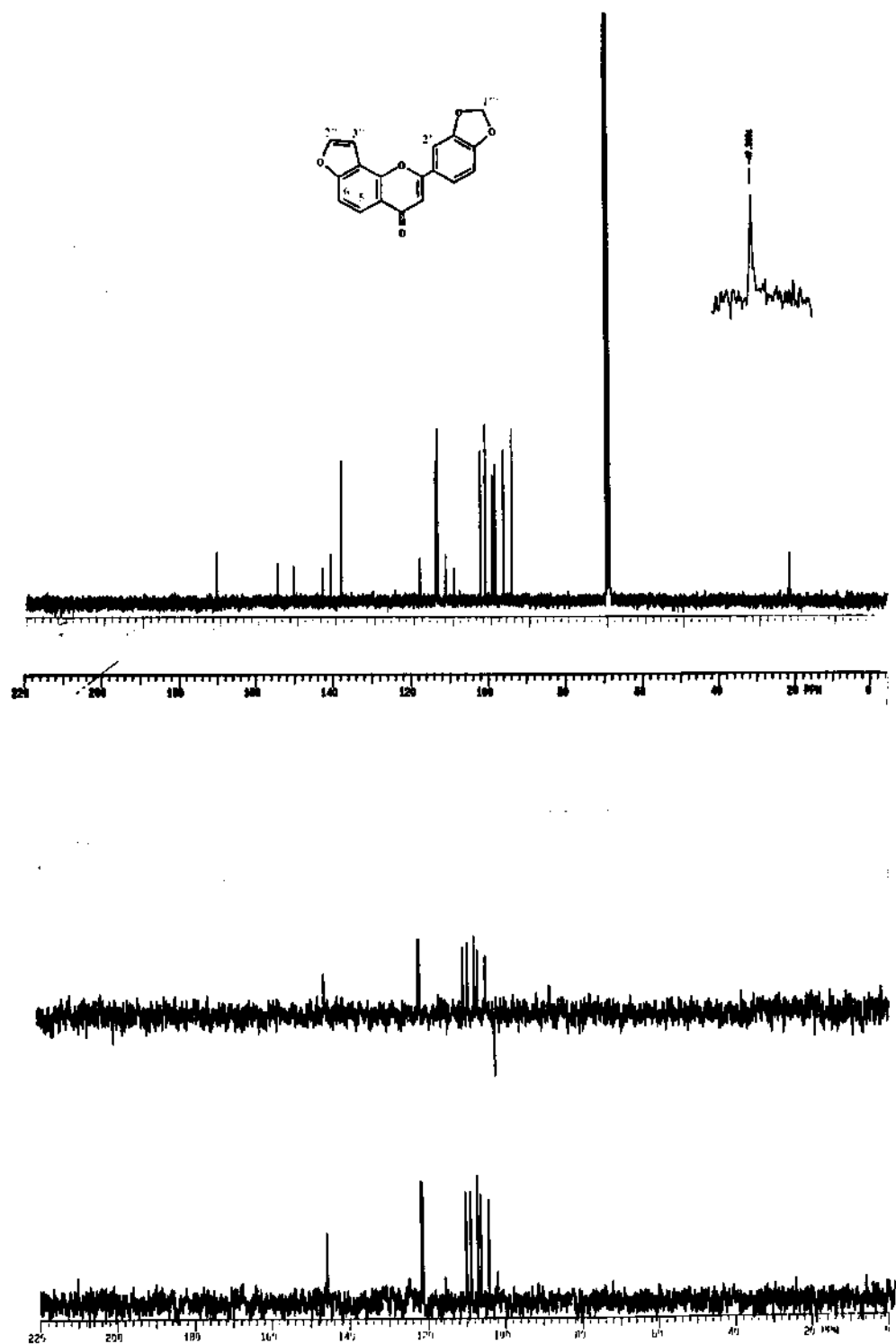


Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT da substância 1

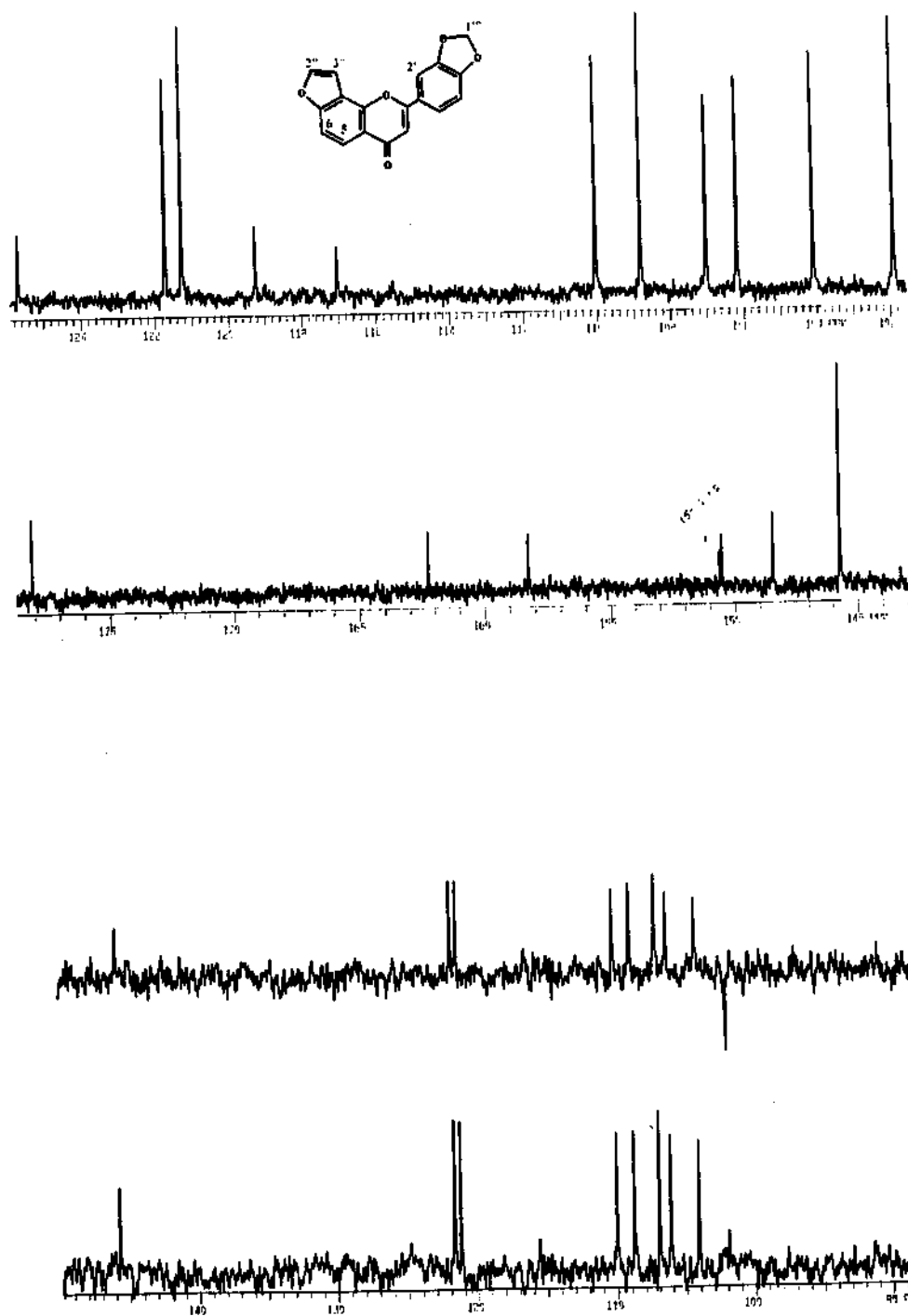


Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C da substância 1, expansão

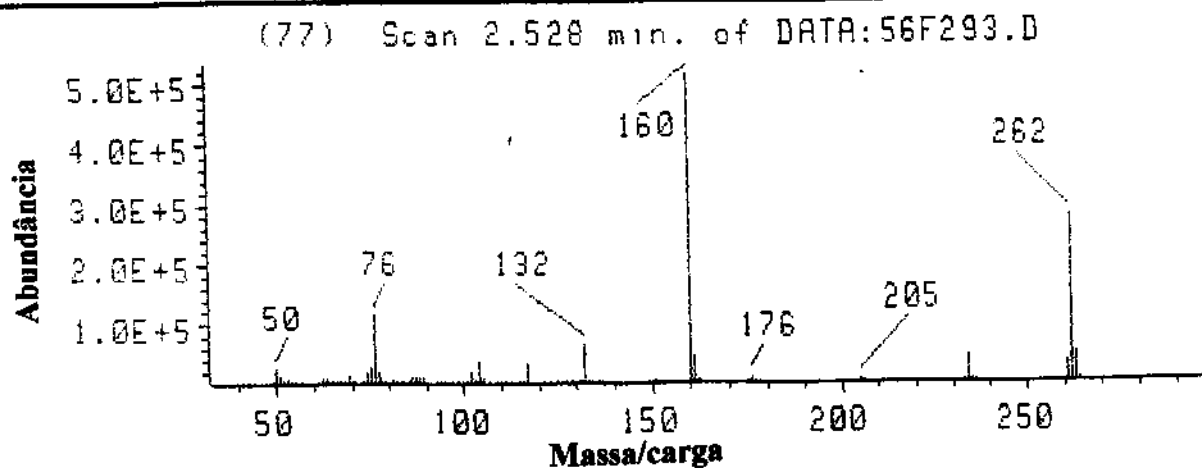
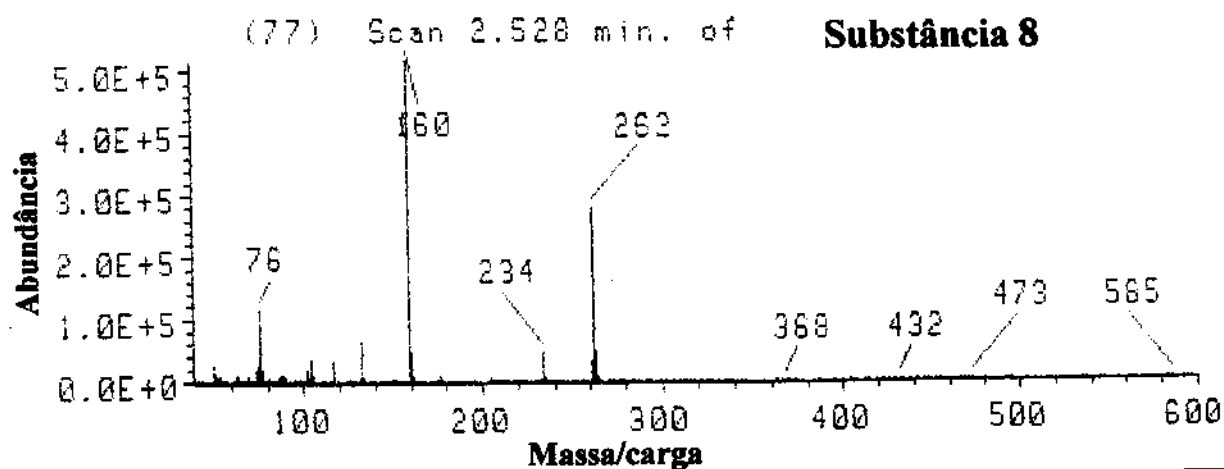
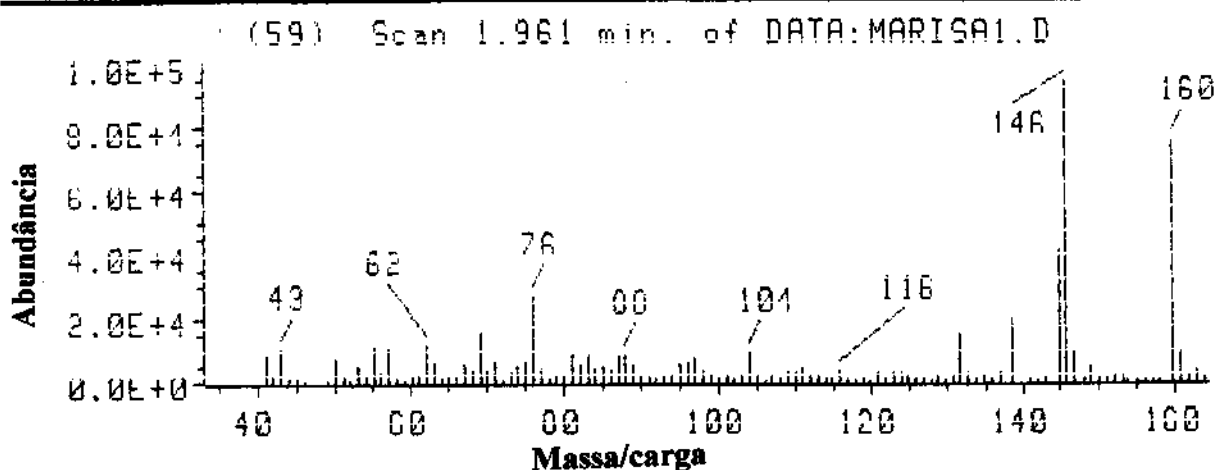
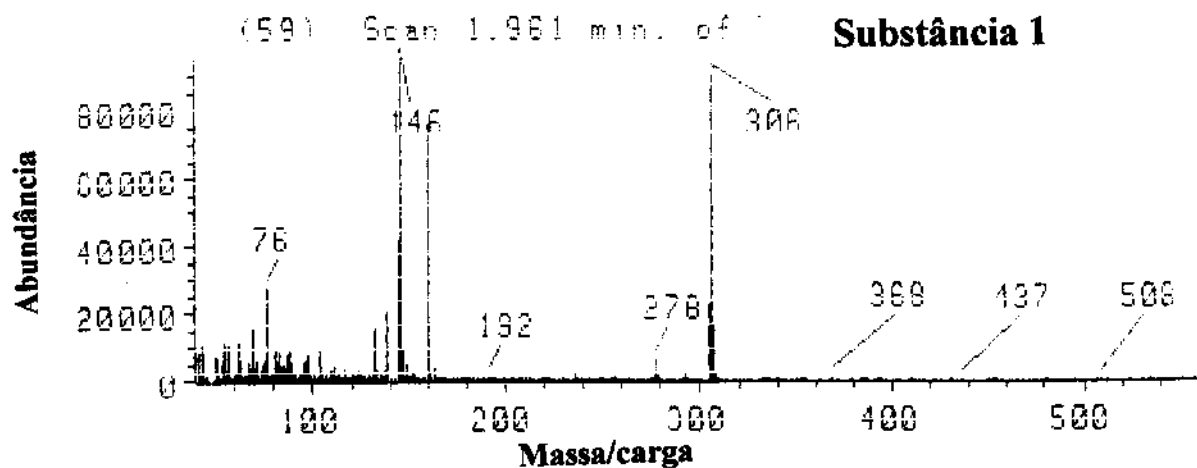
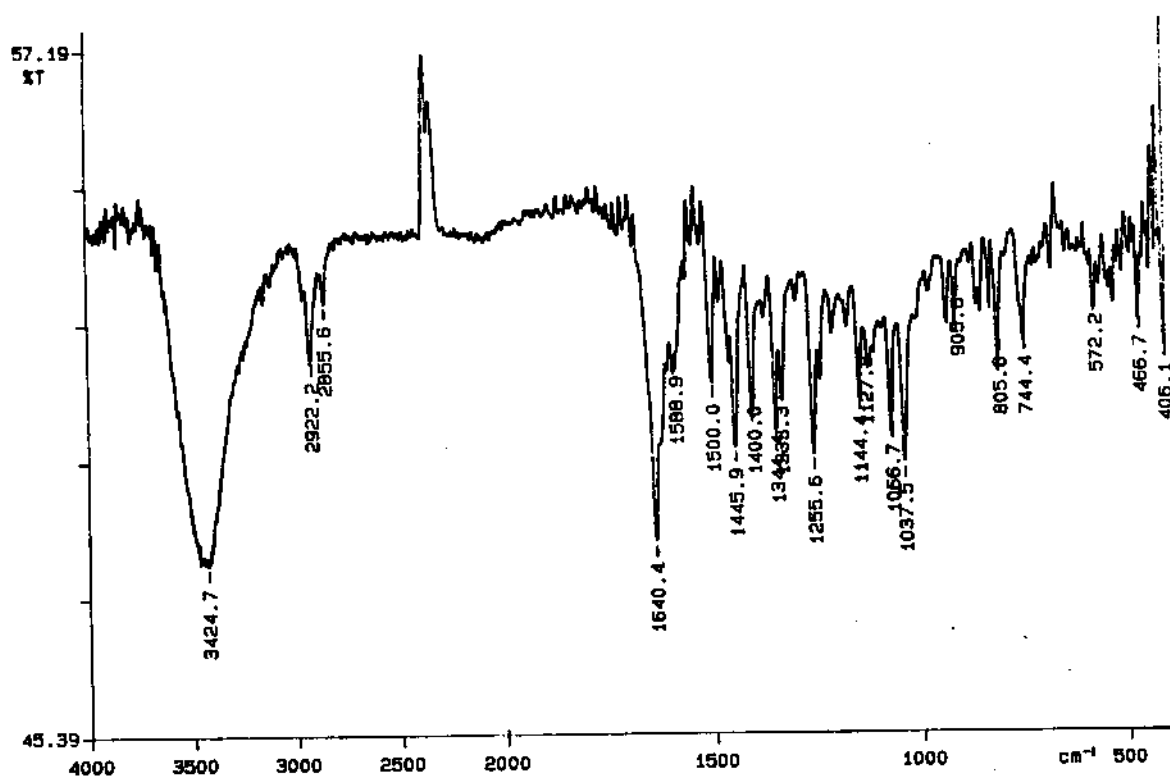


Figura 3. Espectros de massas das substâncias 1 e 8

1



8

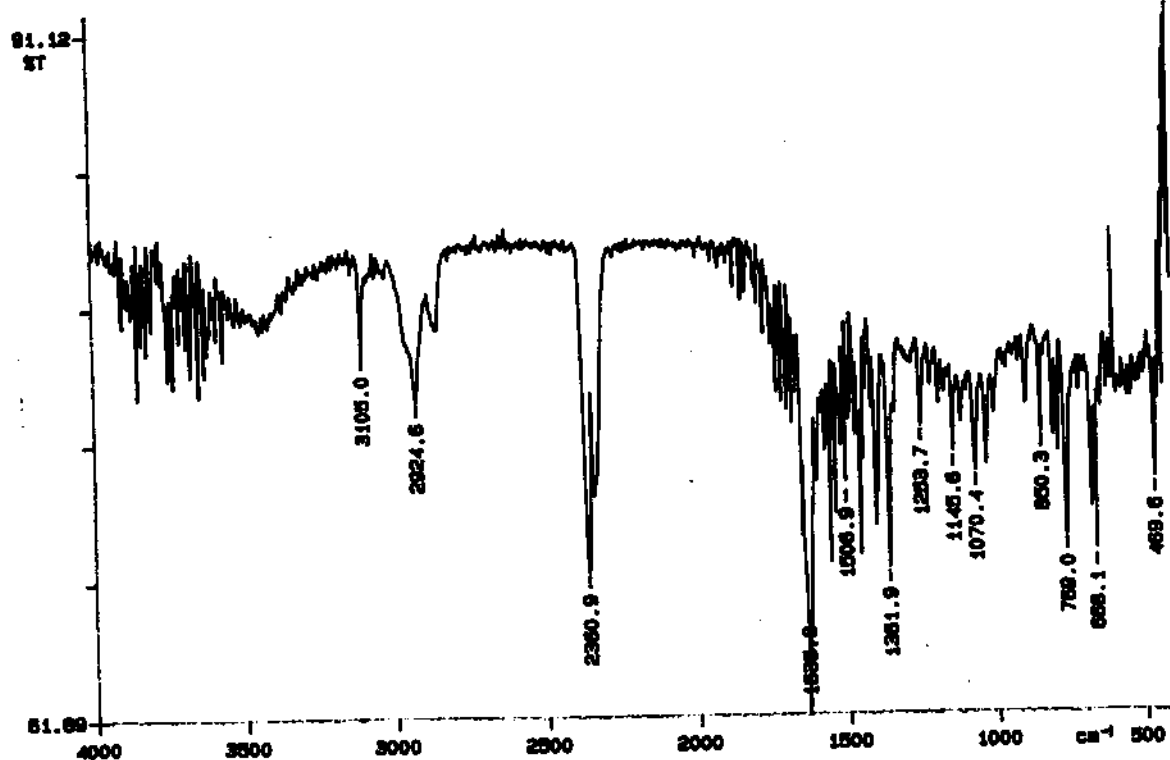


Figura 5. Espectros de IV das substâncias 1 e 8

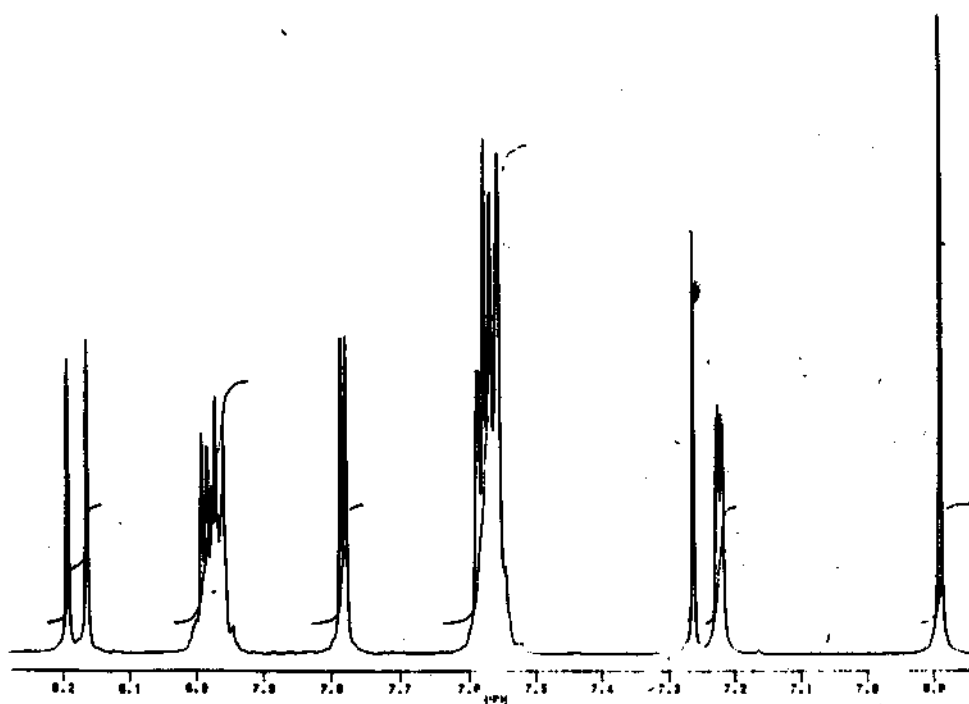
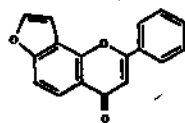


Figura 7. Espectro de RMN ^1H da substância 8

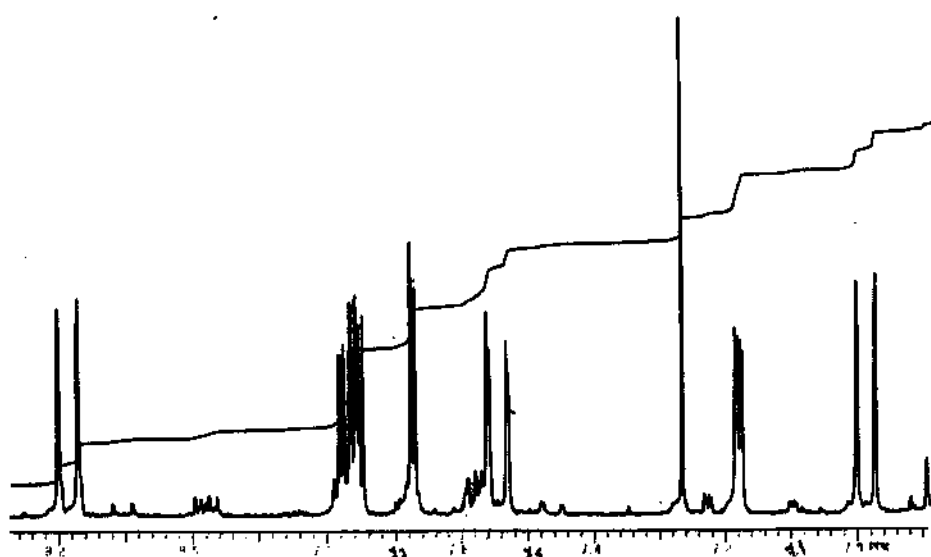
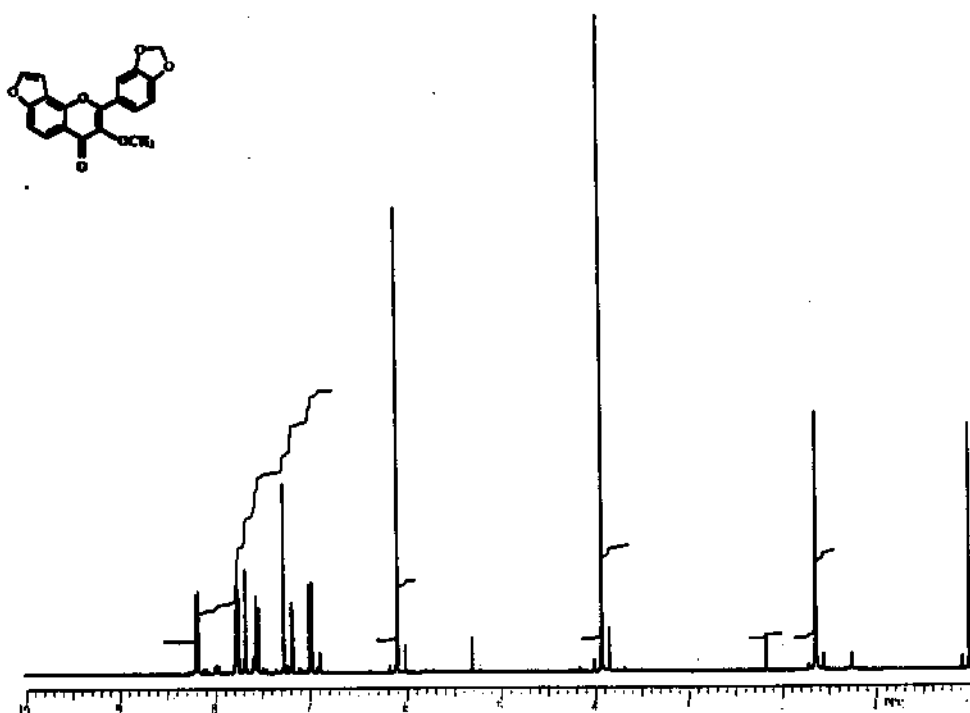


Figura 9. Espectro de RMN ^1H da substância 2

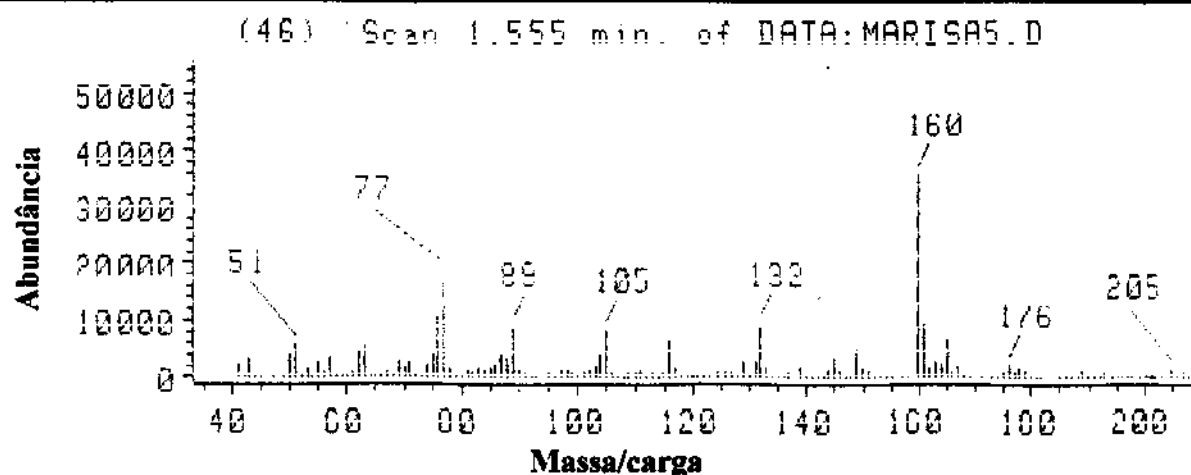
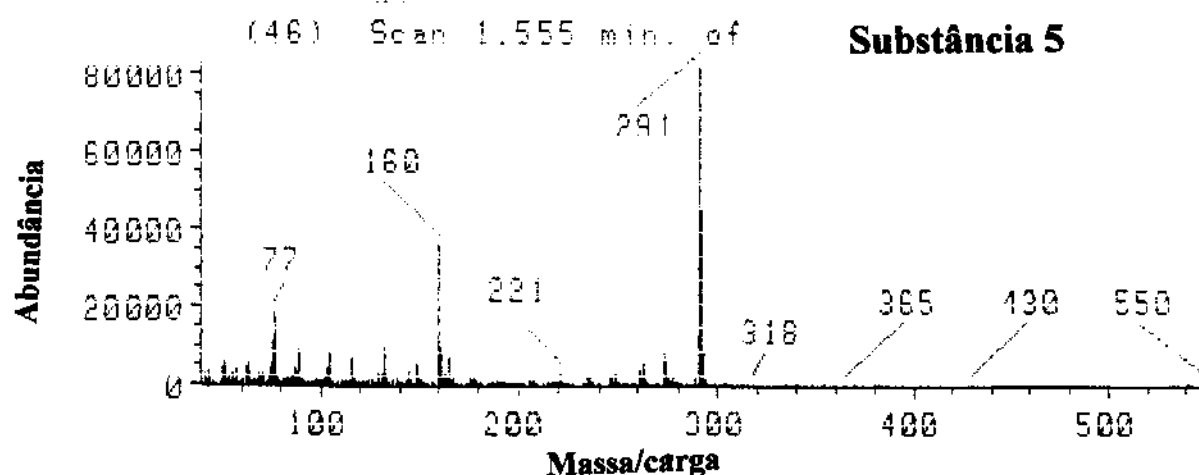
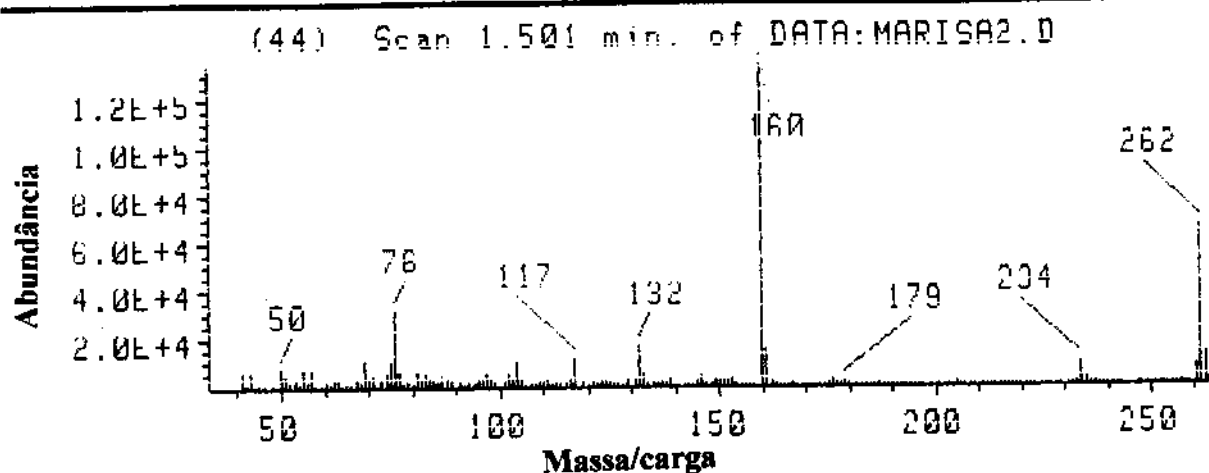
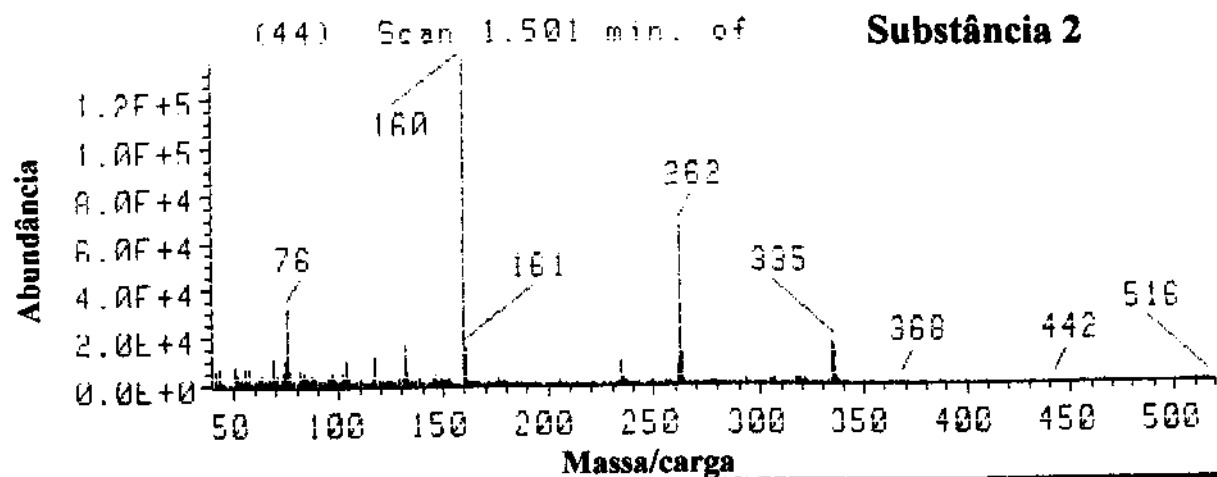


Figura 10. Espectros de massas da substância 2 e 5

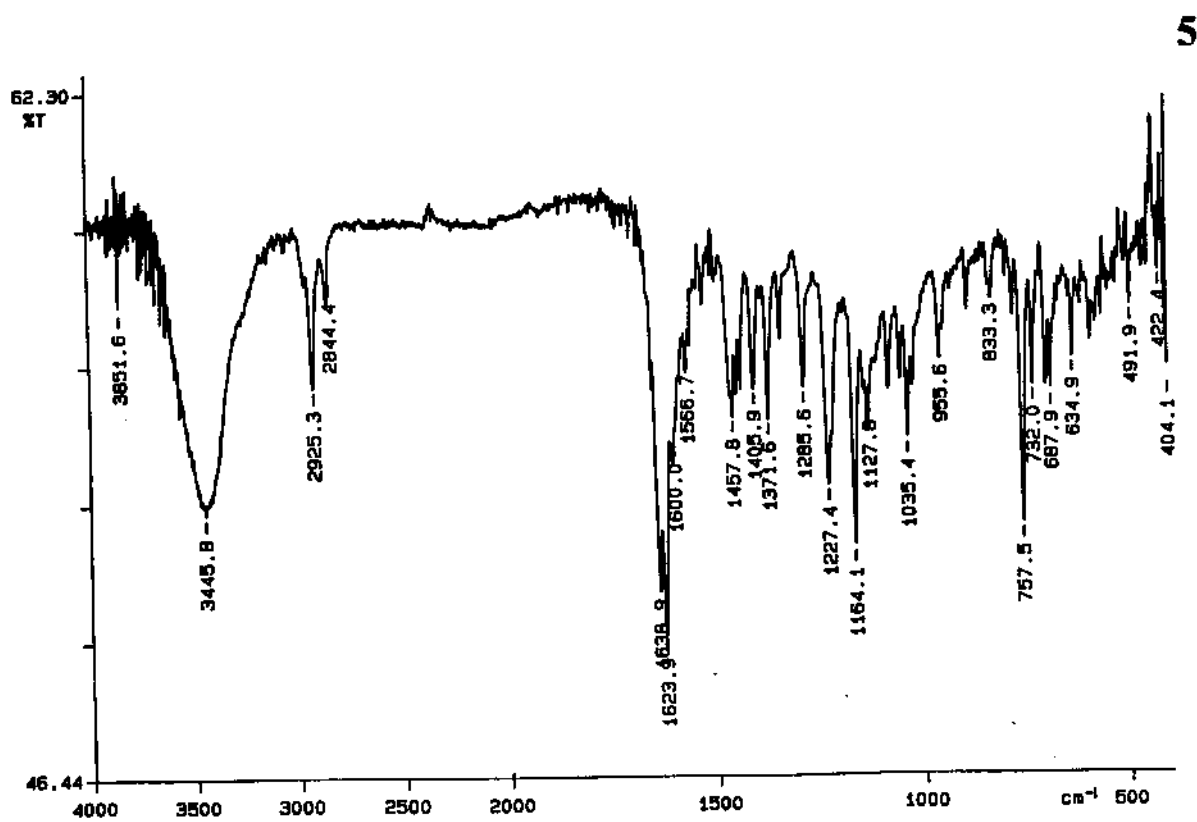
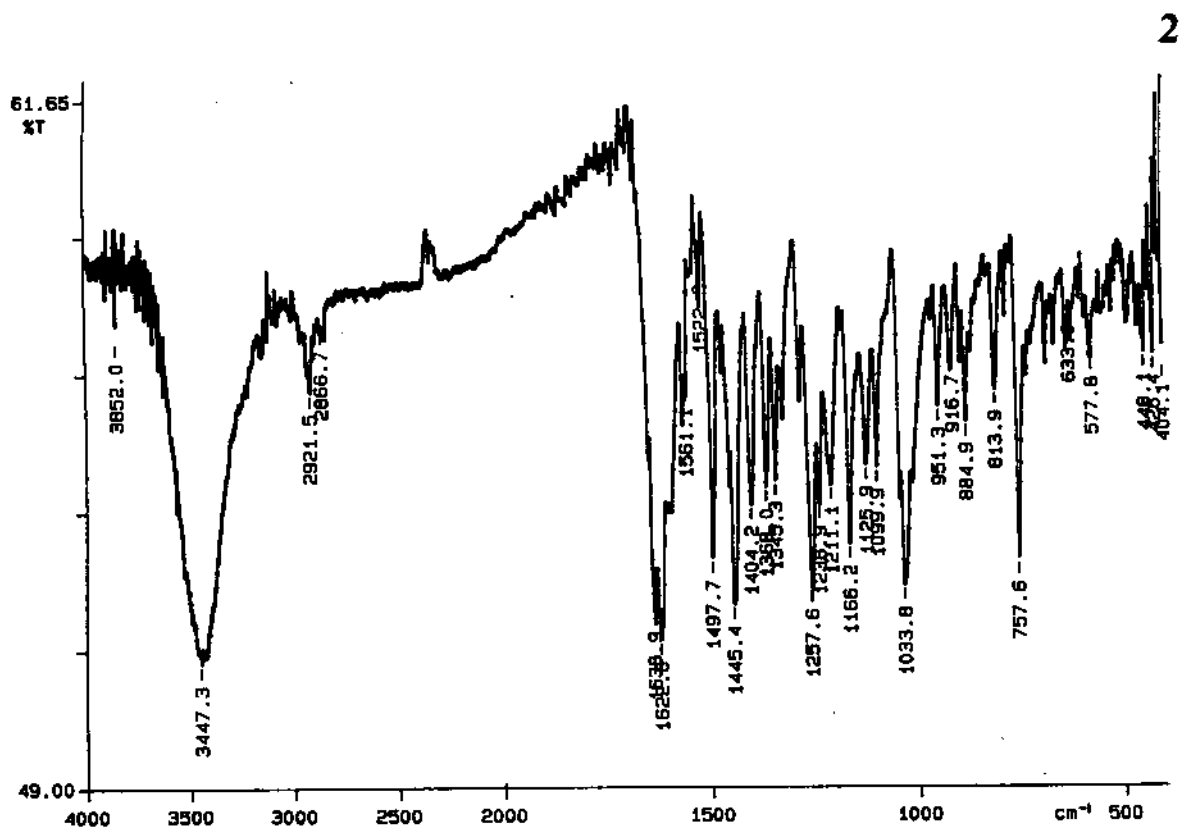


Figura 12. Espectros de IV das substâncias 2 e 5

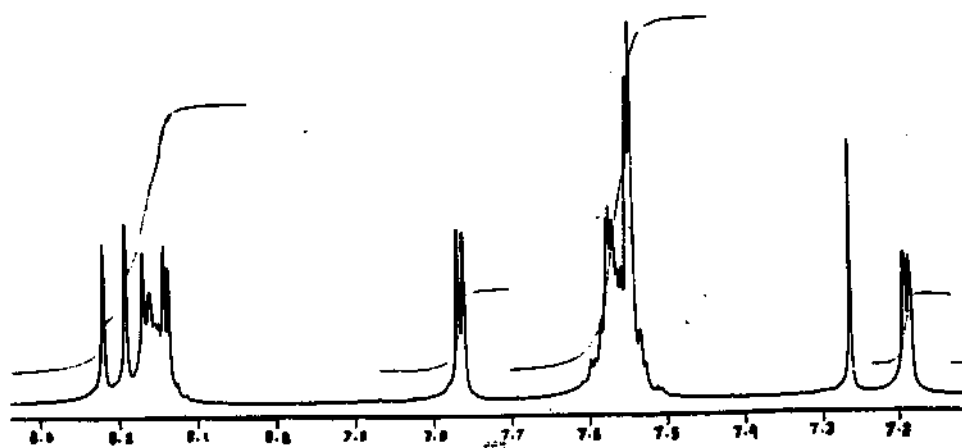
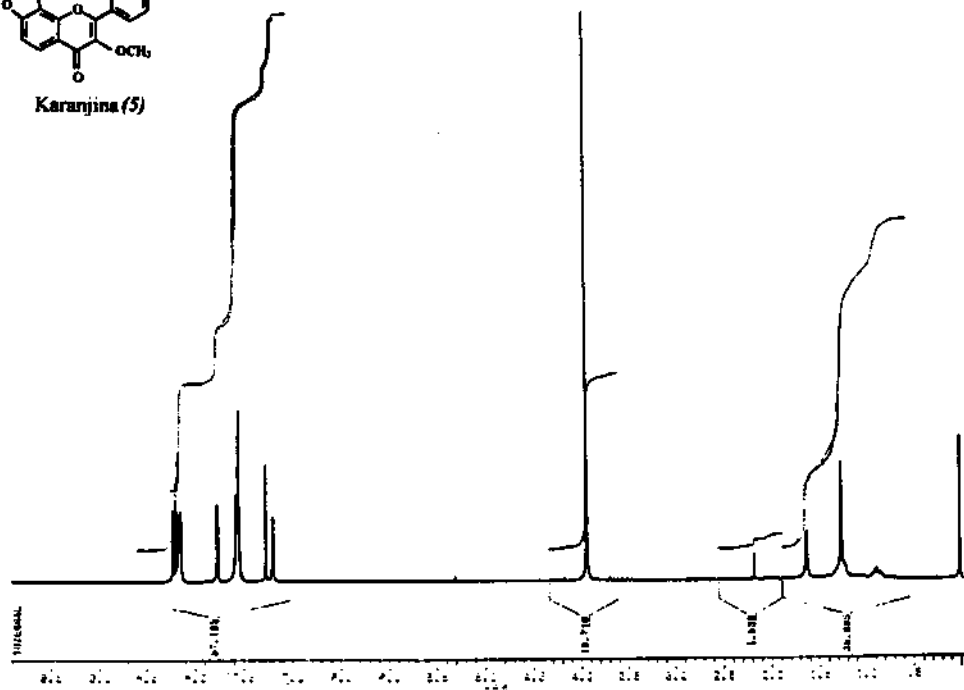


Figura 14. Espectro de RMN ^1H da substância 5

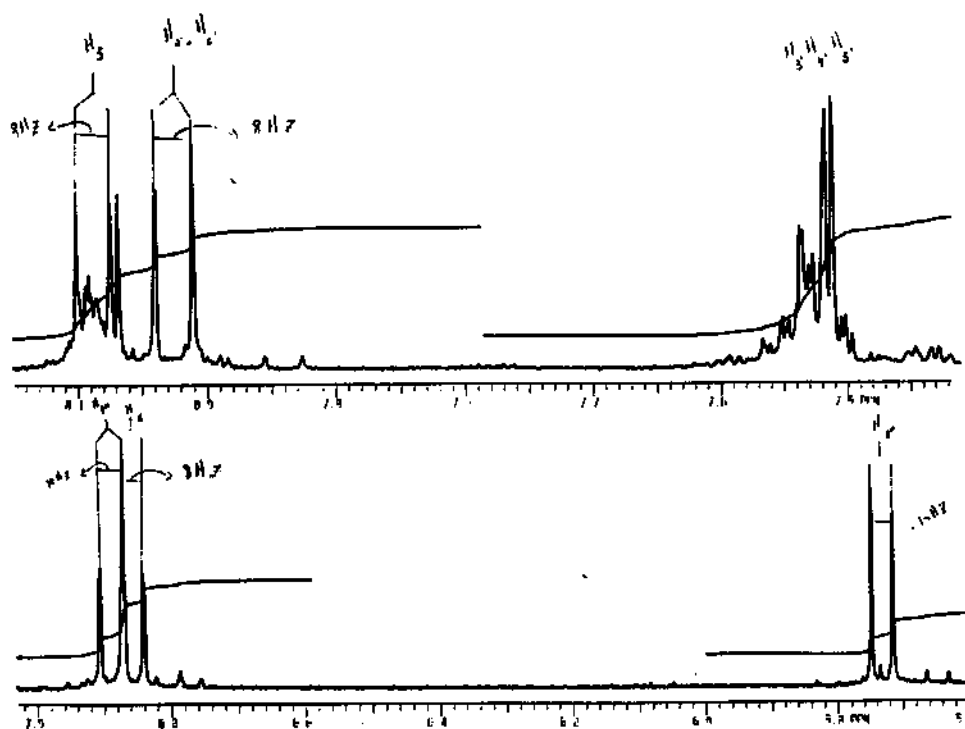
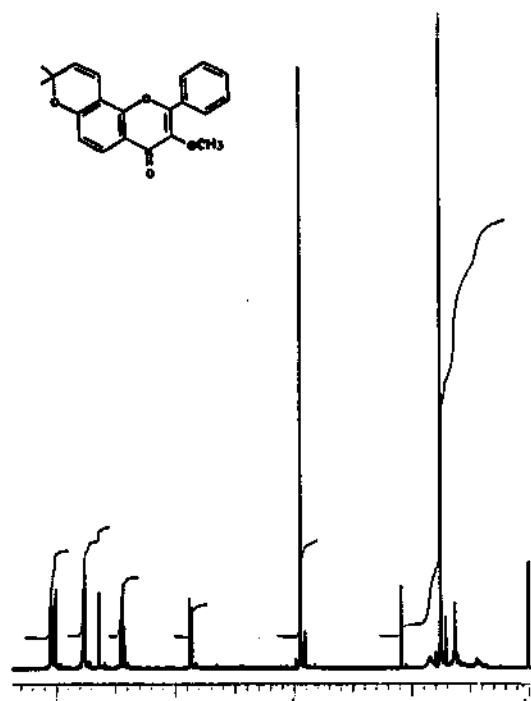


Figura 16. Espectro de RMN ¹H da substância 4

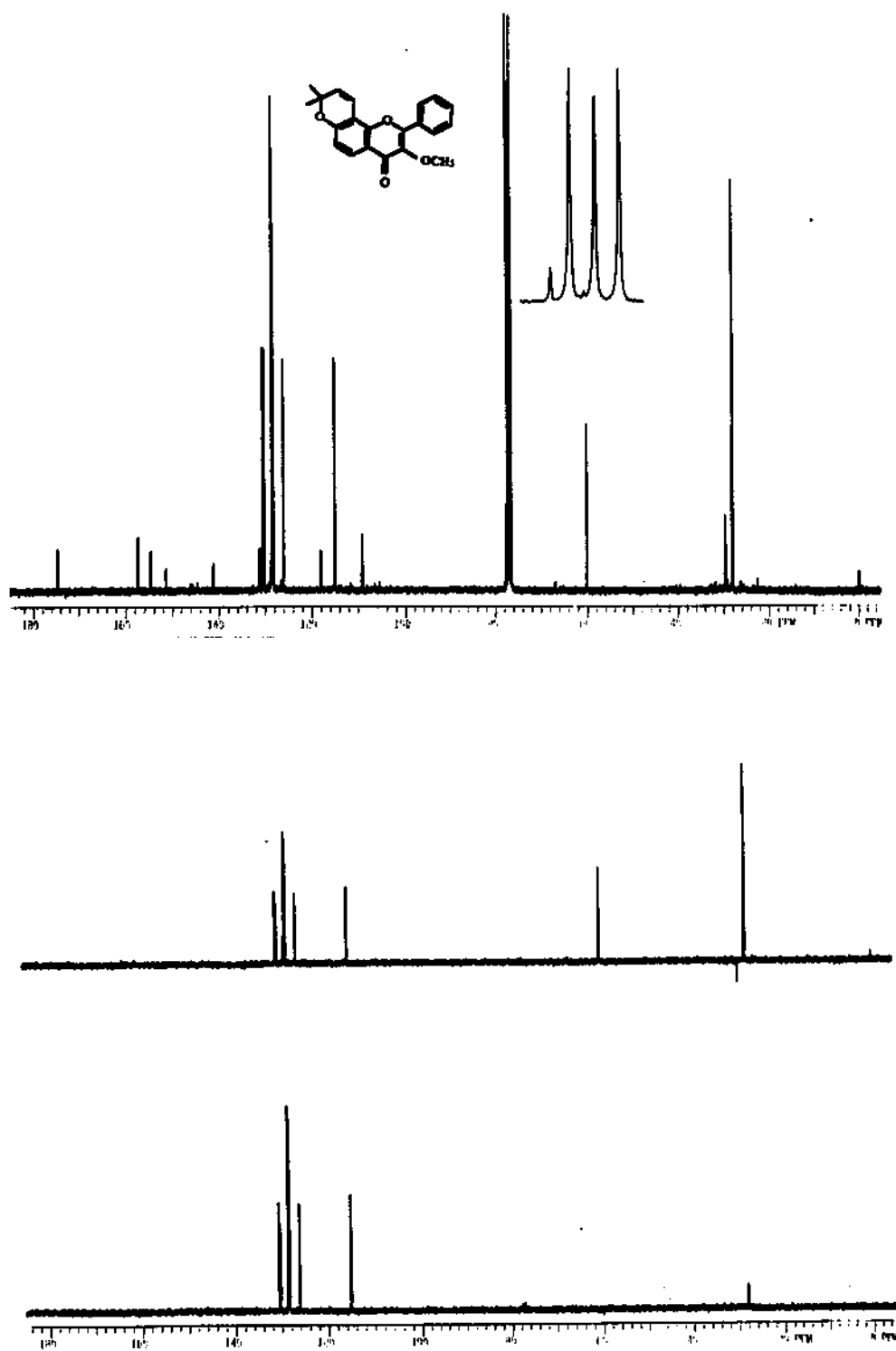


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT da substância 4

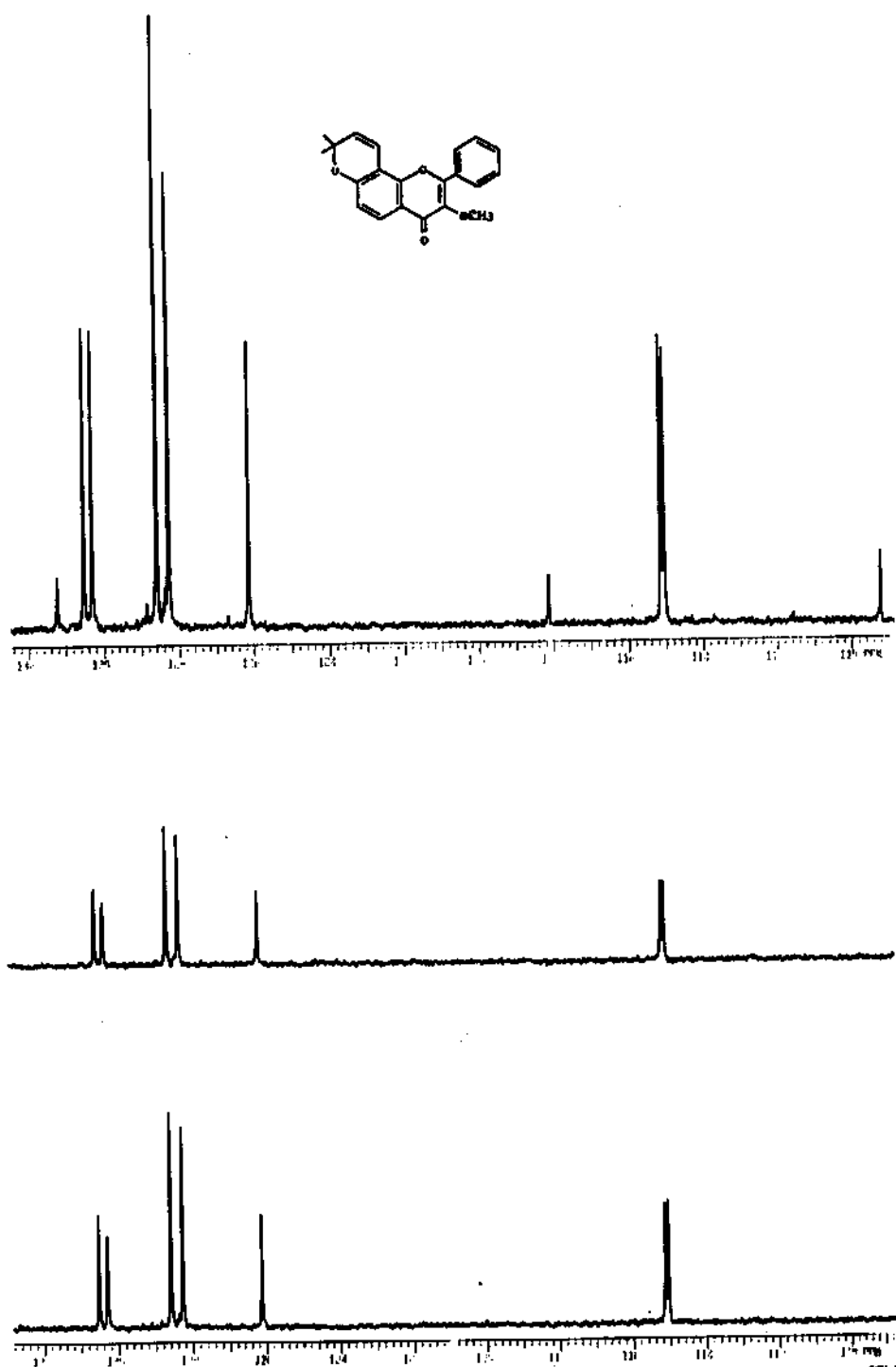


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT da substância 4, expansão

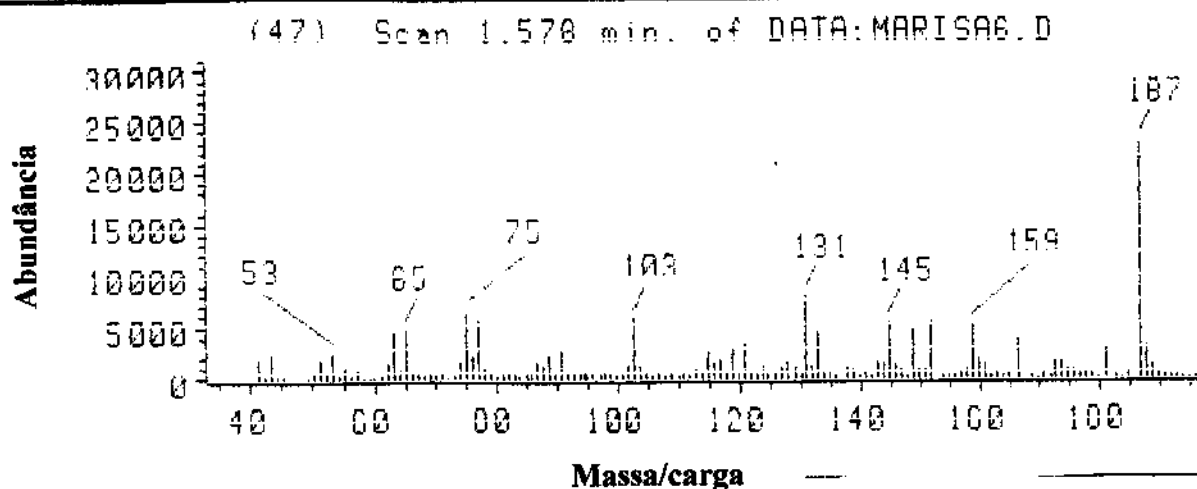
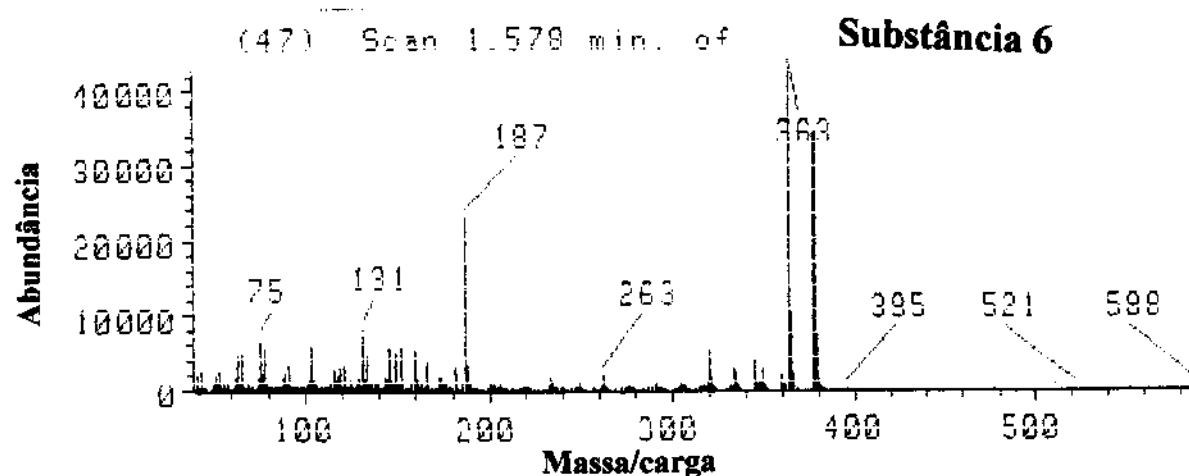
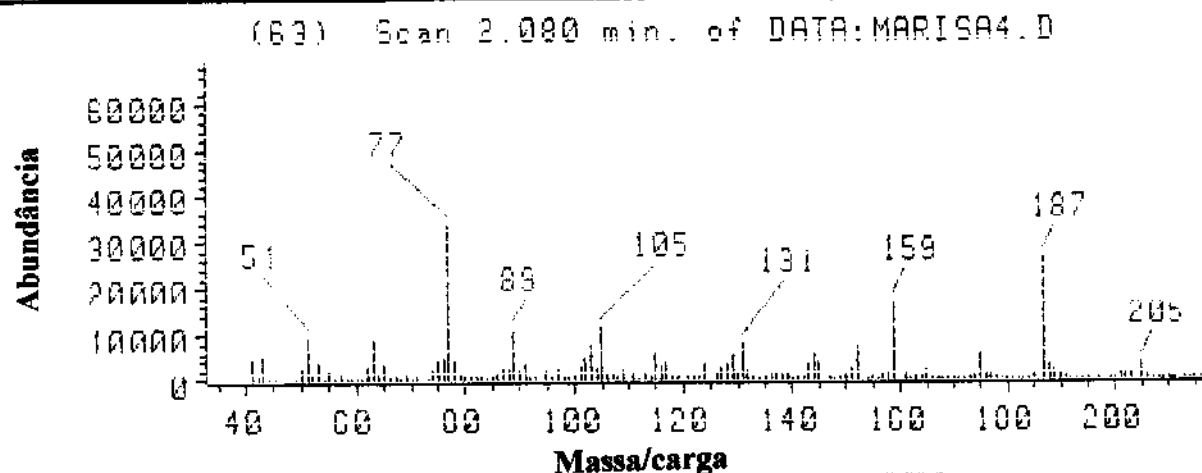
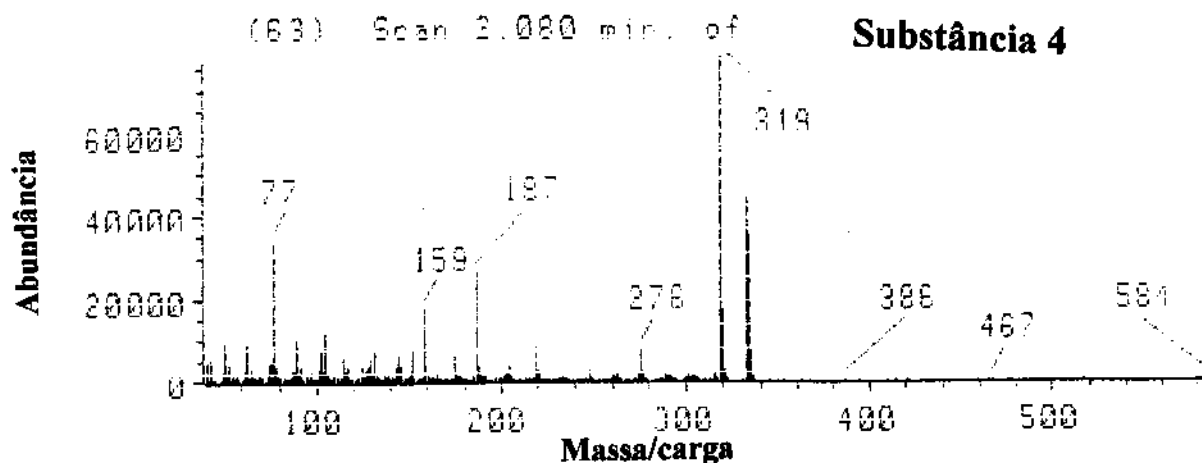


Figura 18. Espectros de massas das substâncias 4 e 6

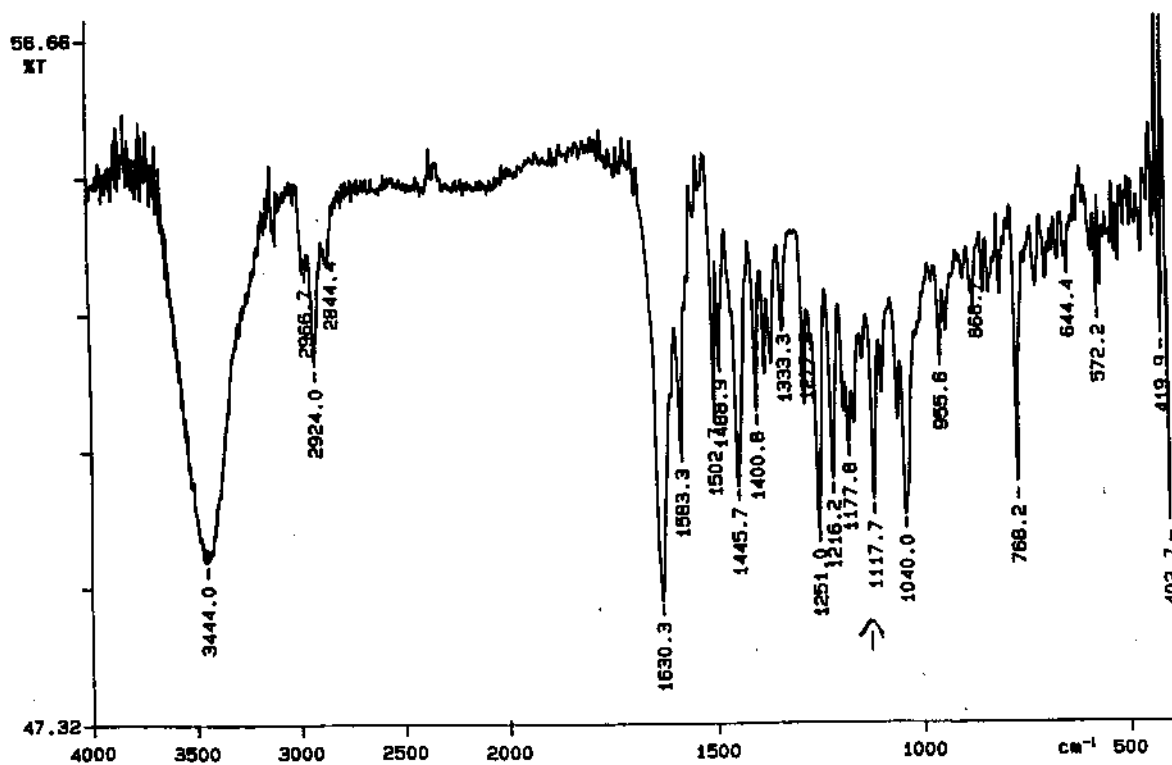
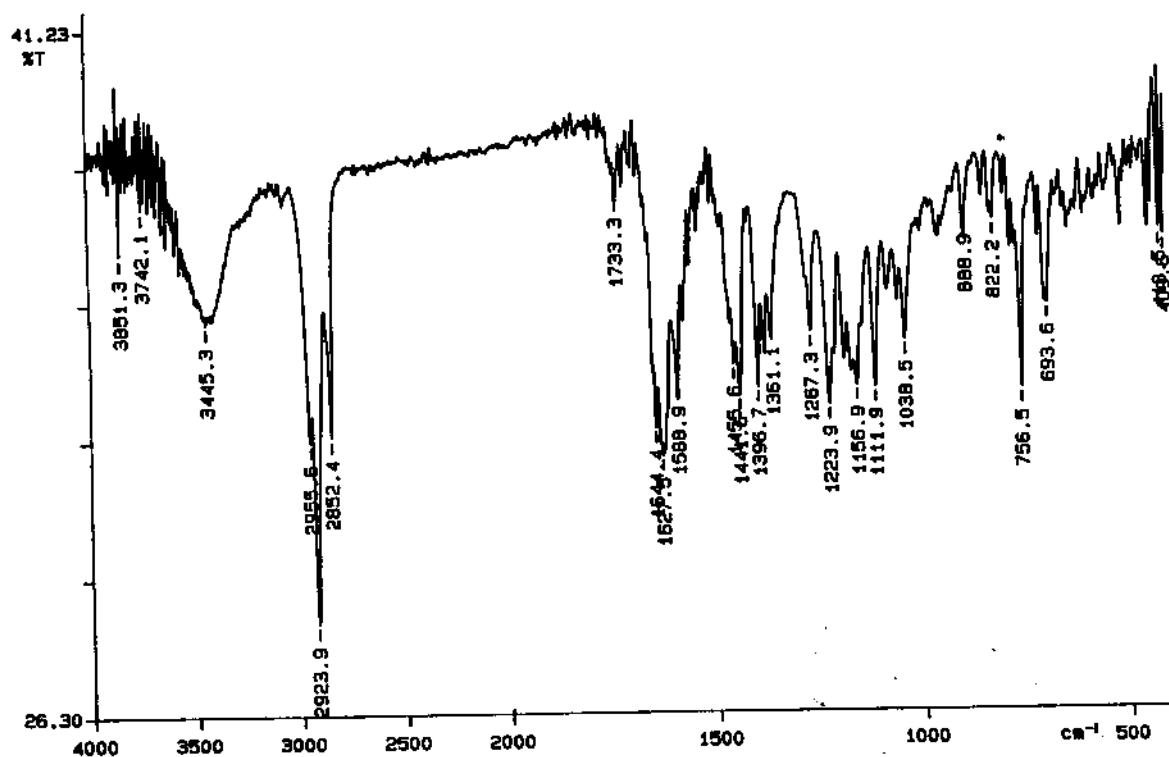


Figura 20. Espectros de IV das substâncias 4 e 6

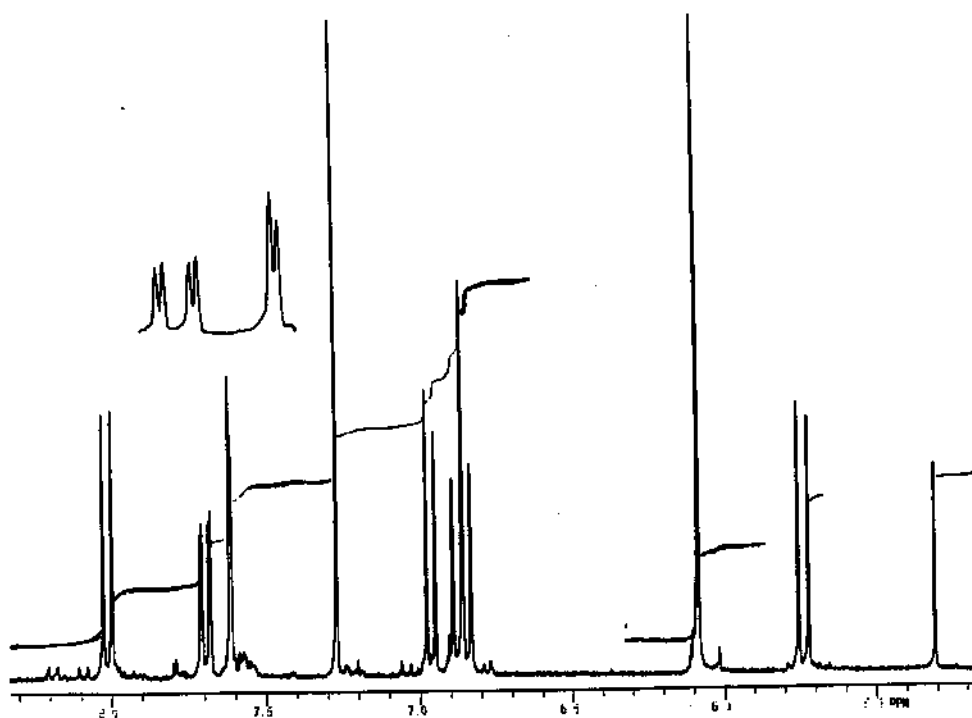
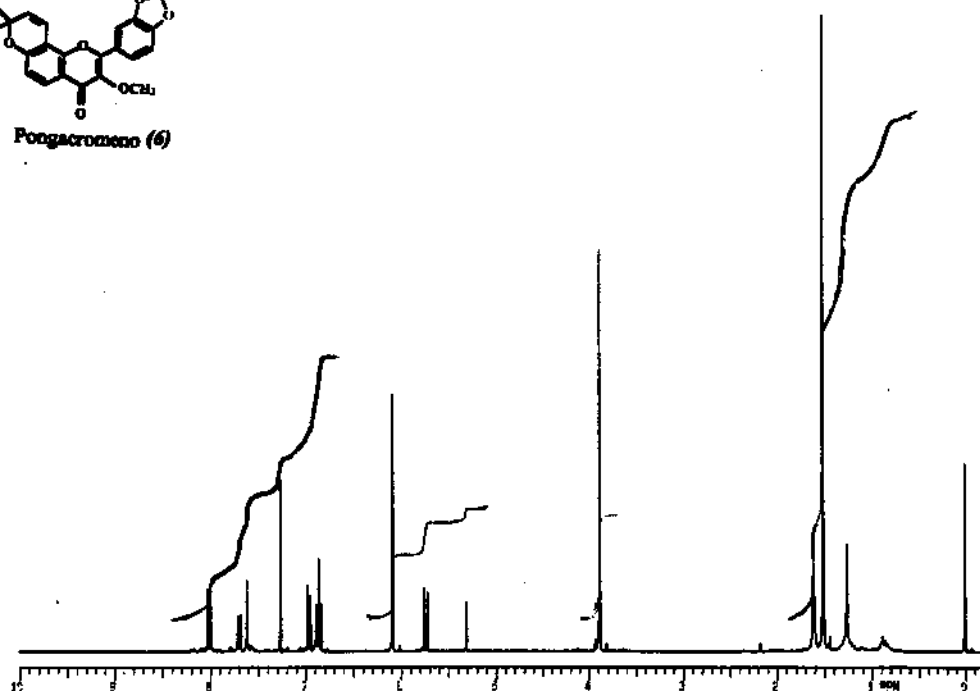
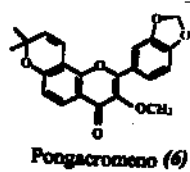


Figura 22. Espectro de RMN ¹H da substância 6

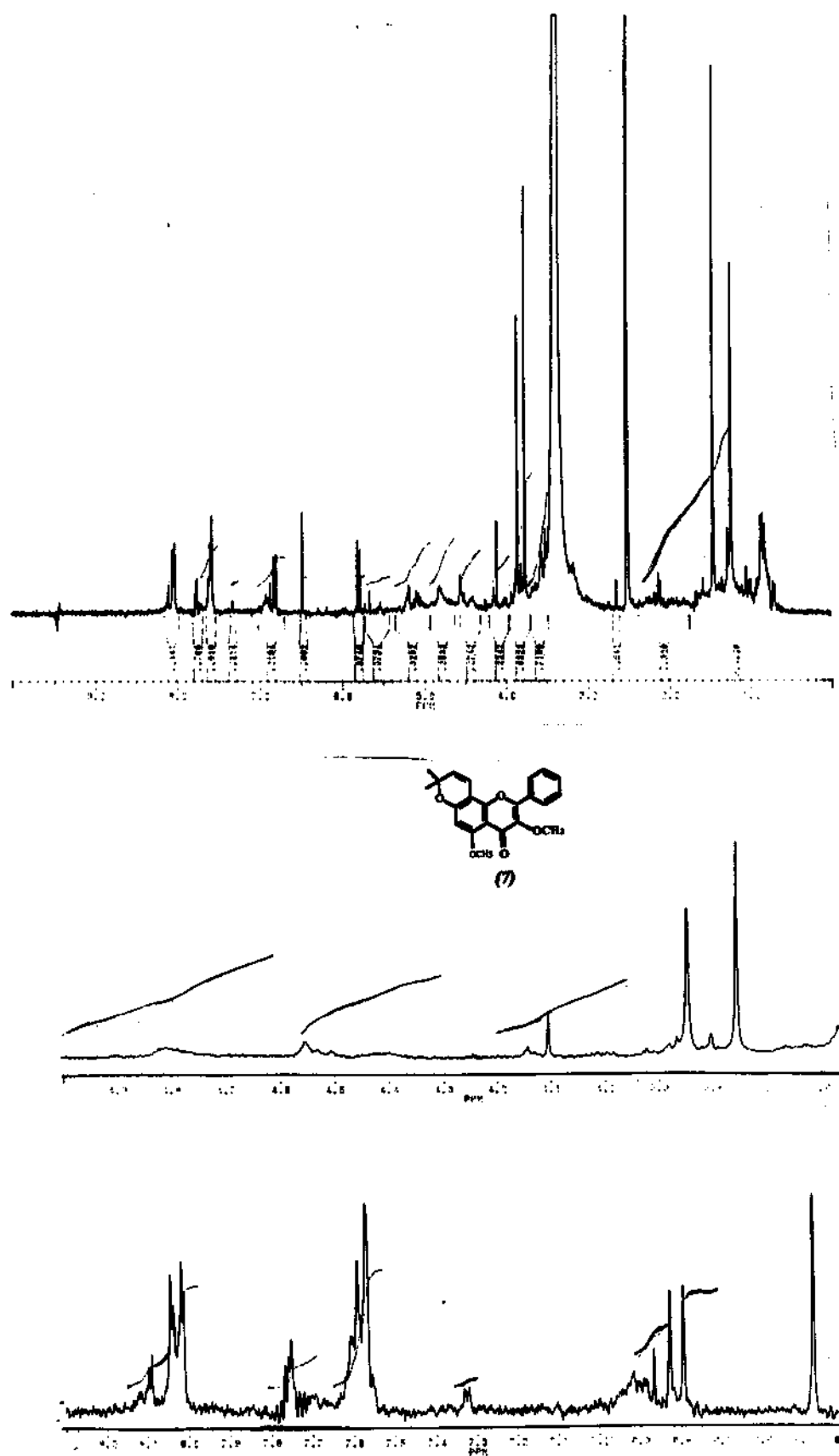


Figura 24. Espectro de RMN ^1H da substância 7

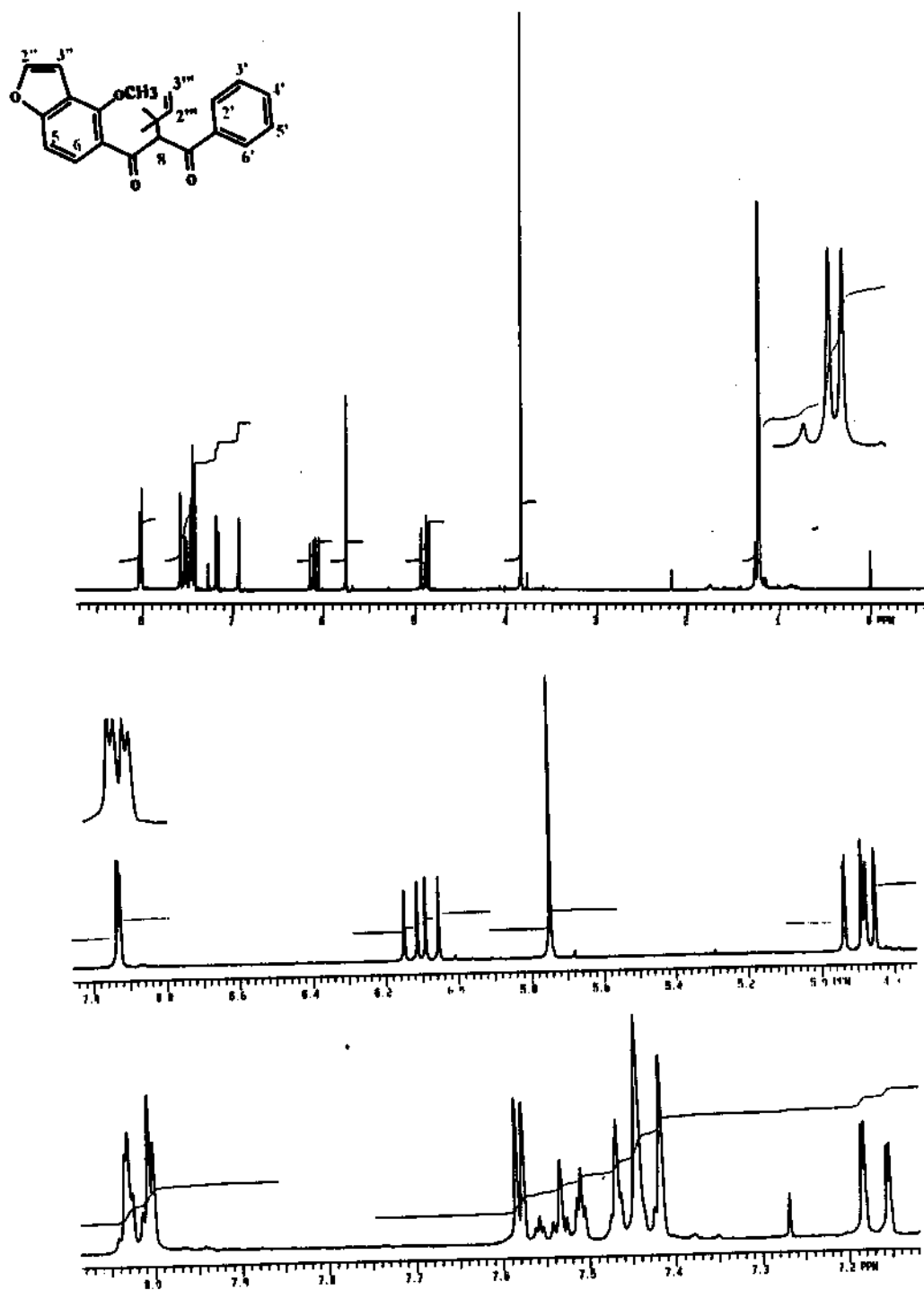


Figura 26. Espectro de RMN ^1H da substância 3

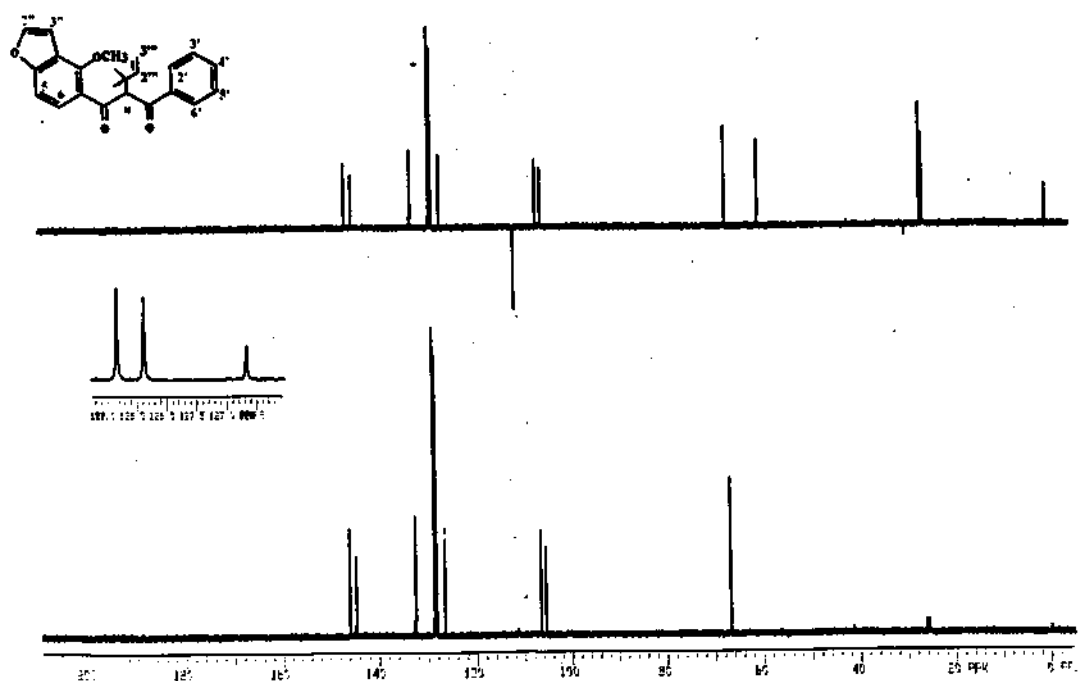
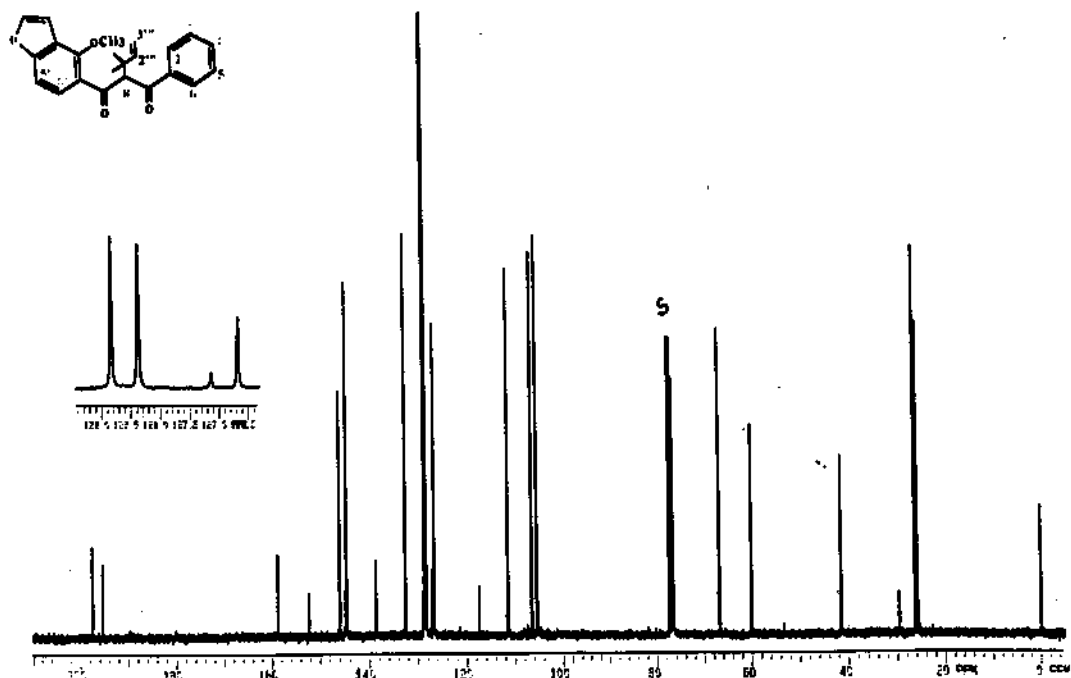


Figura 27. Espectro de RMN ¹³C e DEPT da substância 3

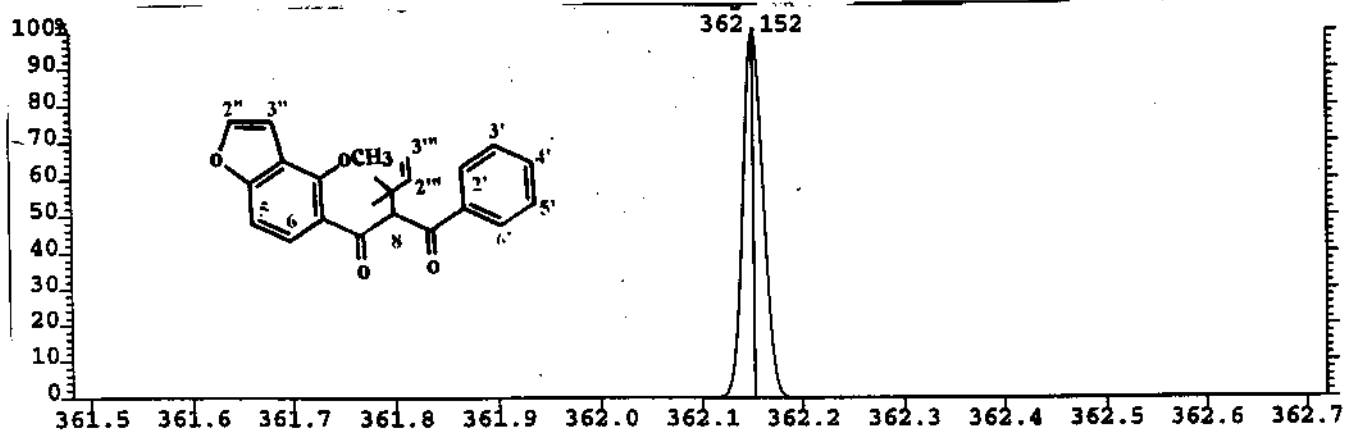
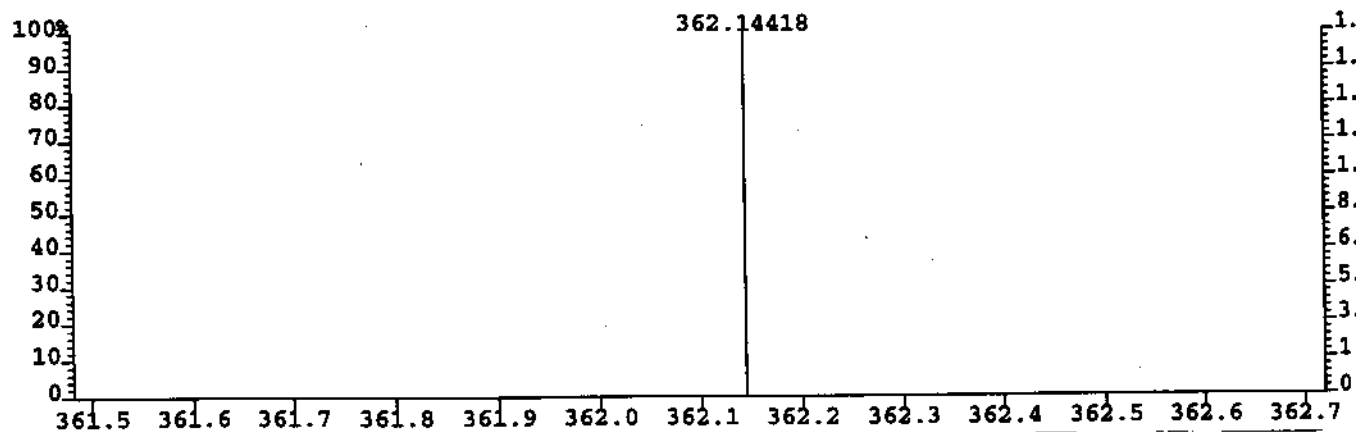
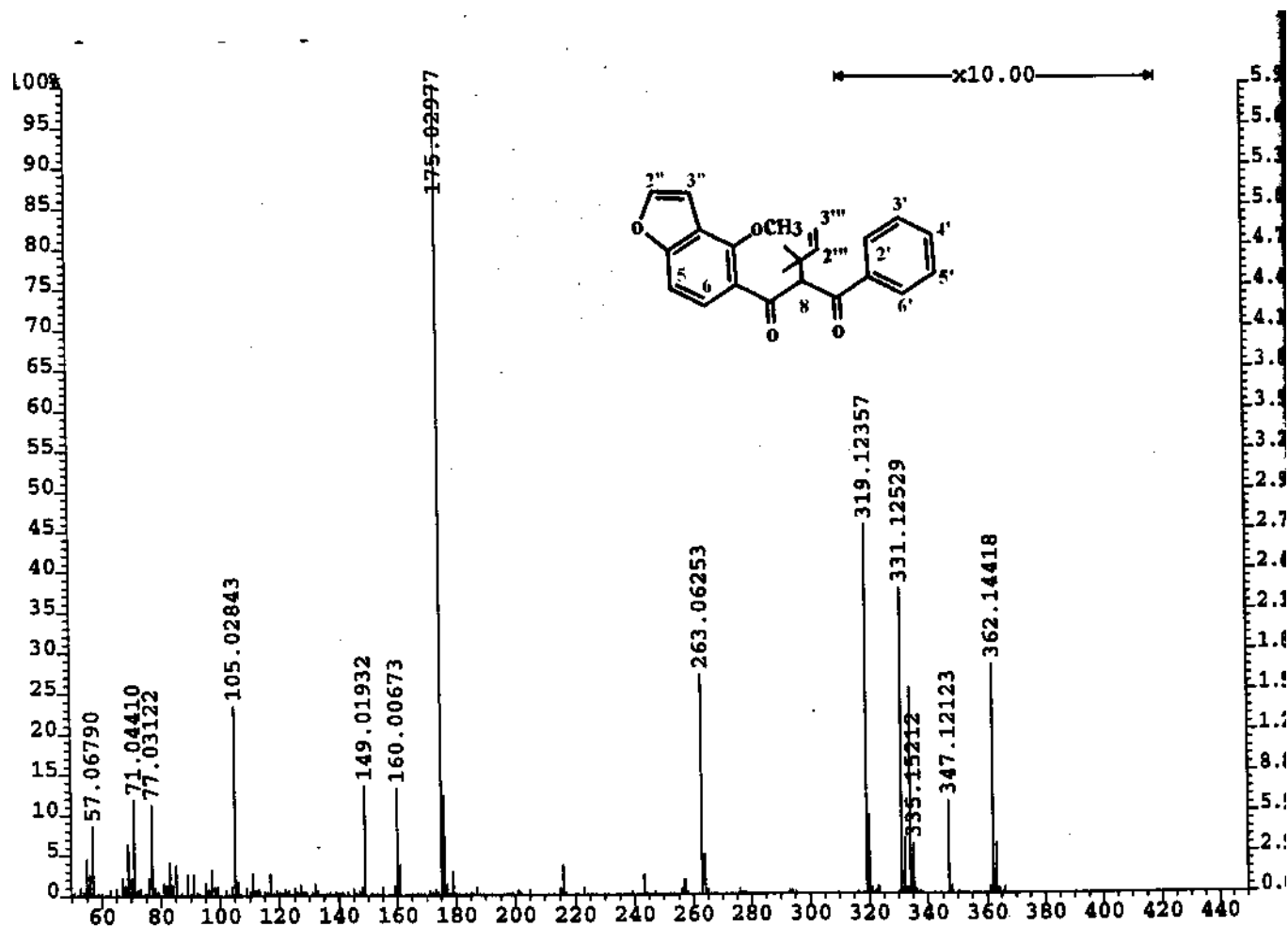


Figura 28. Espectros de massas alta resolução da substância 3

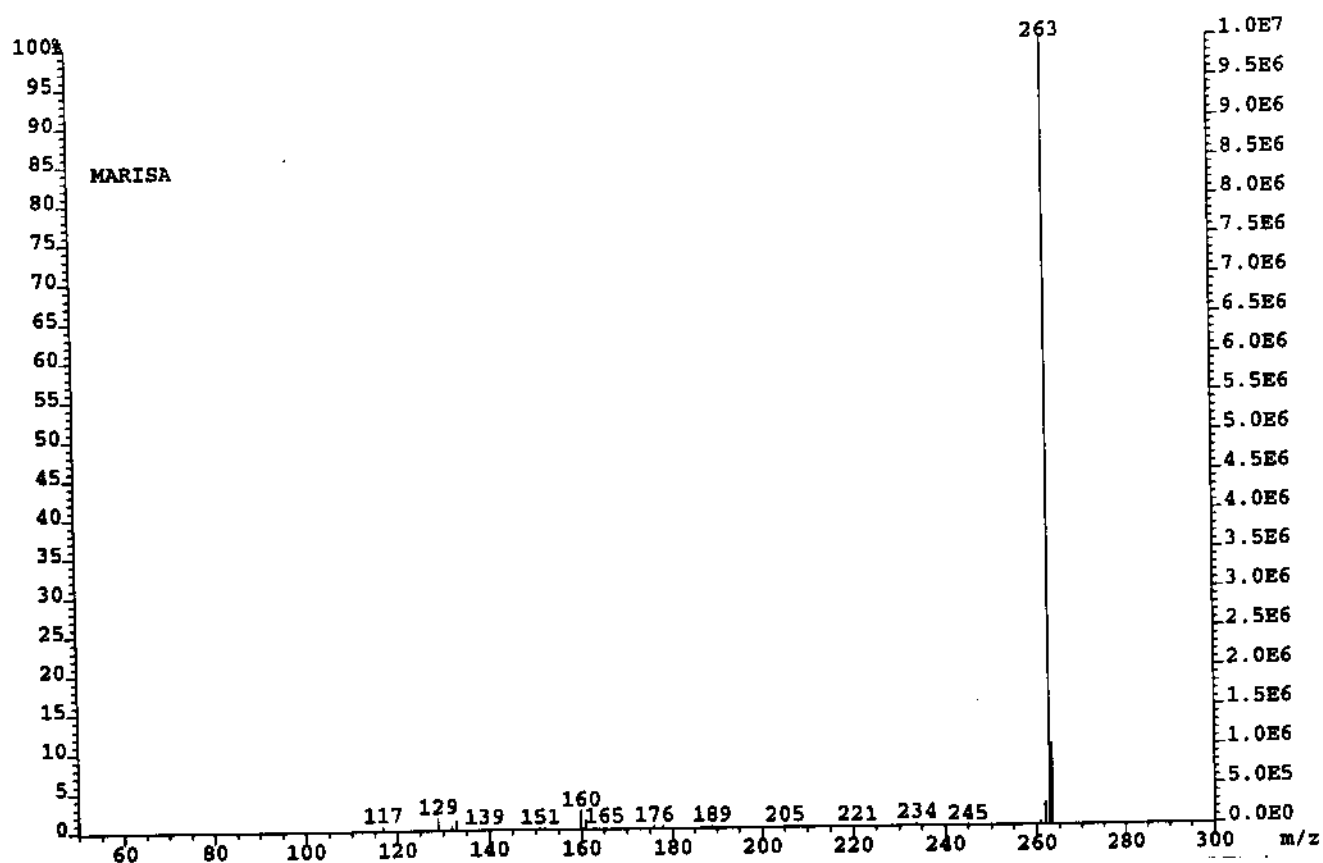


Figura 28 A. Espectro de massas de massas do fragmento m/z 263 da substância 3

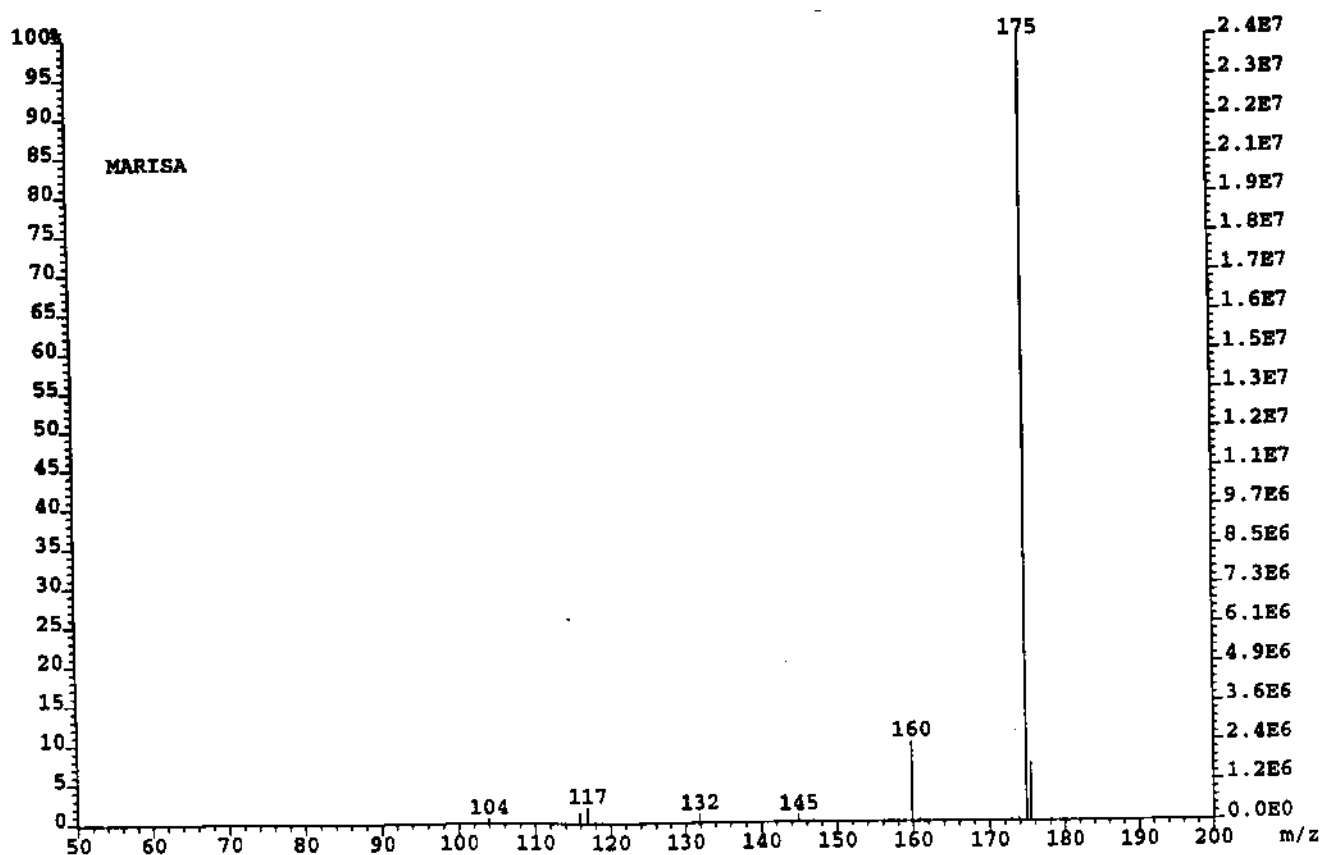


Figura 28 B. Espectro de massas de massas do fragmento m/z 175 da substância 3

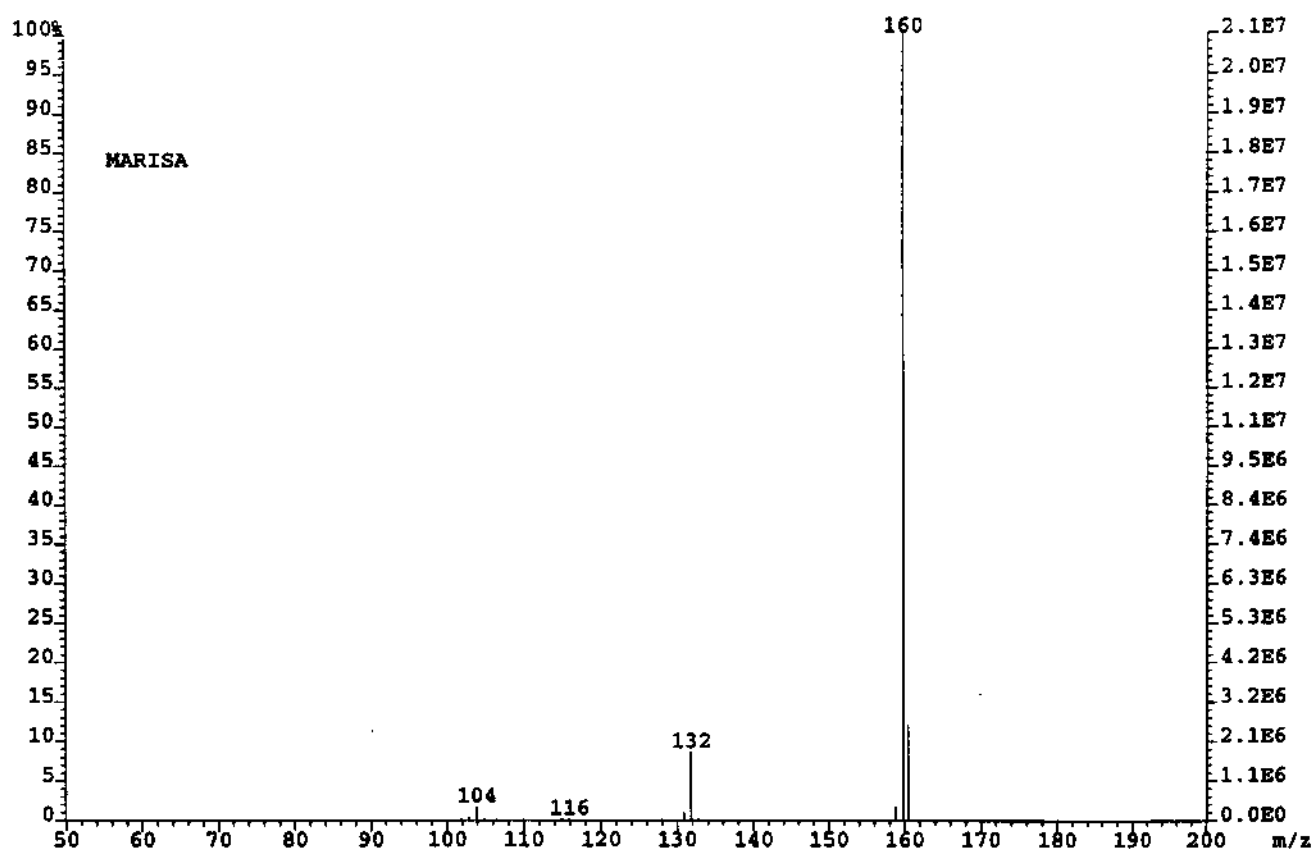


Figura 28 C. Espectro de massas de massas do fragmento m/z 160 da substância 3

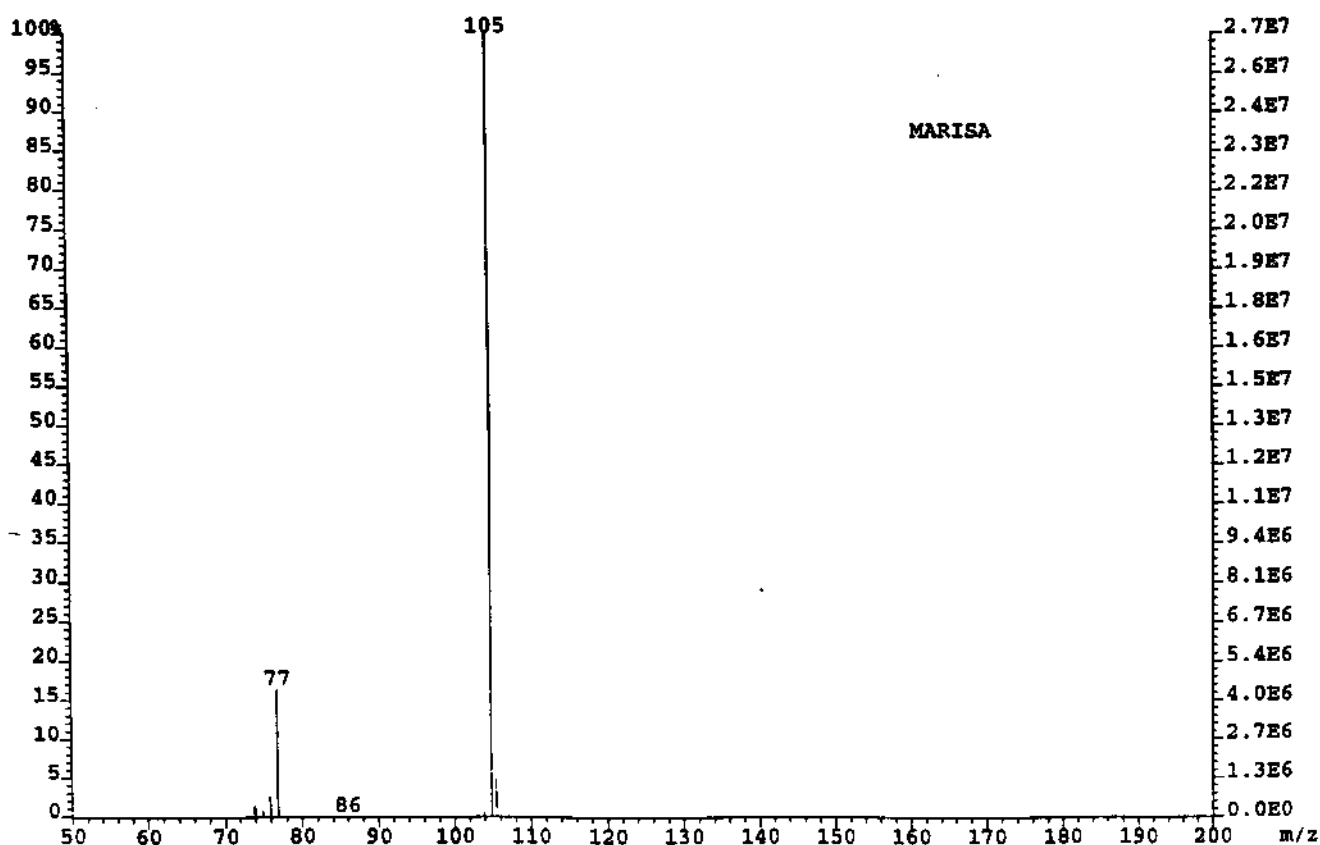


Figura 28 D. Espectro de massas de massas do fragmento m/z 105 da substância 3

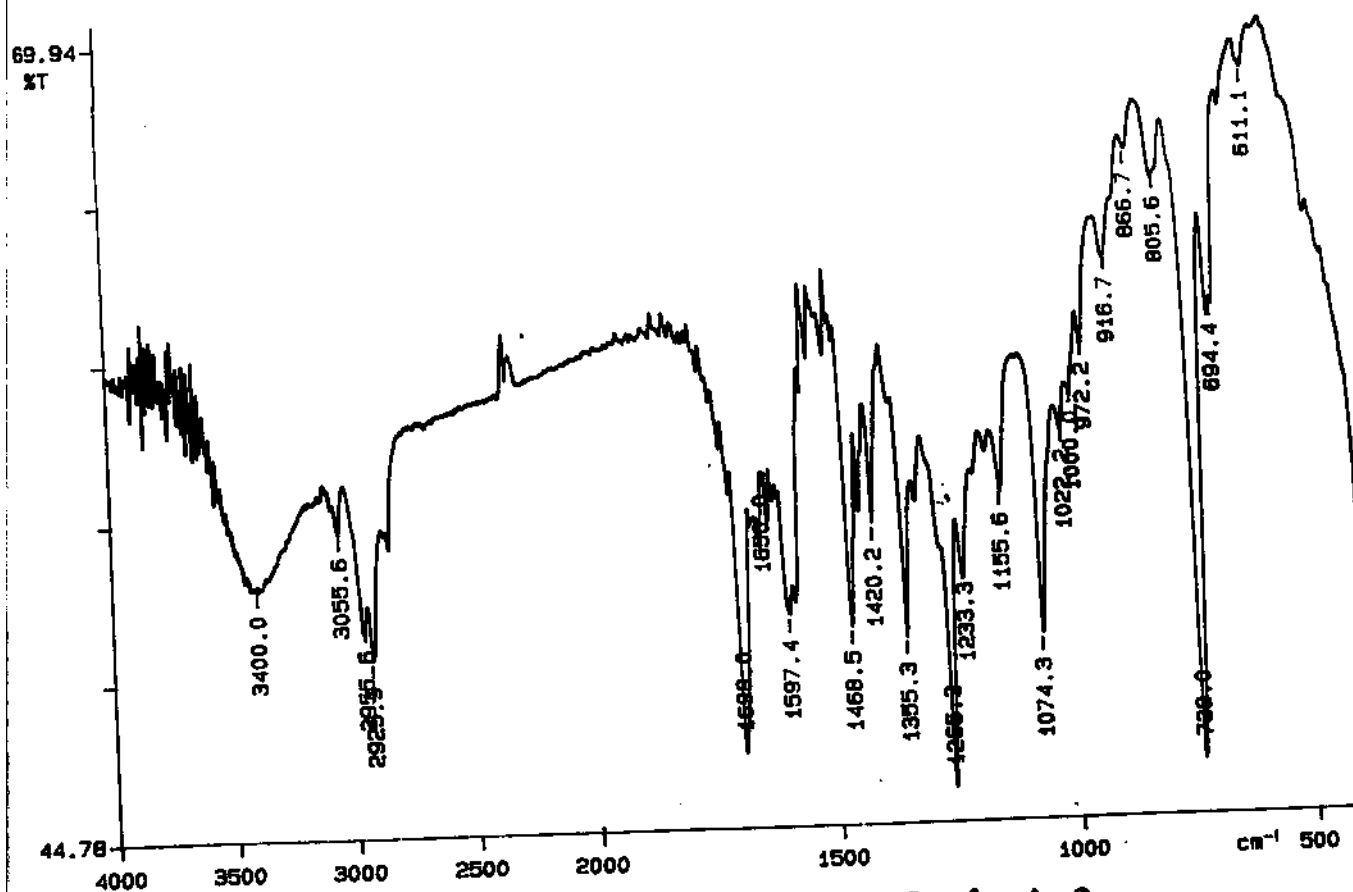


Figura 28 E. Espectro de IV da substância 3

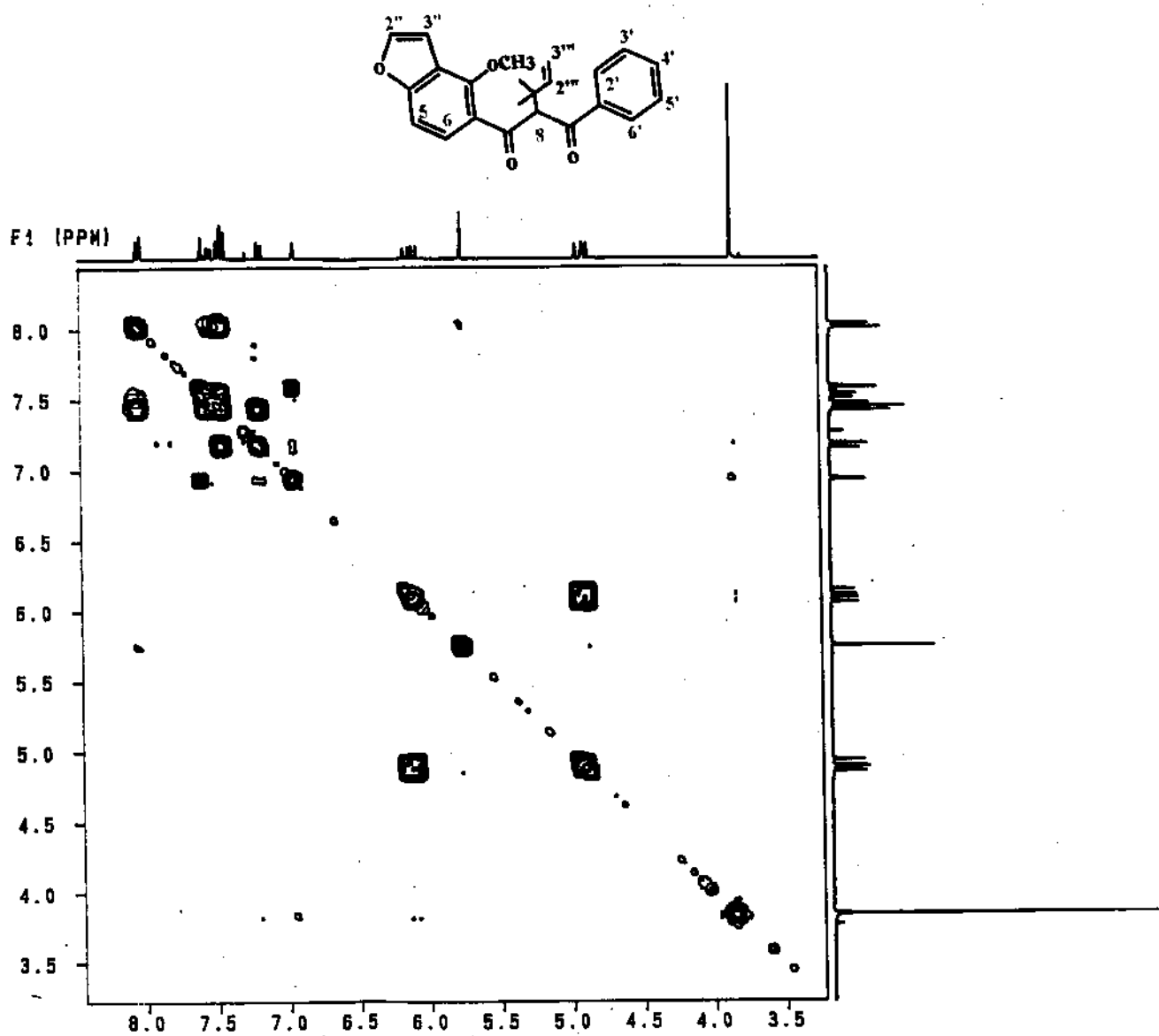


Figura 31. Espectro bidimensional de COSY das substância 3

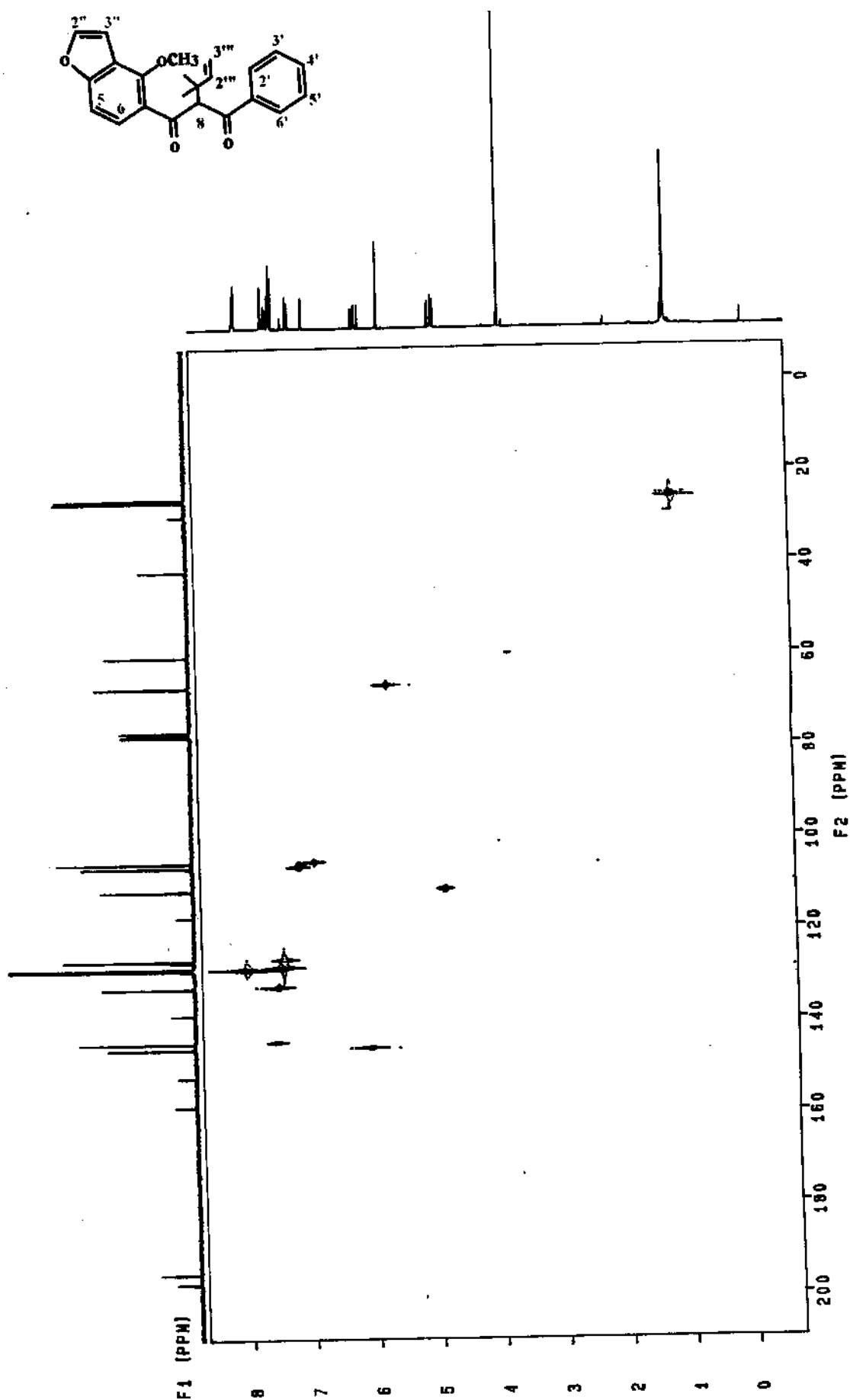


Figura 32. Espectro bidimensional de HETCOR da substância 3

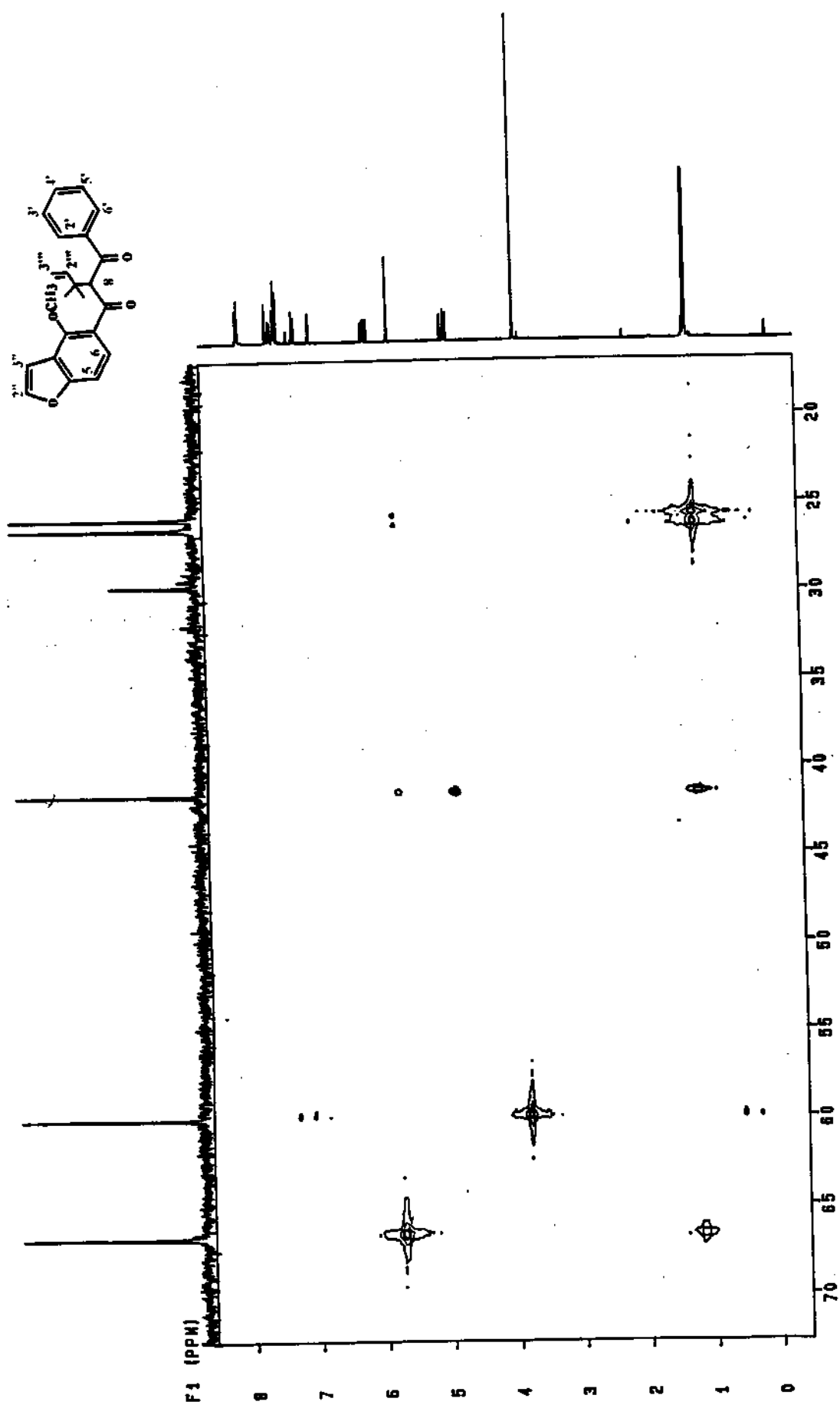


Figura 33. Espectro bidimensional de COLOC da substância 3

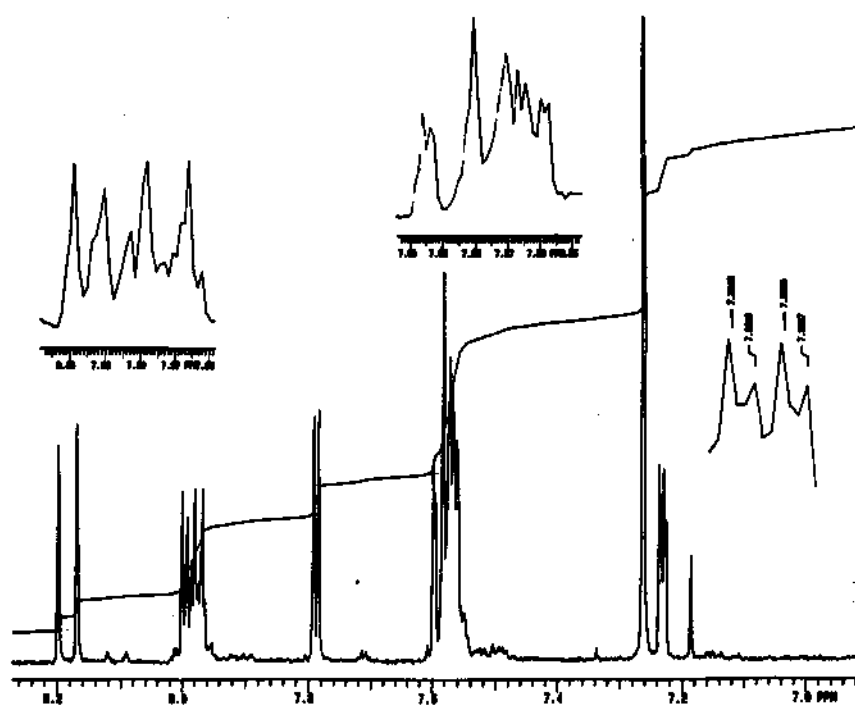
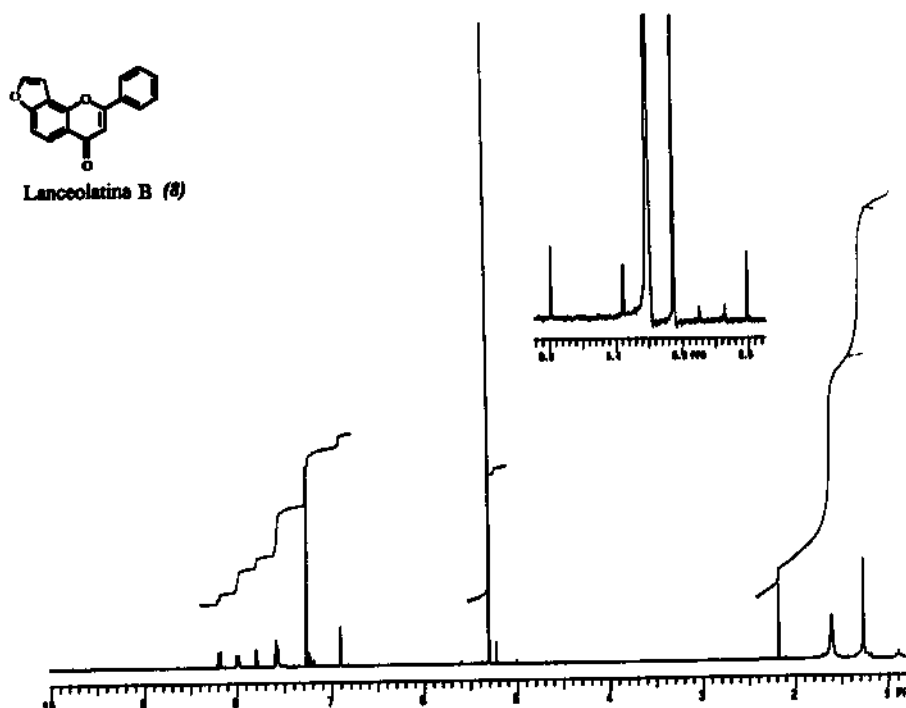


Figura 35. Espectro de RMN ^1H da laceolatina B (produto da reação em meio ácido)

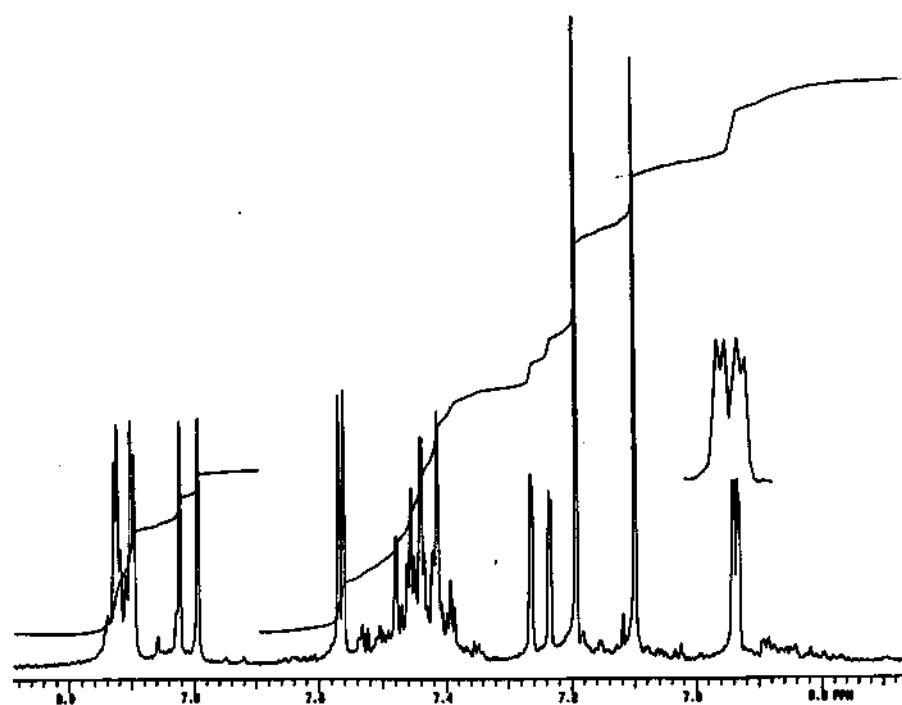
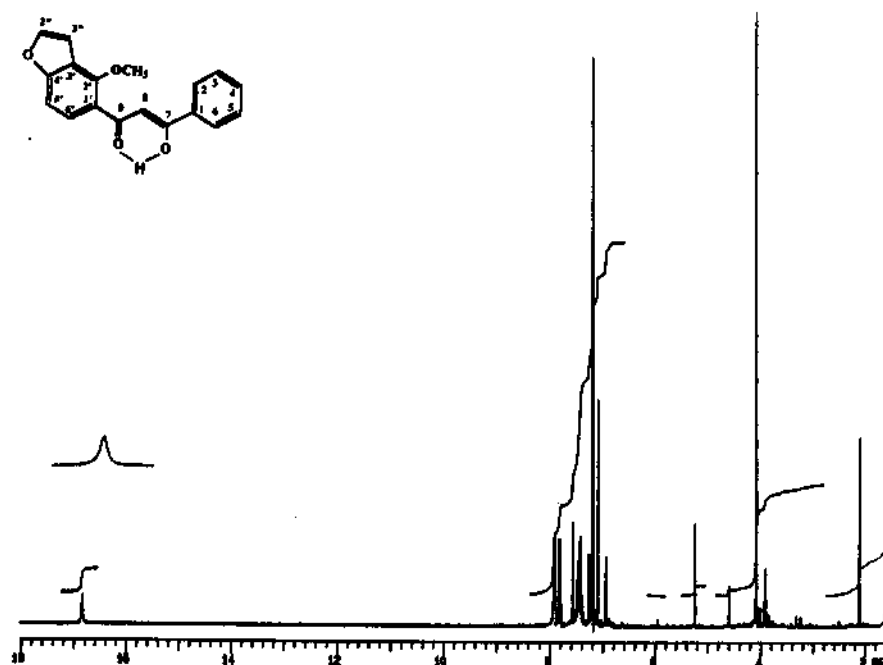


Figura 36. Espectro de RMN ^1H do pongamol (produto da reação em meio ácido)

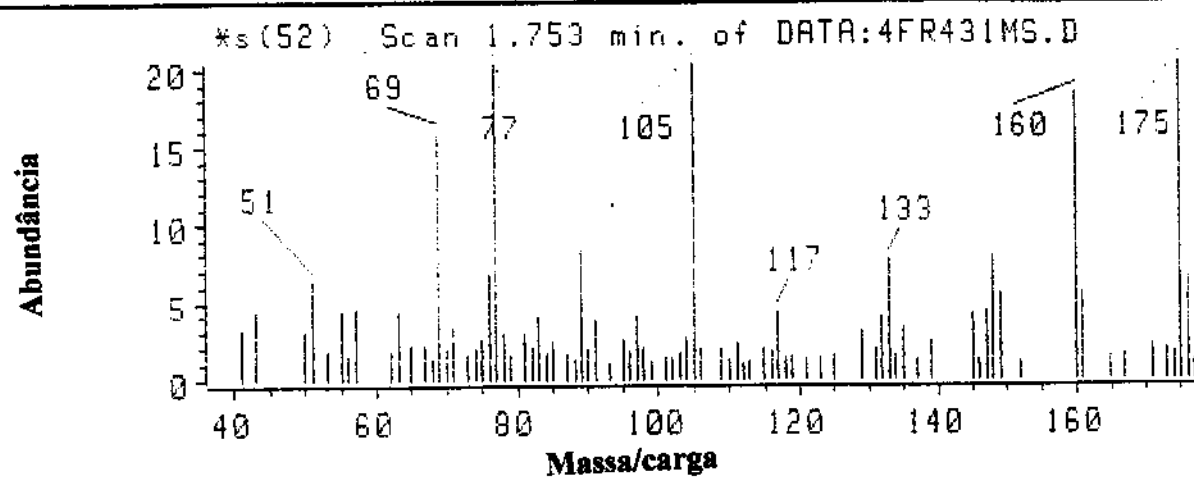
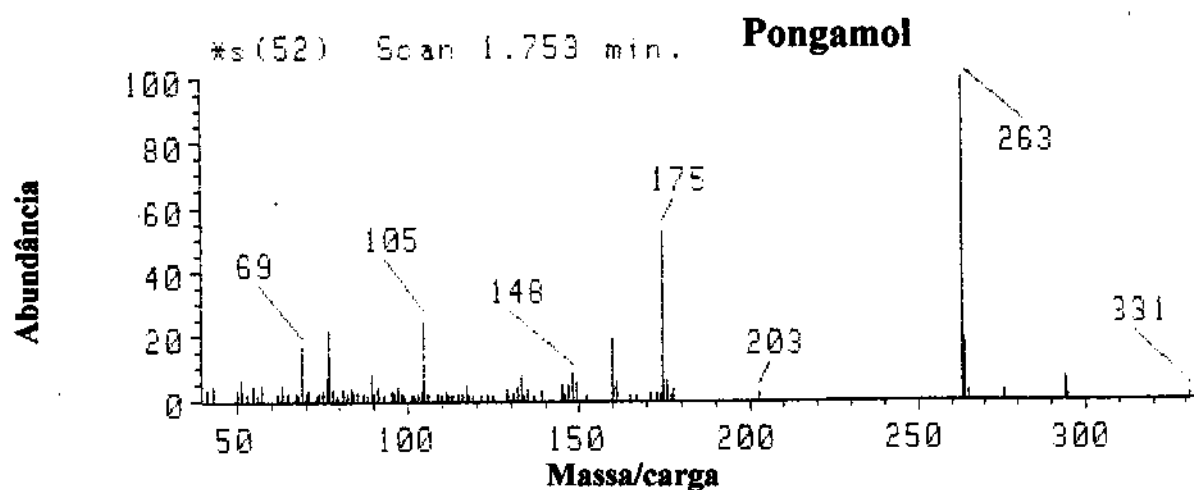
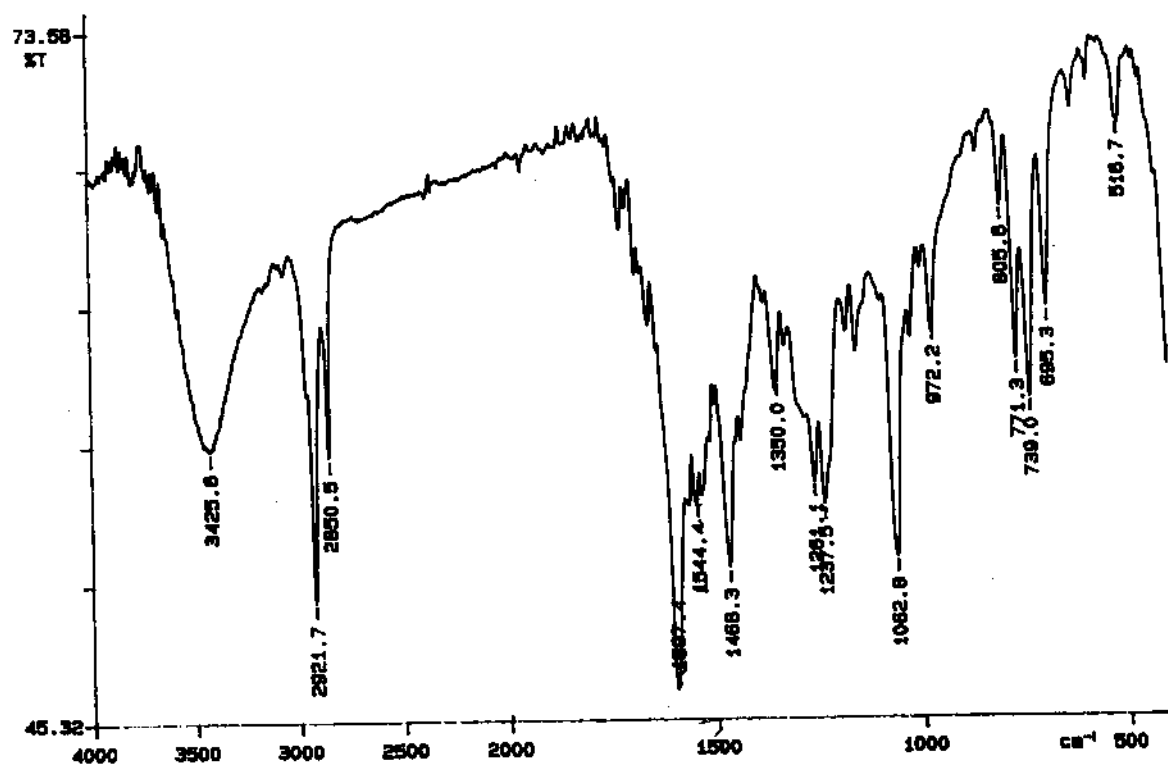


Figura 37. Espectros de IV e massas do pongamol

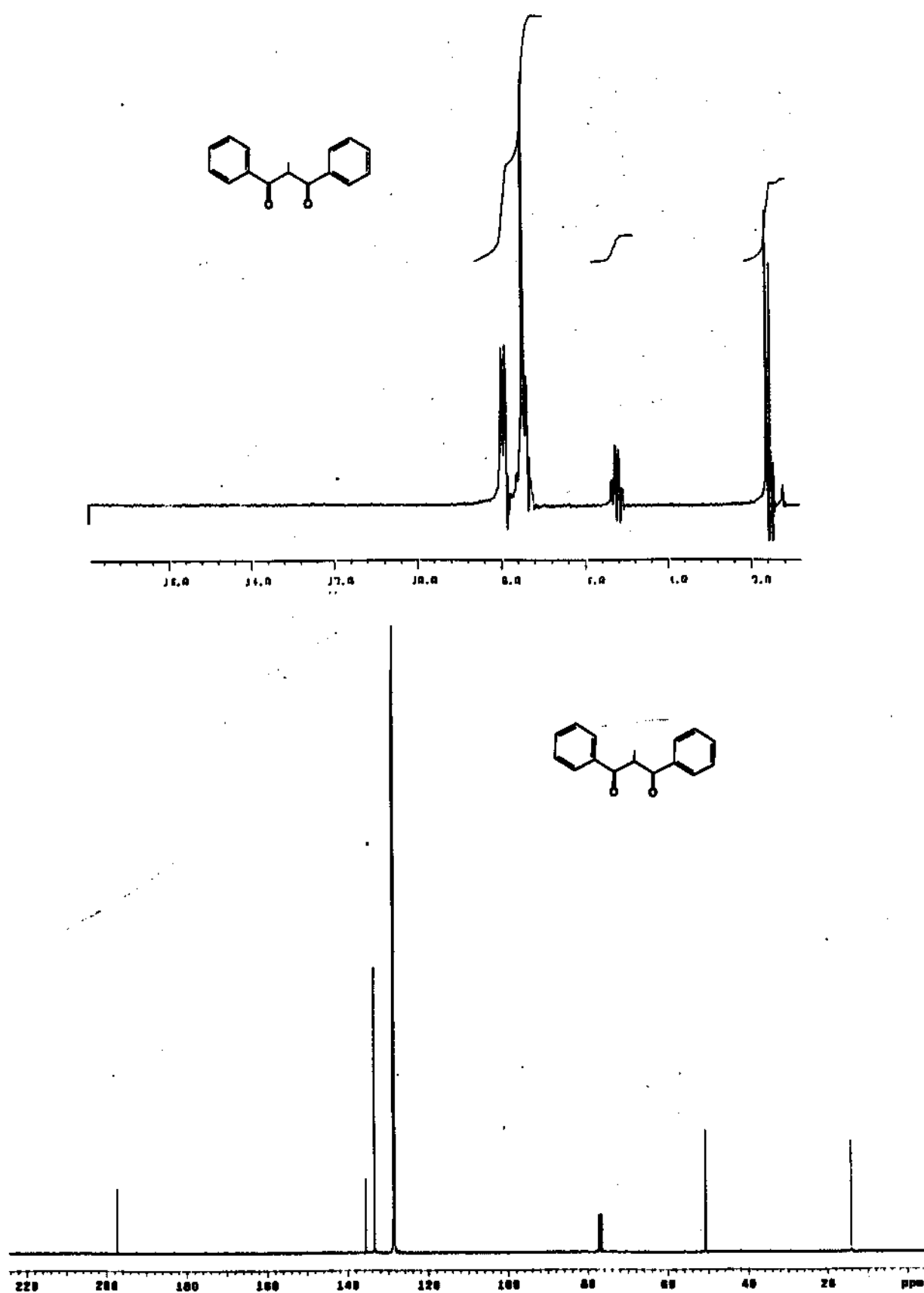


Figura 39. Espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C do 8-metil-dibenzoilmetano

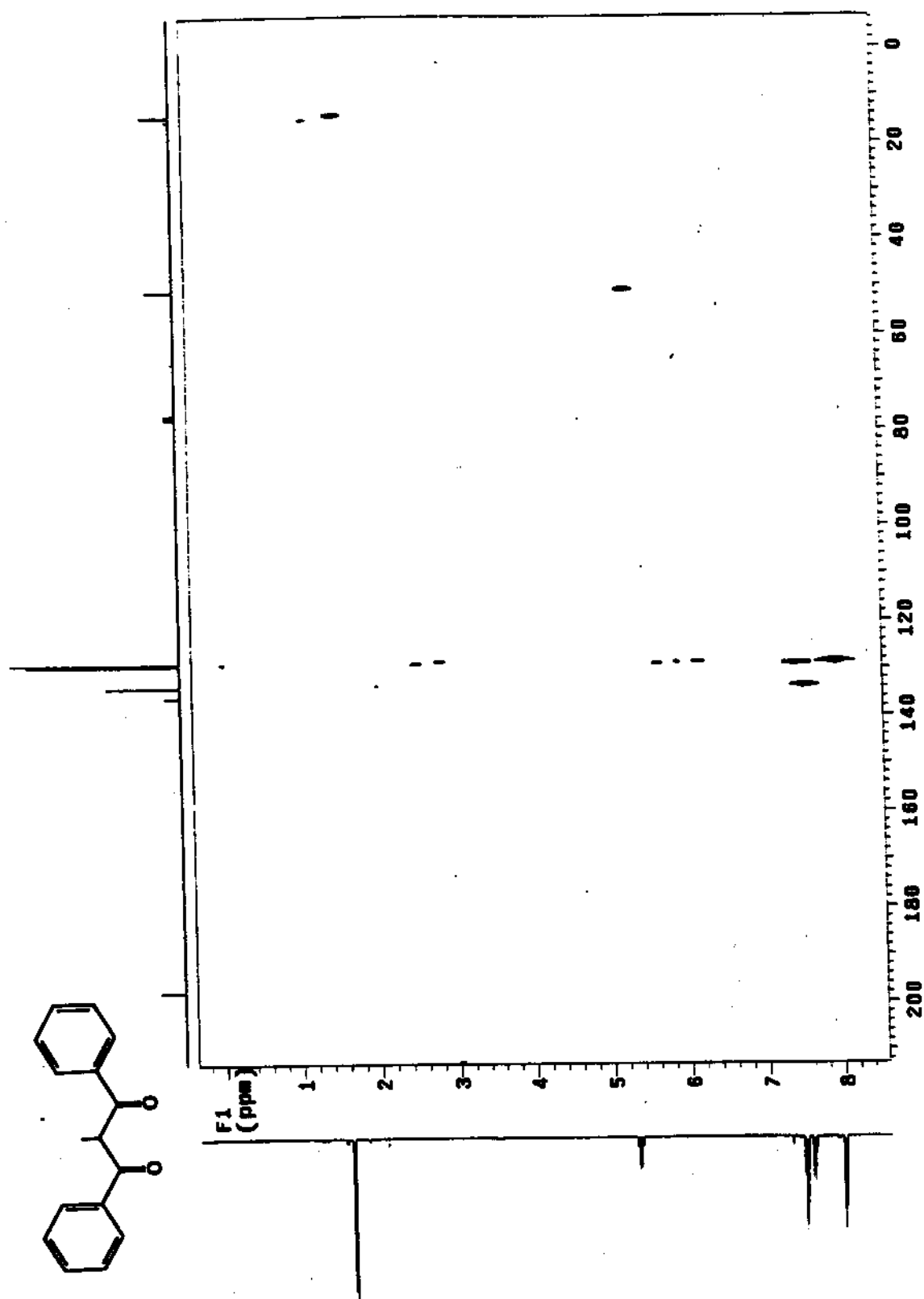


Figura 40. Espectro bidimensional de HETCOR do 8-metil-dibenzilmetano

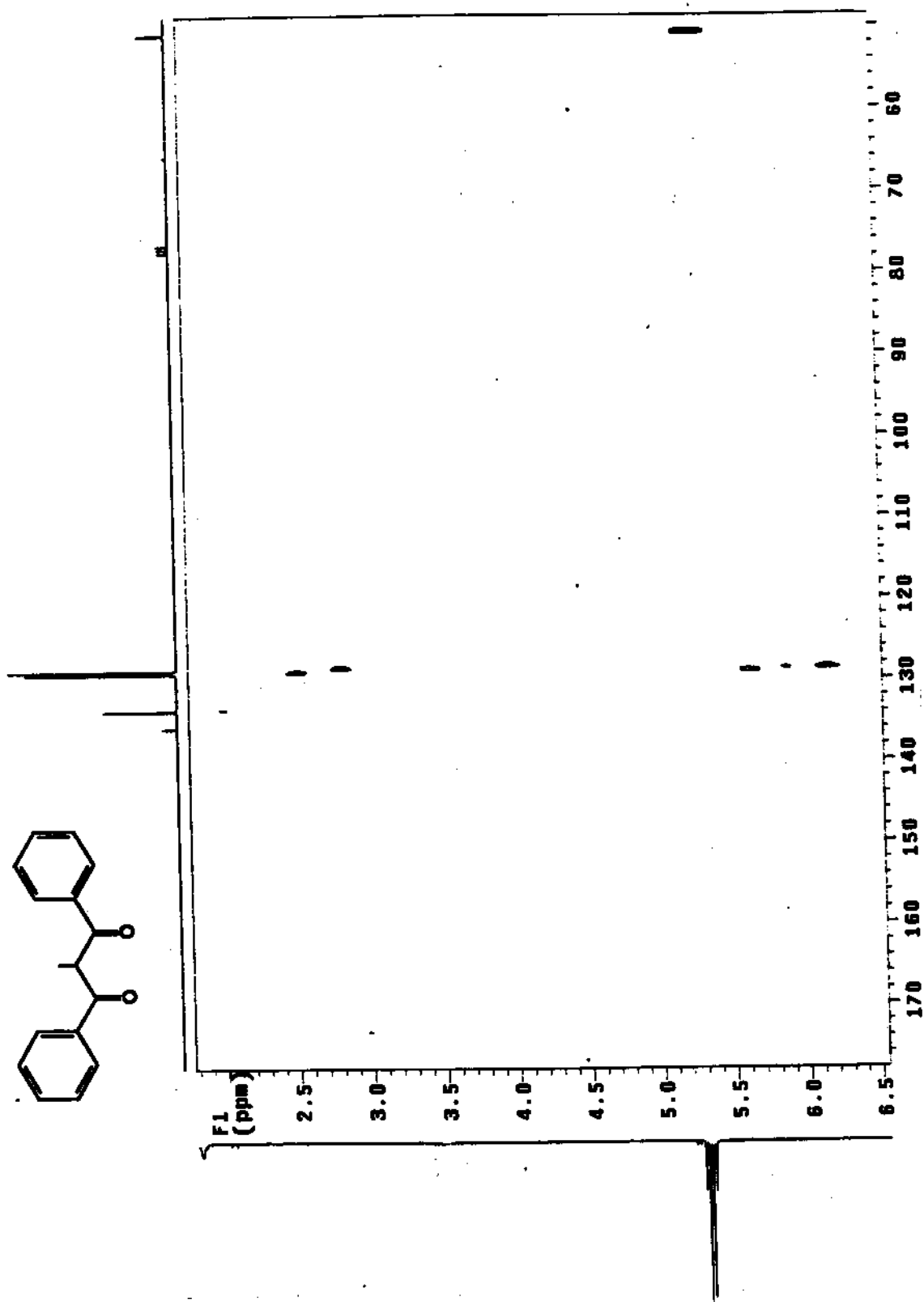


Figura 40. Espectro bidimensional de HETCOR do 8-metil-dibenzoilmetano, expansão

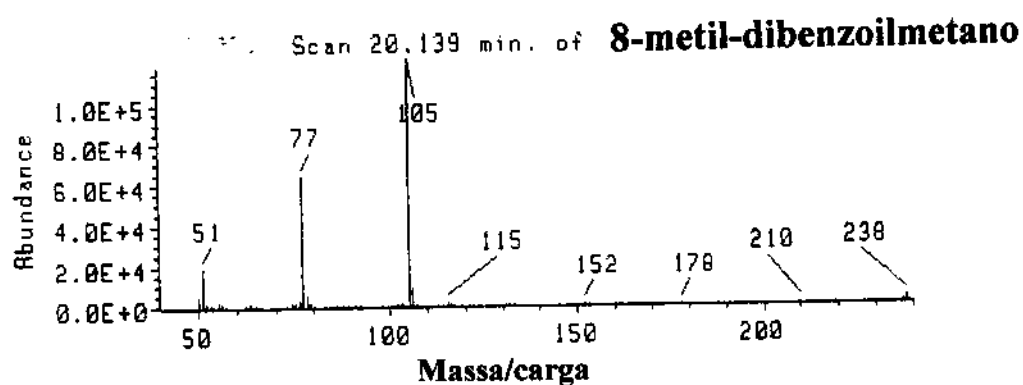
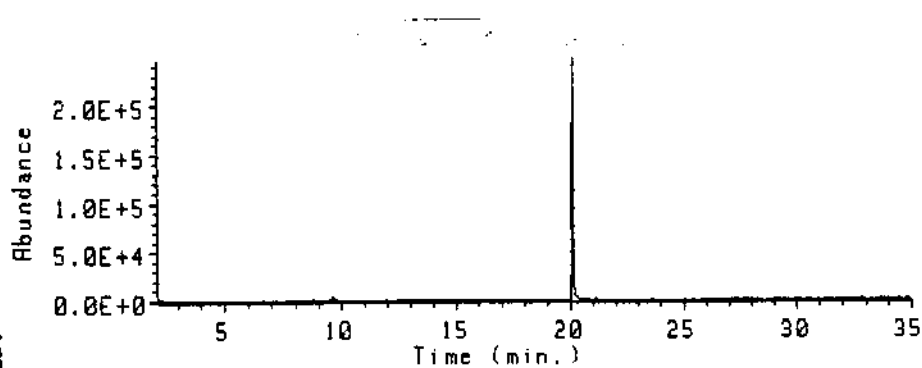
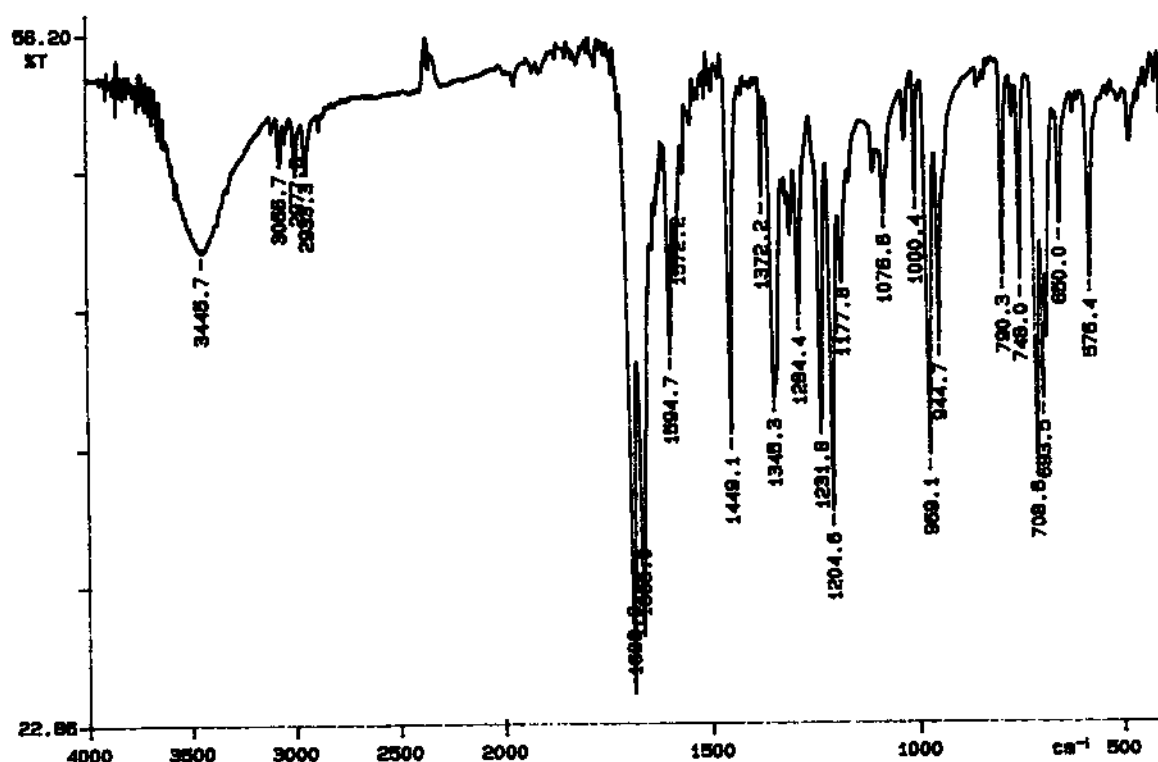


Figura 41. Espectros de IV e massas do 8-metil-dibenzoilmetano

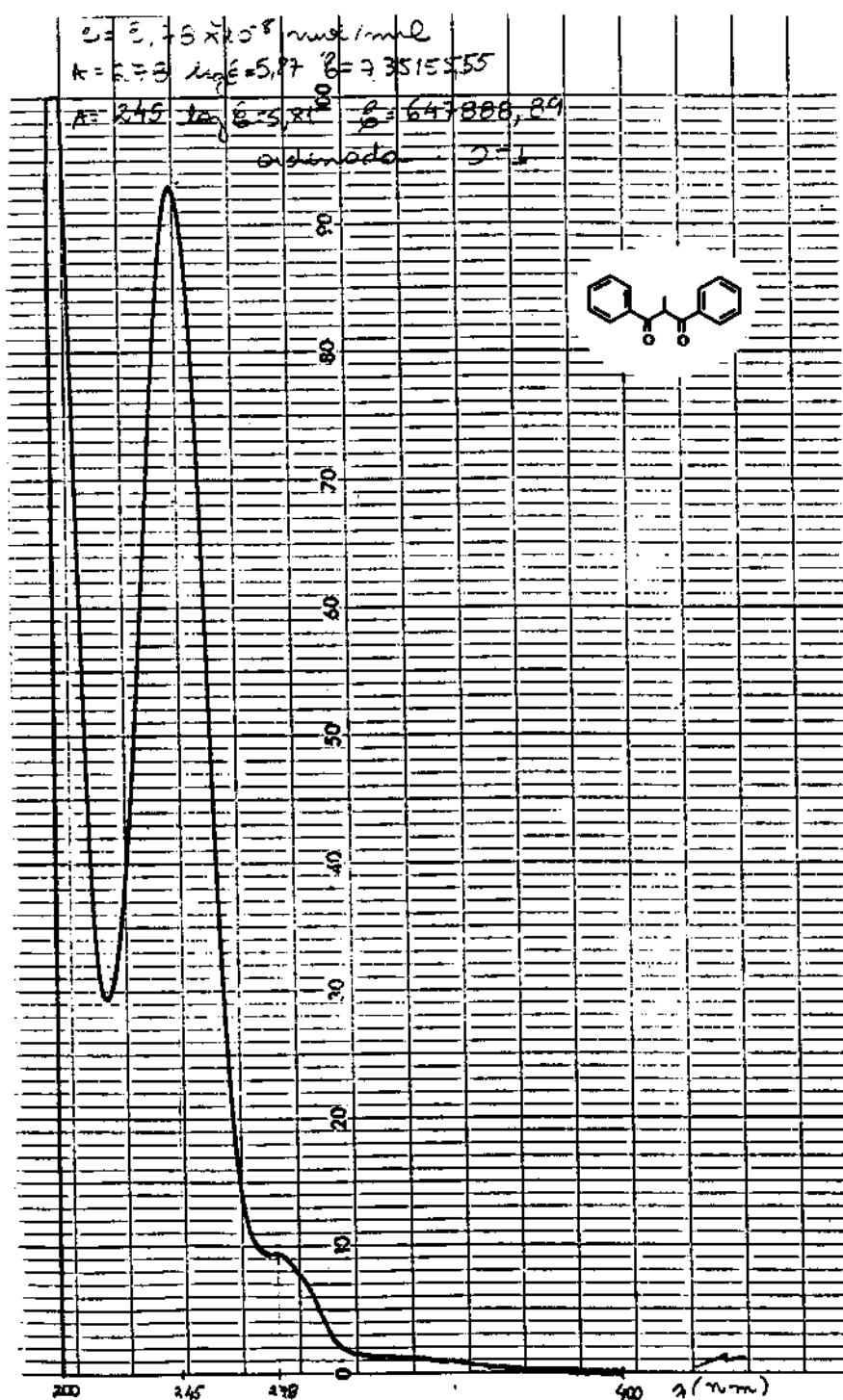


Figura 42. Espectro de UV do 8-metil-dibenzoilmetano

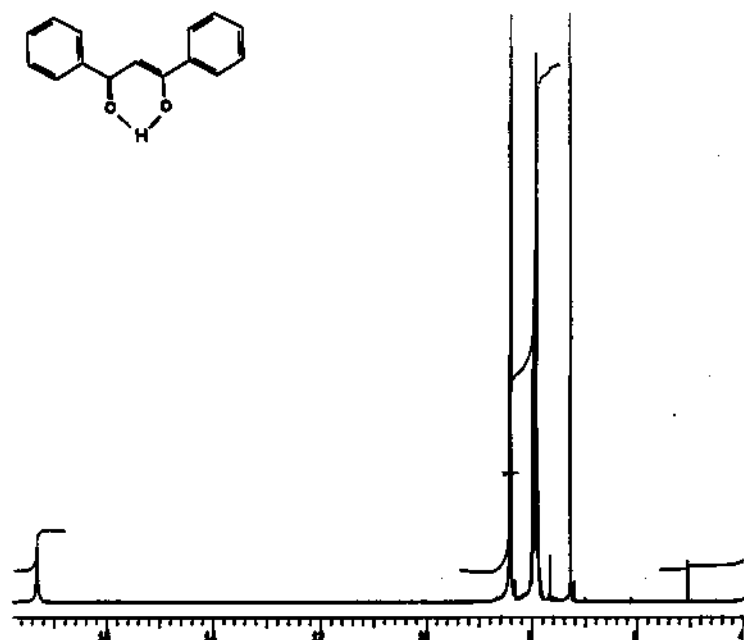
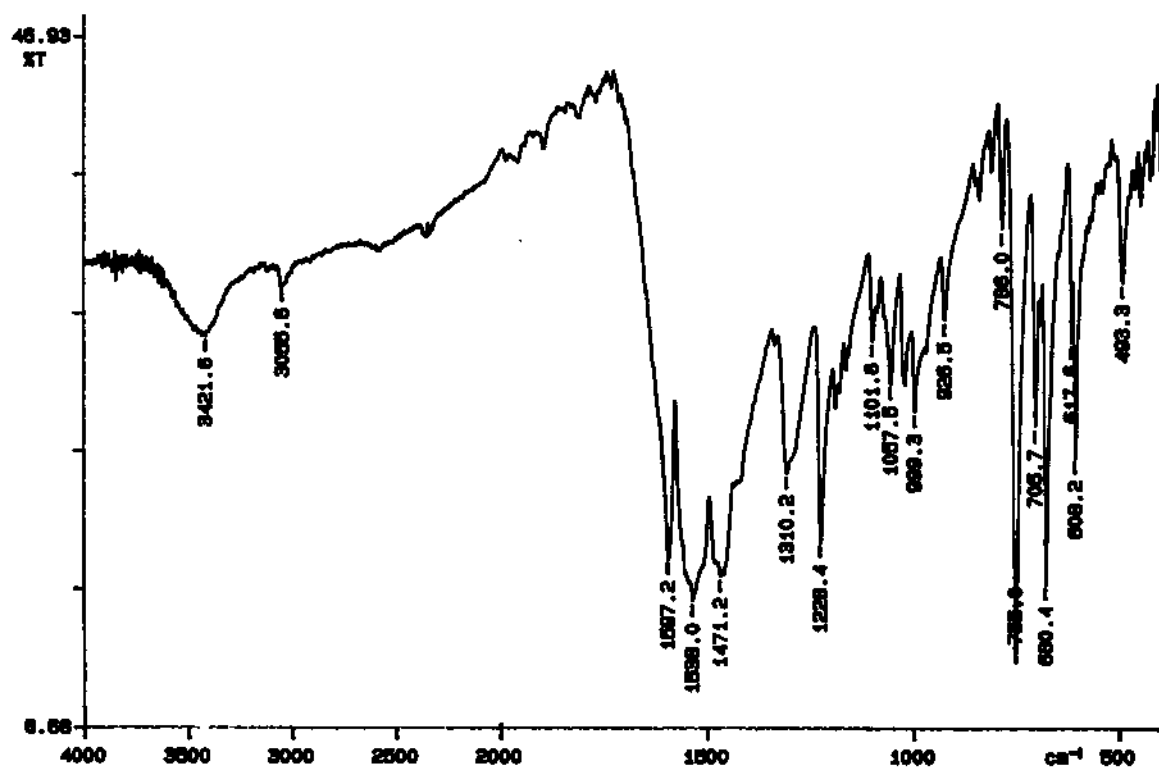


Figura 43. Espectros de IV e RMN ^1H do dibenzoilmetano comercial

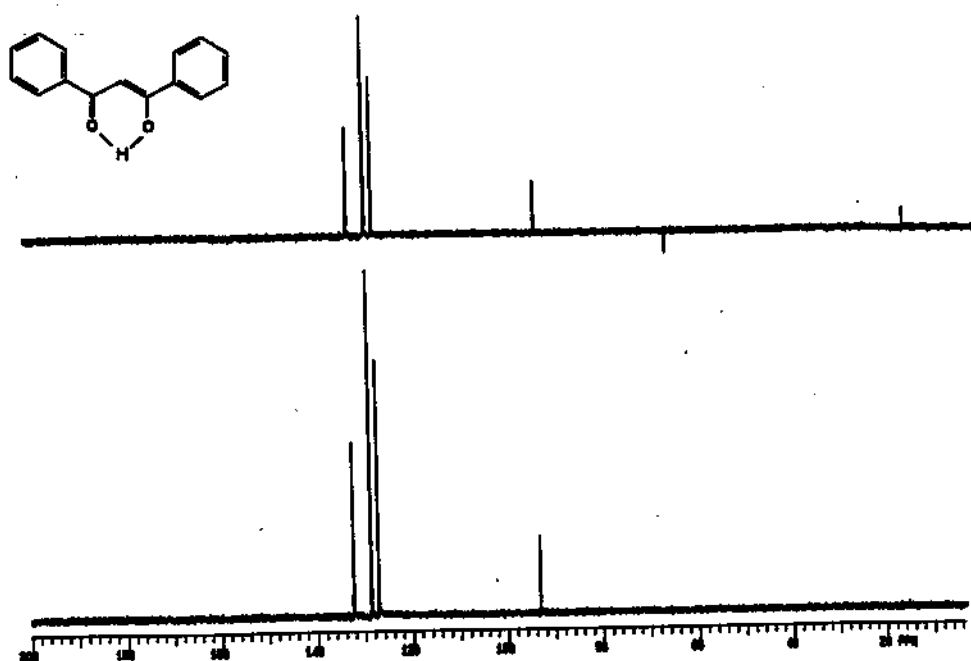
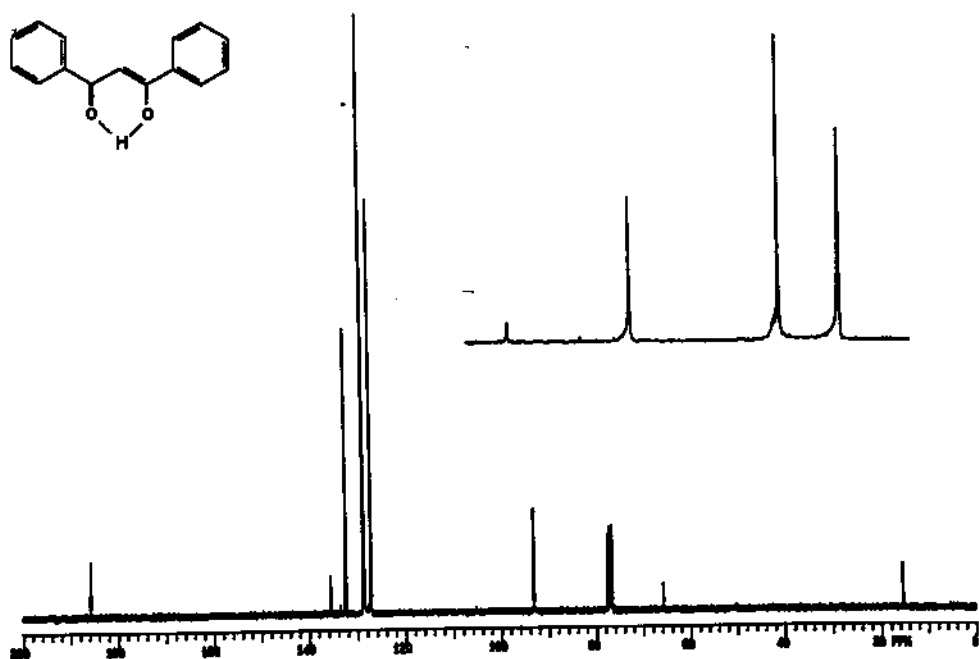


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C do dibenzoilmetano comercial

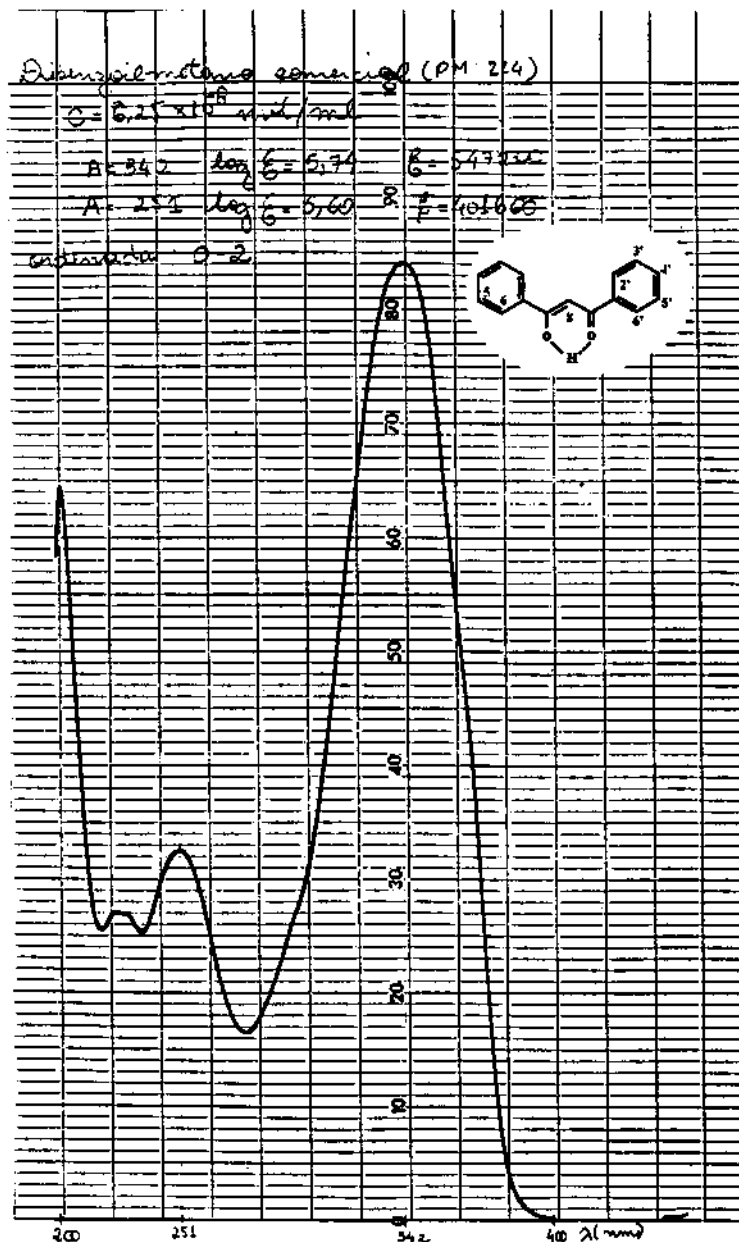
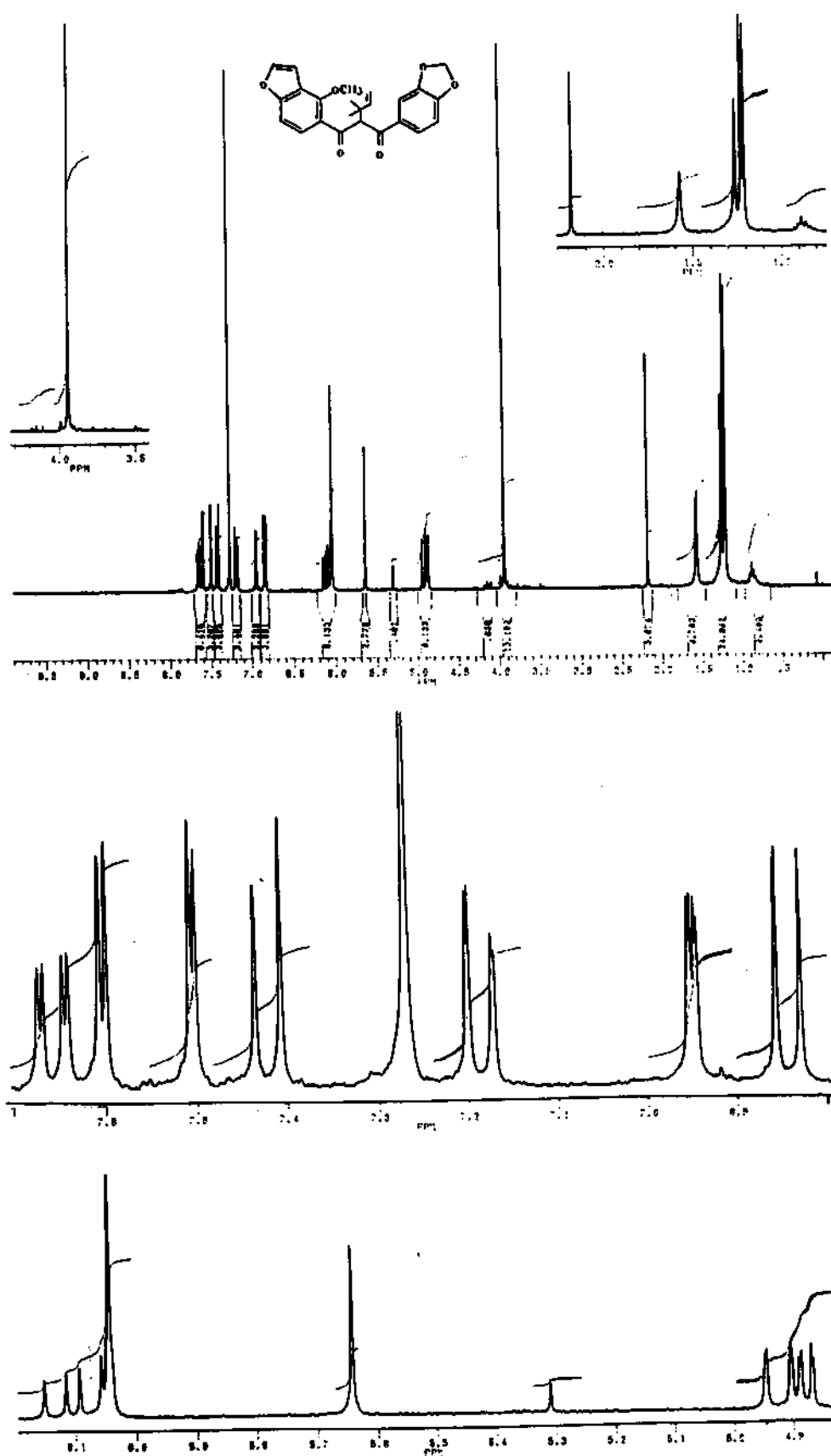


Figura 45. Espectro de UV do dibenzilmetano comercial



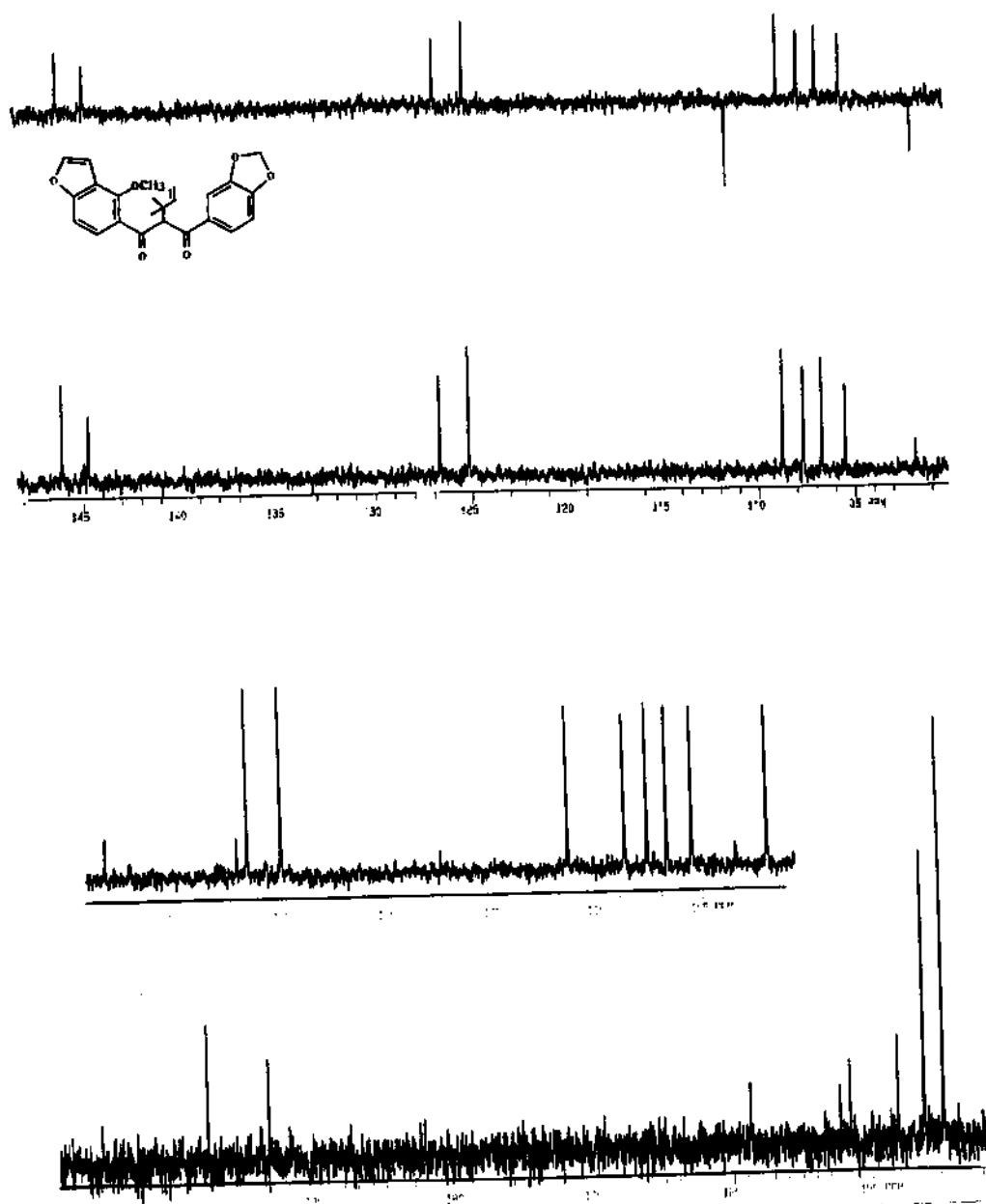


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT da substância 9, expansão

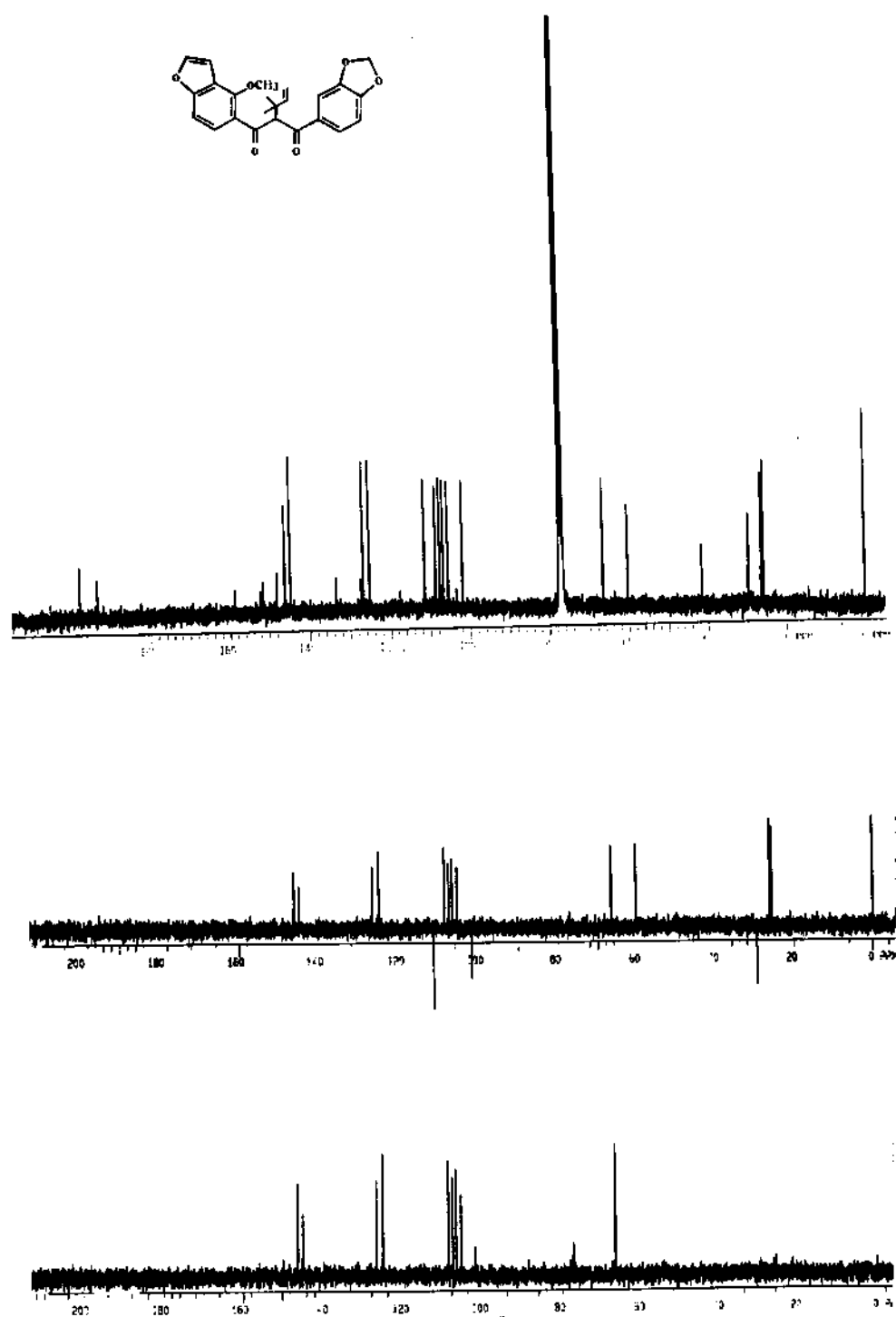


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT da substância 9

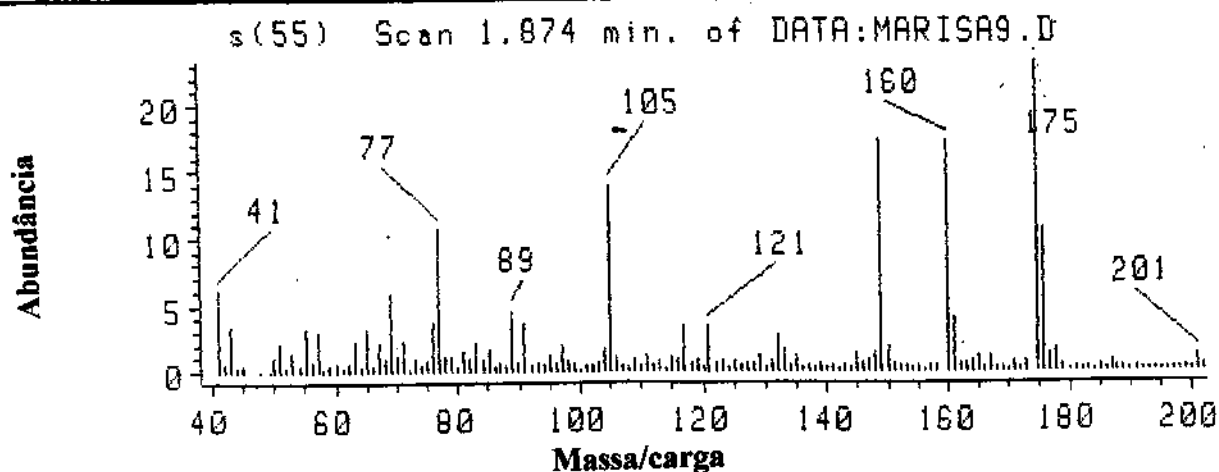
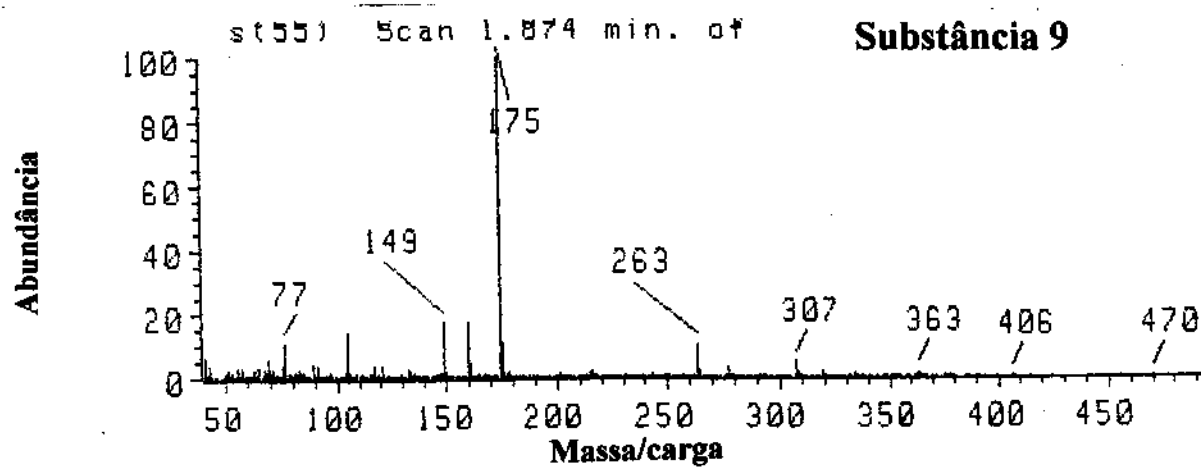
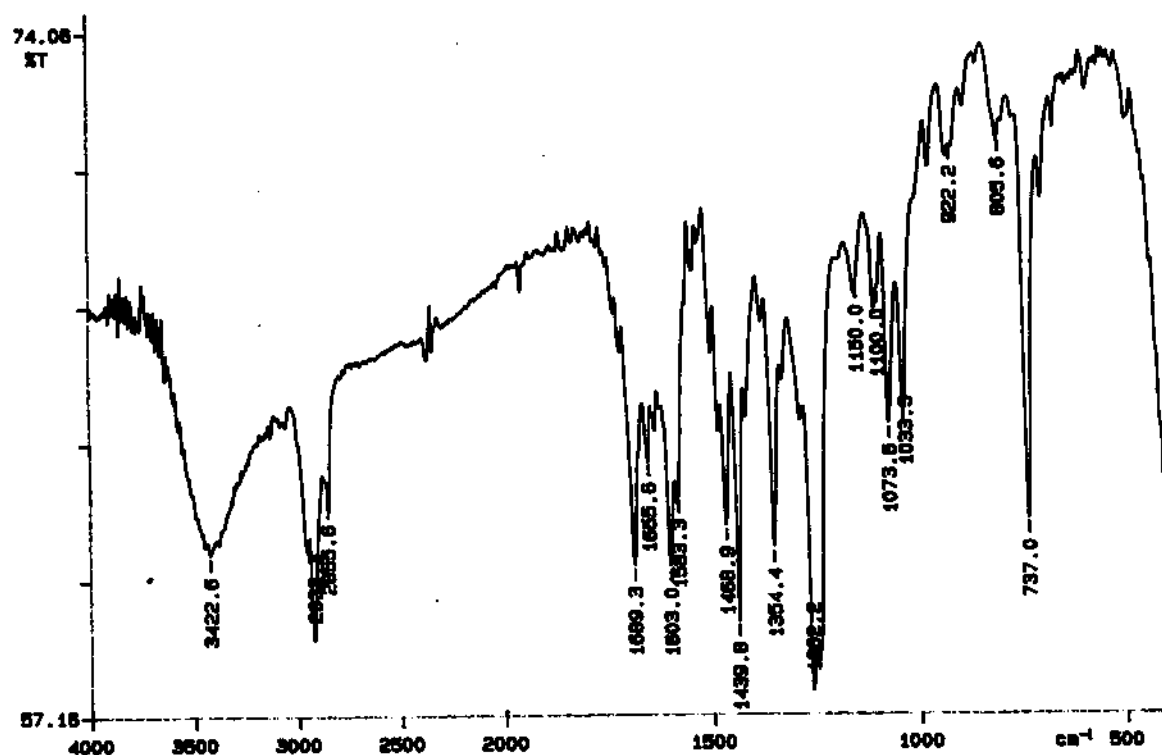


Figura 48. Espectros de IV e massas da substância 9

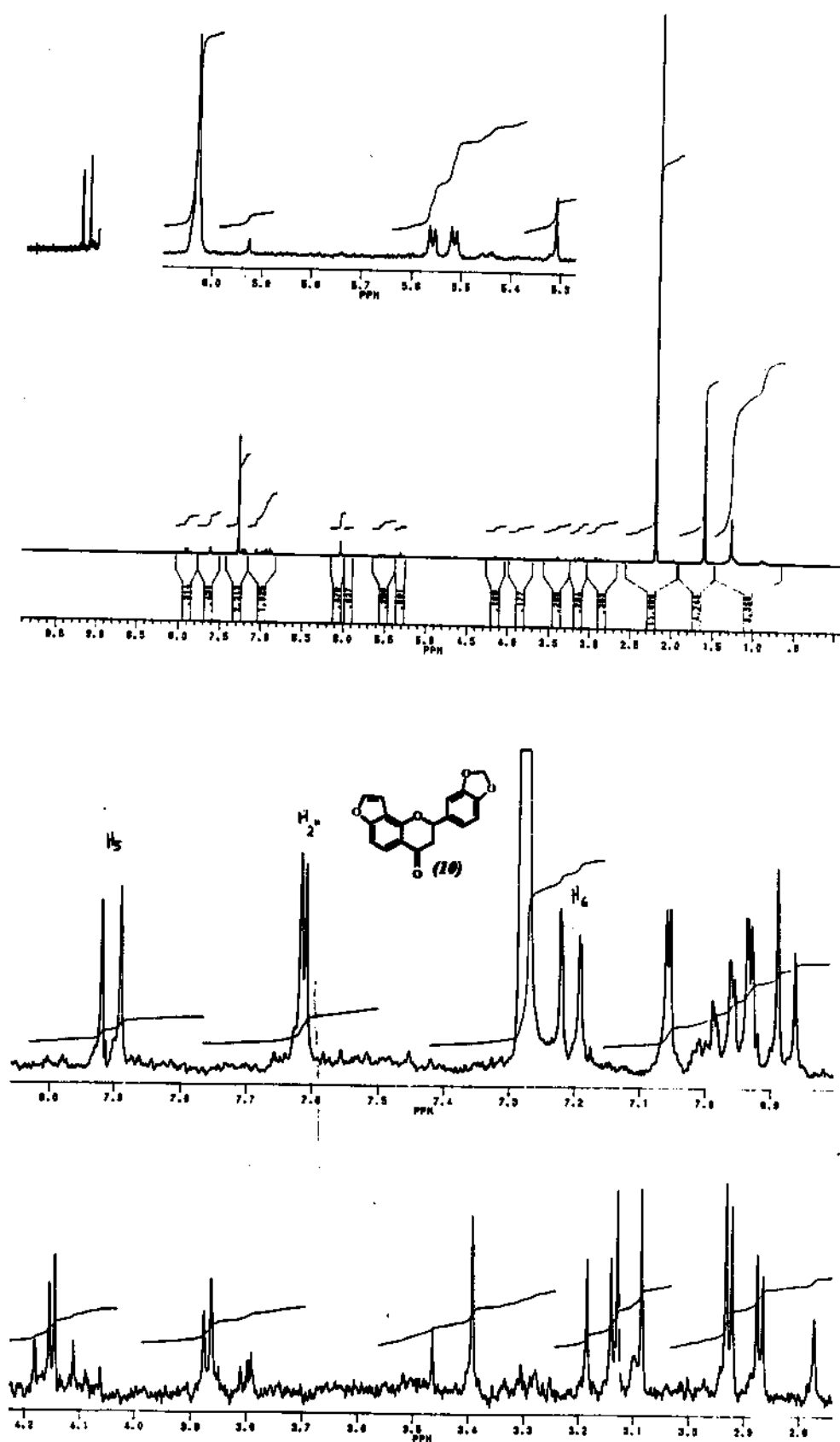


Figura 50. Espectro de RMN ^1H da substância 10

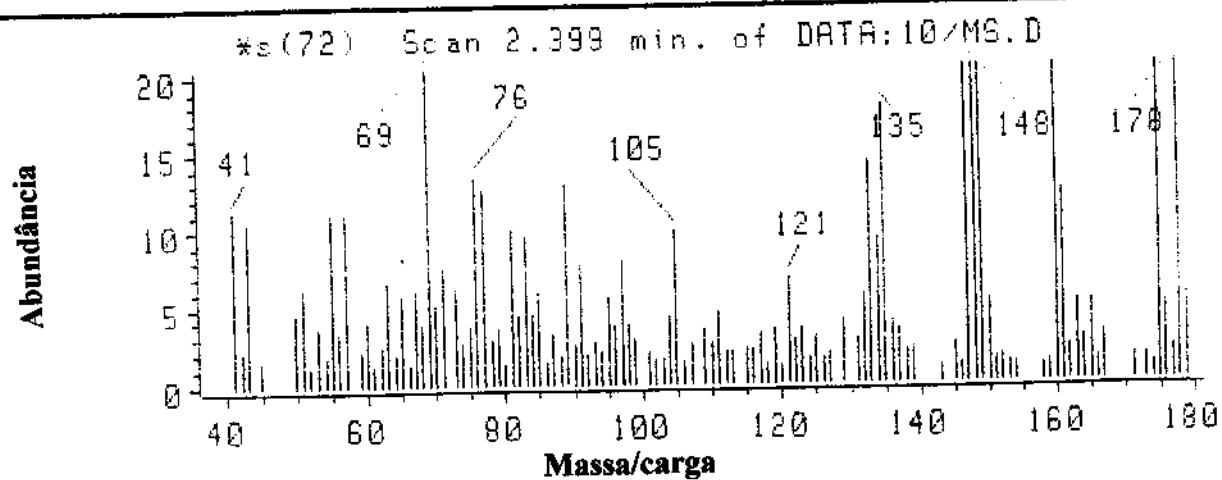
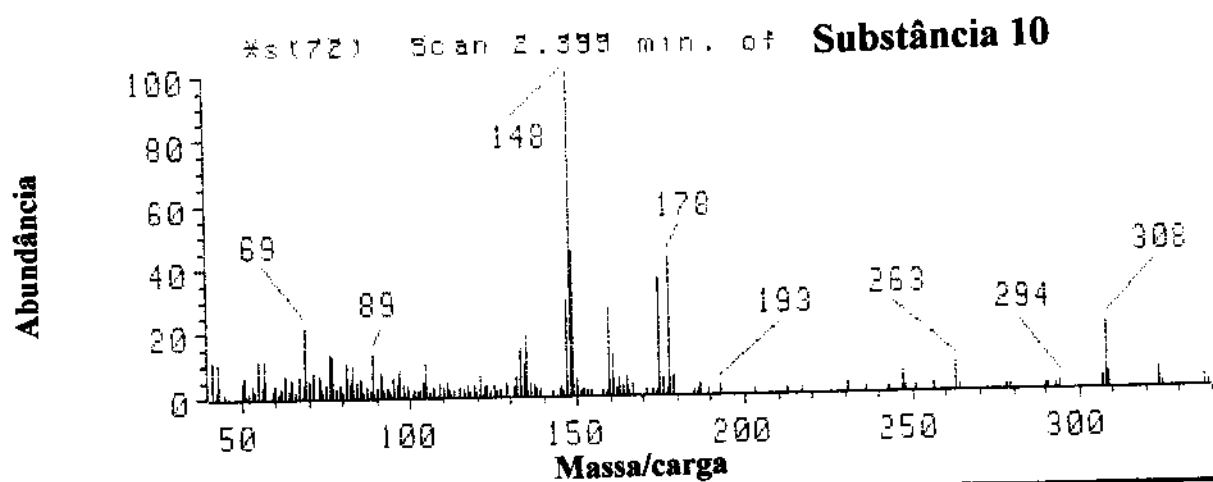
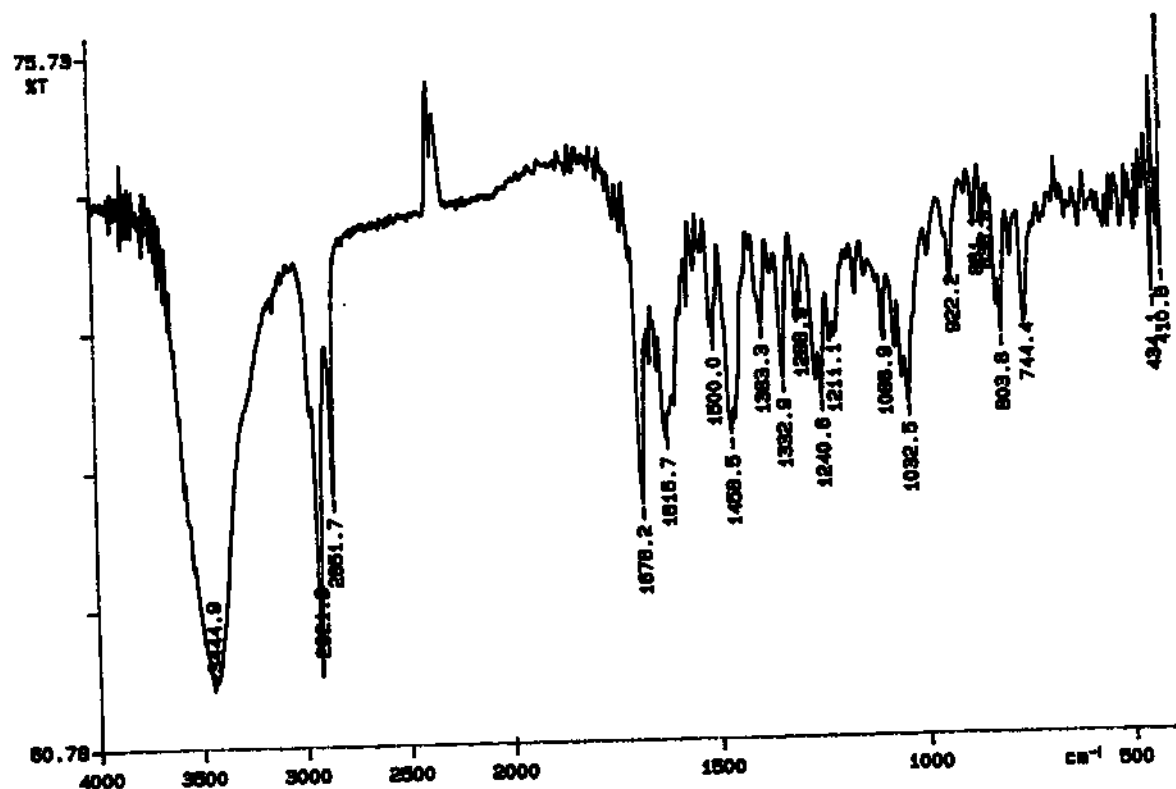


Figura 51. Espectros de IV e massas da substância 10

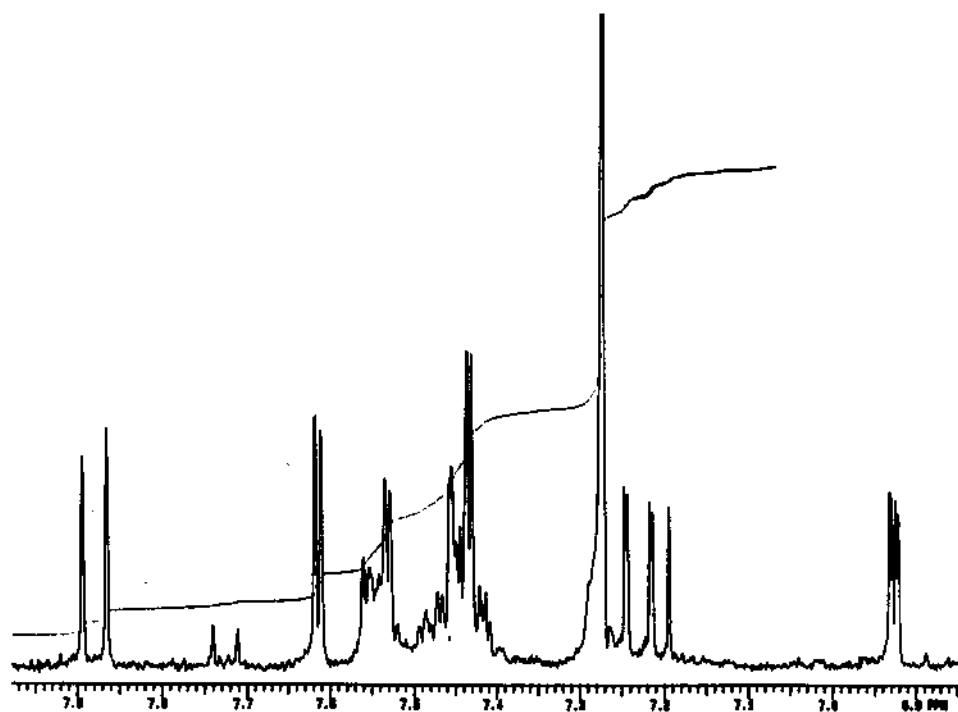
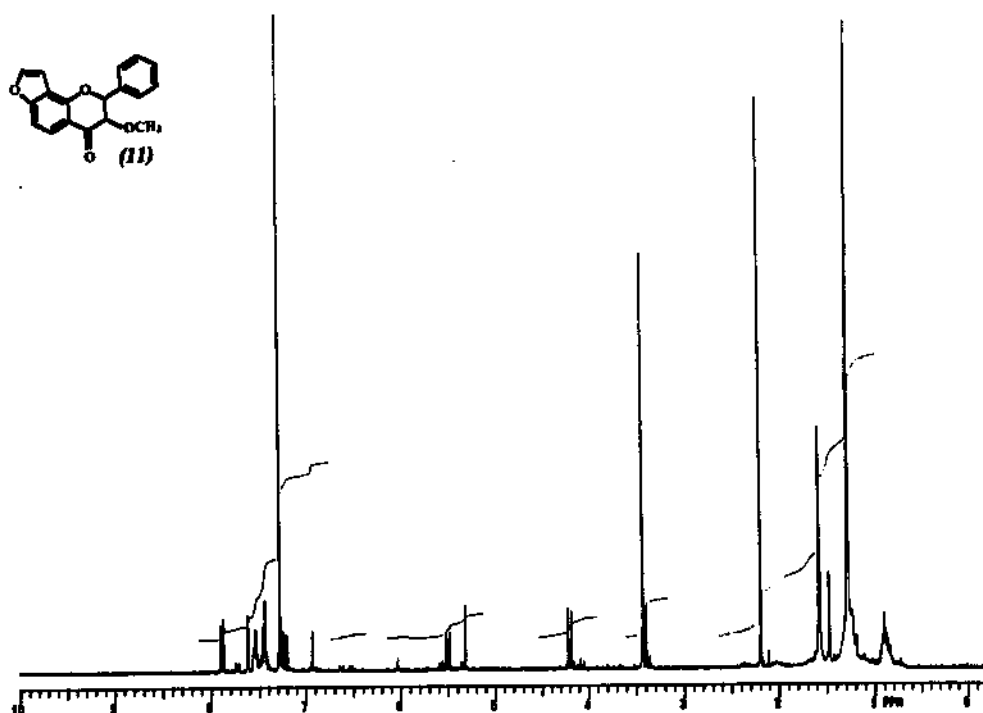


Figura 54. Espectro de RMN ¹H da substância 11

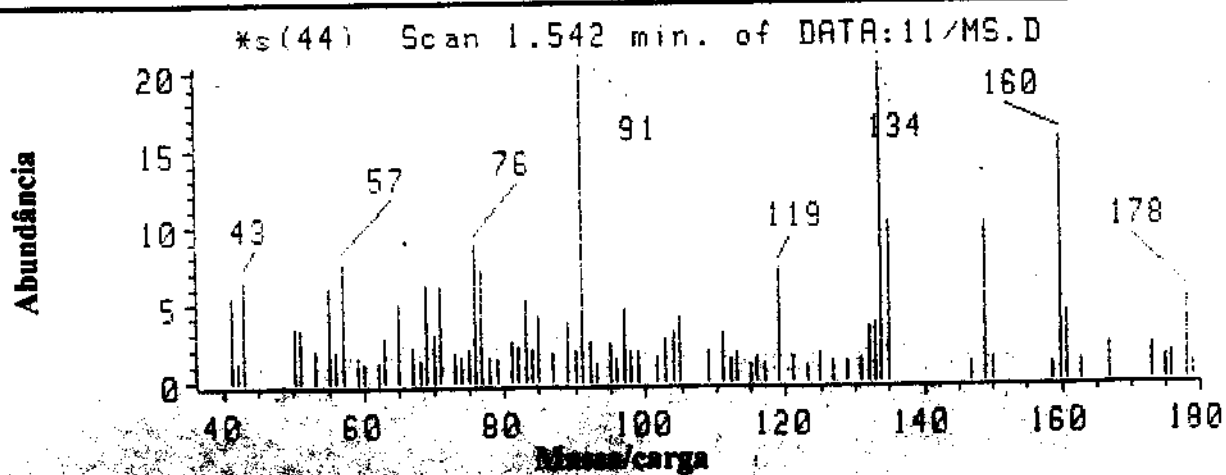
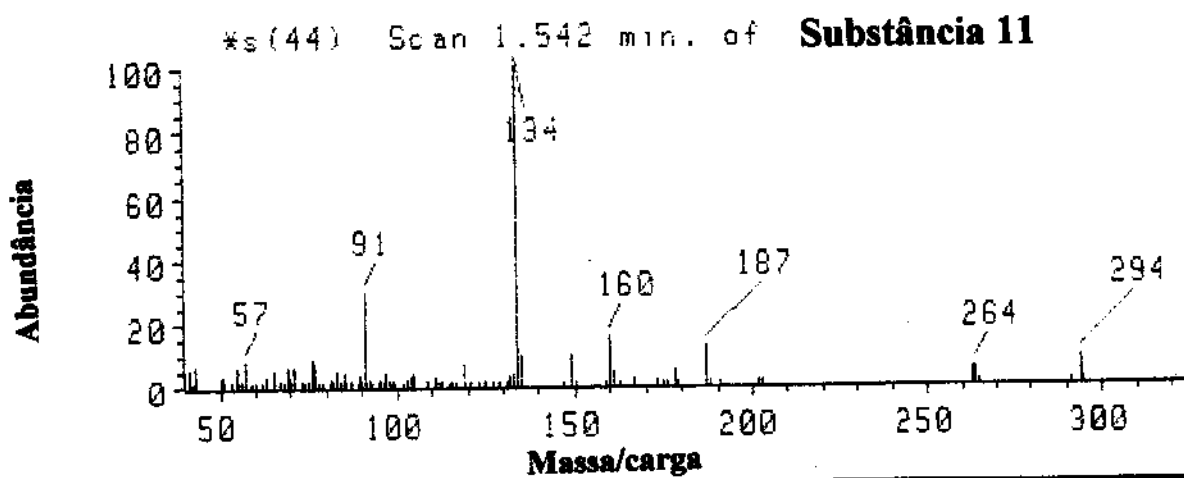


Figura 55. Espectro de massas da substância 11

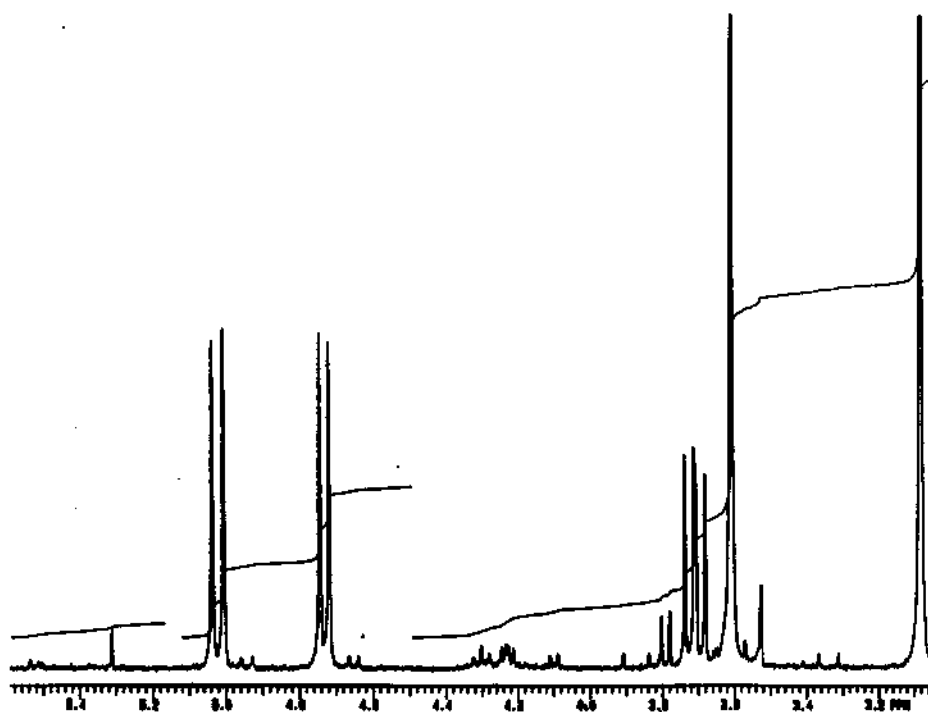
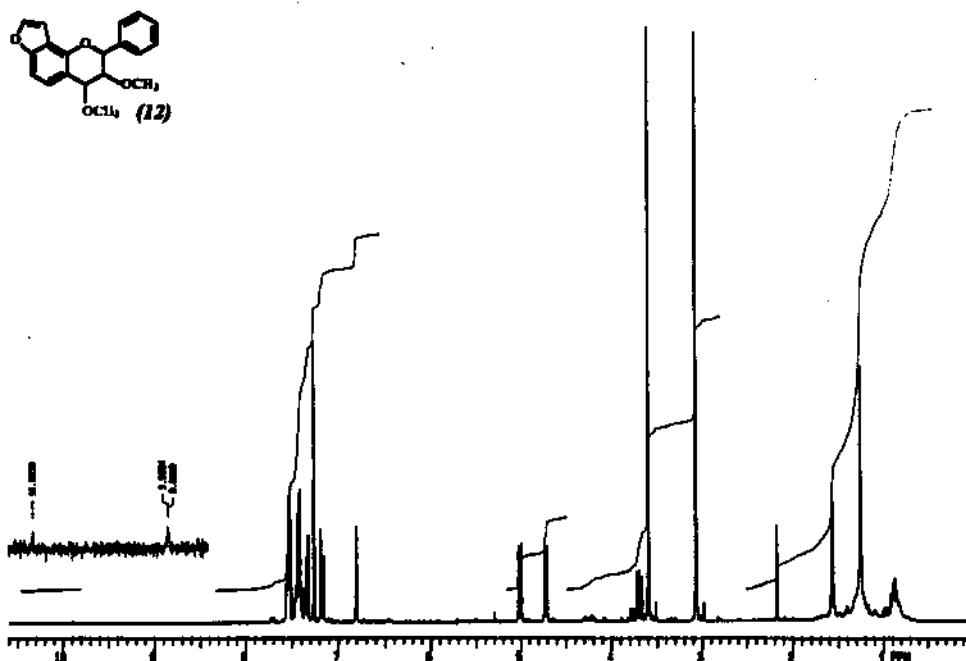


Figura 58. Espectro de RMN ^1H da substância 12

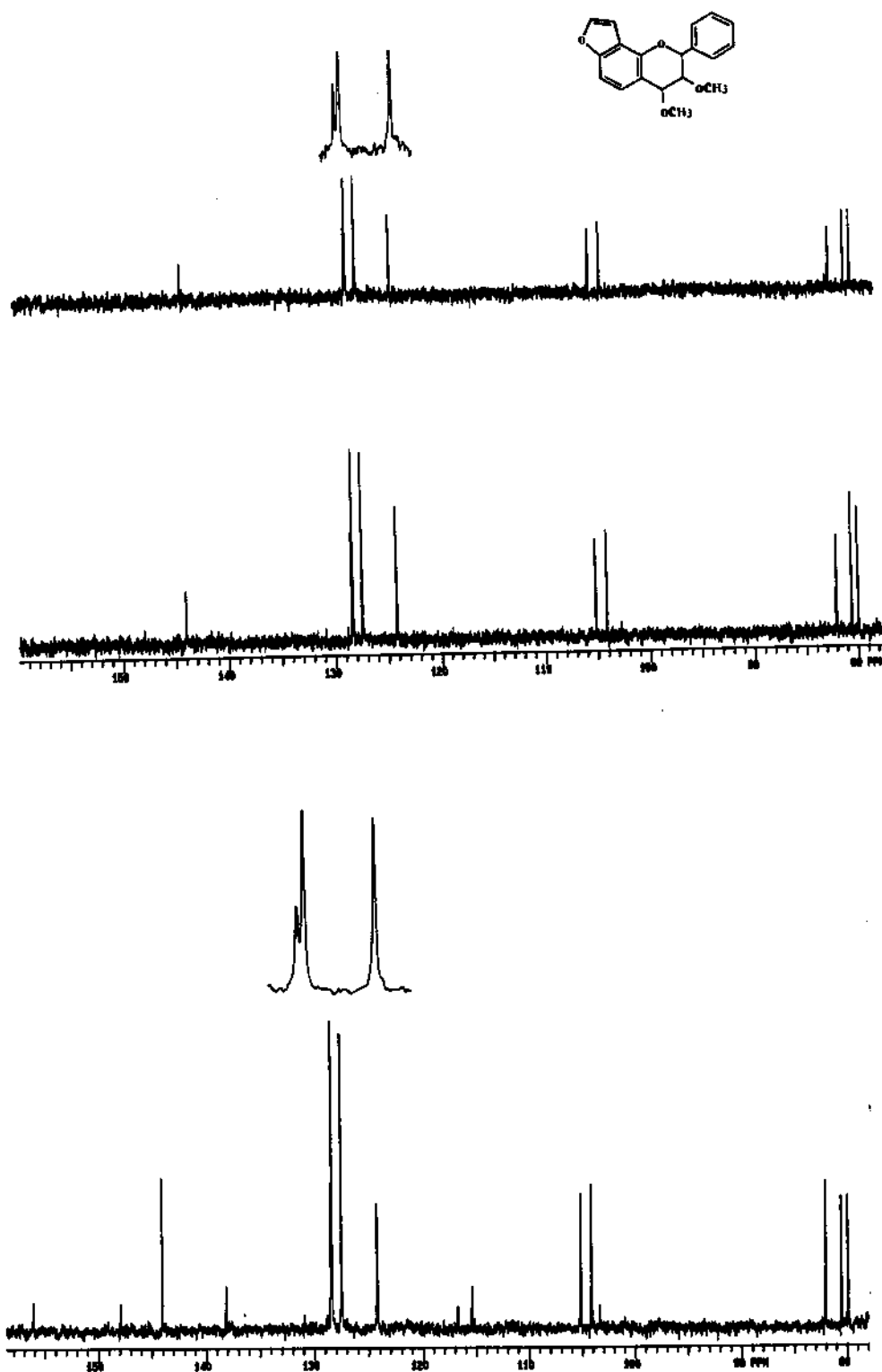


Figura 60. Espectro de RMN ¹³C e DEPT da substância 12, expansão

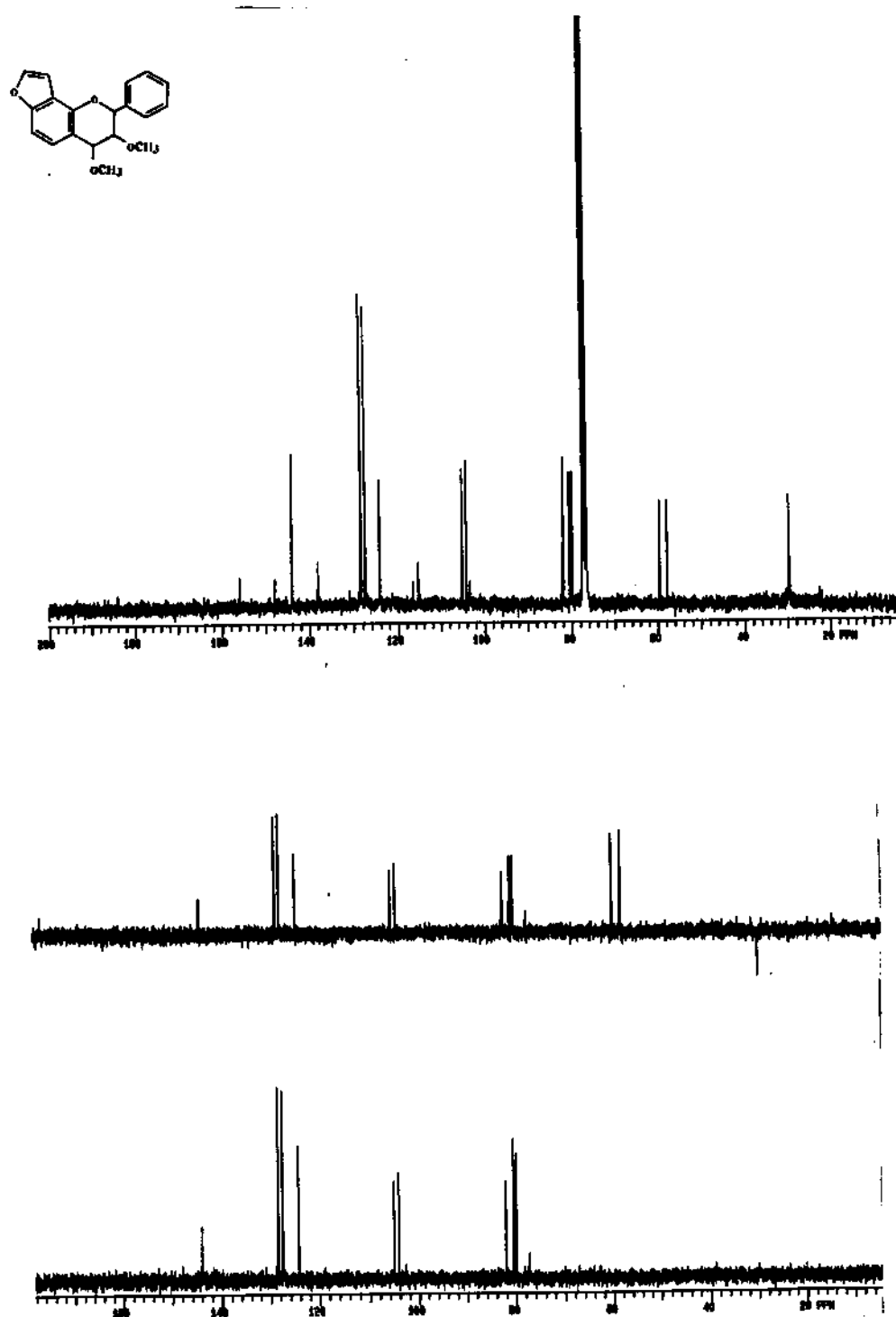


Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT da substância 12

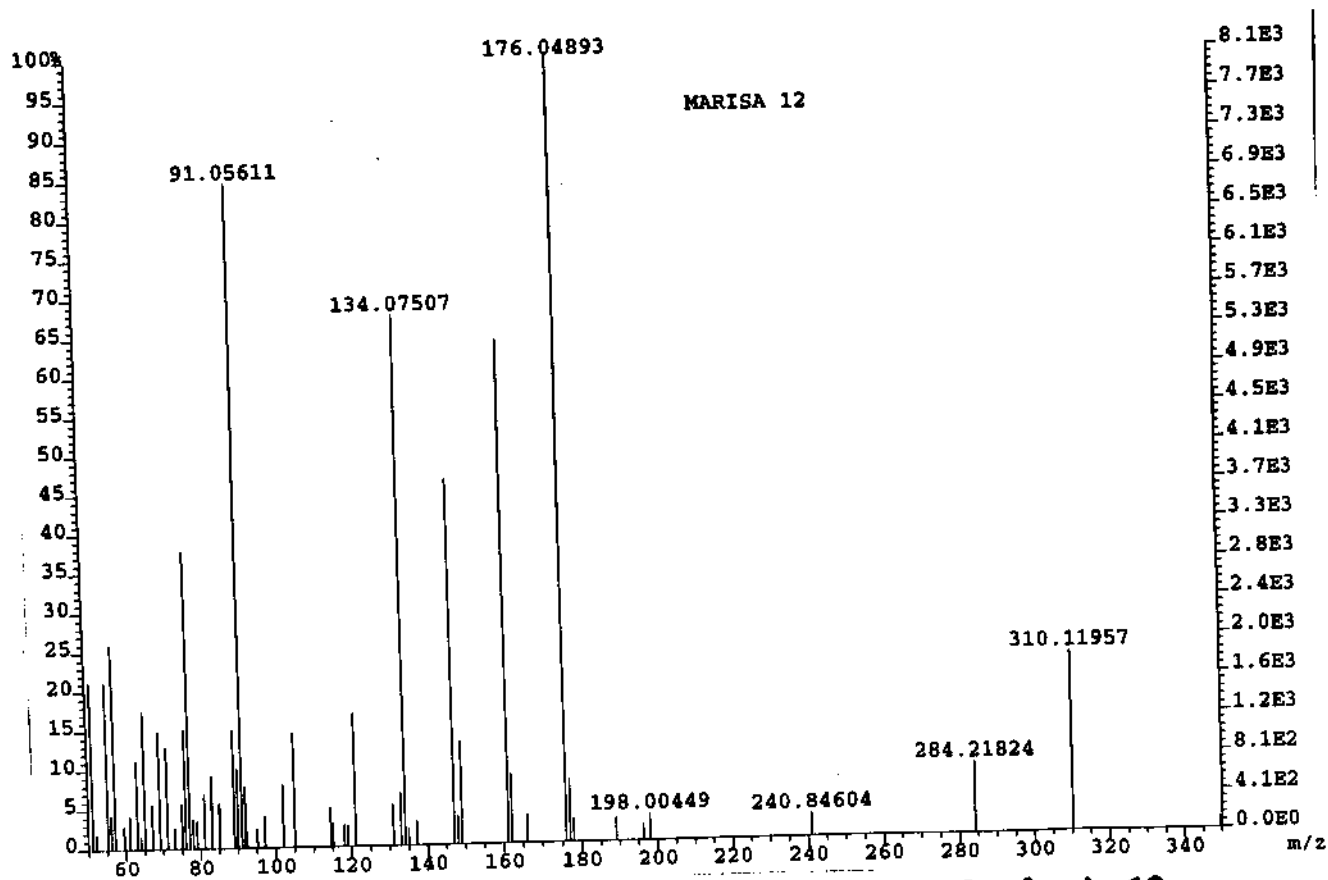
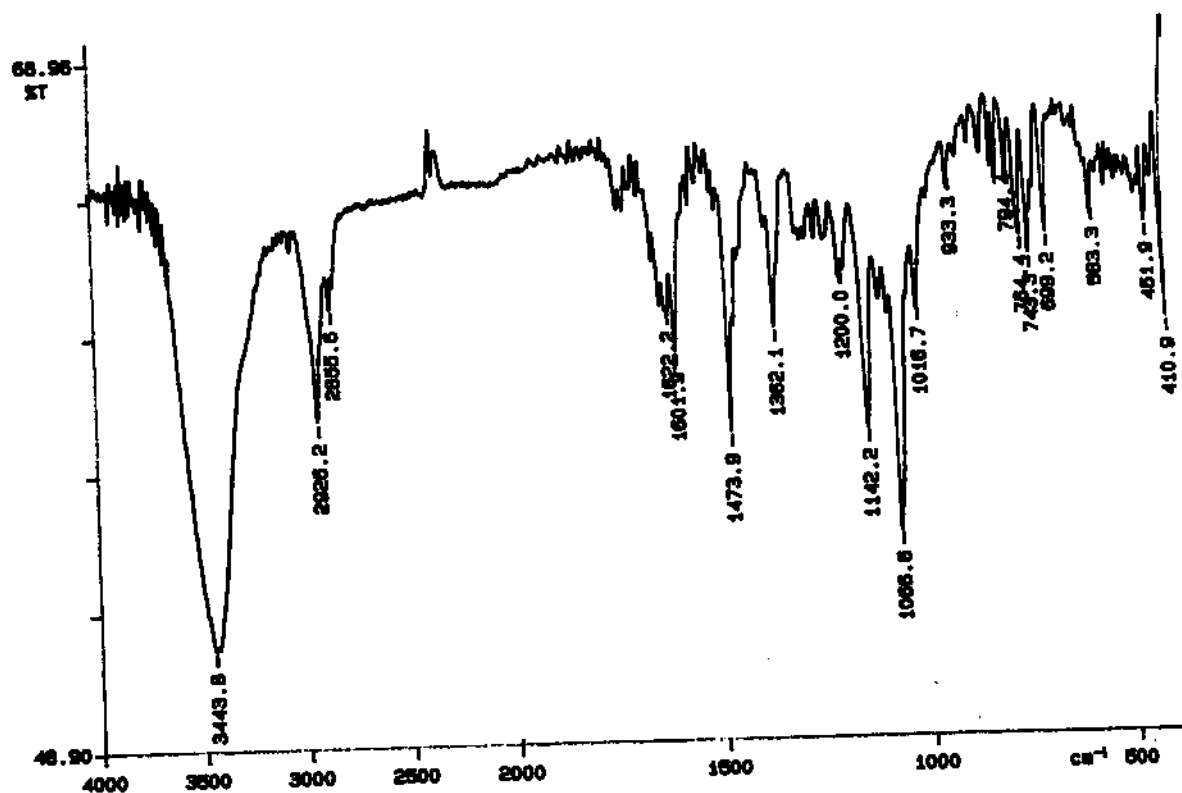


Figura 61. Espectros de IV e massas da substância 12

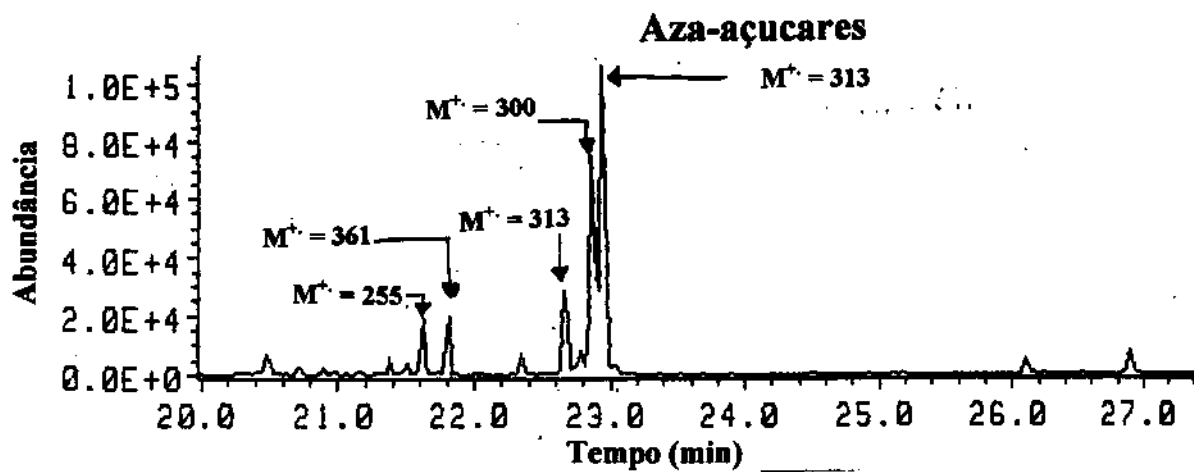
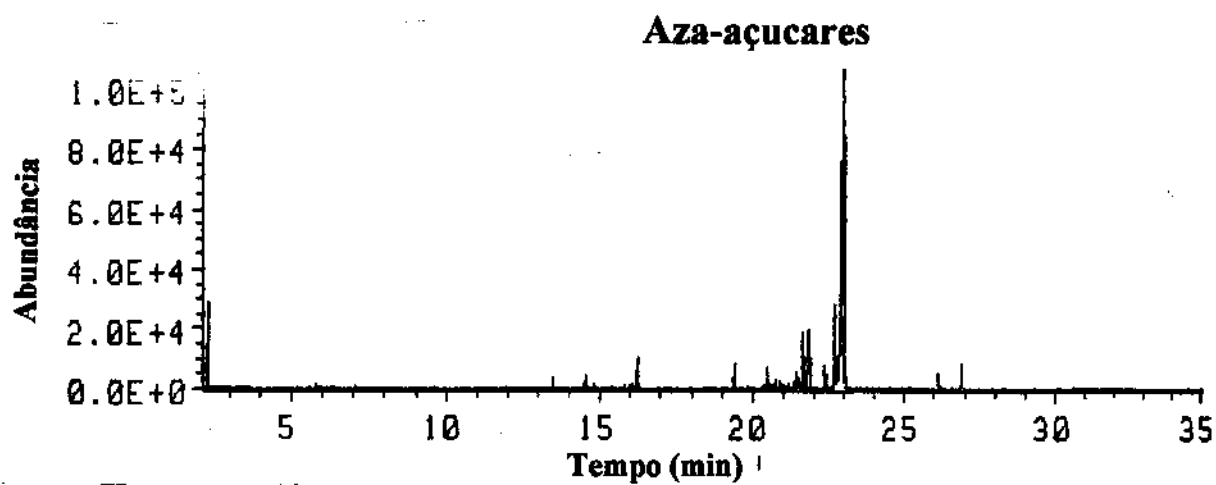


Figura 64. Espectro de CG-EM da mistura de Aza-açúcares

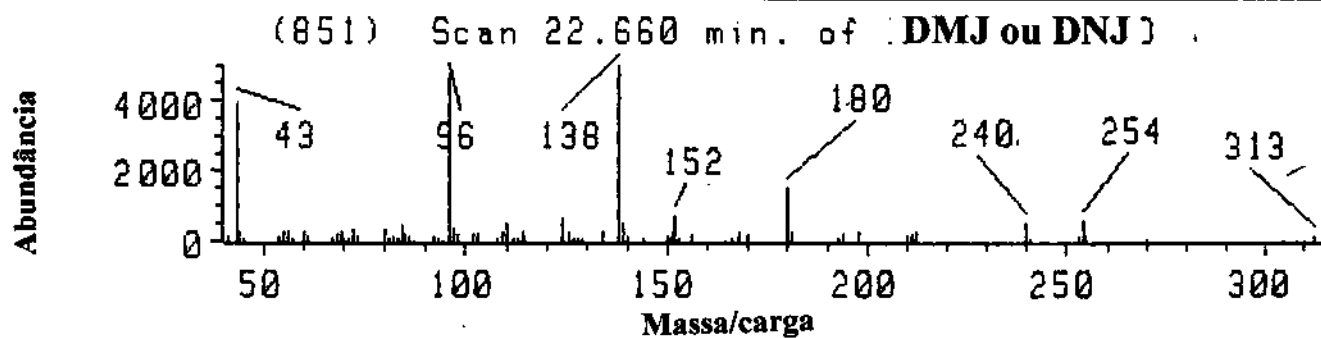
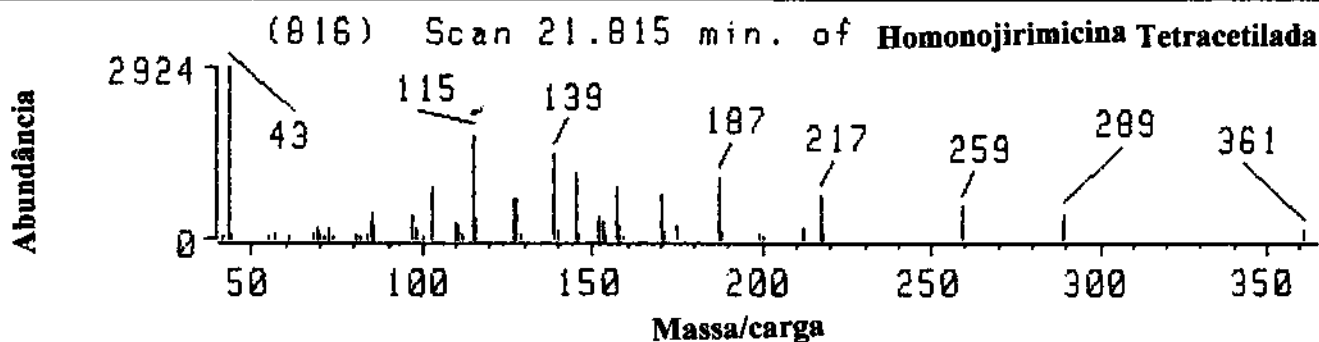
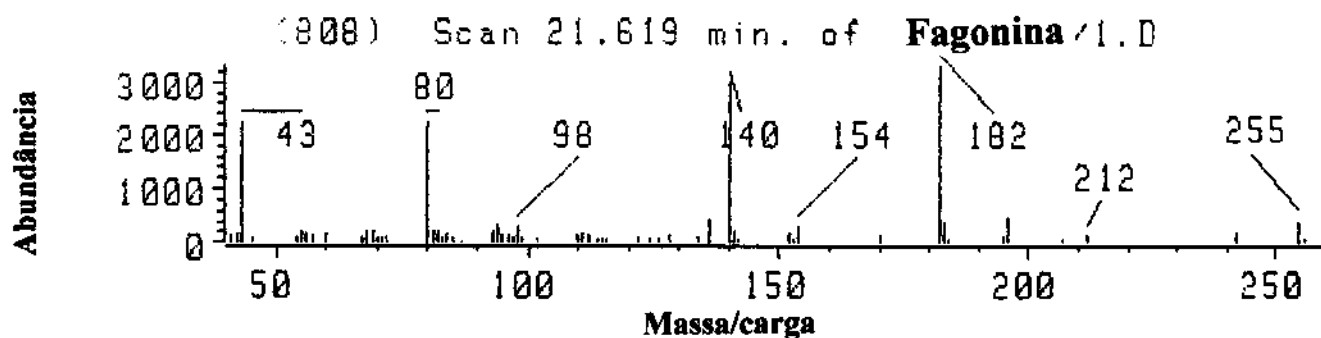
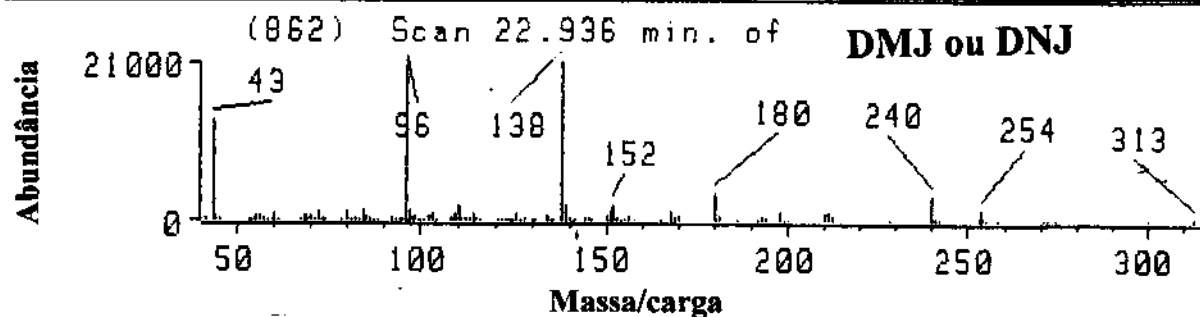
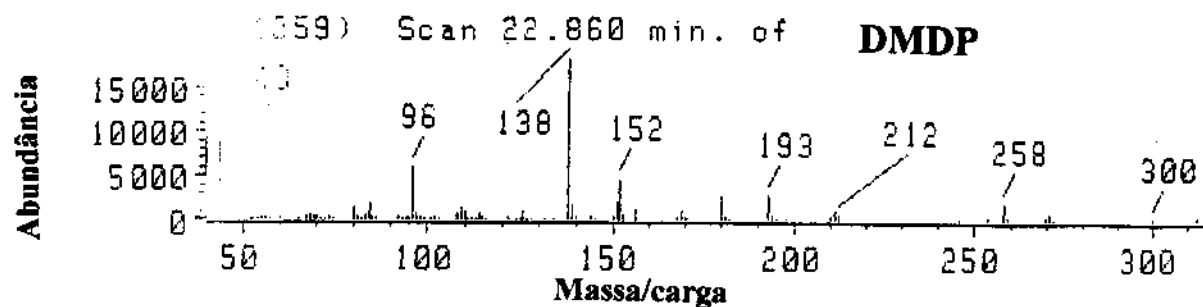


Figura 65. Espectro de massas da mistura de Aza-açúcares

Apêndice B



THREE DIBENZOYLMETHANE DERIVATIVES FROM *LONCHOCARPUS* SPECIES

ADERBAL F. MAGALHÃES*, ANA MARIA A. TOZZI†, EVA G. MAGALHÃES*, IVANI S. BLANCO* and
 MARISA A. NOGUEIRA*

* Instituto de Química, UNICAMP, P.O. Box 6154 CEP., 13081-970-Campinas-São Paulo-Brazil;
 † Instituto de Biologia-UNICAMP

(Received in revised form 14 March 1997)

Key Word Index—*Lonchocarpus latifolius*; *L. muehlbergianus*; roots; Leguminosae; dibenzoyl-
 menthanes.

Abstract—Three new dibenzoylmethane derivatives were isolated from petrol extracts of the roots of *Lonchocarpus latifolius* and *L. muehlbergianus*. Molecular structures were determined from spectroscopic data, especially NMR techniques. An alkyl group bonded to the central carbon (C-8) of a natural dibenzoylmethane, had not been found before. Spectral data analysis suggested a preponderance of the respective diketotautomers.
 © 1997 Elsevier Science Ltd

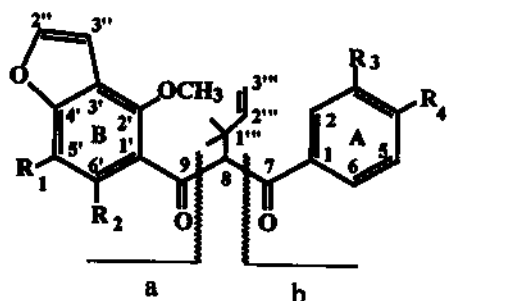
INTRODUCTION

Twenty four Brazilian species of *Lonchocarpus* are recognized from their morphological criteria. Inflorescence structure appeared as an outstanding character. According to this classification *L. muehlbergianus* belongs to the subgenus *Punctati* while *L. latifolius* is placed in the *Densiflori* section of the subgenus *Lonchocarpus*. Both species occur in southern Brazil.

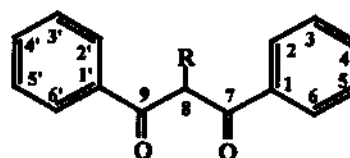
Dibenzoylmethane are rarely found in nature [1]. Among 32 *Lonchocarpus* species previously investigated, only *L. costaricensis* [2] and *L. subglaucescens* [3] furnished such compounds, which were described as β -hydroxychalcone derivatives, because of their high degree of enolization. None of them, possessed a substituent on C-8, although dibenzoylmethane itself (4) has been reacted with allyl halide in the presence of lithium hydroxide monohydrate, furnishing the corresponding C-8 allyl derivative 5 in 92% yield [4]. Some dibenzoylmethane derivatives were synthesized in order to assay their mutagenic activities against *Salmonella tiphymurium* [5].

RESULTS AND DISCUSSION

The roots of each species were extracted with petrol, followed by chromatography on silica gel, allowing the isolation of several flavonoids. Compound 1 was isolated as a yellowish oil. The ¹H NMR spectrum



- 1 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
 2 $R_1 = R_2 = H$ $R_3 = R_4 = -O-CH_2-O-$
 3 $R_1 = R_2 = OCH_3$ $R_3 = R_4 = H$



- 4 $R = H$
 5 $R = \text{allyl}$

(Table 1) showed absorptions corresponding to one free aromatic ring, an uncoupled methynic hydrogen, two *ortho*-coupled hydrogens, one furan ring, one 3,3-dimethylallyl group and one aromatic methoxyl

Table 1. ^1H NMR spectra (300 MHz, CDCl_3) of compounds 1–3

	1	2	3
H-2	8.02 (2H, <i>m</i>)	7.50 (1H, <i>d</i> , $J = 2$)**	7.93–7.90 (2H, <i>m</i>)
H-3	7.45 (3H, <i>m</i>)	—	7.52–7.36 (3H, <i>m</i>)
H-4	7.53 (1H, <i>m</i>)	—	7.52–7.36 (3H, <i>m</i>)
H-5	7.45 (1H, <i>m</i>)	6.84 (1H, <i>d</i> , $J = 8$)††	7.52–7.36 (3H, <i>m</i>)
H-6	8.02 (2H, <i>m</i>)	7.66 (1H, <i>dd</i> , $J = 8$; 2)‡‡	7.93–7.90 (2H, <i>m</i>)
H-8	5.74 (1H, <i>s</i>)	5.64 (1H, <i>s</i>)	5.40 (1H, <i>s</i>)
H-5'	7.17 (1H, <i>dd</i> , $J = 9$; 1)*	7.19 (1H, <i>d</i> , $J = 8$; 1)*	—
H-6'	7.45 (3H, <i>m</i>)	7.42 (1H, <i>d</i> , $J = 8$)	—
H-2''	7.58 (1H, <i>d</i> , $J = 2$)†	7.60 (1H, <i>d</i> , $J = 2$)†	7.54 (1H, <i>d</i> , $J = 2$)†
H-3''	6.93 (1H, <i>dd</i> , $J = 2$; 1)‡	6.95 (1H, <i>dd</i> , $J = 2$; 1)‡	6.80 (1H, <i>d</i> , $J = 2$)†
H-2'''	6.10 (1H, <i>dd</i> , $J = 17$; 11)§	6.10 (1H, <i>dd</i> , $J = 17$; 11)§	6.14 (1H, <i>dd</i> , $J = 17$; 10)§
H-3'''a	4.88 (1H, <i>dd</i> , $J = 11$; 1)	4.88 (1H, <i>dd</i> , $J = 11$; 1)	4.90 (1H, <i>dd</i> , $J = 10$; 1)
H-3'''b	4.92 (1H, <i>dd</i> , $J = 17$; 1)	4.92 (1H, <i>dd</i> , $J = 17$; 1)	4.95 (1H, <i>dd</i> , $J = 17$; 1)
—OCH ₃	3.84 (3H, <i>s</i>)	3.94 (3H, <i>s</i>)	3.78 (3H, <i>s</i>) 3.79 (3H, <i>s</i>) 4.02 (3H, <i>s</i>)
—CH ₃	1.21 (CH ₃) 1.23 (CH ₃)	1.21 (CH ₃) 1.23 (CH ₃)	1.26 (CH ₃) 1.28 (CH ₃)
—O—CH ₂ —O—	—	6.04 (2H, <i>s</i>)	—

* $J_{5,6}$; $J_{5,3}$; † $J_{2,3}$; ‡ $J_{3,2}$; § $J_{3,5}$.§ $J_{2''',3'''}^b$; $J_{2''',3'''}^a$; || $J_{3''',2'''}^a$; $J_{3''',2'''}^b$; ¶ $J_{3''',2'''}^b$; $J_{3''',2'''}^a$.** $J_{2,5}$; †† $J_{5,6}$; ‡‡ $J_{6,5}$; §§ $J_{6,2}$.Table 2. ^{13}C NMR spectra (75 MHz, CDCl_3) of compounds 1–3. DEPT data (90 and 135°) in parenthesis

C DEPT	1*	2	3
1	138.7 (C ₀)	133.5 (C ₀)	135.0 (C ₀)
2	128.9 (CH)	107.7 (CH)	128.6 (CH)
3	128.4 (CH)	148.0 (C ₀)	128.3 (CH)
4	132.7 (CH)	151.5 (C ₀)	132.5 (CH)
5	128.4 (CH)	108.7 (CH)	128.3 (CH)
6	128.9 (CH)	125.2 (CH)	128.6 (CH)
7	195.4 (C=O)	193.3 (C=O)	194.5 (C=O)
8	66.8 (CH)	66.6 (CH)	68.1 (CH)
9	197.6 (C=O)	197.6 (C=O)	196.4 (C=O)
1'	127.2 (C ₀)	126.7 (C ₀)	128.2 (C ₀)
2'	152.3 (C ₀)	152.2 (C ₀)	138.6 (C ₀)
3'	117.4 (C ₀)	118.0 (C ₀)	117.4 (C ₀)
4'	158.8 (C ₀)	158.7 (C ₀)	148.9 (C ₀)
5'	106.6 (CH)	106.7 (CH)	134.5 (C ₀)
6'	126.7 (CH)	126.8 (CH)	144.7 (C ₀)
2''	144.7 (CH)	144.7 (CH)	144.5 (CH)
3''	105.5 (CH)	105.5 (CH)	105.2 (CH)
1'''	41.7 (C ₀)	41.5 (C ₀)	41.6 (C ₀)
2'''	146.1 (CH)	146.1 (CH)	146.0 (CH)
3'''a	111.7 (CH ₂)	111.5 (CH ₂)	111.4 (CH ₂)
3'''b	111.7 (CH ₂)	111.5 (CH ₂)	111.4 (CH ₂)
O—CH ₃	60.0 (CH ₃)	60.4 (CH ₃)	61.0 (CH ₃) 61.1 (CH ₃) 62.4 (CH ₃)
—CH ₃	26.41 (CH ₃) 26.82 (CH ₃)	25.8 (CH ₃) 26.4 (CH ₃)	25.5 (CH ₃) 25.7 (CH ₃)
—OCH ₂ —O—	—	101.8 (CH ₂)	—

* Assignments confirmed by HETCOR (Table 3) and COLOC (Table 4) spectra.

Table 3. Observed correlation in COSY (H-H) and HETCOR (vicinal C-H) spectra of compound 1

δ ^1H (position)	HETCOR (attached carbon)	COSY (coupled hydrogen)
8.02 (H-2; H-6)	128.9 (C2-C6)	7.45 (H-3; H-5)
7.59 (H-2')	144.7 (C2'')	6.87 (H-3'')
7.45 (H-6')	126.7 (C6')	7.18 (H-5')
7.45 (H-3; H-5)	128.4 (C3; C5)	very near
7.53 (H-4)	132.7 (C4)	very near
7.18 (H-5')	106.6 (C5')	7.26-7.54 (H-6')
6.93 (H-3'')	105.5 (C3'')	7.59 (H-2'')
		7.18 (H-5'')
6.10 (H-2'')	146.1 (C2'')	4.87-4.99 (H-3'''a; H-3'''b)
5.74 (H-8)	66.8 (C8)	—
4.88 (H-3'''a)	111.6 (C3''')	6.10 (H-2''')
4.92 (H-3'''b)	111.6 (C3''')	6.10 (H-2''')
3.84 (—OCH ₃)	60.0 (—OCH ₃)	—
1.21	26.4 (C—CH ₃)	—
1.23	26.8 (—CH ₃)	—

135°. Signals at δ 197.6 (C₀) and δ 195.4 (C₀) were assigned to dibenzoylmethane carbonyls [6, 7]. Two-dimensional spectra, such as COSY (Table 3), HETCOR (Table 3) and COLOC (Table 4), were also compatible with this assignment. The most prominent peaks in the mass spectrum could be rationalized as arising from the cleavage of α -carbonyl bonds (Table 5). These findings lead us to conclude that the 3,3-dimethylallyl group must be on C-8, in the middle of the molecule. The lack of a sharp singlet around δ 12-

18 (1H) in the ^1H NMR spectrum, together with the UV spectrum typical of a benzoyl-type chromophore [$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 239 (3.44)] could also be taken as an evidence that the tautomeric equilibrium is highly shifted to the diketone form. In fact, much less steric hindrance is evident from the corresponding diketone molecular model.

In addition, compound 1 was recovered after being left in the presence of CH_2N_2 for 40 hr at room temperature; highly enolized dibenzoylmethanes are rapidly transformed into their methyl-enol derivatives under similar conditions [3, 8]. However, when 1 was refluxed under acidic conditions [HCl, dioxan, 40 hr], several products were detected by TLC. Preparative TLC of the crude reaction product furnished lanceolatin B (7) and pongamol (8), which could have been formed through the reaction pathway shown on Scheme 1.

Compounds 2 and 3 had ^1H NMR (Table 1) and ^{13}C NMR (Table 2) spectra very similar to those of 1, except for a methylenedioxy group on A ring of 2 and two additional methoxyl groups on B ring of 3, confirmed by the most prominent peaks in their mass spectra (Table 5). In the NOE differential spectra of 1 and 2, irradiation of H-8 caused a pronounced enhancement of the H-2 and H-6 signals, but those corresponding to the hydrogens of B ring were little affected (Fig. 1). We suggest the preferential conformation where the A ring benzoyl moiety and the C-8/H-8 bond lie in the same plane, while the B ring benzoyl moiety (R₁) and 3,3-dimethylallyl group (R₂) project out of it, sustaining once more the idea that diketotautomers are the preponderant form of these compounds.

Table 4. Observed long-range C₀-H correlations (J^1) in the COLOC spectrum of compound 1 (See also fig. 2)

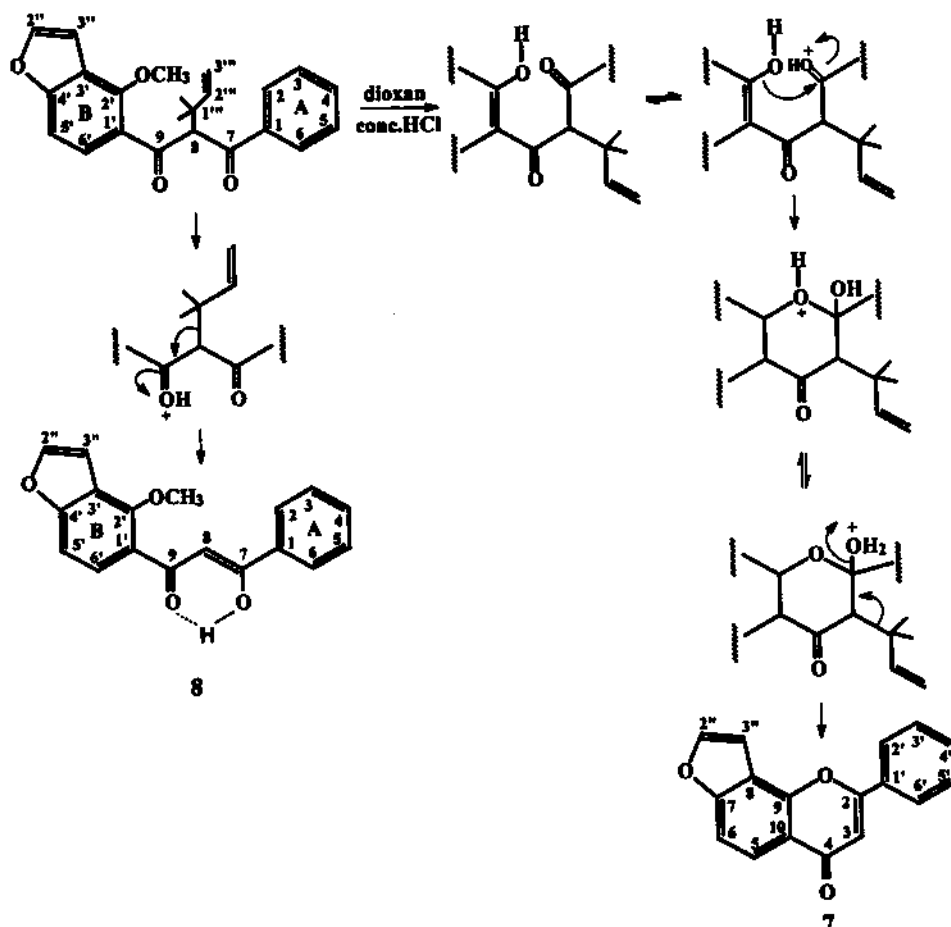
δ $^{13}\text{C}_0$	δ ^1H (ppm)	Carbon assigned
197.57	7.45 (H-6')	C-9
195.41	8.20 (H-2; H-6)	C-7
158.75	7.45 (H-6')	C-4'
152.34	3.84 (—OCH ₃)	C-2'
	7.45 (H-6')	
138.73	8.20 (H-2; H-6)	C-1
127.15	7.18 (H-5')	C-1'
117.43	7.59 (H-2'')	C-3'
41.65	5.74 (H-8)	C-1'''
	4.92 (H-3''')	
	4.87 (H-3''')	
	1.23 (CH ₃)	
	1.21 (CH ₃)	

Table 5. Main fragments (a and b) in the mass spectra of compound 1-3

Compound	m/z (rel. int.)	
	a	b
1	175 (100)	105 (23)
2	175 (100)	149 (17)
3	235 (100)	105 (23)

EXPERIMENTAL

Plant material. Roots of *L. muehlbergianus* (Hassler) were collected at the Ecological Park belong-



Scheme 1. Possible reaction pathway of compound 1 in an acidic medium under reflux.

ing to the Campinas State University (UNICAMP) in the summer of 1992. Those of *L. latifolius* (Wild.) DC were collected at the Instituto Agronômico de Campinas during the winter of 1994. Voucher samples are deposited in the University Herbarium.

Extraction and separation. Dry roots of *L. latifolius* (714 g) and *L. muehlbergianus* (932 g) were separately powdered and extracted for 60 hr in a Soxhlet apparatus with petrol. After solvent evapn, *L. latifolius* gave

a viscous yellow oil (12.5 g) and *L. muehlbergianus*, a viscous brownish oil (9.4 g). Each extract was chromatographed on silica gel, eluting first with petrol. Eluent polarity was gradually increased by addition of CH_2Cl_2 , EtOAc and MeOH to EtOAc–MeOH (1:1). By taking only part of the *L. latifolius* extract (6 g), elution with CH_2Cl_2 followed by prep. TLC in petrol–EtOAc (4:1) gave 1 (200 mg) and 2 (3.0 mg). From the *L. muehlbergianus* extract (9.9 g), elution with petrol–EtOAc (3:2) gave a complex fr. (85.5 mg) which was further submitted to prep. TLC in petrol–EtOAc (9:1), furnishing a less complex fr. (44.7 mg).

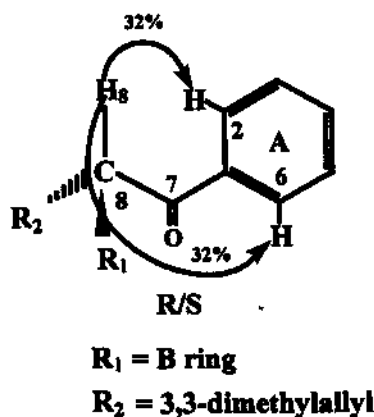
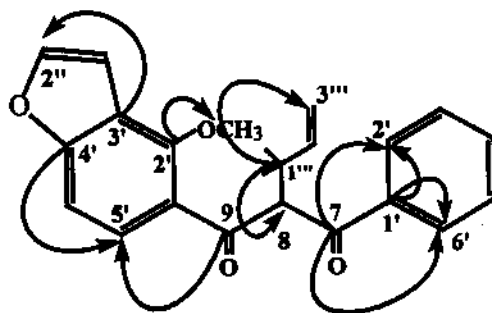


Fig. 1. Preferential conformation of compounds 1–3 based on NOE differential spectra.

Fig. 2. Long-range $\text{C}_\alpha\text{-H}$ correlations in the COLOC spectrum of compound 1.

After two prep. TLC separations in petrol-EtOAc (190:1) compound 3 (11 mg) was isolated.

2'-Methoxy-[2'',3'',4',3']-furanodibenzoylmethane (1). Viscous yellowish oil. $[\alpha]_D^{20} = +28.31$ (c 0.84, CH_2Cl_2). UV λ_{max} nm (log ϵ) 239 (3.44). IR ν_{max} cm^{-1} (film CH_2Cl_2): 3055, 2956, 2925, 1698, 1597, 1468, 1355, 1266, 1074, 738. HR-EIMS, m/z : Found 362.14418 $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_4$ requires 362.15180). GC-MS 70 eV, m/z (rel. int.): 362 $[\text{M}]^+$ (2), 334 (6), 319 (10), 263 (20), 175 (100), 160 (20), 105 (25), 77 (27).

3,4-Methylenedioxy-2'-methoxy-[2'',3'':4'4']-furanodibenzoylmethane (2). Viscous yellowish oil. UV λ_{max} nm (log ϵ) 236 (3.47), 266 (3.05), 310 (2.89). IR ν_{max} cm^{-1} (film CH_2Cl_2): 3055, 2987, 1723, 1700, 1507, 1157. EIMS 70 eV, m/z (rel. int.): 406 $[\text{M}]^+$ (0.4); 307 (5); 263 (10); 175 (100); 160 (17); 149 (17).

2',5',6'-Trimethoxy-[2'',3'':4',3']-furanodibenzoylmethane (3). Viscous yellowish oil. UV λ_{max} nm (log ϵ) 247 (3.87). IR ν_{max} cm^{-1} (film CH_2Cl_2): 3386, 2936, 1709, 1594, 1478, 1423, 1347, 1265, 1133, 1108, 1067, 736, 701. EIMS 70 eV, m/z (rel. int.): 422 $[\text{M}]^+$ (7); 235 (100); 220 (11); 175 (4); 105 (11); 77 (10); 69 (5).

Transformation of 1. Compound 1 (60 mg) was refluxed in dioxane (3 ml) and conc. HCl (3 ml) under reflux for 40 hr. After usual work-up, the reaction mixt. (53.2 mg) was submitted to prep. TLC in hexane-EtOAc (17:3), furnishing the flavone 7 (15.5 mg) and the β -hydroxychalcone 8 (3.5 mg), which were identified as lanceolatin B [9] and pongamol [10], respectively, from their ^1H NMR.

Acknowledgements—The authors are grateful to

CAPES and FAPESP for financial support and the scholarships awarded to I.S.B. and M.A.N.

REFERENCES

1. Demizu, S., Kajiyama, K., Hiraga, D., Kinoshida, K., Koyama, K., Takahashi, K., Tamura, D., Okada, K. and Kinoshida, T., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1992, **40**, 392.
2. Waterman, G. P. and Mahmoud, E. N., *Phytochemistry*, 1985, **24**, 571.
3. Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. A. G., Salles, B. H. L. N. and Magalhães, E. G., *Phytochemistry*, 1996, **42**, 1459.
4. Antonioletti, R., Bonadies, F., Orelli, L. R. and Scettri, A., *Gazzeta Chimica Italiana*, 1992, **122**, 237.
5. Choshi, T., Horimoto, S., Wang, C. Y., Nagase, H., Ichikawa, M., Sugino, E. and Hibino, S., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1992, **40**, 1047.
6. Zeng, L., Fukai, T., Kanesi, T., Nomura, T., Zhang, R. Y. and Lou, Z. C., *Heterocycles*, 1994, **34**, 85.
7. Fukai, T., Nishizaka, J. and Nomura, T., *Phytochemistry*, 1994, **35**, 515.
8. Kiuchi, F., Chen, Y. and Tsuda, Y., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1990, **38**, 1862.
9. Tanaka, T., Iinuma, M., Yuki, K., Fujii, Y. and Mizuno, M., *Phytochemistry*, 1992, **31**, 534.
10. Parnar, V. S., Ratthore, J. S., Jain, R., Henderson, D. A. and Malone, J. F., *Phytochemistry*, 1989, **28**, 591.

**ENSAYOS BIOLÓGICOS CON EXTRACTOS
OBTENIDOS DE RAÍCES DE *Lonchocarpus latifolius*
(WILLD) D.C.Y DE UN NUEVO
DIBENZOILMETANO AISLADO**

Aderbal F. Magalhães²

Ana M. A. Tozzi³

Eva G. Magalhães²

Marisa A. Nogueira²

Victor J. Flórez Roncancio⁴

1. Introducción

Lonchocarpus Kunth es uno de los géneros más numerosos de las leguminosas tropicales (1). *Lonchocarpus latifolius* (Willd.) D.C. es un árbol ornamental, ampliamente distribuido en las Antillas, América Central y en el norte de América del Sur. En Brasil, ésta especie se encuentra en los Estados de Pará y São Paulo y se cultiva en Minas Gerais y Rio de Janeiro. Del extracto éter de petróleo, obtenido de las raíces de *L. latifolius* se aisló un nuevo dibenzoilmetano, cuya estructura molecular se determinó por medio de los espectros de UV, IR, EM, RMN ¹H y RMN ¹³C y de espectros bidimensionales (COSY, HETECOR y COLOC) (2). El metabolito secundario predominante, fue dibenzoilmetano, el cual se cuantificó por HPLC en extractos de raíces, hojas y semillas. Se realizó el estudio biológico de los extractos en éter de petróleo, en cloroformo y en metanol y del nuevo dibenzoilmetano, aplicando las pruebas de bioautografía y antibiograma y el bioensayo de germinación de semillas de lechuga.

¹Aceptado para publicación en --.98

²Instituto de Química de la Universidad Estatal de Campinas - UNICAMP, CP 6154, CEP: 13081-970, Fax: No. 9055-019-2393805 Campinas - SP, Brasil, E-mail: marisa@iqm.unicamp.br.

³Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas - UNICAMP, CEP: 13081-970, Campinas - SP, Brasil

⁴Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional, Santafé de Bogotá, Colombia, Apartado 14490, Fax: No. 3681448, E-mail: vjflorez@bacata.usc.unal.edu.co.

2. Materiales y Métodos

2.1. Bioensayo para la actividad bactericida y fungicida (Bioautografía)

Los extractos éter de petróleo, diclorometano y metanólico y el nuevo dibenzoilmetano puro fueron disueltos en los respectivos solventes en concentración de 1mg/mL. Inmediatamente después se aplicaron en las placas de cromatografía de capa fina (Silica gel G F₂₅₄ Merck 6cm x 6cm) en la proporción de 20µg, junto con el antibiótico, en la proporción de 2µg, y eluidos con hexano:AcOEt (80:20). El eluyente se evaporó y las placas se observaron en lámpara de UV en las longitudes de onda de 254nm y 365nm. Las sustancias que absorbieron en estas longitudes de onda se marcaron en una de las placas de cromatografía (placa testigo) y se pulverizó con revelador específico (anisaldeído modificado). La otra placa cromatográfica se colocó dentro de una caja de Petri de 90mm de diámetro, a la cual se adicionaron 20mL del medio de cultivo específico para cada microorganismo. Se aplicaron, uniformemente, 100µL de una suspensión de concentración aproximada de 10⁶ células/mL. Se prepararon dos cajas de Petri, una con la placa cromatográfica y la otra, solo, con el medio de cultivo del microorganismo (caja blanco) para evaluar su crecimiento. Las dos cajas se incubaron (24h para bacterias y 7 días para hongos) a temperatura específica para cada microorganismo (37°C para bacterias y 25°C para hongos) y, después, se evaluaron los halos de inhibición y se comparó con la placa testigo.

Los medios de cultivo utilizados fueron: para bacterias, NA (agar nutritivo), constituidos por 5g peptona + 3g de extracto de carne + 15g de agar + 1L de agua destilada y, para hongos, MA (agar malte), constituidos de 20g de extracto de malte + 20g de agar.

2.2. Bioensayo de Antibiograma

La prueba de antibiograma fue realizada de acuerdo con la metodología de la United States Pharmacopea (USP XXIII), para dosificación de antibióticos. Para la obtención de resultados más homogéneos, el inóculo se sembró sobre agar nutritivo en una capa fina. Se emplearon discos de papel, impregnados con la muestra prueba, los cuales fueron distribuidos sobre la placa. Para cada conjunto de ensayos, se prepararon cuatro placas. Después de la incubación, se midió el diámetro de los halos formados.

2.3. Bioensayo de germinación en semillas de lechuga

Este bioensayo se realizó de acuerdo con la descripción de Weeb & Wareing (5). Se emplearon semillas de lechuga del cultivar "Grand Rapids", las cuales se colocaron en cajas de Petri de 90mm de diámetro, formando una cámara húmeda con los extractos para evaluar. Se realizaron cuatro repeticiones con 20 semillas por placa.

3. Resultados y Discusión

Se verificó que el nuevo dibenzoilmetano (Figura 1) se encuentra en gran cantidad en extractos éter de petróleo de raíces y, en menor cantidad en hojas y semillas de *L. latifolius* (Cuadro 1). Asumiendo que esta sustancia, en estas cantidades, puede actuar como una fitoalexina, sustancia de defensa común en plantas de la orden Leguminosae, se procedió a realizar los bioensayos de bioautografía con hongos y bacterias de las cepas más conocidas y el bioensayo de inhibición de germinación de semillas de lechuga en los extractos éter de petróleo de raíces. Algunas especies de las Leguminosae producen fitoalexinas, independientemente del agente causal. Los agentes causales puede ser infestación por microorganismos u otros factores, como temperatura o radiación UV (3).

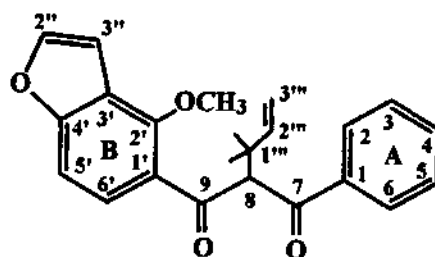


Figura 1. Nuevo dibenzoilmetano aislado

Cuadro 1- Cuantificación del dibenzoilmetano aislado de los extractos éter de petróleo de raíces, hojas y semillas de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) D.C. por HPLC

Sustancia	Cantidad de substancia en el extracto éter de petróleo mg/g		
	Raíces	Hojas	Semillas
Nuevo dibenzoilmetano aislado	8,053	3,673	1,021

En el bioensayo de bioautografía se probaron seis bacterias (Cuadro 2) y siete hongos, de los cuales seis eran filamentosos y otro levadura (Cuadro 3). Los extractos éter de petróleo, diclorometano y el dibenzoilmetano fueron positivos, solamente, para la bacteria *Bacillus subtilis* (Cuadro 2). Para los hongos ensayados, los extractos éter de petróleo y diclorometano presentaron actividad para *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae*. Solamente el nuevo dibenzoilmetano presentó actividad para *Aspergillus niger* (Cuadro 3).

Cuadro 2- Bacterias utilizadas en la prueba bioautográfica con extractos de raíces de *Lonchocarpus. latifolius* (Willd) D.C.

Bacterias	Extractos			Sustancia
	E P	CH ₂ Cl ₂	MeOH	
<i>Escherichia coli</i> (gram -) ^a	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> (gram +) ^b	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (gram +) ^c	+	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (gram +) ^d	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> (gram +) ^e	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (gram -) ^f	-	-	-	-

a CCT 5050; b CCT 0541; c CCT 0089; d CCT 4295; e CCT 2720; f CCT 0528

E P: éter depetróleo; CH₂Cl₂: diclorometano; MeOH: metanol; 1: Nuevo dibenzoilmetano aislado

Cuadro 3- Hongos utilizados en la prueba bioautográfica con extractos de raíces de *Lonchocarpus. latifolius* (Willd) D.C.

Hongos	Extractos			Sustancia
	E P	CH ₂ Cl ₂	MeOH	
<i>Candida albicans</i> ^a	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ^b	++++	++++	-	++++
<i>Penicillium funiculosum</i> ^c	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> ^d	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i> ^e	++++	++++	-	-
<i>Alternaria alternata</i> ^f	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> ^g	-	-	-	-

a CCT 0776; b CCT 1435; c CCT 0490; d CCT 3244; e CCT 4964; f CCT 1250; g CCT 01277

E P: éter depetróleo; CH₂Cl₂: diclorometano; MeOH: metanol; 1: Nuevo dibenzoilmetano aislado

Luego de verificar que el nuevo dibenzoilmetano fue activo, solamente, para la bacteria *B. subtilis*, se realizó el antibiograma para comprobar el MIC (Mínima Concentración Inhibitoria) (Cuadro 4), donde se observó que el nuevo dibenzoilmetano es activo a partir de la concentración de 10µg.

De acuerdo con los datos observados, el nuevo dibenzoilmetano es activo para el *Bacillus subtilis* y para el *Aspergillus niger*, pero no se puede afirmar que sea una fitoalexina producida por infestación de microorganismos, porque pudieron influir otras variables ambientales.

Cuadro 4- Resultados obtenidos en el antibiograma para el nuevo dibenzoilmetano

Dosis ($\mu\text{g}/\text{disco}$)	Repetición (halos en mm)				
	1	2	3	4	Medias
0	0	0	0	0	0
10	8	9	10	10	9,25
20	10	10	11	11	10,50
30	10	11	10	11	10,50
40	11	11	11	11	11,00
50	12	11	12	11	11,50

En el bioensayo de germinación de semillas de lechuga, los tres extractos presentaron actividad inhibitoria sobre la germinación. La actividad fue más acentuada en los extractos metanólico y diclorometano, en las diluciones de 5, 10 y 12,5 mg/mL (Cuadro 5)

Cuadro 5- Influencia de la dilución de los extractos sobre la % de germinación de semillas de lechuga

Diluciones (mg/mL)	% de Germinación					
	24 h			48 h		
	E P	CH ₂ Cl ₂	MeOH	E P	CH ₂ Cl ₂	MeOH
Blanco	86 ^a	80 ^a	92 ^a	93 ^a	95 ^a	98 ^a
Testigo	88 ^a	84 ^a	-	98 ^{ab}	96 ^a	-
2,5	71 ^{ab}	55 ^b	78 ^a	86 ^b	90 ^{ab}	94 ^a
5	80 ^{ab}	40 ^{bc}	35 ^b	90 ^{ab}	89 ^{ab}	71 ^{ab}
10	58 ^b	21 ^c	4 ^c	83 ^b	85 ^b	56 ^b
12,5	66 ^{ab}	35 ^{bc}	0 ^c	88 ^a	89 ^{ab}	43 ^b

De acuerdo con los datos observados, se verificó la presencia de sustancias que inhiben la germinación de semillas de lechuga, principalmente, en el extracto metanólico. Esta inhibición no esta asociada con la presencia del nuevo dibenzoilmetano aislado, ya que en el extracto éter de petróleo, donde esta sustancia esta presente en gran cantidad, la inhibición no fue significativa. En *Lonchocarpus sericeus* (Poir) H. B. K., una especie que pertenece a la misma subclase de *Lonchocarpus latifolius* (Willd.) D.C, la actividad esta asociada con la presencia de un aminoácido no esencial (3-[2-amino-2-imidazolin-4-il]alanina) (4). La actividad alelopática de *L. latifolius* (Willd.) D.C, también, podría estar asociada con la presencia de aminoácidos, por lo cual, se realizó un análisis por cromatografía de capa fina con en el extracto metanólico, donde se identificó aminoácidos.

4. Resumen

Lonchocarpus latifolius (Willd.) D.C. es un árbol de 3 a 4m de altura. Del extracto éter de petróleo obtenido de las raíces, se aisló un nuevo dibenzoilmetano. Este fue el metabolito secundario predominante, que se cuantificó por HPLC en extractos de raíces, hojas y semillas. El metabolito se encontró en mayor proporción en extractos de raíces, por lo cual se realizó el estudio biológico de los extractos éter de petróleo, diclorometano y metanólico, así como del nuevo dibenzoilmetano puro. Se aplicaron las pruebas de bioautografía y antibiograma, y el bioensayo de la germinación de semillas de lechuga. Los extractos éter de petróleo, diclorometano y el nuevo dibenzoilmetano fueron positivos para *Bacillus subtilis* y presentaron actividad para *Aspergillus niger*. Los extractos éter de petróleo y diclorometano, tambien fueron activos para *Cladosporium cladosporioides* e *Rhizopus orizae*. En el bioensayo de germinación de semillas de lechuga presentaron actividad mas acentuada los extractos metanólico y diclorometano.

5. Summary

BIOLOGICAL BIOASSAY IN ROOTS EXTRACTS OF *Lonchocarpus latifolius* (Willd) D. C. AND OF A NEW DIBENZOYLMETHANE DERIVATIVE

Light petroleum extracts from roots of *Lonchocarpus latifolius* furnished a new dibenzoylmethane compound. It was the most abundant compound and was quantified in HPLC analysis of light petroleum extracts of roots, leaves and seeds. The light petroleum extract, dichloromethane extract and new dibenzoylmethane derivative were tested against some fungi and bacteria through the bioautography method and showed activity against *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger*. Light petroleum and dichloromethane extracts of roots showed activity against *Cladosporium cladosporioides* and *Rhizopus orizae*. The dichloromethane and methanol extracts of roots were the most active in the bioassay, inhibiting lettuce seed germination.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Tropical de Investigación y Tecnología "André Tosello", Campinas - São Paulo, Brasil, por los cultivos de microorganismos utilizados en las pruebas bioautográficas y por el análisis del antibiograma; y a la Sección de Semillas del Instituto Agronómico de Campinas (IAC), São Paulo, Brasil.

7. Bibliografía

1. LEWIS, G. P. y OWEN, P. E. 1989. Legumes of Ilha de Maracá Royal Botanic Gardens Kew, 95p.
2. MAGALHÃES, A. F., TOZZI, A. M. A., MAGALHÃES, E. G., BLANCO, I. S. y NOGUEIRA, M. A. 1997. Three new dibenzosilmetane isolated from *Lonchocarpus* species. *Phytochemistry*, 46 (6):1029-1033.
3. AFZAL, M., AL-ORQUAT, G. 1986. Proton magnetic resonance spectra of pterocarpin and related phytoalexins. *Heterocycles*, 24(10):2911-2941.
4. WILSON, M. F. y BELL, A. 1978. Amino acids and β -aminopropionitrile as inhibitors of seeds germination and growth. *Phytochemistry*, 17:403-406.
5. WEBB, D. P. y WAREING, P. F. 1972. Seed dormancy in *Acer*: endogenous germinating inhibitors and dormancy in *Acer pseudoplatanus* L. *Planta*, 104:115-25.