



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS RAÍZES DE *LONCHOCARPUS*
*CAMPESTRIS-TOZZI***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARLOS ALBERTO FIRMINO

ORIENTADOR: PROF. Dr. ADERBAL FARIAS MAGALHÃES

SETEMBRO, 1998



UNIDADE	IA		
N.º CHAMADA:	UNICAMP		
	F518e		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	38973		
PROC.	229199		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	07/10/99		
N.º CPD			

CM-00126396-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

F518e Firmino, Carlos Alberto
Estudo fitoquímico das raízes de *Lonchocarpus*
Campestris-Tozzi / Carlos Alberto Firmino. - - Campinas, SP :
[s.n.], 1998.

Orientador: Aderbal Farias Magalhães
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química.

1. *Lonchocarpus Campestris*. 2. Leguminosae. 3. Flavanonas
Preniladas. I. Magalhães, Aderbal Farias. II. Universidade Es-
tadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

†

À Nalva, à vó Cida, aos meus Pais e irmãos, aos avós Nica e Sebastião (in memória), cujo apoio e incentivo foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradecimentos

◆A D. Maria, o Fontana, Everaldo, Iara, Paula, Rose, Nelson, o André e a Bel pelos inúmeros auxílios prestados.

◆A Sônia Fanelli, Paula Pilli e Sônia Crisóstomo, pelos espectros de RMN, Sônia Queiroz pelo auxílio nas análises por CLAE, a Zelinda e o Cidão pelos espectros de massas e a Bete pelas instruções no espectrômetro Bruker AC-80.

◆O Prof. Dr. Paulo Eduardo Pizão do CPQBA-Campinas, pelos ensaios contra as células cancerosas.

◆A CAPES e a FAPESP pelo suporte financeiro.

Agradecimentos especiais

◆O Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães cuja orientação tornou possível a realização deste trabalho.

◆A Prof^ª. Dra. Eva Gonçalves Magalhães pelas sugestões e ensinamentos.

◆A Prof^ª. Dra. Lúcia Helena Baptistella Brito, Prof^ª. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli, e o Prof. Dr. Antonio Claudio Herrera pelos auxílios nas respectivas disciplinas "Química Orgânica Avançada", "Métodos Físicos em Química Orgânica" e "Estereoquímica".

◆A Valéria, Miriam, Marisa Alves, Ana Lúcia, Celira, Maria Pilar, Luiz e Giordano; o Renato, Paulo, Laverde, Bira, Gelson, Claudio, André, Mariza, Denise, Clara, Catarina e a Raquel pela carinhosa amizade, apoio em equipe e pelos bons momentos compartilhados.

†

Acredite na beleza da trama vital
e a harmonia tomará conta de seu ser
e assim no mais belo silêncio contemplará
o nobre sentido da sua existência.

anônimo

ÍNDICE

Introdução.....	1
Objetivos.....	12
Capítulo 1 Breve Revisão Sobre os Métodos Modernos de Determinação Estrutural de Flavonóides.....	13
Capítulo 2 Resultados e Discussão.....	37
Capítulo 3 Parte Experimental.....	81
Capítulo 4 Atividade biológica.....	90
Capítulo 5 Correlações Taxonômicas de <i>Lonchocarpus campestris</i> e <i>Derris mollis</i>	93
Conclusão Final.....	96
Apêndices Referências Bibliográficas Espectros.....	97

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CC	cromatografia em coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
COLOC	espectro bidimensional de correlação heteronuclear (C,H) a três ligações
DEPT	espectro de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
EM	espectro de massas
eV	elétron-volt
HETCOR	espectro bidimensional de correlação heteronuclear (C,H) a uma ligação
HMQC	espectro bidimensional de coerência múltiplo quantum heteronuclear (C,H) a uma ligação
Hz	hertz
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m/z</i>	razão massa carga
<i>M</i>	íon molecular
<i>m</i>	múltiplo
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-13
δ	deslocamento químico
$[\alpha]_D$	rotação óptica específica
UV	ultravioleta

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nome: Carlos Alberto Firmino.
Filiação: Moacir Firmino e Rosa Maria Pitanga Firmino.
Data de Nascimento: 10 de setembro de 1966.
Nacionalidade: brasileira.
R.G.: 17 570 489 -2; **CPF:** 067 705 808 02.

Formação Acadêmica

2º grau: Colégio Técnico de Limeira (Cotil- Unicamp);
Curso: Técnico em Mecânica;
Período: 1983- 1987.

Superior: Universidade Metodista de Piracicaba (Unimep- Centro de Ciências Exatas)
Curso: Licenciatura em Ciências- Habilitação Química.
Período: Fev./1991- Jul./1995.

Dados Profissionais

Empresa: Oriente Máquinas e Equipamentos Ltda.
Função: Líder- Controle de Qualidade.
Período: Mar./1987- Nov./1994.

Empresa: Colégio Procotil.
Função: Professor de Química.
Período: Mai./1995- Mai./1996.

Empresa: Centro Estadual de Educação Tecnológica "Paula Souza".
Função: Professor de Química.
Período: Mai./1996- Fev./1997.

Resumos Publicados em Congressos

MAGALHÃES, A.F., FIRMINO, C.A., TOZZI, A.M.G.A., MAGALHÃES, E.G., "Estudo Fitoquímico Das Raízes de *Lonchocarpus campestris*", Livro de Resumos da XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN-30, Poços de Caldas S.P., 1998.

MAGALHÃES, A.F., FIRMINO, C.A., TOZZI, A.M.G.A., MAGALHÃES, E.G., "Uma Nova Flavanona de *Lonchocarpus campestris*", Suplemento da XX Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, PN-8, Rio de Janeiro, R.J., 1998.

RESUMO

O estudo fitoquímico dos extratos hexânico e diclorometânico das raízes de *Lonchocarpus campestris*, resultou no isolamento de oito flavonóides (1-8), cujas estruturas moleculares foram determinadas por métodos espectroscópicos. Dentre estes, duas flavanonas são inéditas, 4'-metóxiisoderricina A (7) e 4'-metóxiisolonchocarpina (8).

Apenas os flavonóis 2 e 3, estão dentre os seis flavonóides registrados para *Derris mollis*, até então entendida como sinóníma de *L. campestris*.

A análise qualitativa dos extratos estudados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, demonstrou que aqueles flavonóides isolados constituem os principais picos nos referidos cromatogramas.

O estudo da atividade biológica, *in vitro*, dos extratos com microrganismos fúngico (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides* e *Rhizopus oryzae*) e bacteriano (*Bacillus subtilis*), demonstrou ser estes extratos inativos àqueles microrganismos. Do mesmo modo, apresentou-se inativa, a nova flavanona (7), nos ensaios de citotoxicidade, *in vitro*, com as linhagens de células cancerígenas.

Finalmente, o diversificado perfil estrutural dos flavonóides isolados de *L. campestris* (flavonóis, pterocarpano, chalcona e flavanonas), comparado ao dos flavonóides registrados para *D. Mollis* (apenas flavonas e flavonóis), e ainda, os divergentes valores médios de oxidação/metilação demonstraram a nítida distinção entre estas duas espécies.

ABSTRACT

The phytochemical study of hexane and dichlorometane extracts from *Lonchocarpus campestris* roots allowed the isolation of eight flavonoids (1 - 8) and their molecular structures were determined through spectroscopic methods. Two of them are new compounds (7 - 8).

The flavonoids 2 and 3 are among the six flavonoids which were previously isolated from *Derris mollis*, until now being taken as sinonimous of *L. campestris*.

Qualitative analysis of the extracts from roots of the *L. campestris*, by using HPLC on reverse phase showed that flavonoids 1 - 8 correspond to the main peaks on the cromatograms.

The study of biological activity "*in vitro*" of the extracts against fungi (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides* e *Rhyzpus oryzae*) and bacteria (*Bacillus subtilus*) was made through bioautography when no activity was observed. The new flavanona (7) was inactive when submitted to citotoxicity "*in vitro*" by using lineages of cancer cells.

The flavonoids profile of *L. campestris* (flavonols, pterocarpan, chalcone and flavanones) is different from that of *D. mollis* (only flavones and flavonols), as well as the corresponding mean values of oxidation / methylation. These findings demonstrate that *L. campestris* and *D. mollis* are distinct species.

I - INTRODUÇÃO

I.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Leguminosae ou Fabaceae *sensu lato* é a segunda maior família dentre as dicotiledôneas, mas economicamente ela é muito mais significativa do que até mesmo a família Compositae. Compreende cerca de dezoito mil espécies e mais de seiscentos e cinquenta gêneros. Leguminosae possui distribuição cosmopolitana. É abundante nos trópicos, sub-trópicos e regiões temperada de ambos os hemisférios e ainda em habitats alpinos e sub-ártico¹.

Está subdividida em três sub-famílias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae* as quais são consideradas famílias independentes por alguns taxonomistas. As duas primeiras são encontradas principalmente em regiões tropicais, enquanto que a terceira apresenta distribuição mundial^{1,2}.

Em importância ao homem, a Leguminosae aproxima-se da Gramineae, uma das maiores famílias das monocotiledôneas. A família Leguminosae fornece alimentos, forragem, materiais fibrosos e de coloração, gomas e resinas, taninos, inseticidas e moluscicidas, substituintes do sabão, um grande número de drogas brutas medicinais e ervas, arbustos e árvores ornamentais. Além do mais, muitos bosques de legumes se constituem em valiosos mananciais no controle de erosão e agroflorestamento em regiões áridas e desérticas¹.

No âmbito da sub-família *Papilionoideae* encontra-se o gênero *Lonchocarpus*, compreendendo cerca de cento e cinquenta espécies distribuídas nas Antilhas e na África e, em maior concentração, nas Américas do Sul e Central. O primeiro trabalho que trata o gênero *Lonchocarpus* como um todo, no Brasil, foi realizado por Bentham, em 1862, citado por Tozzi².

As várias posições sistemáticas propostas para o gênero *Lonchocarpus*, mostram a ausência de um consenso entre os estudiosos do grupo, pois várias de suas características morfológicas se intersectam com as de outros gêneros tais como *Derris*, *Pongamia*, *Millettia*, *Deguelia*, *Piscida* e *Muelleria*².

A Dra. Ana M. Tozzi², acaba por alocar as espécies que foram descritas para os gêneros *Lonchocarpus*, *Derris* e *Deguelia* que ocorrem no Brasil, distribuindo-as exclusivamente em *Lonchocarpus* e *Deguelia*. Assim, em 1989 apresentou uma revisão dos estudos taxonômicos destes gêneros com base na estrutura da inflorescência das espécies. Sobre estes estudos nos orientamos para a consecução deste trabalho.

Em 1942, atribuiu-se a uma determinada exsicata proveniente do Sul do Brasil, a denominação de *L. leucanthus*, cuja ocorrência em território brasileiro não é referida na literatura botânica. Mas, na revisão taxonômica realizada por Tozzi, uma das espécies provenientes das regiões Sudeste e Nordeste foi denominada *L. campestris*. Embora houvesse grandes semelhanças morfológicas entre esta espécie e *L. leucanthus* (por exemplo, *L. mollis*), ainda que a análise da estrutura da inflorescência não foi capaz de concluir suas classificações, persiste até hoje a identidade destas duas espécies. Entretanto, desta revisão ficou clara a separação

dos gêneros *Lonchocarpus* e *Deguelia* das espécies brasileiras, os quais ficaram assim definidos: 23 espécies contidas no primeiro e 18 no segundo gênero ².

Propôs-se ainda que o gênero *Lonchocarpus* seja dividido em dois sub-gêneros: *Lonchocarpus* sub-gênero *Punctati* e *Lonchocarpus* sub-gênero *Lonchocarpus* o qual encontra-se dividido em cinco seções. Das 23 espécies brasileiras reconhecidas, 8 foram alocadas no sub-gênero *Punctati* e as demais no sub-gênero *Lonchocarpus* ².

Por outro lado, Harborne ⁴ apregoa que dependendo do grupo de plantas e do grau de variação estrutural de seus metabólitos secundários, pode-se estabelecer nítidas correlações quimiotaxonômicas entre elas. Naquela década, 1970, Bohmann e col. ⁵ realizavam um formidável estudo quimiotaxonômico no âmbito das Asteraceae, baseado na ocorrência de poliacetilenos. De fato, na última década, Gottlieb e col. ⁶ deram um grande salto na utilização dos compostos flavonoídicos visando a sistemática das espécies da sub-família *Papilionoideae*, em função do nível de oxidação/ metilação destes compostos orgânicos.

O estudo fitoquímico dos extratos das raízes de *L. campestris* ⁷, enfatizando a identificação de seus metabólitos secundários, em particular de seus flavonóides, foi por nós decidido em conjunto com a botânica Ana M. G. A. Tozzi ², na expectativa de contribuir com a definição taxonômica desta espécie, como acima descrito, uma vez que dispomos dos resultados fitoquímicos da espécie *L. mollis* ^{3,8} (*L. leucanthus*).

L. campestris é uma arvoreta ou árvore de pequeno porte, geralmente de 4 - 8 m de altura e cerca de 15cm de diâmetro. Distribui-se na região Sul do Brasil, estendendo-se para os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia, da Paraíba ao Ceará e na Argentina até o Paraguai. Nota-se o padrão de distribuição contínuo na região Sul e do Sudeste do Brasil, a ausência da espécie no Rio de Janeiro e a disjunção verificada na distribuição geográfica na região Nordeste.

L. campestris é nativa de formações florestais, especialmente em matas ciliares, secundárias e pluviais. Encontrada também em capoeiras, pastagens e campos e na região Nordeste adentrando pela caatinga. Foi verificada a sua ocorrência em lugares secos, em solos arenosos, podzólicos e rochosos, do tipo rupestre, em vegetação campestre até arbustivo- arbórea e ainda, em altitudes de até 1000 m. É citada como uma das árvores típicas dos campos do nordeste paraguaio ².

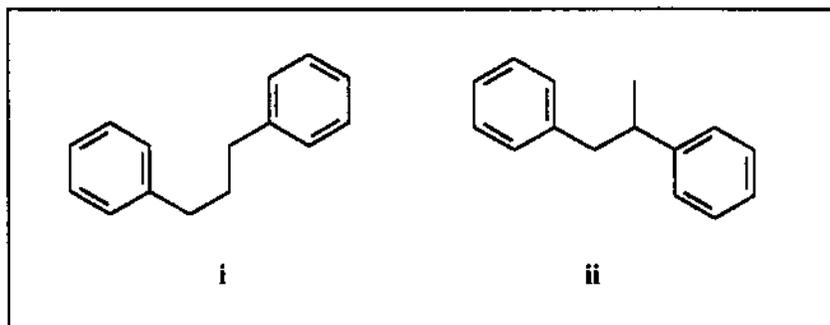
L. campestris é popularmente conhecida como **Angelim-bravo** no Ceará, **Embira-de-sapo** em São Paulo e Minas Gerais, **Maracanã** e **Pau-de-canzil** em Santa Catarina, **Sapuva**, **Pau-de-óleo** ou **Pau-de-olho** em São Paulo, **Rabo-de-Bugio** no Paraná, **Rabo-de-macaco** e **Yvira-itá** na Argentina e **Robinia-pseudo-acácia** no Paraguai ².

A planta *L. campestris* é classificada da seguinte forma ²:

Família: Leguminosae
Sub-família: *Papilionoideae*
Tribo: *Millettiae*
Gênero: *Lonchocarpus*
Sub-gênero: *Lonchocarpus*
Secção: *Laxiflori* Benth
Espécie: *L.campestris*

I. 2 - BIOSÍNTESE DE FLAVONÓIDES

Os flavonóides ⁸, um dos mais diversos e expressivos grupos de produtos naturais ocupam uma proeminente posição entre os fenóis naturais. Dividem-se em dois principais grupos: os flavonóides, no sentido estrito, e os isoflavonóides. As classes flavonoídicas mais comuns são constituídas por um esqueleto molecular básico, cuja biossíntese mista, compreende uma unidade C_6C_3 e três unidades acetato, ou seja, os bi-arilpropanóides ou 1,3-difenilprop(e)anos (i).



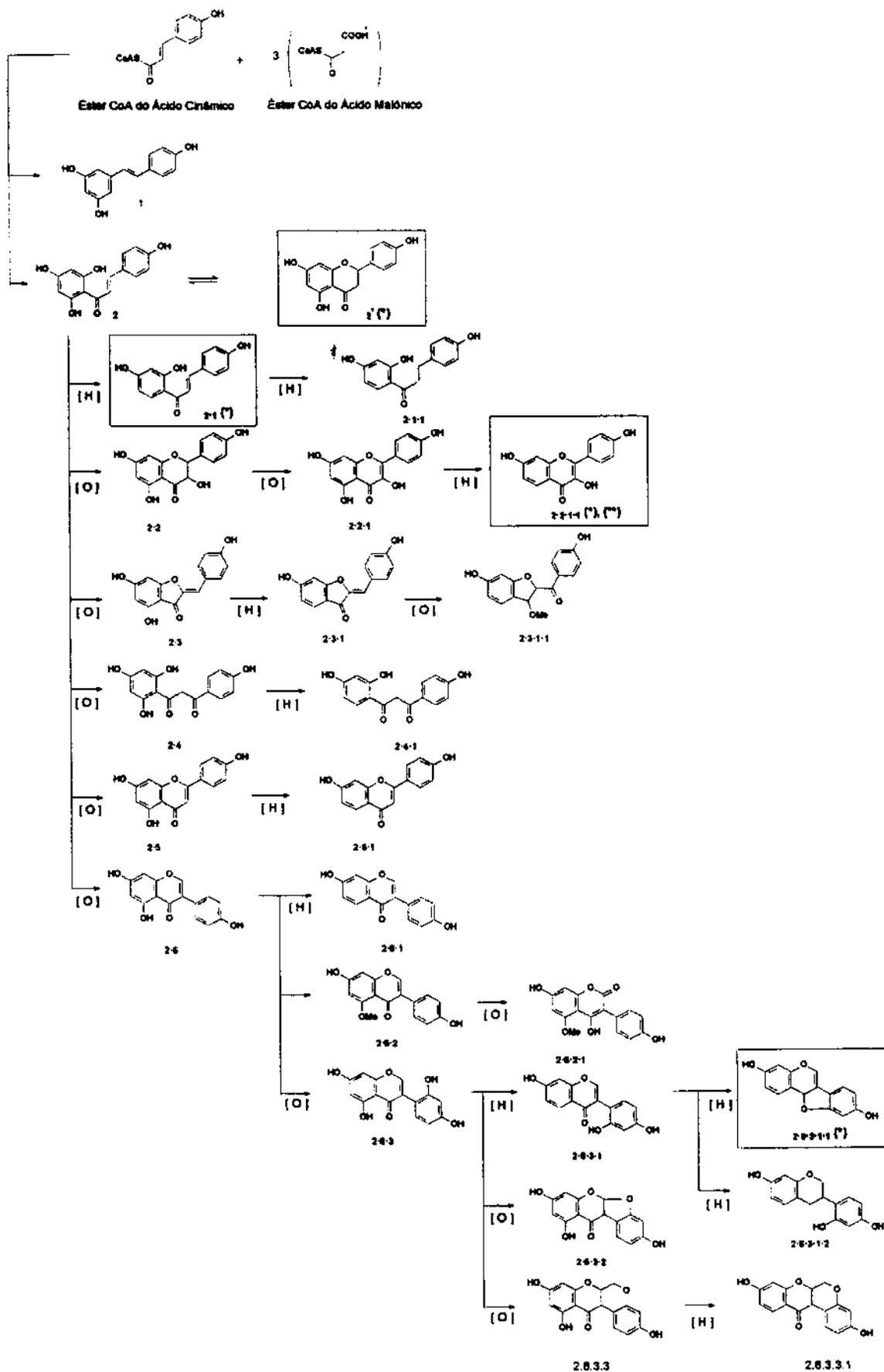
Assim, a primeira reação específica na biossíntese de flavonóides, é a condensação mediada por enzimas de três moléculas do éster do ácido malônico ativado (CoA), com uma molécula do éster CoA do ácido cinâmico adequado, cujo produto é o precursor comum dos estilbenos (1) e das chalconas (2) que existem em equilíbrio com a flavanonas (2') correspondente, Quadro I.2, p.5. Invariavelmente a partir da chalcona, os três átomos de carbono centrais, principalmente, podem sofrer uma série de reações enzimáticas subsequentes, incluindo alquilação, oxidação, redução, glicosilação e acilação, resultando as diversas categorias e subcategorias de flavonóides naturais. As sequências de reações as quais conduzem de 2 a flavonóis (2.2.1), auronas (2.3), β -OH-chalconas (2.4), flavonas (2.5) e isoflavonas (2.6) são todos processos oxidativos ⁸. A presença de uma hidroxila-para sobre o anel B das chalconas é essencial para o rearranjo às isoflavonas (2 \rightarrow 2.6) e a ciclização às auronas (2 \rightarrow 2.3). Na sua ausência ou após a sua redução, a própria chalcona aparece como produto final. De fato, redução na forma de eliminação de hidroxila quelada conduzindo a 2.2.1.1, 2.3.1, 2.4.1, 2.5.1 e 2.6.1 é tido como o passo final em todas as sequências. Aplicação direta desta reação à

própria chalcona resulta em 2.1, cuja posterior redução fornece diidrochalcona (2.2.1).

Isoflavonas, alternativamente à redução (2.6 → 2.6.1), pode ser posteriormente oxidada ou no C-2 levando a 3-aryl-cumarinas (2.6.2.1) ou no C-2', conduzindo a 2'-hidroxiisoflavonas (2.6.3). As duas reações estão sujeitas a diferentes forças eletrônicas diretoras. A primeira, sendo iniciada pela hidroxilação no C-2, requer a existência de um grupo carbonila altamente retirador de elétrons. De fato, todas as 3-fenil-cumarinas (2.6.2.1) conhecidas e até mesmo suas precursoras co-específicas 2.6.1 são 5-O-metil-éteres. Atenuação da retirada de elétrons por carbonila quelada em 5-hidroxiisoflavonas (2.6) estabelece conjugação entre o oxigênio heterocíclico e o C-2', favorecendo oxidação eletrofílica deste carbono. 2'-hidroxiisoflavona pode sofrer posteriores transformações. Novamente, uma requer O-metilação, desta vez da hidroxila na posição C-2', *a priori* para ciclização a rotenóides (2.6.3 → 2.6.3.3 → 2.6.3.3.1). A outra, requer eliminação de 5-hidroxila, *a priori* para redução conduzindo alternativamente a pterocarpanos (2.6.3.1 → 2.6.3.1.1) e a isoflavanas (2.6.3.1 → 2.6.3.1.2) ⁶.

Com a exceção destes pterocarpanos e isoflavanas a grande maioria dos estilbenos e flavonóides sustentam a cadeia lateral C₅ na forma de prenila não-modificada ou oxidativamente modificada.

O Quadro I.1, a seguir, apresenta as rotas biossintéticas acima descritas. Neste destacamos os esqueletos moleculares fundamentais dos flavonóides isolados de *L. campestris* ⁷ e de *L. mollis* ³.

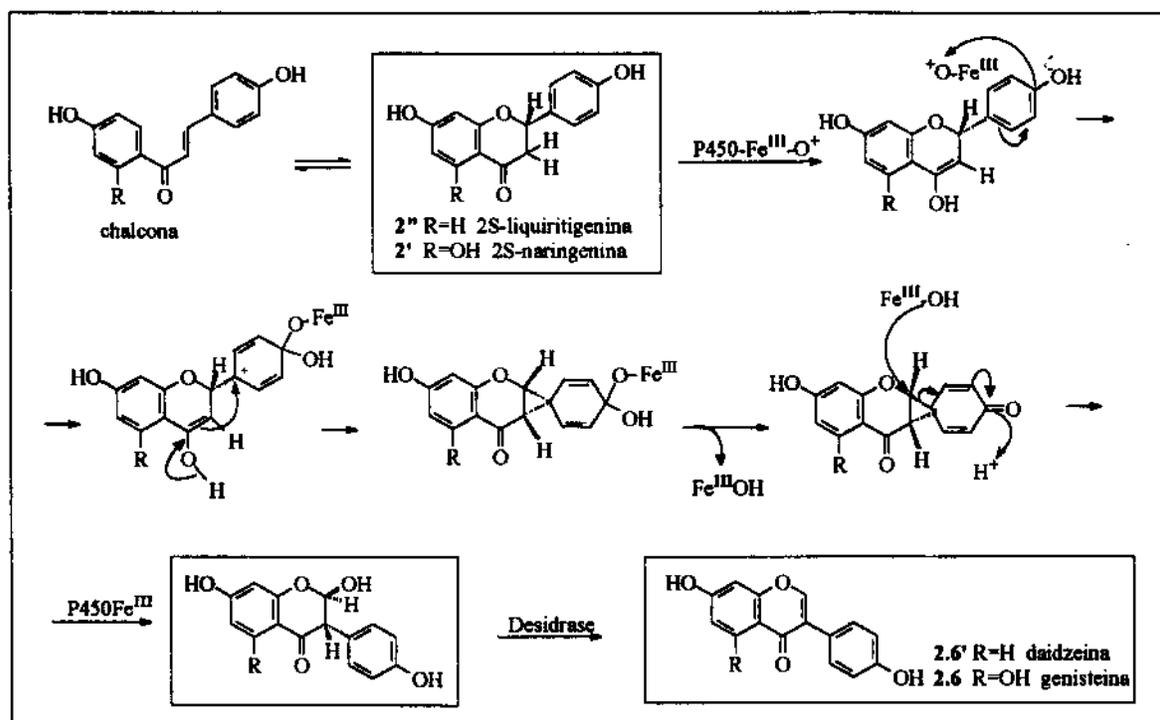


Quadro I.1- Rota biossintética de flavonóides. Em destaque os esqueletos moleculares básicos dos flavonóides isolados de *L. campestris*⁷ (*) e de *L. mollis*³ (**).

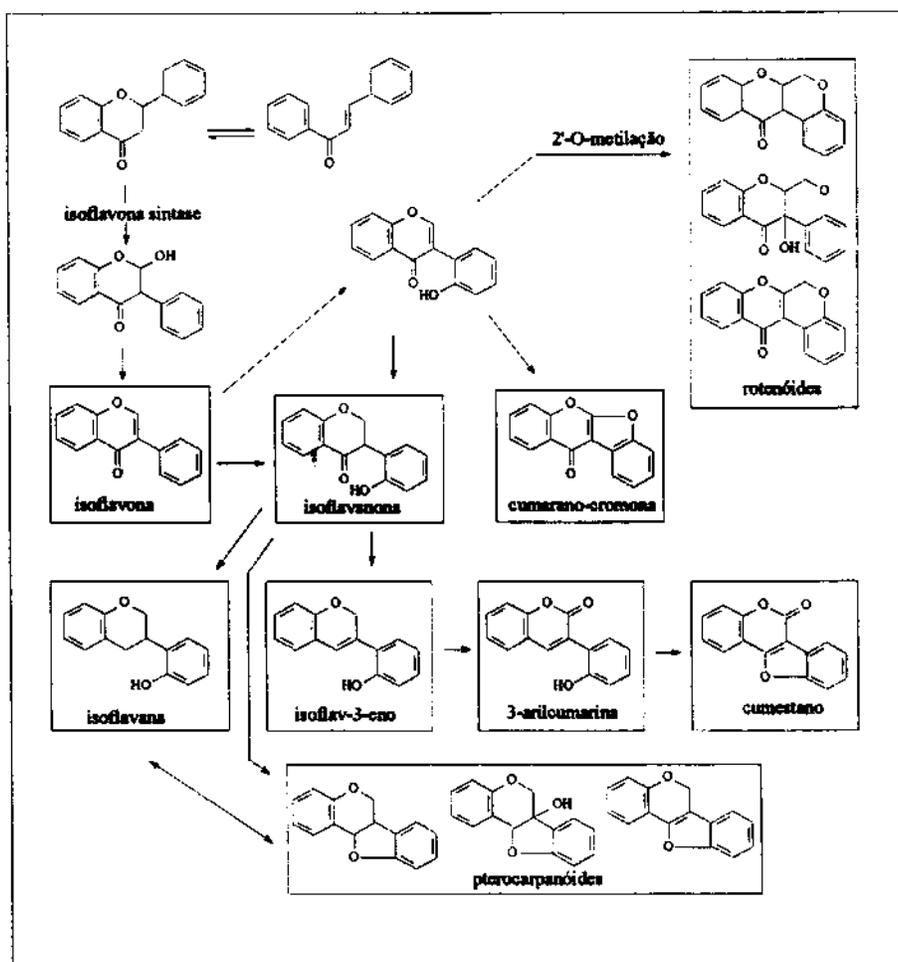
Enquanto os flavonóides, estritamente falando, baseiam-se na estrutura (i), os isoflavonóides baseiam-se na estrutura do 1,2-difenilpropano (ii), que por sua vez, deriva-se de (i). Com maior detalhe, a rota biossintética para isoflavonóides, bem como os seus interrelacionamentos, são apresentados nos Quadros I.2 e I.3, respectivamente ^{8,9}. O esqueleto isoflavonóide é estabelecido por uma enzima de migração arila conhecida como isoflavona sintase. Baseado no esquema da biossíntese de isoflavonóides (Quadros I.1, I.2 e I.3), acredita-se que os precursores desta classe, são sintetizados pela migração 2-, 3-arila em 5-hidroxi- ou 5-deoxiflavanonas, respectivamente, naringenina (2') e liquiritigenina (2''), as quais são catalizada pela enzima isoflavona sintase citocromo P₄₅₀, O₂, NADPH-dependente, fornecendo as respectivas 2'-hidroxiisoflavanonas como fundamentais intermediárias, seguido por desidratação resultando em genisteína (2.6) ou daidzeína (2.6').

Conforme o mecanismo da reação, a migração arila parece requerer um grupo 4'- ou 2'-hidroxila. Assim, quase todos os isoflavonóides são oxigenados nas posições C-4' ou C-2' do anel B das correspondentes flavanonas e isoflavanonas ⁹.

Portanto, isoflavona sintase é a enzima chave na construção de isoflavonóides, com uma pronunciada especificidade a algumas flavanonas simples⁹.



Quadro I.2- Mecanismo ⁹ aceitável da migração enzimática arila: intermediário espiro- dienona formado na substituição *ipso*, envolvendo a enzima P₄₅₀ na forma do seu híbrido de ressonância eletrofílico Fe^{III}O⁺.



Quadro I.3- Classes majoritárias de isoflavonóides e seus interrelacionamentos biossintéticos⁸.

I . 2 . 1 - PROPRIEDADES DOS FLAVONÓIDES NO ORGANISMO VEGETAL

Poucas generalizações sobre a fisiologia ou as funções de flavonóides são possíveis. Generalizações semelhantes implicam que as diferentes estruturas flavonóidicas trabalham no mesmo caminho em uma dada resposta biológica, ou que o mesmo estímulo produz diferentes flavonóides específicos ao tecido afetado.

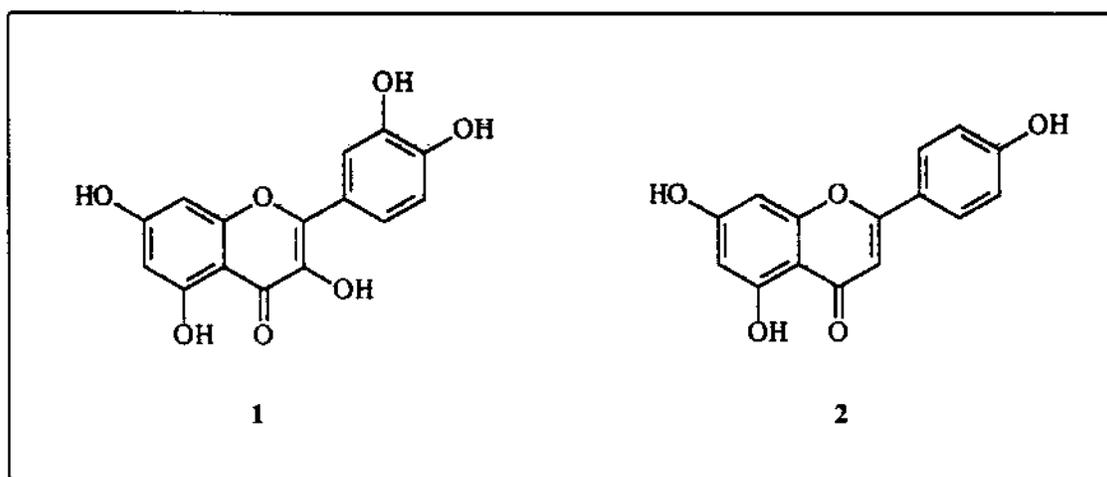
De qualquer forma, generalizações plausíveis são que a função de um flavonóide específico é uma questão da sua reatividade química dentro de uma célula específica e que cada tipo de tecido ou de célula possui um sistema altamente regulado para acumular e / ou copiar flavonóides específicos.

Há um crescente consenso no qual a maioria das substâncias flavonóidicas pré-formadas (presentes mesmo na planta sadia), são consideradas substâncias antimicrobiais constitutivas, recentemente denominadas 'fitoanticipinas', especialmente os que pertencem às classes dos isoflavonóides e estilbenos^{7a}. A definição dos diferentes tipos de metabólitos antimicrobiais, se eles são constitutivos ou induzidos por elicitores bióticos / abióticos (fitoalexinas), pode ser encontrada nos trabalhos realizados por Grayer e Harborne¹⁰.

• Pigmentação

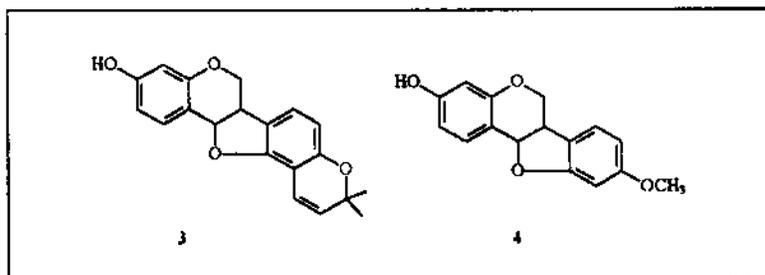
As cores das flores resultam da absorção preferencial de parte da luz visível por um ou vários composto(s) sintetizado(s) por plantas superiores. Uma vez que as plantas não podem “ver” sua própria cor, é concebível que as cores emergentes das flores sejam mensagens interpretáveis tanto por mamíferos quanto por pássaros e insetos. Assim estas cores são mais preferivelmente um laço entre animais e plantas. Em particular insetos e pássaros atraídos pela cor, polinizam as flores e ajudam a sobrevivência da espécie. Contrário ao homem, alguns insetos, especialmente as abelhas, podem perceber em torno do ultravioleta (340- 380 nm) bem como no visível.

O mais importante grupo de pigmentos de flores são os flavonóides. Estes pigmentos compreendem antocianinas (os mais importantes, proporcionam muito as cores rosa, laranja, vermelho, violeta e azul), chalconas, auronas e flavonóis amarelos contribuem algumas vezes para com a cor amarela. Os demais flavonóides são incolores ao homem, mas podem ser visíveis a alguns insetos. Flavonas, flavonóis e seus glicosídeos são também importantes à cores de flores, pois atuam como co-pigmento. Como exemplo citamos o flavonol **quercetina (1)** e a flavona **apigenina (2)**, ambos são responsáveis pela cor marfim ou branca de certas pétalas de flores^{11,12}.



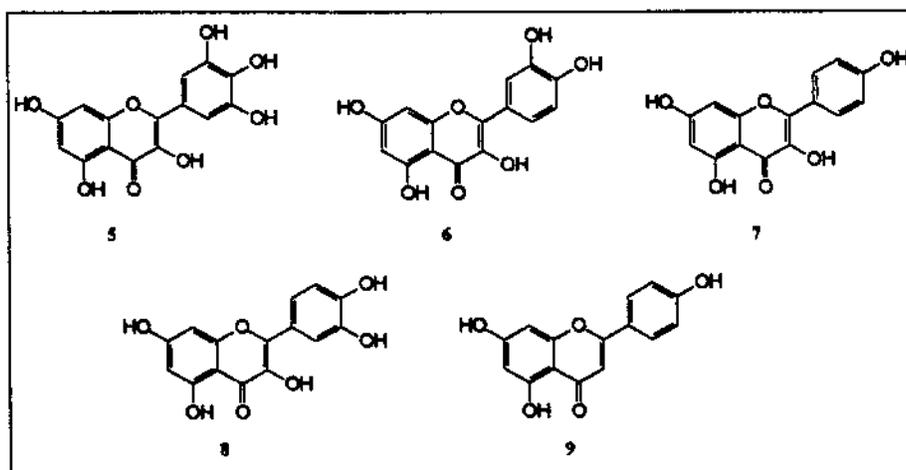
• Defesa química (Fitoalexinas)

Muitas plantas produzem substâncias com propriedades microbianas em respostas a invasões de seus tecidos por microorganismos como bactérias, vírus e principalmente fungos. As fitoalexinas compreendem um grupo quimicamente heterogêneo que inclui terpenos, estilbenos, poliacetilenos e flavonóides. Em geral, somente uma ou duas classes de fitoalexinas são encontrados em determinada família. Assim, em *Leguminosae*, as fitoalexinas são isoflavonóides. Abaixo ilustramos os exemplos representativos de fitoalexinas, os pterocarpanos **phaseollin (3)** e **medicarpina (4)**¹³.



• Antioxidante

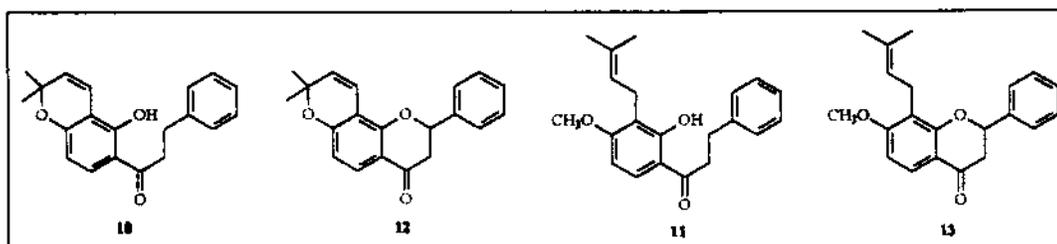
A nível do próprio vegetal que o produz, o flavonol **5** é tido como coadjuvante na ação antioxidante do ácido ascórbico — um componente universal de células vegetais, principalmente as quais possuem alta atividade metabólica¹⁴.



• Antiestimulante alimentar

Muitas espécies de plantas da família Leguminosae são protegidas do ataque de insetos pela presença de substâncias que têm propriedades tóxicas ou antiestimulantes (ou ambas).

Estudos realizados com uma série de 21 flavonóides (chalconas, flavanas e flavanonas) isolados do gênero *Lonchocarpus* e *Tephrosia*, contra larvas de *Spodoptera littoralis* e *S. exempta*, mostraram significativa atividade antiestimulante. Destacam desta série as chalconas **10** e **11** e suas flavanonas correspondentes **12** e **13**, ativas contra ambas as espécies de larvas¹⁵.

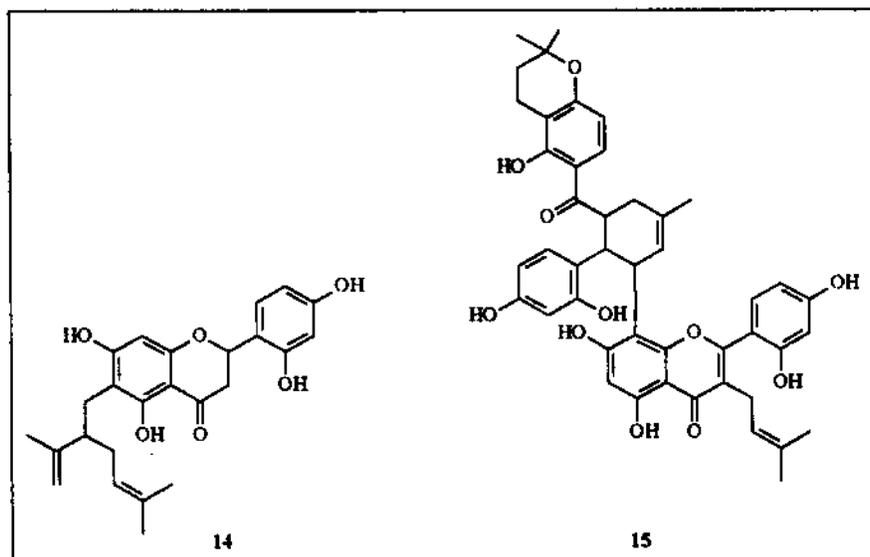


I. 2. 2 - PROPRIEDADES DOS FLAVONÓIDES NO ORGANISMO ANIMAL

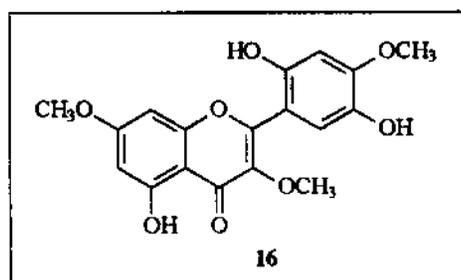
• Atividade antimicrobiana e farmacológica

Os efeitos fungicida / antimicrobial de flavonóides é principalmente atribuído à presença de grupos hidroxílicos fenólicos os quais possuem afinidade por proteínas e, portanto, atuam como inibidores de enzimas microbiais. Em adição, substituição do sistema de anel flavonoídico com grupos prenilas, favorece a sua lipofilicidade e, conseqüentemente, alcança sua atividade antimicrobial através da permeação das membranas celulares. Embora nenhum padrão particular para o relacionamento estrutura-atividade pode ser estabelecido, está geralmente de acôrdo que no mínimo, um grupo hidroxílico fenólico e certo grau de lipofilicidade são requeridos para a atividade biocida de compostos flavonóides. De qualquer modo, a atividade biocida de um padrão de substituição específico pode diferir, dependendo da natureza do flavonóide em questão ⁹.

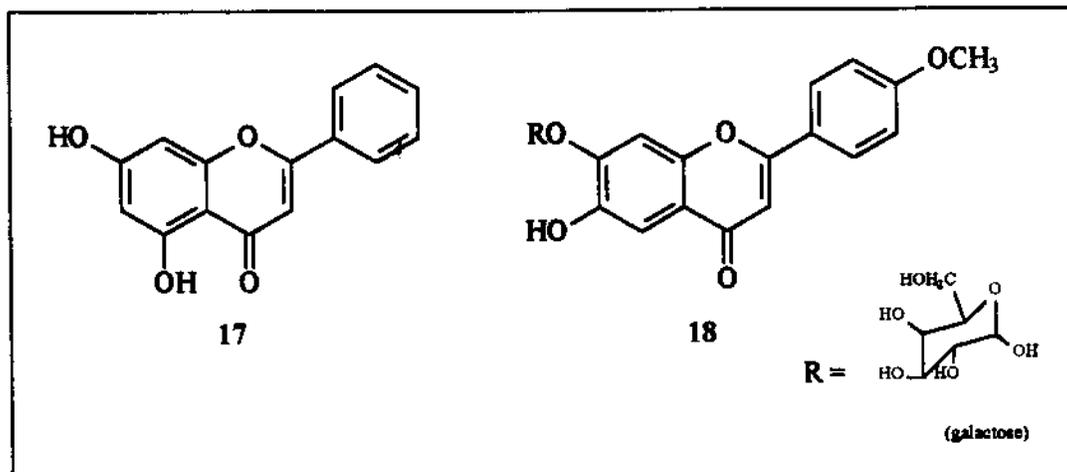
A flavanona vexibinol (14), isolada de *Sophora sp.* (Leguminosae), exhibe significativa inibição à secreção do ácido gástrico, demonstrando, assim, sua ação anti-úlcerosa ¹⁶. Já a flavona moracenina C (15), isolada de *Morus sp.* (Moraceae), exhibe notável atividade hipotensiva ¹⁷.



Oxyyanin A (16), um flavonol isolado de espécies do gênero *Chrysosplenium* (Saxifragaceae), mostrou potente atividade anti-tumoral ¹⁸.



Estudo da inibição do HIV pelos flavonóides mostraram que a flavona **chrysin (17)**, apresentou alta atividade naqueles ensaios. Dos flavonóides estudados, aqueles com grupos hidroxilas nas posições C-5 e -7 e uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, foram os inibidores mais potentes. A flavona isolada de *Chrysanthemum morifolium*, **acacetin-7-O- β -galactopyranoside (18)**, também apresentou boa atividade anti-HIV com baixa toxicidade¹⁹.



Vários flavonóides atuam como antioxidantes. Estudos demonstraram que flavonóides cítricos reduzem os efeitos da trombose coronária, enquanto estudos epidemiológicos indicaram que há uma baixa incidência de doenças coronárias (CHD) na França. Estes últimos, puderam ser explicados pelo consumo de vinho na dieta alimentar francesa e atribuído ao efeito antioxidante de flavonóides contidos no vinho. Assim, o consumo dos flavonóis, presentes no vinho, **miricetina (5)**, **quercetina (6)**, **campferol (7)**, **luteolina (8)** e **apigenina (9)**, estão relacionados com a redução de doenças coronárias. Outras substâncias flavonóidicas, também presentes no vinho, demonstraram ser inibidores da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, cujo acúmulo nas artérias é o principal responsável por estas doenças coronárias²⁰.

II - OBJETIVOS

- Nosso grupo de pesquisa está desenvolvendo o estudo fitoquímico e quimiotaxonômico das espécies brasileiras inéditas do gênero *Lonchocarpus* sub-gêneros *Lonchocarpus* e *Punctati*. Para tanto, contamos com a colaboração da Dra. Ana M. G. A. Tozzi ² do Departamento de Botânica-Unicamp, responsável pela última proposta de classificação do gênero como anteriormente mencionado.

- O estudo fitoquímico inédito dos extratos das raízes de *L. campestris*, enfatiza o isolamento e a identificação de seus metabólitos secundários, em particular de seus flavonóides ⁷. Foi por nós decidido em conjunto com Tozzi ², na expectativa de contribuir com a definição taxonômica desta espécie, uma vez que dispomos dos resultados fitoquímicos da espécie *L. mollis* ^{3,6} (ou *L. leucanthus*).

- Análise qualitativa dos extratos diclorometânico e hexânico (miolo e cascas das raízes) através da CLAE.

- Atividade biológica, *in vitro*, de flavonóides isolados e dos extratos das raízes de *L. campestris* ^{39,40}.

- Quimiosistemática dos taxons *L. campestris* ^{2,7} e *L. mollis* ^{3,6} em conjunto com os demais taxons do gênero *Lonchocarpus* estudados e registrados na literatura, de acordo com a sistemática proposta por Harborne ⁴ e adotada por Gottlieb e col. ⁶.

CAPÍTULO 1

Breve Revisão Sobre os Métodos Modernos de Determinação Estrutural de Flavonóides

1.1- Introdução

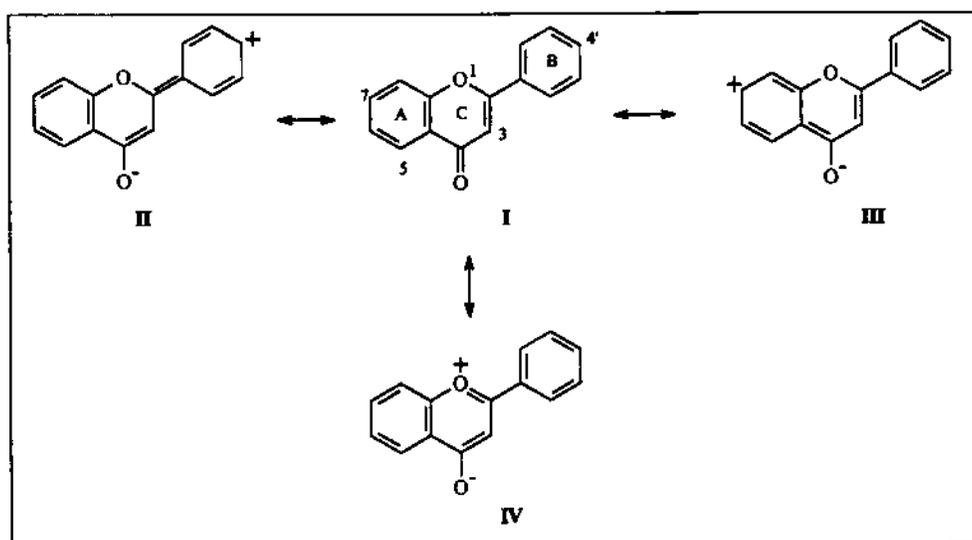
Nas tarefas de isolamento dos constituintes utilizou-se sempre que possível, métodos cromatográficos como discutidos no capítulo 3.

A determinação estrutural das substâncias isoladas de *L. campestris*⁷, envolveu, principalmente, métodos espectrométricos tais como: espectrometria na região do ultravioleta, do infravermelho, de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e de massas^{4a,4b,21-24}, razão pela qual iniciamos a descrição deste trabalho com uma revisão daqueles métodos aplicados aos flavonóides. Os dados dos constituintes de *L. campestris*⁷ foram comparativamente identificados com os da literatura e em todos os casos coincidentes^{5,25-28}.

1. 2- Espectrofotometria na Região do Ultravioleta^{4a,21}

1.2.1- Introdução

A espectrometria no UV assume importância na confirmação de estruturas moleculares de flavonóides, em particular, na classe das flavonas, devido a conjugação existente entre os anéis A e B, Quadro 1.2.1 (I). Enquadram-se nesta classe as 3-hidroxi flavonas (flavonóis).

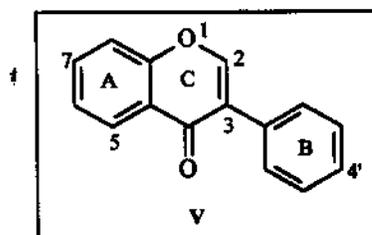


Quadro 1.2.1- Estruturas canônicas de flavonas (e flavonóis).

As posições dos máximos de absorção e suas respectivas intensidades podem ser utilizadas para a classificação de uma substância flavonóidica.

Em meio neutro, as flavonas exibem pelo menos duas bandas entre 240- 390 nm. A banda com máximo de absorção entre 240- 280 nm é referida como Banda II e entre 300- 390 nm como Banda I.

A relação entre as intensidades das Bandas I e II nas flavonas é muito variável, sendo maior ou menor do que a unidade. O mesmo não ocorre com as isoflavonas (V), sendo esta relação sempre menor do que 1. Excluem-se desta dedução as isoflavonas que apresentam dupla ligação conjugada com o esqueleto fundamental.



Conseqüentemente, pode-se ocasionalmente decidir sobre a natureza flavônica ou isoflavônica de uma substância com base no espectro de UV:

ϵ Banda I / ϵ Banda II > 1: flavona

ϵ Banda I / ϵ Banda II < 1: isoflavona

O comprimento de onda da Banda I pode também informar-nos sobre a natureza destas classes. Nas isoflavonas, esta banda comparece entre 300- 330 nm, sendo freqüentemente de baixa intensidade.

A presença de um grupo hidroxila no átomo de C-3 pode ser deduzida da posição de absorção da banda I, conforme apresentado na Tabela 1.2.1:

Tabela 1.2.1: Posição de absorção de flavonas e flavonas 3-oxigenadas.

Flavonas	Posição da banda I
3H	294- 352
3- OCH ₃	330- 359
3- OH	354- 387

A posição e a intensidade destas bandas no espectro de UV de flavonas, dependem da contribuição relativa dos híbridos de ressonância I, II, III e IV (Quadro 1.2.1).

Jurd, citado por Bráz Filho ²¹, admite que a estrutura cinamoílica II é a principal contribuinte para com a Banda I, enquanto a estrutura benzolítica III é a principal responsável pela Banda II no espectro de flavonas.

Assim, a não contribuição de estrutura canônica do tipo II em isoflavonas conduz a uma fraca absorção da Banda I nestas substâncias.

Perante ao exposto, as posições e intensidades dos máximos de absorção no espectro de UV, dependem do número e da posição de funções oxigenadas que sustentam o esqueleto flavônico ou isoflavônico.

Logo, um H hidroxílico terá seu carácter ácido influenciado pela posição que o grupo OH ocupa na arquitetura molecular. Grupo OH localizado em C-7, posição conjugada com o grupo C=O, apresenta maior carácter ácido. Todavia, grupo OH localizado em C-5, também conjugado com a carbonila, não apresenta acidez; não é capaz de ser ionizado por base fraca em vista da forte ligação hidrogênio intramolecular em hexanel. Por outro lado, um grupo OH em C-3 apresenta acidez; é capaz de ser ionizada por base fraca. Trata-se aqui de uma OH tipo enólica e a ligação H intramolecular envolve um anel de 5-membros.

Portanto, as posições que oferecem maior carácter ácido para H hidroxílicos são 3, 4' e 7 nas flavonas e C-7 nas isoflavonas. Assim, grupo OH nestas posições podem ser ionizados por AcONa, uma base fraca, tornando evidente a importância de espectros de UV na presença de aditivos. Os aditivos utilizados e as suas finalidades, são resumidas abaixo ²¹.

1. Solução aquosa de NaOH 20% (1 a 2 gotas).

Com a adição de 1 a 2 gotas de uma solução aquosa de NaOH 20% nas duas cubetas e retomadas de espectro UV, pode-se decidir pela presença ou ausência de grupo OH nos flavonóides. Inalteração do espectro indica ausência de OH, já que esta base forte é capaz de ionizar tal grupo localizado em qualquer posição do esqueleto flavonóidico.

A alteração de espectro UV em presença de NaOH pode ser reversível ou não (decomposição). A irreversibilidade indica a presença de sistema *orto* e/ou *para*-diidroxí. Em flavonas a existência de grupo OH em 3 e 4' também origina decomposição.

1a. Solução de HCl concentrado (d = 1,18).

Esta solução é adicionada, nas duas cubetas, em quantidade suficiente para neutralizar a solução de NaOH usada no item anterior (1). Comparação das curvas obtidas em presença destes aditivos com a curva obtida em meio neutro, revela se a modificação espectral correspondente à ionização é reversível ou irreversível.

2. Acetato de sódio anidro.

Evidenciada a presença de OH através de adição de NaOH, toma-se nova alíquota da solução da substância e junta-se acetato de sódio anidro, inclusive na célula de referência, até obter uma solução saturada. Este reagente ioniza somente os grupos OH no C-7 em flavonóides em geral e nos C-3, -7 e 4' em flavonas particularmente. Deslocamento batocrômico de 5 a 20 nm na Banda II é indicativo da presença de grupo OH em C-7, sendo que a ionização de OH em C-3 e/ou C-7 afeta principalmente a Banda I.

Flavonas que contém sistema 5,6,7-, 5,7,8-, ou 3,3',4'-trihidroxi são decompostas por acetato de sódio decorridos alguns minutos. Em face disto, os espectros destas substâncias devem ser varridos imediatamente após a adição de acetato de sódio.

Quando a flavona possui substituintes em C-6 e C-8, o deslocamento batocrômico observado com a adição de acetato de sódio é muito pequeno ou não perceptível.

3. Acetato de sódio + ácido bórico.

Se a substância não sofre decomposição com a adição de AcONa, usa-se a solução contendo este reagente para adicionar-se o ácido bórico em quantidade suficiente para saturá-la.

O ácido bórico em presença de AcONa forma complexo com sistema *orto*-diidroxilado. A formação de complexo envolvendo sistema *orto*-diidroxilado localizado no anel B de flavonas provoca deslocamento batocrômico da ordem de 12 a 30 nm da Banda I.

4. Solução etanólica de tricloreto de alumínio 5 a 10 %.

O $AlCl_3$ forma complexo com sistema *orto*-dihidroxi e 5- ou 3-hidroxi-flavona. A formação de tais complexos é revelado pelos deslocamentos batocrômicos observados nos máximos de absorção do espectro UV em presença deste aditivo (Quadro 1.2.2).

4a. Solução aquosa de HCl 18%.

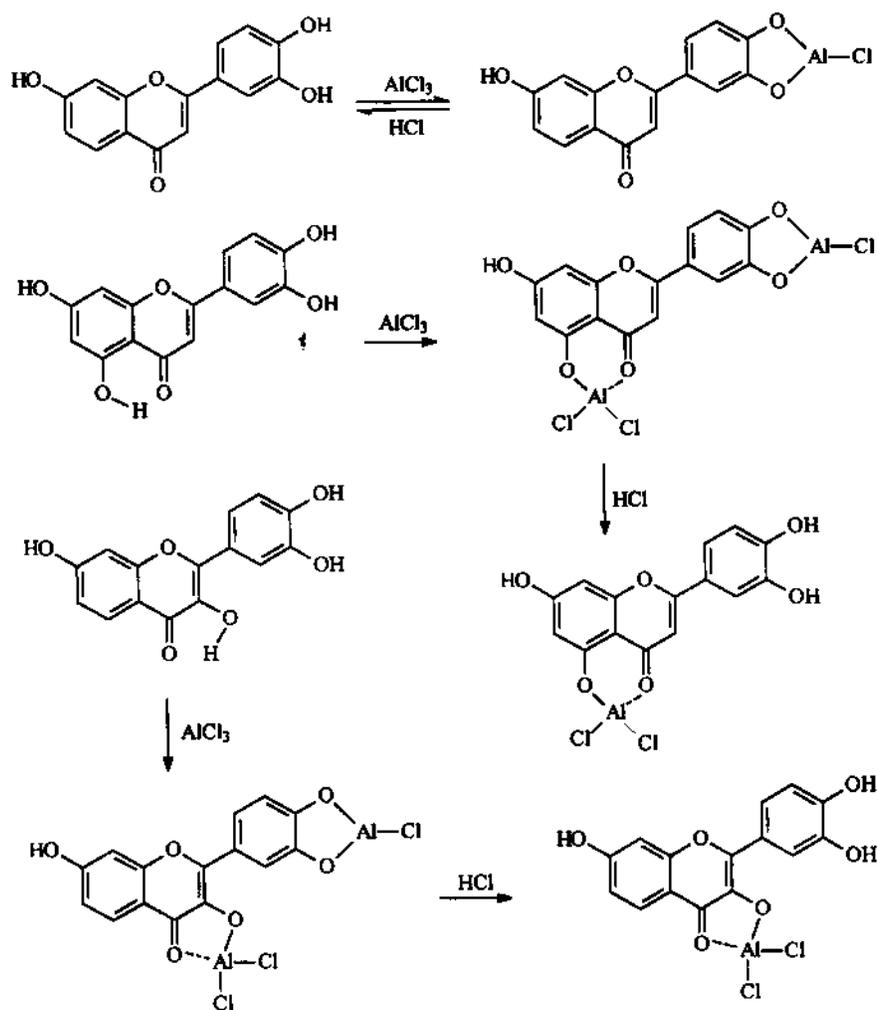
Os complexos que envolvem sistema *orto*-diidroxilado são decompostos pela adição de ácido e os complexos que envolvem o grupo carbonila e o grupo OH em C-3 ou C-5 apresentam-se estáveis com a adição de ácido.

Quando o sistema *orto*-diidroxilado está localizado no anel B, a comparação do espectro de UV obtido em presença de $AlCl_3$ com o espectro obtido em presença de $AlCl_3 + HCl$, revela deslocamento hipsocrômico (para menor comprimento de onda) da ordem de 30- 40 nm para a Banda I (ou Ia no caso da Banda I consistir de dois picos).

Deslocamento batocrômico da Banda I (em MeOH) em relação a Banda Ia (em MeOH + $AlCl_3 + HCl$) da ordem de 40 a 45 nm é favorável a 5-hidroxi-flavona, enquanto tal deslocamento sendo da ordem de 60 nm, sugere 3-hidroxi-flavonas.

Constatando-se a superposição do espectro obtido em meio neutro (MeOH) com aquele obtido com a adição de $AlCl_3 + HCl$ deduz-se pela ausência de grupo OH em C-3 e/ou C-5.

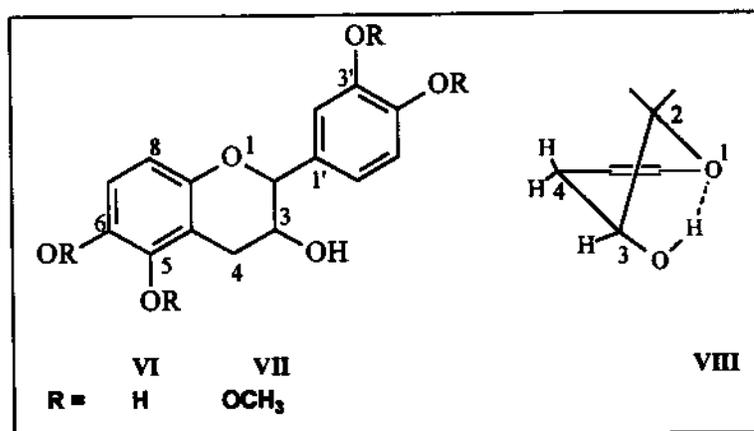
Quadro 1.2.2: Ilustração dos tipos de complexos que AlCl_3 pode formar com flavonas na presença ou ausência de ácido.



1.3- Espectrofotometria na Região do Infravermelho ²¹

1.3.1- Introdução

Normalmente é possível ganhar na espectrometria no IV, além das informações mais evidentes, tais como natureza aromática (4 a 6 bandas entre $1625-1400\text{ cm}^{-1}$), presença ou ausência de grupos OH ($3300-3450\text{ cm}^{-1}$) e C=O ($1608-1670\text{ cm}^{-1}$), até uma idéia sobre a natureza e posição de grupos vizinhos à C=O e, em menor extensão, posição de grupo OH. Como exemplo, citaremos um caso extremo. Whalley, citado por Bráz Filho ²¹, admitiu o método usado para a determinação da stereoquímica do grupo OH localizado na posição 3 de uma (+)-catequina (VI). Este pesquisador, constatou que o éter 5, 6, 3', 4'-tetra-O-metilico (VII) revela a freqüência correspondente ao estiramento OH em cerca de 40 cm^{-1} abaixo da freqüência normal. Tal comportamento foi atribuído à existência de uma ligação hidrogênio intramolecular com o oxigênio heterocíclico, compatível somente com OH em posição axial (VIII):



Deste modo focalizaremos em nossa revisão a região correspondente ao estiramento do grupo C=O do anel pirano e a influência de grupos vizinhos sobre a posição exata de absorção do primeiro.

1.3.2- Flavonas

As flavonas (I) que sustentam um grupo OH em C-5 revelam a frequência correspondente ao estiramento da carbonila entre 1641- 1672 cm^{-1} . A influência de outras funções oxigenadas em qualquer posição do esqueleto molecular fica muito atenuada. Através de absorção nesta faixa caracterizam-se ainda as flavonas que apresentam grupos metoxilas no C-5, -6, -7 e -8, *i.e.*, possuem o anel A tetrametoxilado.

Já as flavonas que ostentam grupo metoxila na posição 5 apresentam a absorção da C=O entre 1608- 1649 cm^{-1} , mais frequentemente em 1629 cm^{-1} . Nesta faixa também absorvem 3-hidroxi-5-metoxiflavonas. Portanto, de posse de um espectro de IV pode-se classificar uma flavona em um dos dois grupos apresentados na Tabela 1.3.1.

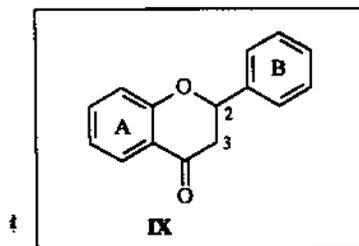
A presença de funções oxigenada em outras posições não interferem nesta classificação, enquanto que a flavona não substituída apresenta a frequência de estiramento do grupo C=O em torno de 1695 cm^{-1} .

Tabela 1.3.1: Classificação de flavonas baseada na frequência de estiramento da carbonila.

ν C=O, 1641 - 1672 cm^{-1} (freqüentemente 1653 cm^{-1})	ν C=O, 1608 - 1649 cm^{-1} (freqüentemente 1629 cm^{-1})
3-metoxiflavonas	5-metoxiflavona
5-hidroxiflavona	3-hidroxiflavonas
3,5-diidroxiflavonas	3-hidroxi-5-metoxiflavonas
5-hidroxi-3-metoxiflavonas	3,5-dimetoxiflavonas
5,6,7,8-tetrametoxiflavonas	

1.3.3- Flavanonas

As flavanonas (IX) comportam-se de maneira diferente quando comparadas com as flavonas pois a ausência de dupla ligação entre os átomos de C-2 e C-3 evita a conjugação do anel B com a carbonila.

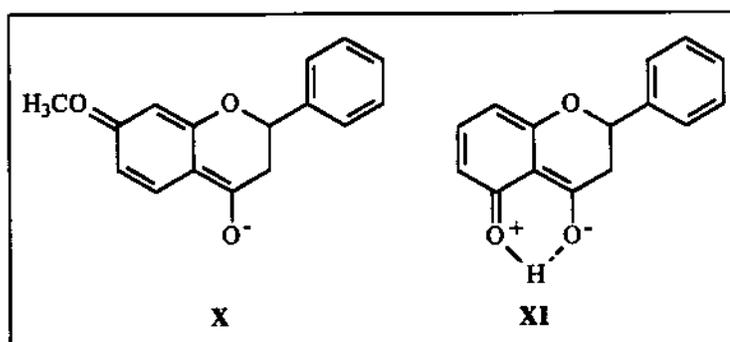


A partir da Tabela 1.3.2 é visto que introdução de um grupo OCH_3 na posição C-7, do núcleo flavanona, causa um deslocamento para a menor frequência da carbonila de 10 cm^{-1} , presumivelmente devido a contribuição de X à estrutura de

Tabela 1.3.2- Classificação das flavanonas baseada na frequência de absorção da carbonila.

Substituição	$\nu \text{ C=O (cm}^{-1} \text{)}$
nenhuma	1695
7-metoxiflavanona	1685
7,4'-dimetoxi-	1686
5-hidroxi-	1648

ressonância. A introdução de um grupo 4'-metoxila, como esperado, não causa posterior mudança. Um grupo hidroxila em C-5 causa um deslocamento da frequência da carbonila de -40 cm^{-1} resultante da estrutura quelada (XI).



No trabalho de Shaw e Simpson (1955), citado por Bráz Filho ²¹ e até mesmo em sua revisão, há detalhadas discussões da frequência de absorção de grupos C=O para outros padrões de substituição, comparativamente, de flavonas e flavanonas.

1.4- Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H

1.4.1- Introdução

A espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C , associada com as suas técnicas bidimensionais (COSY, HETCOR, COLOC, HMQC) e diferença de NOE, é capaz de fornecer dados suficiente para elucidar a estrutura molecular de flavonóides, inclusive de suas configurações relativas. A literatura especializada contém excelentes trabalhos de revisão sobre a utilização destas técnicas [refs. 4a, 4b,21-24(e refs. lá citadas)].

Um dos principais problemas encontrados na obtenção de espectros de RMN de flavonóides, envolve a baixa solubilidade apresentada por grande parte destes compostos nos solventes usuais (CDCl_3 e CD_3COCD_3). Já CD_3SOCD_3 apresenta-se como um solvente capaz de solubilizar mesmo as substâncias mais polares.

Por outro lado, registra-se algumas desvantagens na utilização de dimetilsulfóxido como solvente:

- a recuperação da amostra torna-se difícil em vista do ponto de ebulição ($189\text{ }^\circ\text{C}$), relativamente elevado.
- a absorção de água com muita facilidade origina o aparecimento do sinal correspondente ao H de H_2O em torno de 3,5 ppm, região de interesse no espectro de determinados flavonóides, assim como do próprio dimetilsulfóxido, cujos deutérios dos grupos metilas trocam na presença de H da H_2O .
- o perigo da facilidade de absorção pela pele do pesquisador servindo como veículo para substâncias nele dissolvidas.
- possibilidade de decomposição da amostra. Já observou-se tais fenômenos com algumas substâncias flavonoídicas.

Em face disto, é sempre conveniente a preparação de derivados solúveis em CDCl_3 . Entre os derivados comumente preparados cita-se: acetato, éteres trimetilsilílico, metílico e etílico.

A obtenção do acetato ou do éter trimetilsilílico revela-se mais prática em vista da possibilidade de recuperação da substância no seu estado original mediante reação de hidrólise.

A importância da preparação do derivado acetato reflete-se também na relativa facilidade de contagem do número de grupo OH presente na substância original.

A seguir, registramos com base na literatura ^{4a,21}, os deslocamentos químicos dos H nas principais classes de flavonóides. Salvo quando mencionado, os referidos espectros foram obtidos em solvente CCl_4 .

1.4.2- Hidrogênios do anel heterocíclico C

Um flavonóide pode ter seu esqueleto molecular (Quadro I.1, p.5) determinado com base no seu espectro de rnm através da contagem do número de H e da natureza e número de grupos substituintes freqüentemente encontrados nas substâncias naturais⁸. Evidentemente, tais grupos têm sua presença revelada através do próprio espectro de rnm. Além disso, a feição espectral das bandas correspondentes aos H do anel heterocíclico e suas respectivas freqüências de absorções permitem avaliar a natureza do flavonóide (Tabela 1.4.1).

Tabela 1.4.1 - Deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos do anel C de algumas comuns classes de flavonóides^{4a,*}.

Classes	H-2 (C-2)	H-3 (C-3)	H-4(C-4)	
Flavonas (2.5)	— (162,6)	6,3 (107,2)	— (177,4)	
Isoflavonas (2.6)	7,6- 7,9 (151,5)	— (124,6)	— (175,5)	
Flavanonas (2')	5,0- 5,5 (79,5)	2,8 (43,9)	— (190,2)	
	H- α (C- α)	H- β (C- β)		C=O
Chalconas (2)	6,7- 7,4 (116,6- 128,1)	7,3- 7,7 (136,2- 145,4)		188,6- 203,1
	H-6ax (C-6)	H-6eq	H-6a (C-6a)	H-11a (C-11a)
Pterocarpanos (2.6.3.1.1)	3,5-3,6 (66,5)	4,1- 4,2	3,4- 3,4 (39,8)	5,4- 5,5 (78,4)
(*)- as estruturas dos esqueletos básicos encontram-se no Quadro I.1, p.5.				

1.4.2.1- Flavonas. O hidrogênio sobre o C-3 em flavonas (2.5) usualmente aparece como um singlete em torno de 6,3 ppm. Contudo, ele pode ser confundido com os sinais dos H-6 e -8 em 5,6,7-, 5,7,8- ou 5,6,7,8-flavonas oxigenadas. Todavia, métodos de distinção dos sinais destes hidrogênios foram estudados e registrados por alguns autores^{4a}.

1.4.2.2- Isoflavonas. O hidrogênio sobre o C-2 em isoflavonas (2.6) ocorre como um singlete na série de 7,6- 7,88 ppm, *i.e.*, mais desprotegido do que a maioria dos H- arila, devido o seu relacionamento β com o grupo carbonila e o fato que ele está fixado sobre um carbono carbinólico. Um acentuado deslocamento paramagnético, entre 8,5- 8,7 ppm, é evidenciado quando DMSO- d_6 é utilizado como solvente (e entre 7,8- 8,1 ppm em $CDCl_3$)^{4a}.

1.4.2.3- Flavanonas e Dihidroflavonóis. Nas flavanonas (2'), o hidrogênio em C-2 aparece como um duplo dubleto ($J_{trans} = ca. 11$ Hz, $J_{cis} = ca. 5$ Hz) centrado a 5,2 ppm. Os H-3 resultam, cada um, em duplo dubleto devido a interações spin-spin um ao outro ($J_{gem} = 17$ Hz) e com o H-2. Os sinais aparecem acima de 2,8 ppm; de qualquer modo, eles se sobrepõem e são geralmente, pouco diferenciáveis.

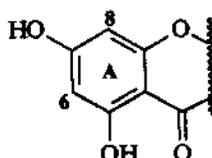
Em dihidroflavonóis (2.2), os hidrogênios sobre os C-2 e -3 estão trans-diaxialmente relacionados um ao outro e, assim aparecem como um dubleto ($J =$

ca. 11 Hz). O sinal do H-2 acima de 4,9 ppm, está separado e mais desprotegido, do sinal do H-3, que por sua vez, está acima de 4,3 ppm.

1.4.2.4- Chalconas e Auronas. Nas chalconas (2), os H- α e H- β aparecem como dupletos ($J = ca. 17$ Hz) na série de 6,7- 7,4 ppm, respectivamente. O H benzílico nas auronas (2.3) aparece como um singletto na série de 6,5- 6,7 ppm. Em DMSO- d_6 as auronas exibem este sinal na série de 6,37- 6,94 ppm; a exata posição é uma função do padrão de hidroxilação ^{4a}.

Já que o número, natureza e posição de grupos substituintes no anel A não afetam significativamente as posições de absorção dos H do anel B, e vice-versa, estudaremos, a seguir, alguns dos padrões de oxigenação dos aneis A e B de flavonóides naturais ^{4a,21}.

1.4.3- Hidrogênios do anel A



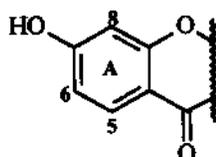
1.4.3.1- 5,7-dihidroxi flavonóides. Hidrogênios nos C-6 e -8 aparecem separadamente como dubletos, $J = 2,5$ Hz, na região de 5,7- 6,9 ppm. O H-6 é consistentemente mais protegido do que o H-8 e glicosilação do grupo OH-7 provoca desproteção de ambos os H (Tabela 1.4.2), o fenômeno de deslocamento que também é observado com a acetilação destas OH.

Tabela 1.4.2- Deslocamentos químicos dos H sobre os C-6 e -8 (em 5,7-dihidroxi flavonóides) ^{4a, *}

Classes	H- 6 (ppm)	H- 8 (ppm)
Flavonóis (2.2.1), Flavonas (2.5), Isoflavonas (2.6)	6,0- 6,2 <i>d</i>	6,3- 6,5 <i>d</i>
7- glicosídeos dos compostos acima	6,2- 6,4 <i>d</i>	6,5- 6,9 <i>d</i>
Flavanonas (2'), Dihidroflavonóis (2.2)	5,75- 5,95 <i>d</i>	5,9- 6,1 <i>d</i>
7- glicosídeos dos compostos acima	5,9- 6,1 <i>d</i>	6,1- 6,4 <i>d</i>

* veja estruturas no Quadro I.1, p.5

1.4.3.2- 7-hidroxi flavonóides (5-deoxi flavonóides). O adicional H sobre o C-5 nestes compostos é fortemente desprotegido pelo grupo 4-ceto e aparece como um



dubletto, $J = ca. 9$ Hz, em torno de 8,0 ppm devido ao acoplamento em *orto* com H-6. Os sinais dos H-6 (*q*, $J = 9$ e 2,5 Hz) e H-8 (*d*, $J = 22,5$ Hz), os quais compreendem a

porção BC de um sistema de spins ABC tendendo para ABX, são mais desprotegidos do que em 5,7-dihydroxiflavonóides (Tabela 1.4.3).

Tabela 1.4.3- Deslocamentos químicos dos H sobre C-5, -6 e -8 (em 5-deoxiflavonóides) ^{4a,*}.

Classes	H-5 (ppm)	H-6 (ppm)	H-8 (ppm)
Flavonas, Flavonóis, Isoflavonas (2.5.1), (2.2.1.1), (2.6.1)	7,9- 8,2 <i>d</i>	6,7- 7,1 <i>q</i>	6,7- 7,0 <i>d</i>
Flavanonas, Dihidroflavonóis (2')** (2.2)**	7,7- 7,9 <i>d</i>	6,4- 6,5 <i>q</i>	6,3- 6,4 <i>d</i>
* veja as estruturas moleculares no Quadro I.1, p. 5. ** 5-deoxi			

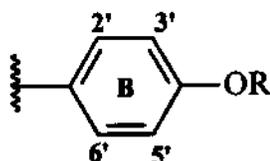
1.4.4- Hidrogênios do anel B

1.4.4.1- Flavanonas (2'), Flavonas (2.5) e Isoflavonas (2.6) com o anel B não substituído. Na estrutura molecular 2.5, a ausência de substituintes no anel B pode ser deduzida pelo aparecimento de duas bandas múltiplas, representando 2H e 3H respectivamente. Os H-2' e -6', devido a maior proximidade com o sistema carbonílico α , β -insaturado, aparecem mais desprotegidos do que os H-3', -4' e -5'. Por outro lado, a ausência de substituintes no anel B de 2' e 2.6 pode ser deduzida pelo aparecimento de uma banda múltipla representando 5H, em face da ausência de conjugação com o grupo carbonila (Tabela 1.4.4),.

Tabela 1.4.4- Deslocamentos químicos de H localizados no anel B de flavanonas, flavonas e isoflavonas, em unidades δ ^{4a,*}.

Classes	H-2',-6'	H-3',-4', -5'	H-2', -3', -4', -5', -6'
Flavanonas (2')**	-----	-----	7,33- 7,51
Flavonas (2.5)**	7,79- 7,97	7,46- 7,57	-----
Isoflavonas (2.6)**	-----	-----	7,39- 7,48
* veja as estruturas moleculares no Quadro I.1, p. 5. ** em 4'- deoxi-.			

1.4.4.2- Flavonóides 4'-oxigenados. O espectro destas substâncias, devido a livre rotação do anel, revela um sistema A_2B_2 , rigorosamente, AA'BB', compreendendo os H-2', -3', -5', e -6' representados por dois pares de dubletos em *orto* acoplados ($J = ca.$ de 8,5 Hz):



Os dupletos dos H-3', H-5' sempre ocorrem mais blindados do que os dupletos dos H-2', -6' devido ao efeito mesomérico do substituinte oxigênio (similar para R = H ou CH₃) sobre os primeiros (em *orto*). A posição da frequência de absorção dos H-2', -6', depende, ainda, do nível de oxidação do anel heterocíclico C, não variando significativamente, λ_a dos H-3', -5' (Tabela 1.4.5).

Tabela 1.4.5- Deslocamentos químicos dos H sobre os C-2', -3', -5', e -6' (em flavonóides 4'-oxigenados) * em unidades δ .

Classes	H-2', -6'	H-3', -5'
Flavanonas (2')	7,1- 7,3 d	6,5- 7,1 d
Dihidroflavonóis (2.2)	7,2- 7,4 d	6,5- 7,1 d
Isoflavonas (2.6.1)	7,2- 7,5 d	6,5- 7,1 d
Chalconas (2.1)**(H2,6,3,5)	7,4- 7,6 d	6,5- 7,1 d
Auronas (2.3.1)	7,6- 7,8 d	6,5- 7,1 d
Flavonas (2.5.1)	7,7- 7,9 d	6,5- 7,1 d
Flavonóis (2.2.1.1)	7,9- 8,1 d	6,5- 7,1 d
(*) veja as estruturas moleculares no Quadro I.1, p. 5.		
(**) em 2'- deoxi-		

A comparação de espectros de substâncias em que R = Me com espectros de substâncias em que R = COCH₃, revela-se importante em trabalhos de investigação estrutural. Esta análise comparativa permite deduzir pela existência ou não de grupo OH em 4', já que este grupo exerce o mesmo efeito de blindagem exercido pelo grupo OCH₃. Todavia, a acetilação de OH- 4', provocará um deslocamento paramagnético da banda correspondente aos H-3', -5', enquanto que a banda correspondente aos H-2', -6' não sofre significativa modificação (Tabela 1.5.5.1) ²¹.

Tabela 1.4.5.1- Deslocamentos químicos dos H sobre o anel B de 4'-oxiflavonas . Os valores registrados independem da natureza ou do número de substituintes existentes nos outros anéis ²¹:

R	H-2', -6'	H-3', -5'	Solvente
Me	7,78- 8,18	6,95- 7,05	CDCl ₃
Ac	7,85- 8,24	7,24- 7,30	CDCl ₃
SiMe ₃	7,10- 8,10	7,10- 6,65	CCl ₄
H	8,10- 7,98	6,90- 6,98	(CD ₃) ₂ SO

1.4.5- Hidrogênios hidroxílicos

Flavonóides completamente trimetilsililados, por definição não contém hidrogênios hidroxílicos fenólicos (OH) e, assim, não podem ser usados para a sua detecção. DMSO- d_6 , portanto, demonstra ser um solvente ideal para a detecção de OH. Por exemplo, no espectro de 3,5,7-tridroxiflavona as ressonâncias dos OH ocorrem a 12,40 ppm (5-OH), 10,93 ppm (7-OH) e 9,70 ppm (3-OH) ^{4a}. O desaparecimento sobre a adição de D₂O, dos sinais observados, confirma a sua identidade como ressonâncias de OH.

1.4.6- Hidrogênios metoxílicos

Os sinais de hidrogênios de grupos metoxila, com poucas exceções aparecem na série de 3,5- 4,1 ppm ^{4a} quando solventes como CCl₄, CDCl₃ e DMSO- d_6 são usados. Eles são de pouco valor diagnóstico, a menos que deslocamentos induzidos são medidos.

1.4.6.1- Deslocamentos induzidos por benzeno. Na análise de estruturas de metoxiflavonas (2.5) e flavonóis (2.2.1) pode ser demonstrado, primeiro registrando o espectro de RMN-¹H em CDCl₃, e depois em C₆H₆, que o tamanho do deslocamento benzeno-induzido (Δ) de certos sinais de metoxilas, era, em alguma extensão, indicativo da posição do grupo metoxila sobre o núcleo da flavona, como mostra a Tabela 1.4.6 ^{4a}.

Tabela 1.4.6- Valores Δ ($\delta_{CDCl_3} - \delta_{C_6H_6}$) para os sinais de metoxilas em flavonas (2.5) na ausência de *orto*-substituintes.

Metoxila em	Δ
C-3	- 0,07 a + 0,34 ppm
C-5	+ 0,43 a + 0,58 ppm
C-7	+ 0,54 a + 0,76 ppm
C-2'	+ 0,46 a + 0,53 ppm
C-4'	+ 0,54 a + 0,71 ppm
(*)- veja as estruturas moleculares no Quadro I.1, p. 5.	

Grandes deslocamentos foram notados para as metoxilas na posições conjugadas à carbonila e, todavia, estes deslocamentos eram reduzidos na presença de *orto*-oxigenação (-OH ou -OCH₃). Em 7,8-dimetoxiflavona o sinal 8-metoxila sofre somente um pequeno deslocamento e em 5,7-dioxigenado-6-metoxiflavonas o sinal 6-metoxila exhibe um deslocamento de somente $\pm 0,03$ ppm.

Orto-oxigenação de uma 5-metoxiflavona (*i.e.*, no C-6), resulta em uma drástica redução no deslocamento do sinal de 5-OCH₃ a partir de um alto valor positivo para próximo de zero. Pelter *et al.* (1969), segundo Mabry ^{4a}, demonstrou que o volumoso *orto*-substituinte pode ser qualquer variedade de outros grupos e

não necessariamente um grupo metoxila. Eles também estabeleceram que a disponibilidade do benzeno para a metoxila é somente impedida se a metoxila é ladeada sobre ambos os lados por substituintes.

Estava assim concluído que, o deslocamento induzido por benzeno para os sinais de grupos metoxilas (ou no anel A ou no anel B), *orto* a um H-arila, é maior do que 0,3 ppm, enquanto que os sinais de grupos metoxilas na ausência de H semelhante é movido por somente 0,0- 0,2 ppm.

Outros estudos envolvendo a associação do benzeno com grupos metoxilas são encontrados nas referências citadas por Mabry *et al.* ⁴⁸.

1.4.7- Efeito Nuclear Overhauser (NOE)

Nos trabalhos de determinação estrutural de uma 8-isoprenil-3,7,4'-trimetilquercetina, Pinhey *et al.* (1973), segundo Mabry ⁴⁸, usou o NOE para comprovar o padrão de substituição dos aneis A e C. Assim, irradiação na frequência de ressonância do grupo metoxila produziu um aumento de 13% da integral do sinal do H-2', presumivelmente devido ao NOE entre o grupo 3-OCH₃ e o H sobre o C-2'.

1.4.8- Correlação C,H por transferência de polarização (HETCOR)

Experimentos de correlação C,H bidimensional, fornece sinais cruzados para todos os núcleos de ¹H e ¹³C os quais estão conectados por um acoplamento de uma ligação [¹J (C,H)]. A designação de um membro do par de spins-acoplados, conduz imediatamente à designação do outro ²². De qualquer modo, é frequentemente desejável observar sinais-cruzados de pares de spin C,H conectados por acoplamentos de duas (²J_{C,H}) ou três (³J_{C,H}) ligações. Para tanto, outras alternativas são os experimentos COLOC e HMBC.

1.4.9- Correlação C,H via acoplamento a longa- série (COLOC)

O procedimento de correlação C,H a longa-distância como descrito acima, pode ainda não ser satisfatório. Um método denominado COLOC (Correlation spectroscopy via Long range Coupling), pode portanto ser desenvolvido ²³.

1.4.10- Experimentos de HMQC

O experimento a priori descrito, é a mais simples forma de uma técnica de correlação H, X. HMQC destaca-se para Heteronuclear Multiple Quantum Coerence. A sequência HMQC, foi designada para correlacionar núcleos de ¹H e ¹³C via ¹J_{C,H} ²⁴.

1.5- Espectrometria de Massas ^{4b,21}

1.5.1- Introdução

O trabalho de Reed e Wilson, citado por Bráz Filho ²¹, marcou o início da aplicação da espectrometria de massas no campo de flavonóides. Os resultados experimentais demonstraram a possibilidade da utilização deste método para fins de determinação estrutural.

Três fatores principais justificam a crescente aceitação da espectrometria de massas, especialmente aos estudos da química de produtos naturais:

- a- aperfeiçoamento dos aparelhos;
- b- pequena quantidade necessária da amostra (ca.de 1 mg);
- c- número de informações obtidas, além do peso molecular das substâncias.

Evidentemente, a potencialidade do método torna-se mais acentuada quando associado aos outros métodos físicos anteriormente revistos.

Fragmentação de flavonóides sob impacto de elétrons ocorre por um número limitado de caminhos previsíveis. Fragmentos característicos originam-se por fissão do íon molecular (M^+) em fragmentos derivados dos anéis A e B. Esta fragmentação usualmente envolve um ou ambos caminhos I (retro-Diels-Alder) e II (deslocamento não compensado de elétrons).

1.5.2- Determinação do peso molecular e fórmula molecular

O espectro de massas de um flavonóide é via de regra dominado por um número reduzido de picos, que aparecem predominantemente na região de massas mais elevadas, nas imediações do pico do íon molecular e na região de massas médias, parte central do espectro.

O pico correspondente ao íon molecular é facilmente reconhecido já que frequentemente revela-se muito intenso, não raro constituindo o pico base. Tal comportamento é previsto. A aromaticidade dos flavonóides confere grande estabilidade ao íon molecular.

Com base no peso decorrente do esqueleto básico fundamental (Quadro I.2, p.5) e nos principais grupos substituintes encontrados em produtos naturais⁹, incluindo-se os grupos OH, OCH₃ e OCH₂O, pode-se deduzir a fórmula molecular de um flavonóide. A presença e a natureza de grupos substituintes podem ser deduzidos com grande segurança por espectrometria de rmn.

Assim, a soma das massas da substância fundamental e a dos grupos substituintes, tentativamente escolhidos⁹, permitirá propor a fórmula molecular para uma substância flavonoídica. Para exemplificar citamos uma substância cujo espectro de massas revela peso molecular 270. Este peso molecular pode corresponder ao peso básico 224 + 1 OCH₃ + 1 OH. Ou seja, 224 + 30 + 16 = 270.

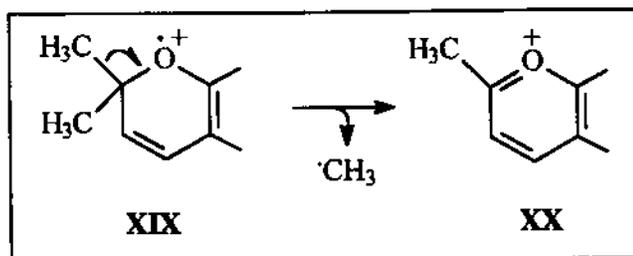
Com base nestes dados, poderíamos estar diante de uma flavanona, chalcona, isoflavanona ou pterocarpano (Quadro I.1, p.5) de fórmula molecular

$C_{15}H_{10}O_2$ (OCH_3) (OH). Evidentemente, os caminhos de fragmentação seguidos pelos pterocarpanos permitem distinguí-los dos demais. As rupturas envolvendo o hexanel heterocíclico nos pterocarpanos levam a fragmentos diferentes daqueles originários das flavanonas, chalconas e isoflavanonas.

1.5.3- Análise do espectro de massas nas imediações do íon molecular

A presença de grupo OCH_3 pode ser atribuída pela análise aritmética do espectro através da perda de 30 e/ou 31 e/ou 15 unidades de massa. Já a presença do grupo OH pode ser proposta através da verificação de picos em M-17 e/ou M-18³³⁻³⁵. A contagem do número de grupo OH, pode ser feita através do espectro de massas do produto de metilação ou acetilação.

Frequentemente, as substâncias que contêm o substituinte 2,2-dimetilcromeno (XIX) apresentam o pico base em M-15 devido a fácil eliminação de radical metila para formar um íon não radicalar (XX) com estabilidade significativa.



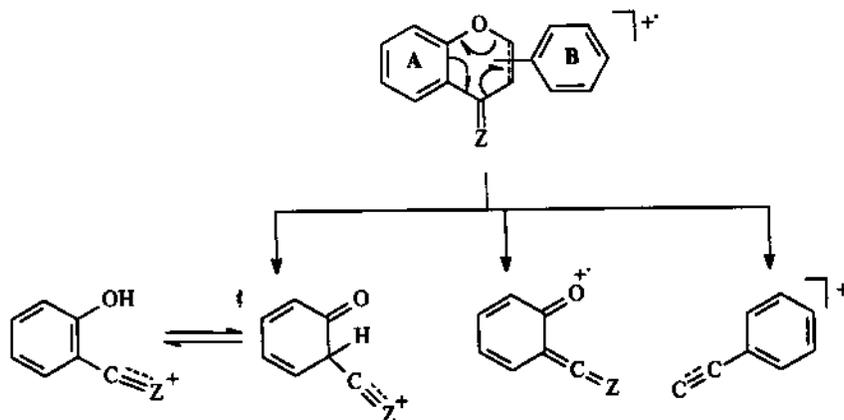
Portanto, é perfeitamente previsível que o número, a natureza e a posição de grupos substituintes pode modificar significativamente o comportamento de flavonóides no espectrômetro de massas. Evidentemente, o aumento de grupos substituintes oxigenados permite uma maior estabilização do íon molecular através de efeitos eletrônicos, principalmente mesomérico.

1.5.4- Análise do espectro de massas na região de picos de massas intermediárias

As fragmentações que envolvem o hexanel heterocíclico podem ser utilizadas para confirmação de um flavonóide. Além disso, o número e a natureza de grupos substituintes podem ser conferidos através dos fragmentos que envolvem os anéis A e B. As fragmentações que ocorrem no anel heterocíclico sem e/ou com rearranjo de hidrogênio são referidas como retro-Diels-Alder (Quadro 1.5.2)^{4b-21}.

Os pterocarpanos (Quadro 1.5.9, p.36) apresentam condições estruturais desfavoráveis para este tipo de fragmentação (Quadro 1.5.2). Portanto, os pterocarpanos podem ser distinguidos das chalconas (2) e flavanonas (2'), embora possuam a mesma fórmula molecular fundamental, $C_{15}H_{12}O_2$.

Quadro 1.5.2- Fragmentação envolvendo deslocamento compensado de elétrons sem rearranjo de hidrogênio. Z= oxigênio (C=O), Z= OH (CHOH) ou Z= H, (CH₂).

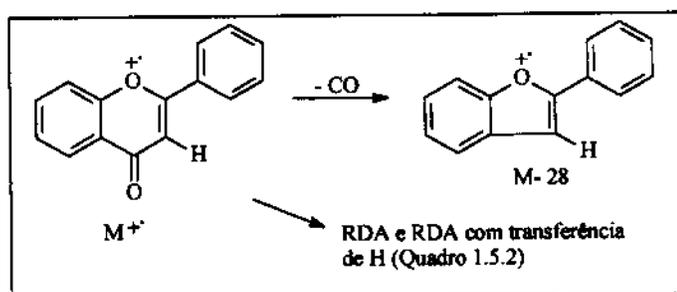


1.5.5- Flavonas

As flavonas apresentam um esqueleto básico de fórmula molecular C₁₅H₁₀O₂ (Quadro 1.5.3) e diante das possibilidades de substituintes⁹, pode-se formular estrutura molecular para estas substâncias.

Flavonas que não apresentam função oxigenada na posição C-3, revelam a presença de pico em M-28 e M-28/2 correspondente à expulsão de monóxido de carbono. A fragmentação tipo RDA e o deslocamento compensado de H, aparecem como caminhos importantes, Quadro 1.5.3.

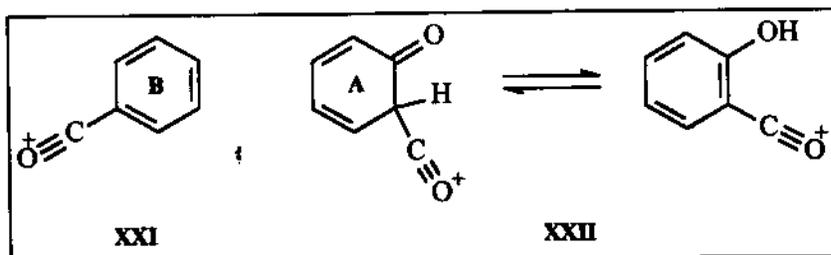
Quadro 1.5.3- Caminhos principais de fragmentação de flavonas no espectrômetro de massas.



Entretanto, com o aumento de funções oxigenadas no esqueleto flavônico, ocorrerá uma maior estabilização do íon molecular e, conseqüentemente, uma diminuição nas abundâncias relativas dos fragmentos correspondentes aos anéis A e B (RDA).

As flavonas que sustentam função oxigenada no C-3, comportam-se de maneira diferente no espectrômetro de massas. Embora a fragmentação RDA possa ocorrer, os picos correspondentes têm a abundância relativa fortemente diminuída.

Audier, citado por Bráz Filho ²¹ formulou o fragmento XXI como característico de 3-hidroxi flavonas. A racionalização mecanística de sua formação, que envolve o anel B, foi confirmada através do uso de deutério. Outro fragmento importante no espectro de massas destas substâncias envolve o anel A, oriundo de um deslocamento compensado de elétrons com rearranjo de H (XXII), cujo mecanismo de formação não foi ainda esclarecido.

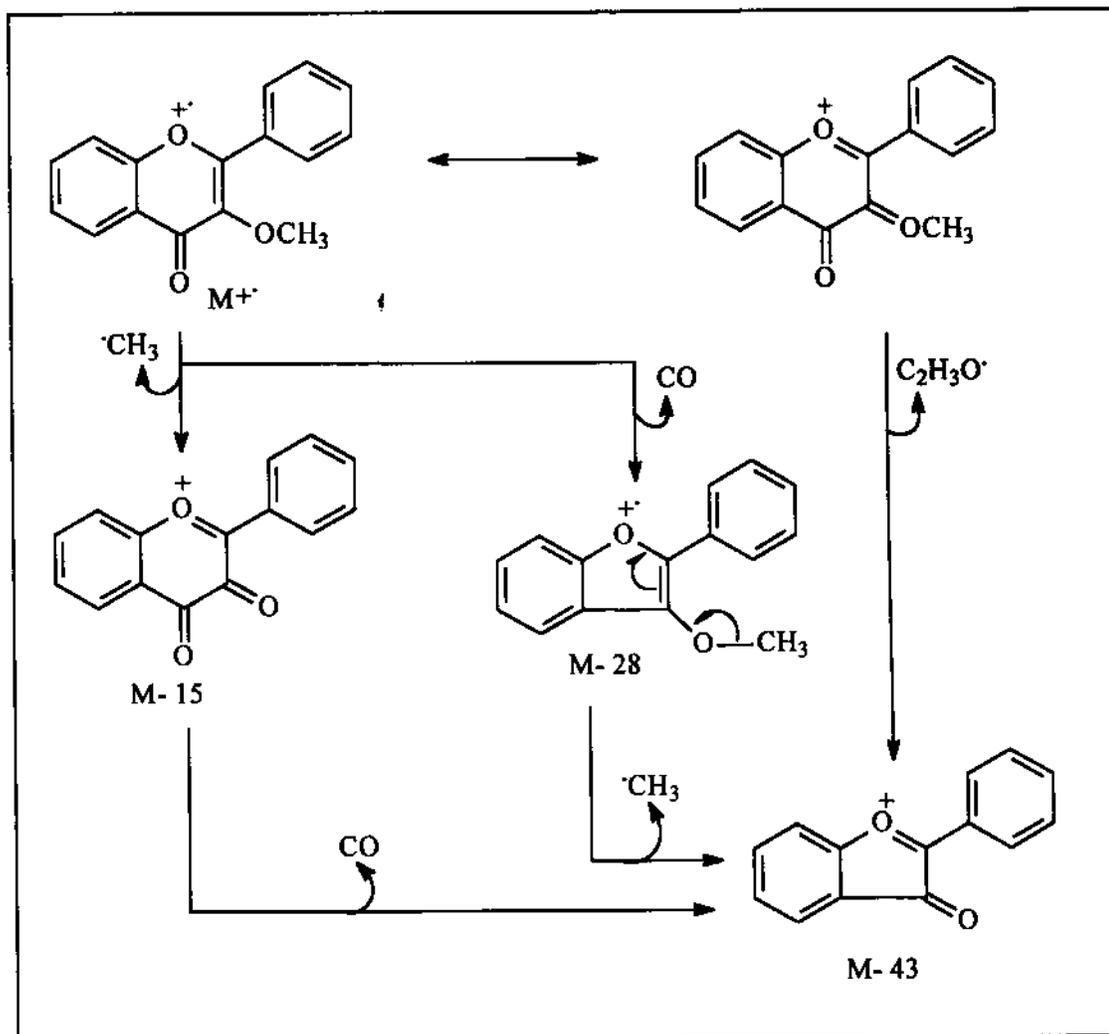


Observação destes fatos experimentais permitiu-nos averiguar o comportamento de substâncias análogas contendo um grupo OCH_3 em vez de um grupo OH em C-3. O trabalho descrito por Bowie e Cameron, segundo Bráz Filho ²¹, foi dedicado por este tipo de substância. Os autores discutem os espectros de 13 substâncias que sustentam um grupo OCH_3 -3 e chamam a atenção para a impotência do espectro de massas para fins de determinação estrutural. Resumidamente, os pesquisadores concluíram que:

1. A eliminação de 43 unidades de massas do íon molecular é compatível com a existência de grupo OCH_3 no C-3, $\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}$;
2. A natureza do grupo localizado no átomo de C-6 pode ser deduzida;
3. A ocorrência de fragmentação RDA pode ser deduzida da análise dos espectros registrados, embora os picos correspondentes sejam de baixa intensidade.

Aqueles pesquisadores atribuem a formação do pico em M-43 através da expulsão dos elementos do radical acetil por um processo que envolve uma única etapa. Por outro lado, é também viável que o pico M-43 possa originar-se através de duas transições consecutivas que envolvem a expulsão de $\cdot\text{CH}_3$ (M-15) e $\text{C}=\text{O}$ (M-28) e/ou $\text{C}=\text{O}$ e $\cdot\text{CH}_3$, conforme racionalização mecanística no Quadro 1.5.4 ²¹.

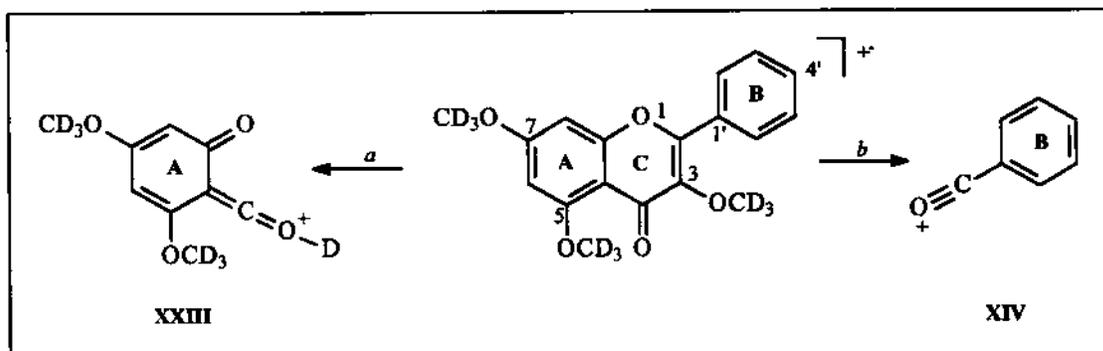
Quadro 1.5.4- Racionalização mecanística para a expulsão de C_2H_3O no espectro de massas de 3-metoxiflavonas.



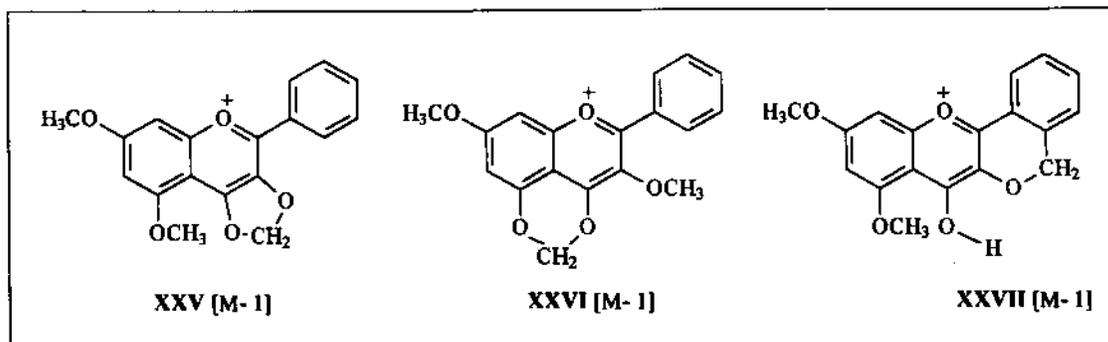
Embora Bowie e Cameron, segundo Bráz Filho ²¹, não comentam a possibilidade de formação do íon fragmentário XXI (p.30), pode se constatar a sua provável presença através da análise de espectros publicados por aqueles autores. Esta dedução é corroborada pela análise dos espectros de massas das substâncias isoladas da *Apuleia leiocarpa* ²¹ (compostos 11 e 19), *Lonchocarpus campestris* ⁷ (compostos 19 e 20) e de *Derris mollis* ³ (compostos 2 e 6).

Mais tarde, porém, Mabry, Schmid *et al.* ²⁹, propuseram experimentalmente, a origem do íon fragmento XXI a partir do estudo de padrões de fragmentação em CG-EM de flavonóides agliconas perdeuteriometilados (PDM).

Estes pesquisadores, verificaram que no EM da maioria dos flavonóides permetilados, $M^{\bullet+}$, $[M-1]^{\bullet+}$ e $[M-15]^{\bullet+}$ são proeminentes picos. Os mais abundantes fragmentos tipo-*a* (RDA + H) e -*b*, são XXIII e XIV, respectivamente. Nas análises de CG-EM de flavonóides PDM, intensos $M^{\bullet+}$, $[M-1]^{\bullet+}$, moderadamente intenso $[M-CO_3]^{\bullet+}$ e fracos picos XXIII e XIV foram observados.



A presença de um intenso pico $[M-1]$ em flavonol peretil éter pode ser atribuída^{4b} às estruturas XXV e XXVI, as quais podem ser formadas após perda de H dos grupos 3- ou 5-OCH₃, respectivamente.



Todavia, essa interpretação requer reinvestigação, já que nos estudos²⁹ com flavonóis PDM no C-3 e C-5, um comparável pico $[M-2]^+$ não foi observado enquanto que um $[M-1]^+$ estava ainda presente. Portanto, a formação do pico $[M-1]^+$ nestes flavonóis presumivelmente envolve um H aromático, quiçá, como em uma estrutura semelhante a XXVII²⁹.

Por outro lado, após perdeutériometilação, o fraco fragmento XXIII foi observado a 1 u.m.a. maior que a calculada para uma simples transferência de H em todos os compostos exceto galangina 3-O-metil éter. É portanto concluído que, nestes compostos D ou H é transferido do substituinte em C-3.

Os fragmentos XXV e XXVI em flavonóis PDM permitiram identificação do número e tipo de substituinte nos anéis A e B dos compostos de origem; no entanto, o grau de oxigenação parece determinar a intensidade destes picos.

Finalmente, estudos do comportamento no espectro de massas de flavonas oxigenadas em outras posições possíveis, foram muito bem documentados por Bráz Filho²¹.

1.5.6- Isoflavonas

As isoflavonas comportam-se de maneira análoga às flavonas. Os fragmentos principais que aparecem no espectro de massas das isoflavonas resultam da fragmentação envolvendo deslocamento compensado de elétrons. Conseqüentemente, pode-se estabelecer a distribuição das funções oxigenadas nos anéis A e B. Obviamente, as influências eletrônicas de grupos substituintes aqui também se evidenciam.

As diferenças principais que podem ser constatadas nos espectros de isoflavonas em relação às flavonas são ²¹:

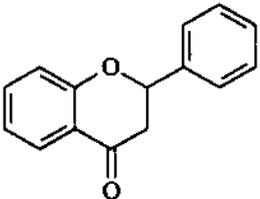
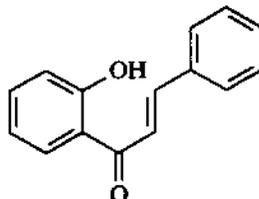
- a. o pico em M-28 é significativamente menos intenso;
- b. o pico em M-28/2 não aparece;
- c. a ocorrência de pico significativo em M/2;
- d. a ocorrência de pico significativo em M-1.

1.5.7- Flavanonas e Chalconas

Os espectros de massas destas substâncias são qualitativamente idênticos, conforme revela a comparação dos espectros da flavanona XXVIII e da chalcona XXIX ²¹ (Quadro 1.5.5).

Estes dados são favoráveis à existência de um equilíbrio entre as duas substâncias ionizadas, o que é muito razoável. Com isso, não é possível distinguir uma chalcona de uma flavanona, substâncias isômeras, com base somente no espectro de massas. Entretanto, um simples espectro de UV permitirá a distinção entre estas duas classes.

Quadro 1.5.5- Dados do espectro de massas da flavanona (XXVIII) e da chalcona correspondente (XIX).

 XXVIII		 XXIX	
m/z	%	m/z	%
224	79	224	100
223	66	223	83
147	69	147	80
121	27	121	41
120	100	120	63
104	42	104	39
103	23	103	25

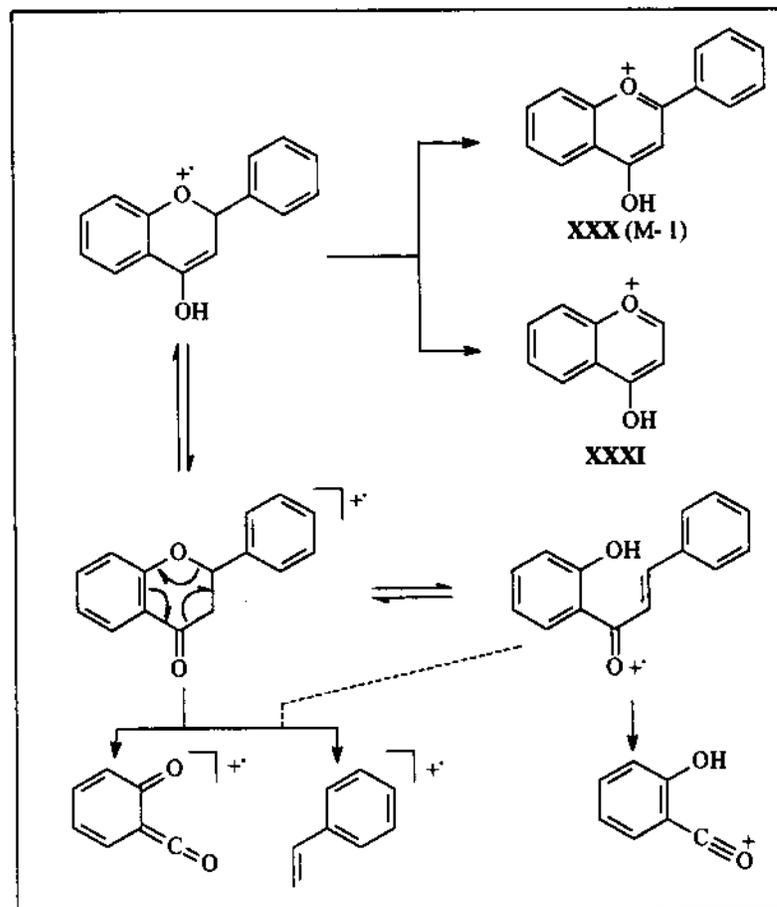
Pode-se, entretanto, constatar dos dados figurados acima ($m/z = 120$ e $m/z = 104$) que a fragmentação envolvendo clivagem RDA, assume maior importância nas flavanonas e chalconas do que no caso das flavonas e isoflavonas.

Em face da possibilidade do equilíbrio referido, pode-se justificar esta maior facilidade de fragmentação (RDA), pois, as flavanonas apresentam o anel heterocíclico com uma ligação simples C_2-C_3 que facilita a ruptura $C_2-C_3-C=O$. As flavonas apresentam um sistema carbonílico α,β -insaturado, o que dificulta a ruptura da ligação $C_2=C_3-C=O$.

Esta fragmentação, em conjunto com o peso correspondente ao esqueleto, permite distinguir estes compostos dos demais flavonóides, bem como a localização e natureza de substituintes nos anéis A e B.

O Quadro 1.5.6 resume os principais caminhos de fragmentação de flavanonas e chalconas. A forma enólica da flavanona favorece as fragmentações que envolvem a expulsão ou de um átomo de hidrogênio ou radical arila, a partir do íon molecular, para fornecer as espécies catiônicas ³⁰XXX e XXXI. Esta dedução é corroborada pela análise dos espectros de massas das flavanonas (22, 23 e 24) isoladas de *L. campestris*⁷.

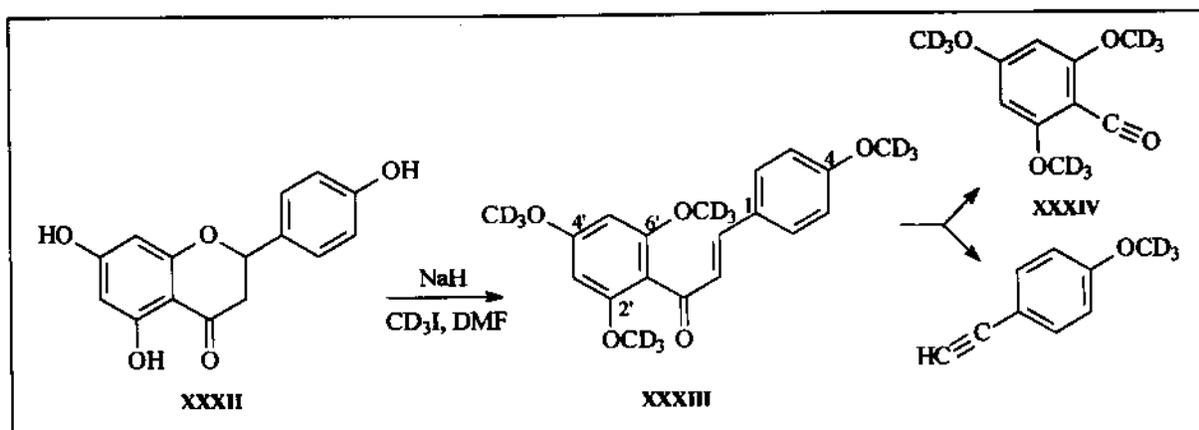
Quadro 1.5.6- Caminhos principais de fragmentação de flavanonas no espectrômetro de massas.



Constata-se a partir da literatura ³⁰, que as flavanonas (inclusive as de *L. campestris*, 5, 6, 7 e 8) e chalconas revelam picos intensos, não raro o pico base, na região correspondente aos fragmentos devido a clivagem RDA.

Na presença da base forte usada no processo de perdeutériometilação, as flavanonas sofrem abertura de anel para chalconas, as quais são subsequêntemente convertidas a chalconas PDM. Por exemplo, naringenina (XXXII) fornece XXXIII (por UV e RMN), Quadro 1.5.7 ²⁹.

Quadro 1.5.7- Conversão de flavanonas a chalconas durante perdeutériometilação; fragmentos da chalcona PDM no espectro de massas.



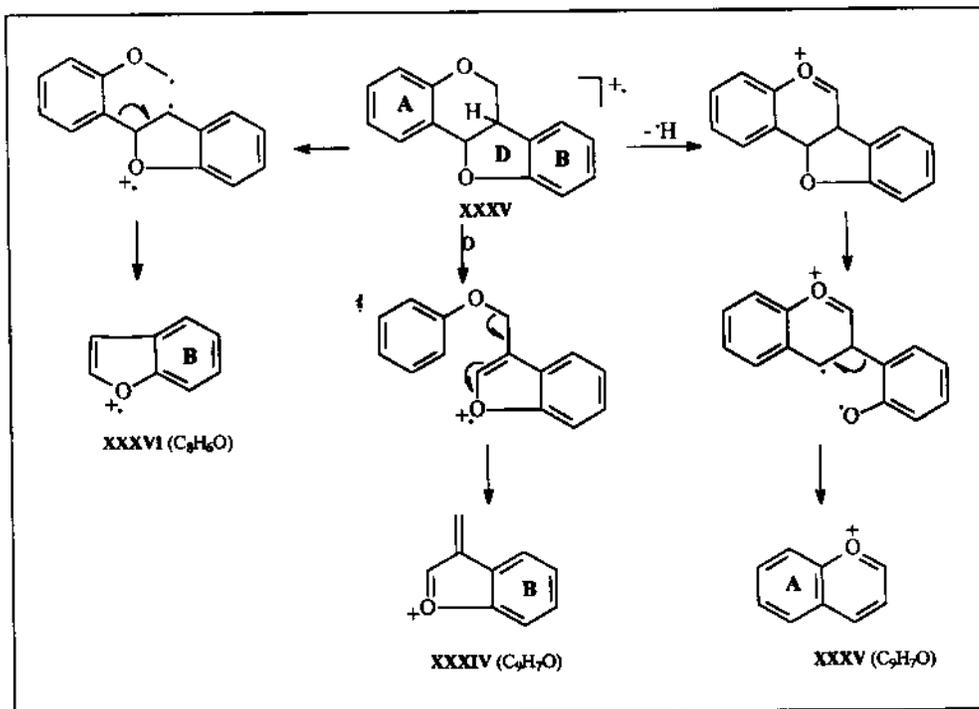
Nas análises de CG-EM de chalconas PDM empregadas neste estudo, um forte pico $[M-28]^+$ é observado. Isso parece típico para chalconas com grupos 2'- e 2',6'-(di)metoxila ²⁹.

A estrutura proposta para o fragmento diagnóstico XXXIV, é suportada pelo seu deslocamento a partir de m/e 204 para m/e 195 nos compostos permetilado, indicando a presença de três grupos deutériometilados neste fragmento ²⁹.

1.5.8- Pterocarpanos

Os pterocarpanóides XXXV apresentam a mesma fórmula molecular das flavanonas, chalconas e isoflavanonas. Entretanto, eles comportam-se no espectrômetro de massas de maneira diferente, sendo o pico correspondente ao íon molecular geralmente o pico base e o pico $[M-1]^+$, significativo. Além disso a fragmentação via clivagem RDA deixa de ocorrer em vista da própria arquitetura molecular (Quadro 1.5.8) ²¹.

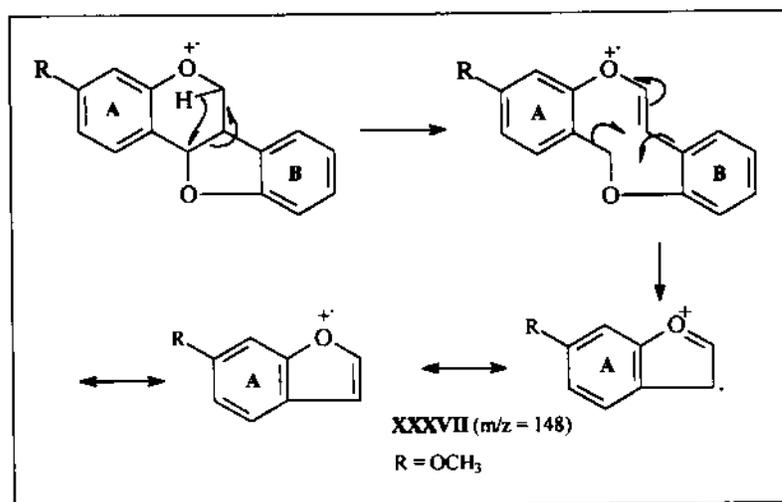
Quadro 1.5.8- Caminho principais de fragmentação de pterocarpanos no espectrômetro de massas .



Porém, conforme se deduz do Quadro 1.5.8, o espectro de massas de pterocarpanos não permite afirmar de modo confiável, os grupos substituintes localizados nos anéis A e B ²¹.

Por outro lado, o pico em m/z 148 também pode ser justificado através do fragmento XXXVII, conforme a racionalização mecanística envolvendo rearranjo de H (Quadro 1.5.9). Todavia, o fragmento XXXVII resultante tem a mesma fórmula molecular básica C_9H_8O que o fragmento XXXVI Quadro 1.5.8) ²¹.

Quadro 1.5.9- Fragmentação envolvendo o anel A de pterocarpanos no espectrômetro de massas.



CAPÍTULO 2

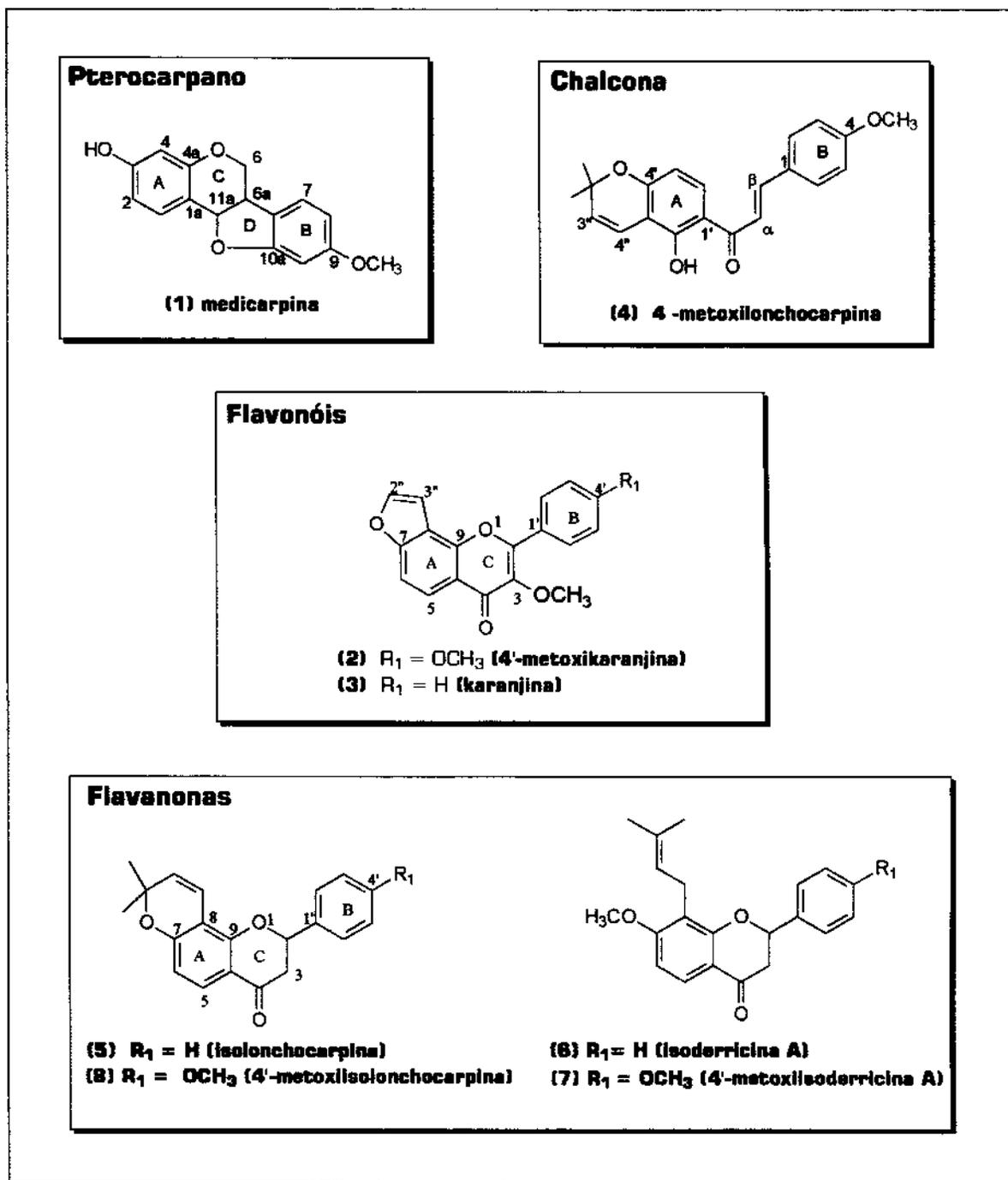
Resultados e Discussão

2.1- Determinação Estrutural dos Flavonóides de *L. campestris*

O estudo fitoquímico dos extratos das raízes de *L. campestris*⁷, possibilitou-nos o isolamento de seis constituintes flavonóides já conhecidos como produtos naturais, a saber: um pterocarpano (*medicarpina*, 1), previamente isolado de *Dalbergia stevensonii*²⁵, dois flavonóis (*4'-metoxikaranjina*, 2 e *karanjina*, 3), dentre os seis que ocorreram em *Derris mollis*³, uma chalcona (*4'-metoxilonchocarpina*, 4), isolada previamente de *Millettia pachycarpa*²⁶ e duas flavanonas (*isolonchocarpina*, 5) e (*isoderricina A*, 6), previamente isoladas de *Pongamia glabra*²⁷ e *Dahlstedtia pentaphyla*²⁸, respectivamente, e duas novas flavanonas cujas estruturas moleculares compreendem um derivado da isoderricina A (6) e da isolonchocarpina (5), respectivamente, a *4'-metoxiisoderricina A* (7)⁷ e a *4'-metoxiisolonchocarpina* (8)⁷, Quadros I.1, p.5 e 2.1.1, p.38).

Realizamos a determinação estrutural dos constituintes isolados de *L. campestris*⁷, através dos métodos físicos anteriormente revistos. Adicionalmente comparamos nossos dados com os registrados na literatura^{3,25-28} e, em particular, a *medicarpina* e a *karanjina* foram comparadas com amostras autênticas previamente identificadas em nosso laboratório.

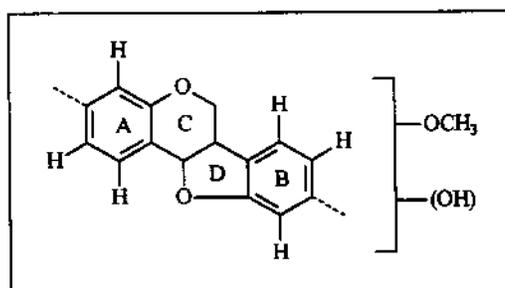
Quadro 2.1.1- Classes e estruturas moleculares dos flavonóides isolados de *L. campestris* ⁷.



2.1.1- Pterocarpano [medicarpina (1)]

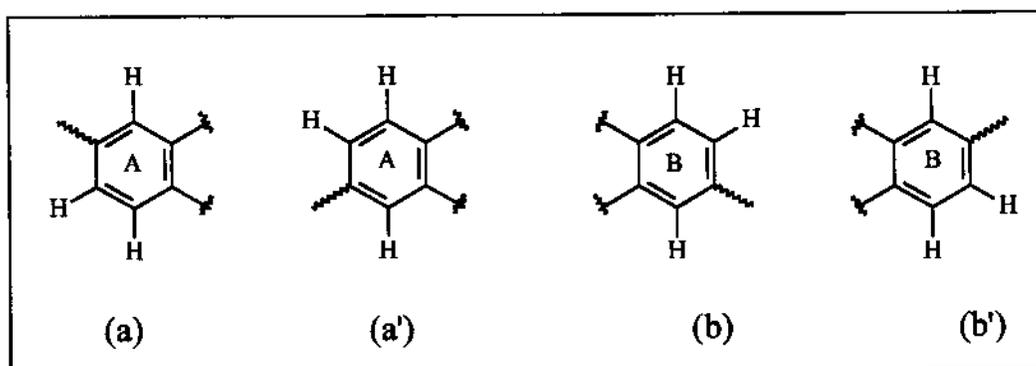
No espectro de RMN de ¹H da substância 1 (Tabela 2.1.1, p.41 e espectro E1, p.97), observamos na região de absorção de H alifáticos, as características bandas múltiplas constituídas de um multipeto o qual integra 2H a 3,42- 3,69 ppm.

Relativamente mais desblindado um duplo dubleto com $J = 10,6$ e $5,1$ Hz, integrando 1H a 4,23 ppm. Ainda nesta região, um dubleto com $J = 7$ Hz, integrando 1H a 5,48 ppm, caracteriza um acoplamento vicinal. Por outro lado, na região da frequência de absorção de H aromáticos, um segundo multipletto correspondendo a 3H, comparece a 6,41- 6,47 ppm. Por sua vez, um típico acoplamento em *orto* e a longa- distância, 4J , é revelado por um duplo dubleto com $J = 8,5$ e 2 Hz, integrando 1H a 6,52 ppm e por um dubleto com $J = 8,5$ Hz integrando 1H, o qual suporta a maior desblindagem na arquitetura molecular a 7,36 ppm; em vista das magnitudes destas constantes de acoplamentos e de suas respectivas frequências de absorção, estas bandas denotam, portanto, um sistema de três spins acoplados do tipo AMX. Outro típico acoplamento em *orto*, denota-se pela banda múltipla de absorção representada por um dupleto com $J = 9$ Hz integrando 1H a 7,11 ppm. Finalmente, um intenso e típico singletto integrando 3H os quais ressonam na frequência de absorção a 3,76 ppm, caracteriza como o primeiro substituinte, uma metoxila aromática. Assim, com estes dados definimos a montagem de um esqueleto pterocarpanóide:

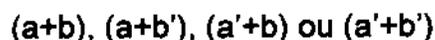


Ponderando-se o número de H em uma estrutura pterocarpanóide, ressonando no espectro em questão, bem como a presença de dois acoplamentos em *orto* e de dois a longa-distância, um segundo substituinte tipo hidroxílico é claramente evidenciado e confirmado pelo peso molecular do íon de maior massa ($M^+ = 270$), presente no espectro de massas [$M^+ = 224 + 30(OCH_3) + 16(OH)$]²¹, (espectro E1d e Quadro 2.1.3, p.44).

Ambos acoplamentos em *orto* e ambos a longa-distância, permitem estabelecermos quatro possíveis regioisômeros, a saber:



simplificando, temos:



Entretanto, admitindo-se o aceito postulado ⁶ de que a rota biossintética de pterocarpanos, invariavelmente resulta em função di-oxigenada em C-3 e -9 (Quadro I.2, p.5), resta-nos somente a alternativa (a+b). Todavia, ambos substituintes OH e OCH₃, podem ainda gerar dois possíveis regioisômeros na estrutura (a+b), ou seja, temos um dos estereoisômeros ou de medicarpina (1) ou de 3-metóxi-9-hidroxipterocarpano ³¹.

A priori parece nos ambígua a atribuição dos sinais de absorção dos hidrogênios aromáticos no espectro de RMN¹H do composto em questão ³². De acordo com a literatura, as frequências de ressonância devido aos átomos de carbonos aromáticos (E1a, p.98, Tabela 2.1.1, p.41), tomam-se úteis no estabelecimento do presente padrão de substituição do esqueleto pterocarpanóide ^{19,21-23} (1), apoiando-se nos seguintes critérios:

- a- completa independência dos deslocamentos químicos dos carbonos dos anéis A e D, constatada em modelos com diferentes grupos substituintes;
- b- efeitos de grupos substituintes (hidroxila, metoxila e acetila) sobre os deslocamentos químicos dos C de derivados de benzeno simples e de pterocarpanos;
- c- experimentos de correlação de deslocamentos químicos heteronuclear, C-H, SFORD e HETCOR, como suporte dos critérios acima.

Em estudos anteriores ³³, pôde-se demonstrar que em derivados de benzeno simples, o átomo de carbono *ipso* sustentando um grupo metoxila, é desblindado cerca de 30,2 ppm, enquanto que os átomos de carbonos nas posições *orto* e *para* são protegidos cerca de 15,5 e 8,9 ppm, respectivamente. Em sistemas aromáticos mais complexos é indicado que estes deslocamentos químicos variam em magnitude mas não em sentido. Grupos hidroxila e metoxila, exercem efeitos mesomérico similares sobre as frequências de ressonância dos átomos de carbonos aromáticos. De qualquer modo, acetilação de um grupo hidroxila fenólico causa significativo deslocamento nas ressonâncias destes átomos, podendo, portanto, ser usada para determinar o arranjo de grupos hidroxila e metoxila presentes. Assim, átomo de carbono em *ipso* é protegido, enquanto que os carbonos em *orto* e em *para* são desprotegidos.

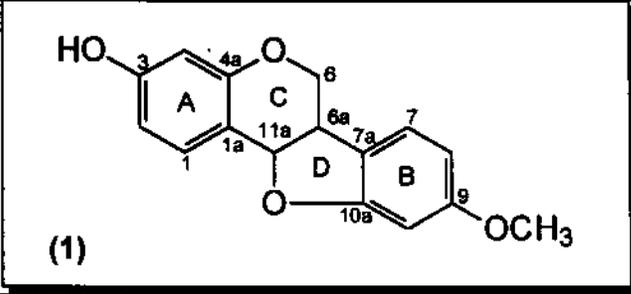
Diante do anteriormente exposto, podemos distinguir os sinais dos átomos de carbonos aromáticos dos anéis A e B e confirmá-los através dos experimentos HETCOR, C-H, DEPT 90 e 135⁰ (E1b, p.98) e COLOC. Assim, finalmente decimos pela estrutura 1 (Quadro 2.1.1, p.38).

Vale ressaltar que o padrão de substituição de pterocarpanos não pode ser estabelecido, exceto o número e a natureza dos substituintes, por espectrometria de massas ²¹, uma vez que, os fragmentos envolvendo os anéis A e B, possuem a mesma massa fundamental (Quadro 2.1.3, p.44).

- Análise Conformacional do Anel Heterocíclico

A literatura³⁴ tem nos mostrado que a partir de modelo de Dreiding, os dois anéis heterocíclicos no sistema 6a-11a-diidro 6H-benzofuro [3-2c][1] benzopirano (1), estão *cis* fundido, pois a configuração relativa oposta, *trans*, confere maior tensão à molécula devido às interações entre os seus átomos. Quanto a sua

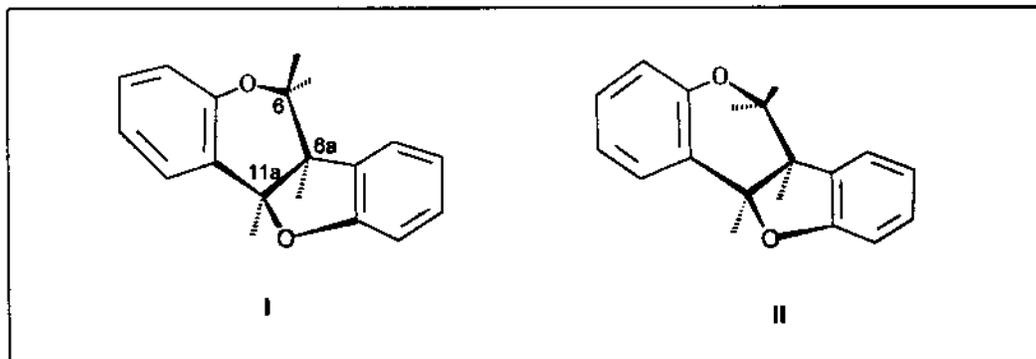
Tabela 2.1.1- Dados de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ / TMS) e RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃ / TMS) da medicarpina (1):

			
H	δ [multiplicidade, J (Hz)]	C	δ
1	7,36 (1H, d, 8,5)	1	132,7 (CH)
2	6,52 (1H, dd, 8,5 e 2,0)	1a	112,9 (C ₀)
4	6,41- 6,47 (3H, m)	2	110,3 (CH)
6ax	3,42- 3,69 (2H, m)	3	157,7* (C ₀)
6eq	4,23 (1H, dd, 10,0 e 5,0)	4	104,0 (CH)
6a	3,42- 3,69 (2H, m)	4a	157,2* (C ₀)
7	7,11 (1H, d, 9,0)	6	66,7 (CH ₂)
8	6,41-6,47 (3H, m)	6a	39,5 (CH)
10	6,41- 6,47 (3H, m)	7	125,3 (CH)
11a	5,48 (1H, d, 7,0)	7a	119,6 (C ₀)
OCH ₃ (C-9)	3,76 (3H, s)	8	106,8 (CH)
		9	161,2* (C ₀)
		10	97,3 (CH)
		10a	161,7* (C ₀)
		11a	78,8 (CH)
		OCH ₃ (C-9)	55,7 (CH ₃)

(*), (*)- valores intercambiáveis.

configuração absoluta, a mesma literatura atribui-na $6a_R : 11a_R$. De qualquer modo, há duas possíveis conformações, I e II, para este sistema, Quadro 2.1.2:

Quadro 2.1.2 - As duas possíveis conformações de $(6a_R : 11a_R)$ -6a,11a-diidro-6H-benzofuro [3,2c] [1] benzopirano.



De acordo com a equação de Karplus, as magnitudes das constantes de acoplamentos vicinais, H-H, para estes dois confôrmeros, são esperadas e significativamente diferentes (Quadro 2.1.2 e Tabela 2.1.2)³⁴.

Tabela 2.1.2- Constantes de acoplamentos esperadas para as mútuas conformações de $(6a_R : 11a_R)$ -diidro-6H-benzofuro [3,2c] [1] benzopirano.

Conformação I		Conformação II	
H acoplados	ângulo diedro ($^{\circ}$) J (Hz)	ângulo diedro ($^{\circ}$)	J (Hz)
6a- 11a	0 8 - 9 [7] ^a	0	8 - 9
6a- 6ax	180 10 - 12 [11] ^a	60	2 - 3
6a- 6eq	60 4 - 5 [5] ^a	60	2 - 3

(a) - valores experimentais por nós obtidos

Portanto, a comparação das constantes de acoplamentos experimentalmente determinadas, com as esperadas (Tabela 2.1.2), demonstra claramente que o sistema de anel benzofurobenzopirano (1), existe na conformação I, com o anel heterocíclico de 6-membros na forma meia-cadeira unida ao planar anel heterocíclico de 5-membros. A magnitude das constantes de acoplamentos observadas sugere que distorções angulares são minoritárias. Contudo, concluímos que a molécula, muito provavelmente existe predominantemente na conformação I e que, embora a molécula possa sofrer mudanças conformacionais entre os confôrmeros I e II, o equilíbrio é muito favorável ao primeiro³⁴.

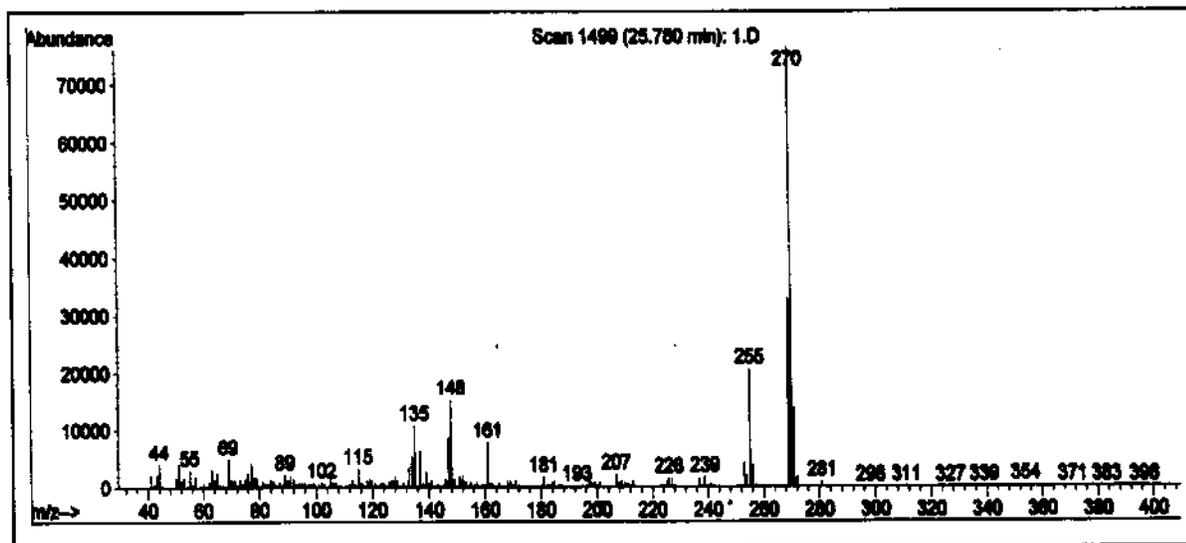
A magnitude absoluta da constante de acoplamento geminal ($J_{H_{6ax} - H_{6eq}} = 10$ Hz), está em perfeito acordo com os acoplamentos observados em sistemas similares, tais como MeOH: $J = 10,8$ Hz³⁴.

Embora nossos dados de rotação ótica não coincidam exatamente com os da literatura ²⁵, há uma grande probabilidade de termos o mesmo isômero 6aR e 11aR, pois, temos a mesma configuração relativa do produto natural referido e de atividade levógira com valores cujas magnitudes estão muito próximas (Tabela 2.1.3).

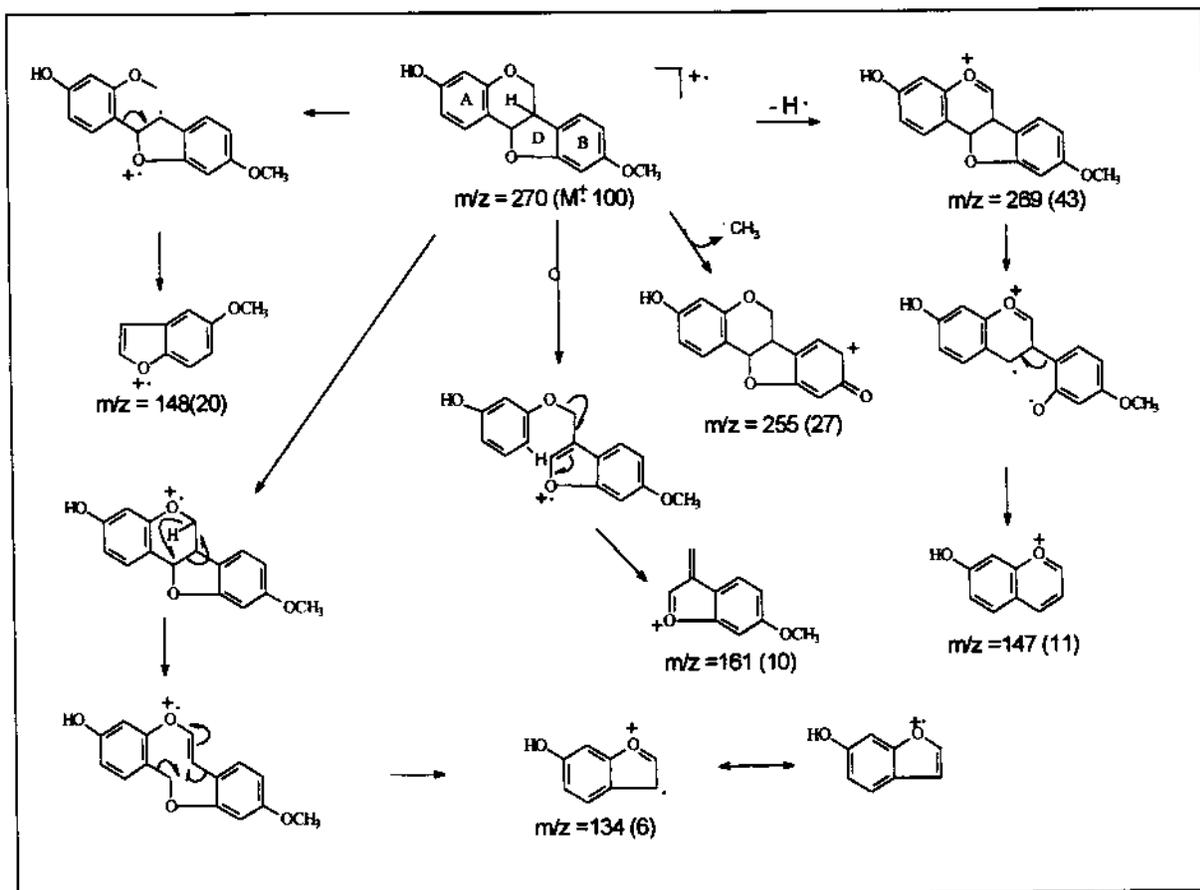
Tabela 2.1.3- Dados de EM, IV e atividade ótica ($[\alpha]_D$) da medicarpina (1):

EM, m / z (%): 270(M ⁺ 100), 269(43), 255(27), 161(10), 148(20), 147(10), 135(14), 134(6) u.m.a. Mecanismos de fragmentação, ver Quadro 2.1.3, p.44.
IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (CHCl₃): 3387 (OH), 1621, 1505, 1497, 1474 (C=C), 1380, 1345, 1277, 1192, 1146, 1116 (C-O). Ver espectro E1c, p.99
$[\alpha]_D$ (c = 10,0 mg / ml; CDCl₃; l = 0,5 dm): - 197 ^o (lit.: -234 ^o) ²⁵

E1d- Espectro de massas da medicarpina (1).

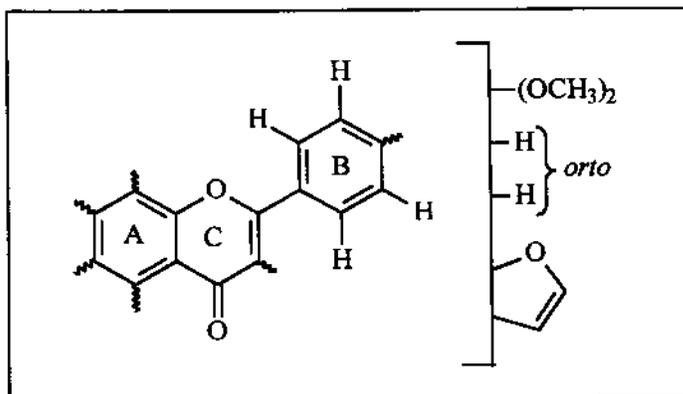


Quadro 2.1.3 - Racionalização mecanística da fragmentação da medicarpina (1), no espectrômetro de massas ²¹.



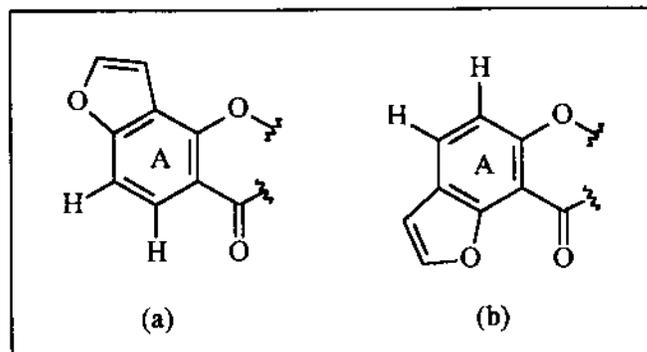
2.1.2- Flavonol-3-metil-éter [4'-metoxikaranjina (2)]

No espectro de RMN de ^1H do composto 2 (Tabela 2.1.4, p.47 e E2, p.100), predominam as bandas de absorção de H aromáticos. Observamos aí, os desdobramentos de H em *orto* acoplados representados por dois dubletos com $J = 9$ Hz, integrando 2H cada um a 7,06 e 8,15 ppm, caracterizam um anel benzênico *para*-dissubstituído. Um acoplamento em *orto* e a longa-distância, é representado pelo duplo dubleto com $J = 8,5$ e 1 Hz a 7,55 ppm, bem como pelo dubleto com $J = 8,5$ Hz cujo H relativamente mais desprotegido, ressona na frequência de 8,20 ppm; cada uma destas bandas integram 1H. Por sua vez, um duplo dubleto com $J = 2$ e 1 Hz a 7,18 ppm e um dupleto com $J = 2$ Hz a 7,64 ppm, cada um integrando 1H, caracterizando, respectivamente; um acoplamento a longa-distância e um acoplamento vicinal de H olefinicos, denotam claramente o típico substituinte anel furânico. Finalmente, um típico e intenso singlete a 3,92 ppm correspondendo a 6H, evidencia dois grupos substituintes metoxilas. Destes dados concluímos então, a montagem de um esqueleto flavônico:



A presença de um anel aromático *para*-dissubstituído no espectro de RMN ^1H , como acima discutido, a priori admite, aí, a fixação de um dos substituintes metoxila.

Por outro lado, os 2H em posição relativa *orto*, permitem estabelecermos dois possíveis regioisômeros:



Entretanto, a rota biossintética ⁶ (Quadro I.1, p.5), sistematicamente nos conduz às estruturas flavonoidicas com função mono-oxigenada na posição C-7, resultando portanto no regioisômero "a". Adicionalmente, o dubleto com $J = 8,5$ Hz

a 8,18 ppm no espectro de RMN de ^1H evidencia a localização de 1H periplanar ao grupo carbonila, o que só é possível no isômero "a".

A localização dos grupos substituintes metoxila é confirmada pela espectrometria de massas ^{4b,21} (E2a e Quadro 2.1.4, p.48). Para tanto, os principais fragmentos diagnósticos, estão a $m/z = 162$ (3%) produzido pela não favorável clivagem RDA de flavonas (ou flavonóis) e a $m/z = 279$ (14%) produzido pela típica eliminação dos elementos do radical acetila (CH_3 e $\text{C}=\text{O}$) o que caracteriza uma flavona 3-oxigenada (p.50).

Por outro lado, a eliminação de um radical H^\cdot gerando o fragmento que constitui o pico base, é predominante à difícil clivagem RDA, o que mais uma vez caracteriza esta substância como pertencente à classe das flavonas, ou seja, a presença de uma ligação dupla entre os C-2 e -3 ^{4a,21,29}.

Assim, concluímos finalmente pela estrutura do flavonol 2, a 4'-metoxikaranjina (Tabela 2.1.4 adiante).

De fato, uma pesquisa bibliográfica levou-nos à identidade do constituinte isolado de *Derris mollis* ³, cujos dados espectrométricos coincidem perfeitamente com os nossos.

Tabela 2.1.4 - Dados de RMN ^1H de 4'-metoxikaranjina 2 (300 MHz, CDCl_3 / TMS):

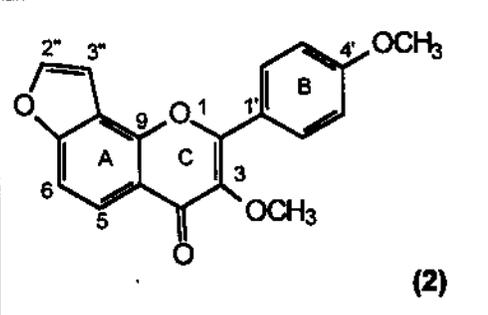
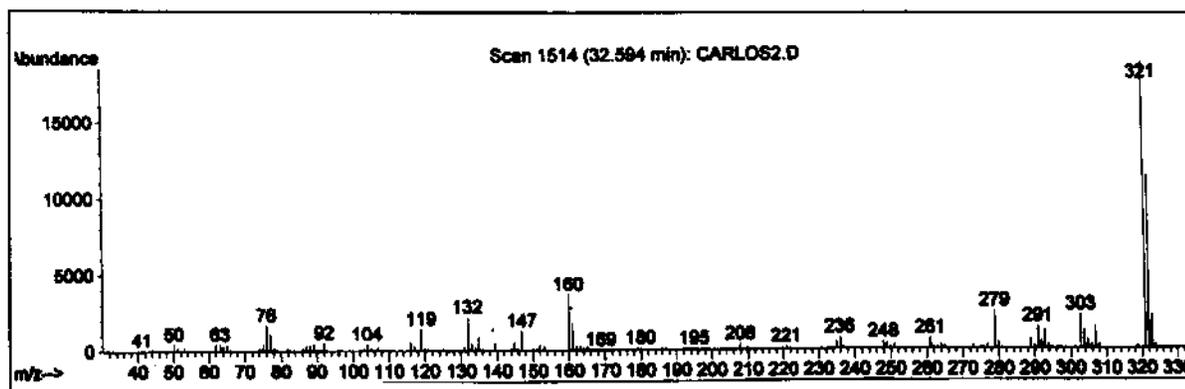
			
H	δ [multiplicidade, J(Hz)]	H	δ [multiplicidade, J(Hz)]
5	8,18 (1H, d, 8,5)	2''	7,64 (1H, d, 2,0)
6	7,56 (1H, dd, 1 e 8,5)	3''	7,18 (1H, dd, 1,0 e 2,0)
2', 6'	8,15 (2H, d, 9,0)	3-,4'- OCH ₃	3,92 (6H, s)
3', 5'	7,06 (2H, d, 9,0)		

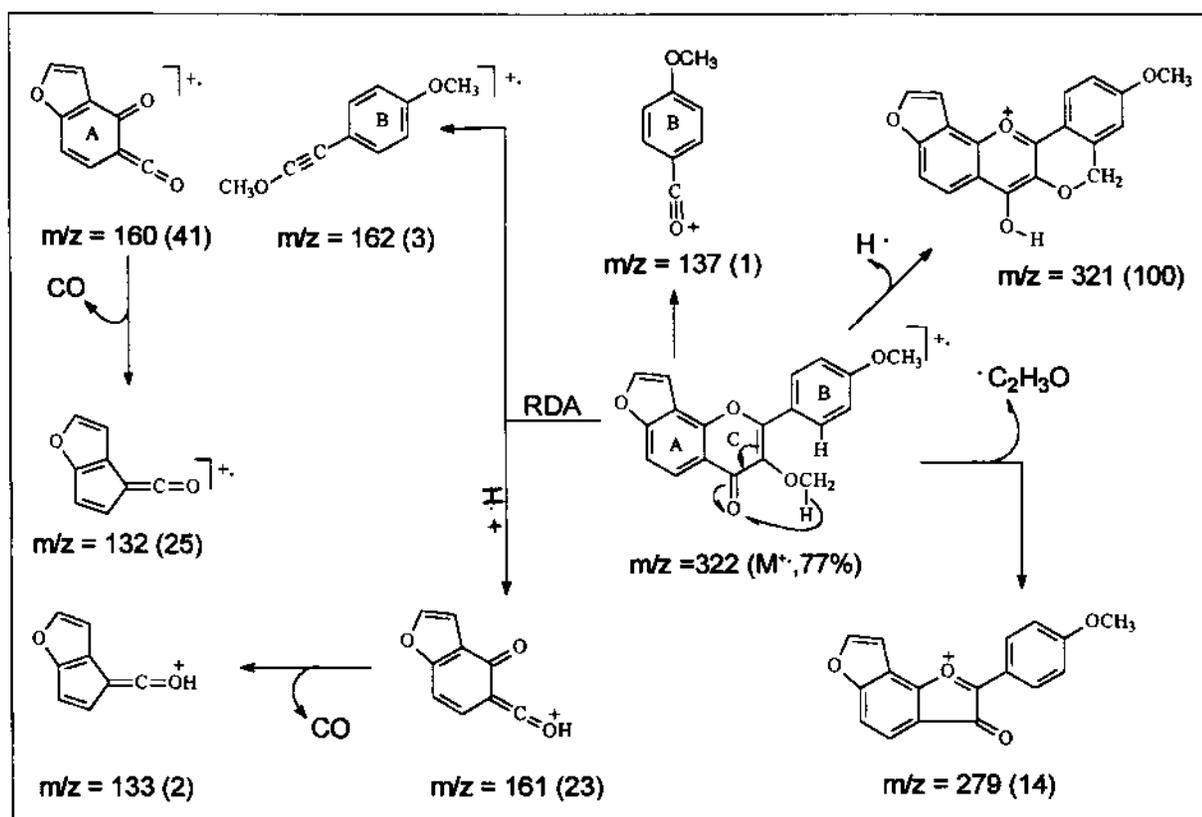
Tabela 2.1.5- Dados dos espectros de massas e de IV da substância 2:

EM, m / z (%):		
322(M ⁺ , 77), 321(100), 303(14), 279(14), 162(3), 161(23), 160(41), 132(25), u.m.a.		
Mecanismos de fragmentação, ver Quadro 2.1.4, p. 47.		
IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (KBr):		
C=O	C=C	benzeno <i>para</i>-disubstituído
-----	1625	ausência das bandas a 690 e 750 cm ⁻¹
Ver espectro E2b, p.101		

E2a- Espectro de massas de 4'-metoxikaranjina (2).



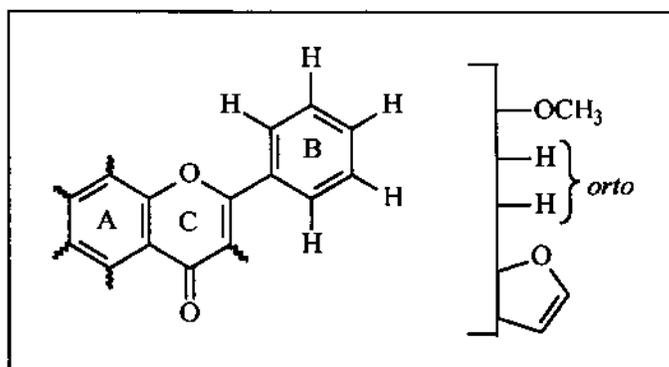
Quadro 2.1.4- Racionalização mecanística da fragmentação de 4'-metoxikaranjina (2), no espectrômetro de massas^{4b,21}.



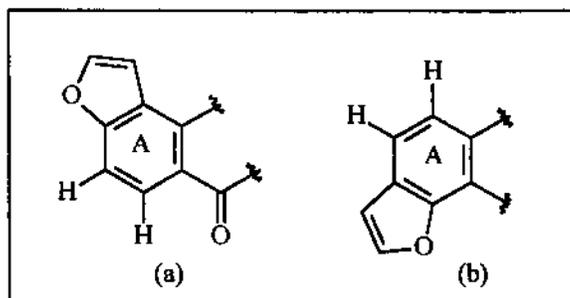
2.1.3- Flavonol-3-metil-éter [karanjina (3)]

O espectro de RMN¹H do composto 3 (Tabela 2.1.6, p.50 e E3, p.102), apresenta uma feição espectral similar à do composto 2 anterior. Assim, observamos a princípio, as típicas bandas múltiplas que, representadas por um multipletto a 7,53- 7,61 ppm, integrando 3 (e 1H) e, por outro notável multipletto a 8,14- 8,17 ppm correspondendo a 2H, evidenciam um anel aromático mono-substituído. Por sua vez, uma banda múltipla, a mais desprotegida no espectro, constituindo-se de um dubleto com $J = 8 \text{ Hz}$, integrando 1H a 8,19 ppm, denota um acoplamento em *orto*, justificável pelo quarto H o qual se sobrepõe ao multipletto a 7,53- 7,61 ppm. Por outro lado, as bandas remanescentes representadas por um duplo dubleto com $J = 2$ e 1 Hz a 7,19 ppm e por um dubleto com $J = 2 \text{ Hz}$ a 7,77 ppm, cada uma delas integrando 1H, evidenciam claramente um típico substituinte anel furânico. Finalmente, uma banda simples a 3,93 ppm, integrando 3H, caracteriza um grupo metoxila como o segundo substituinte.

Portanto, dos dados acima, novamente podemos definir a montagem do esqueleto molecular de uma flavona:



Os 2H em posição relativa *orto*, permitem estabelecermos dois possíveis regioisômeros, a saber:



Entretanto, a rota biossintética ⁶ (Quadro I.1, p.5), sistematicamente nos conduz às estruturas flavonoídicas com função mono-oxigenada somente na posição C-7, resultando inevitavelmente no isômero "a". Adicionalmente, a presença de 1H- β à função C=O cuja frequência de absorção está a 8,19 ppm no espectro de RMN¹H, é permitida somente neste isômero.

Por outro lado, a localização do substituinte metoxila, pode ser racionalizada pela EM na qual a formação do fragmento M-43, produzido pela eliminação dos elementos do radical acetila (C_2H_3O), é peculiar a uma função oxigenada na posição C-3^{4b,21}. Portanto, esta localização caracteriza ainda esta classe de substância como uma flavona-3-metil-éter (Quadro 2.1.5, p.51).

De fato, da comparação desta substância com uma amostra previamente identificada em nosso laboratório e, da bibliografia a qual identifica o constituinte isolado de *D. mollis*³, concluímos pela estrutura molecular da karanjina (3), um flavonol 3-metil-éter, cujos dados espectrométricos coincidem perfeitamente com os nossos, Tabelas 2.1.6 - 7.

Tabela 2.1.6 - Dados de RMN¹H da karanjina (3) (300 MHz, CDCl₃ / TMS):

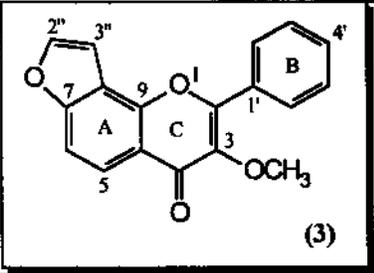
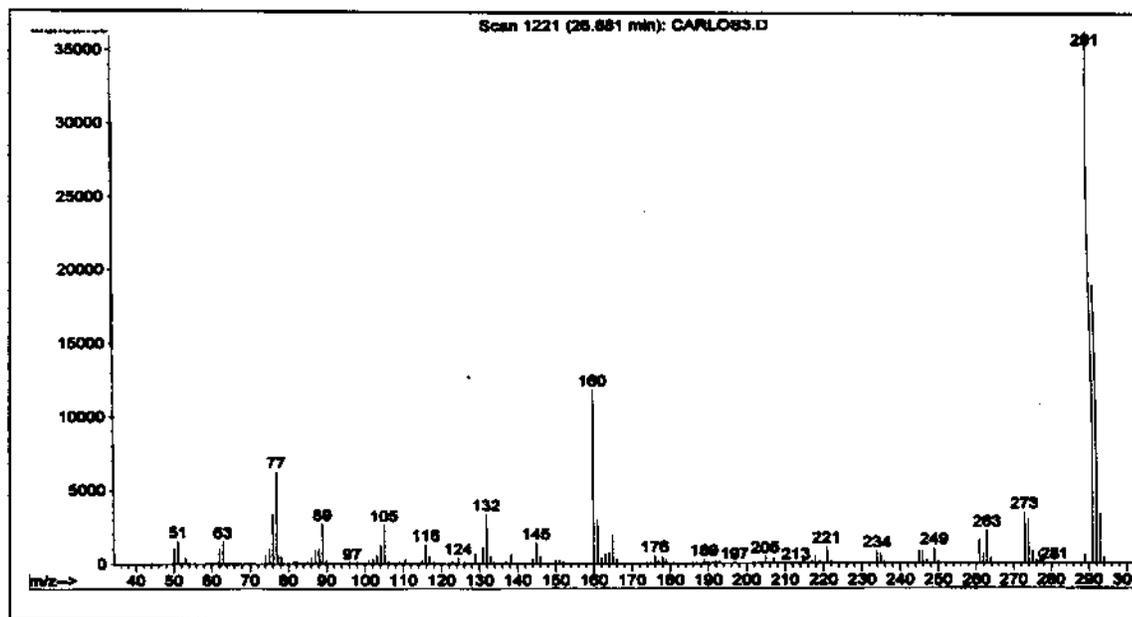
			
H	δ [multiplicidade, J(Hz)]	H	δ [multiplicidade, J(Hz)]
5	8,22 (1H, d, 8,0)	2''	7,77 (1H, d, 2)
6	7,53 - 7,61 (4H, m)	3''	7,19 (1H, dd, 2 e 1)
2', 6'	8,14 - 8,19 (2H, m)	OCH ₃ -3	3,92 (3H, s)
3', 4', 5'	7,53 - 7,61 (4H, m)		

Tabela 2.1.7- Dados dos espectros de massas e de IV da karanjina (3).

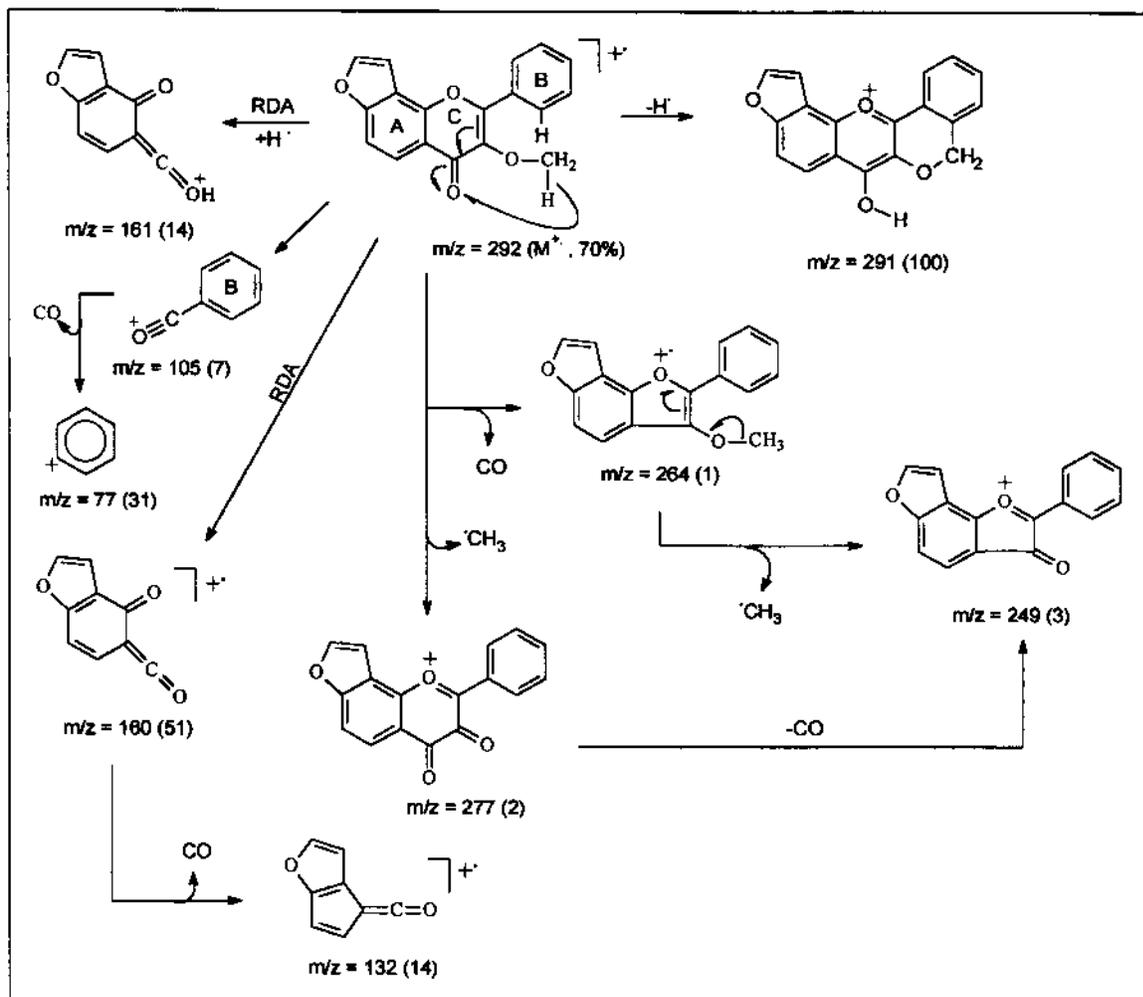
EM*, m/z (%):		
292(M ⁺ ,70), 291(100), 277(2), 264(1), 249(3), 161(14), 160(51), 132(14), 77(31) u.m.a.		
IV**, ν_{máx} cm⁻¹ (KBr):		
C=O	C=C	benzeno mono-substituído
1638	1624	757 e 700

(*)- Mecanismos de fragmentação ver Quadro 2.1.5, p.51; (**)- ver espectro E3b, p.103

E3a- Espectro de massas da karanjina 3.

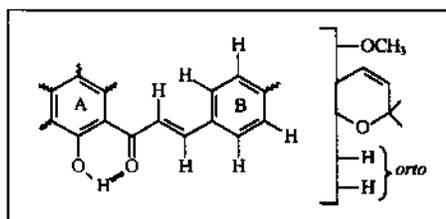


Quadro 2.1.5- Racionalização mecânica da fragmentação da karanjina (3), no espectrômetro de massas^{4b,21}.

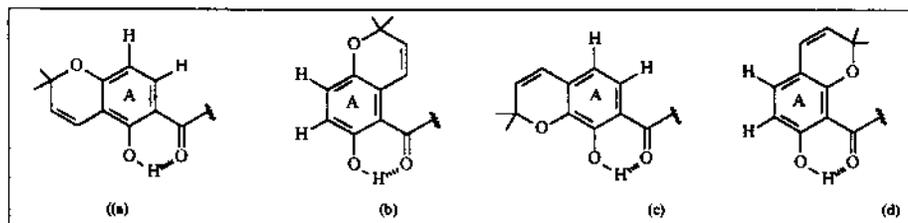


2.1.4- Chalcona [4'-metoxilonchocarpina (4)]

No espectro de RMN¹H da substância 4 (Tabela 2.1.8, p.54 e E4, p.104), observamos dois dubletos a 7,79 e a 7,48 ppm, cada um com J = 16 Hz integrando 1H, típicos de um sistema cinâmico, enquanto que, um singlete a 3,87 ppm integrando 3H caracteriza um grupo substituinte metoxila aromático. Por sua vez, as bandas a 5,47 e a 6,79 ppm desdobradas em dubletos, cada um com J = 10 Hz correspondendo a 1H, caracterizando um sistema de dois spins acoplados do tipo AB e, associadas a um intenso e típico singlete a 1,46 ppm, integrando 6H, denotam a presença de um grupo isoprenila oxidativamente ciclizado (2,2-dimetilcromeno). Adicionalmente, claramente delineamos um derivado benzênico *para*-dissubstituído, gerando um sistema de quatro spins do tipo AA'BB' representado pelos dubletos com J = 9 Hz a 6,96 e a 7,63 ppm, cada um integrando 2H. Finalmente, um singlete correspondendo a 1H a 13,80 ppm, evidencia a presença de um grupo hidroxila quelatogênico. Temos assim, a montagem de um esqueleto chalcônico:

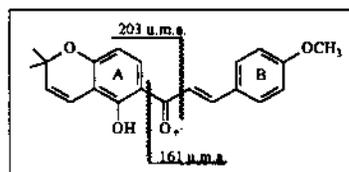


Os 2H em posição relativa orto permitem estabelecermos quatro possíveis regioisômeros, a saber:



Entretanto, a rota biossintética ⁶ (Quadro I.2, p.5) de chalconas, sistematicamente nos conduz às estruturas moleculares com funções di-oxigenadas nas posições C-2' e C-4', resultando, portanto, somente no isômero "a".

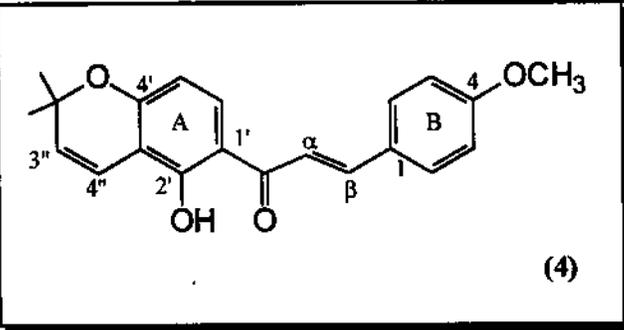
Na espectrometria de massas (Quadro 2.1.6, p.55), os íons catiônicos produzidos pela fissão das ligações em torno do grupo C=O ^{4b} (m/z = 203 e 161), bem como os fragmentos, cátions radicalares, oriundos da clivagem RDA a partir da flavanona tautomérica (m/z = 202 e 134), confirmam a presença e a localização dos substituintes isoprenila, hidroxila e metoxila.



Por outro lado, chama-nos a atenção a ausência do pico M-28, típico e intenso nas 2'- ou 2',6'-(di)metoxichalconas ²⁹, provavelmente aqui devido à presença do sistema quelatogênico.

Em adição, um levantamento bibliográfico levou-nos a identificar o constituinte isolado de *Millettia pachycarpa* ²⁶, a 4'-metoxilonchocarpina, cujos dados espectrométricos coincidem perfeitamente com os nossos (Tabela 2.1.8- .9, p.54 e Quadro 2.1.6, p.55).

Tabela 2.1.8- Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 / TMS) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 / TMS) de 4'-metoxilonchocarpina (4).

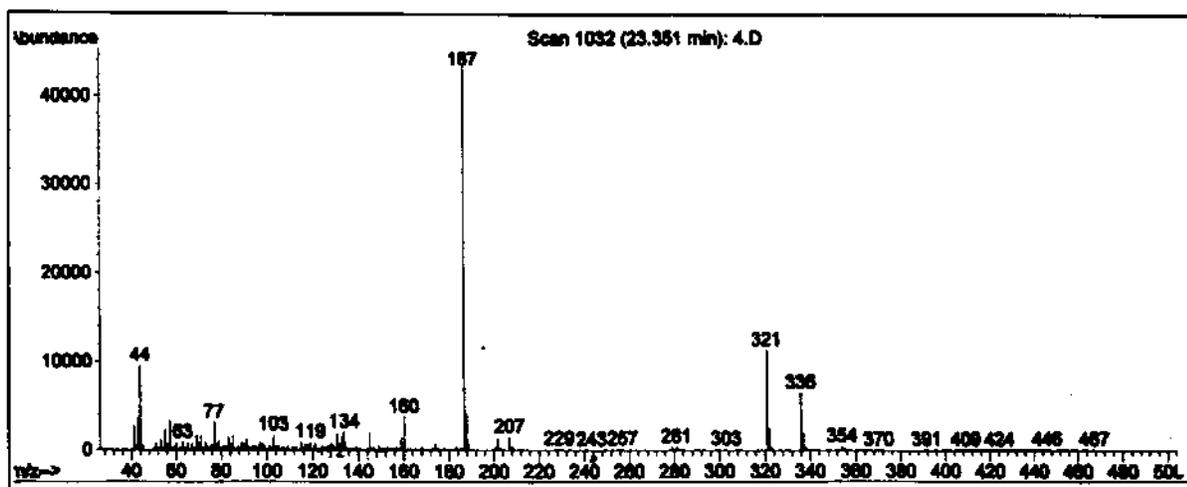
			
H	δ [multiplicidade, J (Hz)]	C	δ
2, 6	7,60 (2H, d, 9)	1	127,6 ⁺ (C ₀)
3, 5	6,93 (2H, d, 9)	2, 6	130,6 (CH)
α	7,83 (1H, d, 16)	3, 5	114,4 (CH)
β	7,43 (1H, d, 16)	4	160,9 [*] (C ₀)
5'	6,37 (1H, d, 9)	α , 4''	117,8 (CH)
6'	7,71 (1H, d, 9)	β	144,1 (CH)
3''	5,68 (1H, d, 10)	9	192,0 (C=O)
4''	6,74 (1H, d, 10)	1'	127,9 ⁺ (C ₀)
OCH ₃ (C-4)	3,87 (3H, s)	2'	161,8 (C ₀)
OH (C-2')	13,80 (1H, s)	3'	109,4 (C ₀)
2CH ₃ (C-2'')	1,46 (6H, s)	4'	159,6 [*] (C ₀)
		5'	115,9 (CH)
		6'	128,0 (CH)
		2''	77,8 (C ₀)
		3''	130,5 (CH)
		CH ₃ -2''	28,3 (CH ₃)
		CH ₃ -2''	29,7 (CH ₃)

(+), (*)- valores intercambiáveis.

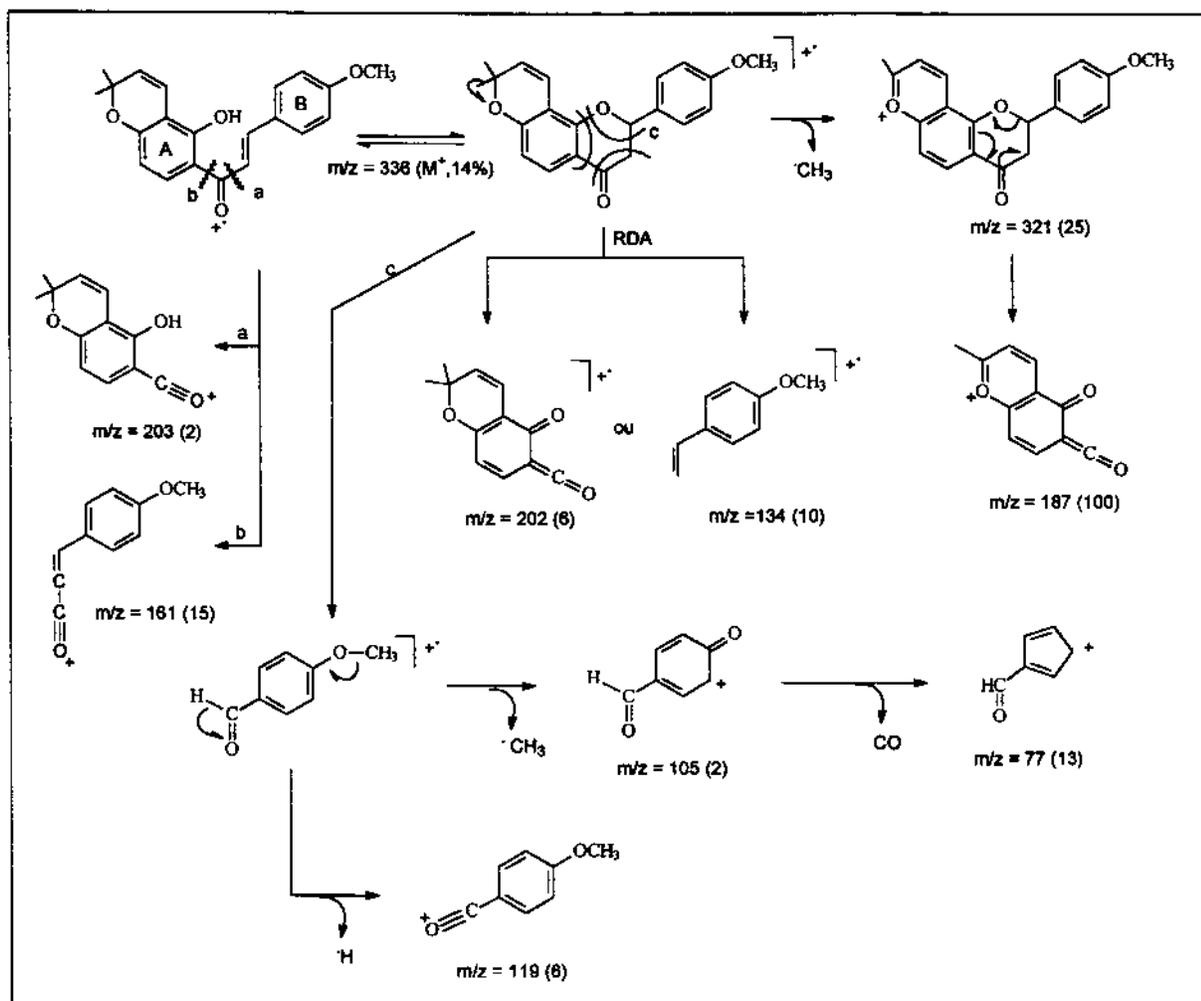
Tabela 2.1.9- Dados dos espectros de massas e de IV de 4.

EM, m/z (%): 336(M ⁺ , 14), 321(25), 202(6), 203(<2%), 187(100), 161(15%), 134(10%), 119(3%), 105(3%), 77(13%) u.m.a. Quadro 2.1.6, p.55.
IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm ⁻¹ , (CHCl_3): 3415(OH), 1635(C=O), 1377 e 1358 (gem -dimetil), 980 (C=C- trans), 831(benzeno para-dissubstituído), 699 (C=C- cis). E4c, p.106

E4a- Espectro de massas de 4'-metoxilnonchocarpina (4).



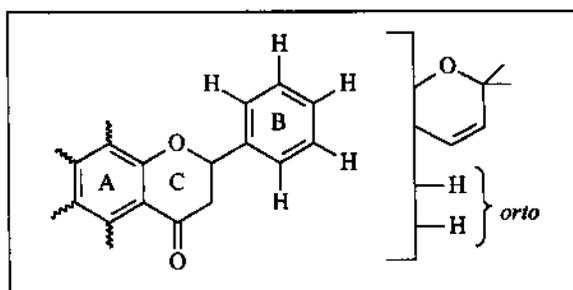
Quadro 2.1.6- Racionalização mecanística da fragmentação de 4'-metoxilnonchocarpina (4) no espectrômetro de massas^{4b, 21}.



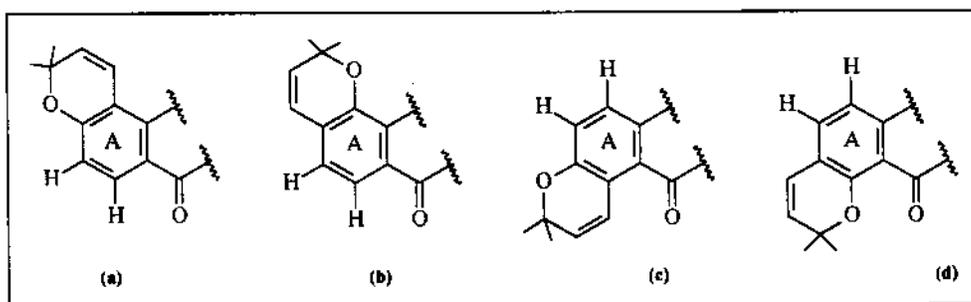
2.1.5- Flavanona [isolonchocarpina (5)]

No espectro de RMN¹H da substância **5** (Tabela 2.2.0, p.58, E5, p.107), observamos o par de duplos dubletos com $J = 17$ e 3 Hz e 17 e 13 Hz a $2,84$ e $3,02$ ppm, respectivamente, integrando $1H$ cada um, típicos da porção AB de um sistema de três spins acoplados. Já, relativamente mais desblindado, $1H$ cuja banda de absorção se desdobra em duplo dubleto com $J = 13$ e 3 Hz a $5,49$ ppm, caracteriza a porção X, portanto, de um sistema de três spins acoplados do tipo ABX. Por sua vez, um acoplamento em *orto* é denotado por um dubleto, com $J = 9$ Hz a $6,49$ ppm e, por conseguinte, pelo dubleto com $J = 9$ Hz a $7,74$ ppm, cada um integrando $1H$. Já, um multipletto a $7,40$ - $7,51$ ppm, integrando $5H$, claramente evidencia um derivado benzênico mono-substituído. Finalmente, os dubletos a $5,60$ e $7,74$ ppm, ambos com $J = 10$ Hz e, cada um integrando $1H$, associados a dois singletos, a $1,45$ e a $1,47$ ppm, integrando cada um $3H$, claramente denotam a presença do substituinte isoprenila oxidativamente ciclizado, ou, 2,2-dimetilcromeno.

Assim, destes dados, delineamos a montagem do esqueleto molecular de uma flavanona mono-substituída:



Os 2H em posição relativa *orto* permitem estabelecermos quatro possíveis regioisômeros, a saber:



Entretanto, a rota biossintética de flavonóides ⁶ (Quadro I.1, p.5), sistematicamente nos conduz às estruturas moleculares com função mono-oxigenada somente na posição C-7, resultando, portanto, no isômero "a".

Por outro lado, podemos racionalizar a presença e a localização do substituinte 2,2-dimetilcromeno sobre o anel A, através da espectrometria de massas ^{4b,21,35} cujo fragmento à razão $m/z = 187$, o pico base, produzido pela eliminação de um radical metila a partir do íon molecular, e posterior clivagem RDA é um importante diagnóstico para esta análise (Quadro 2.1.7, p.59) ³⁵.

Além do mais, podemos ainda distinguir esta classe de compostos flavonoídicos dos demais, tais como os α,β -insaturados, em face da favorável e referida clivagem RDA, o que torna o pico íon molecular pouco abundante (12%). Assim, já que as flavanonas apresentam o anel heterocíclico com uma ligação simples C_2-C_3 , o que facilita a ruptura $C_3-C=O$, por conseguinte, produz o íon fragmento cujo peso molecular, comparado ao do íon fragmento análogo não-substituído, permite, então, atribuímos a natureza e a localização do substituinte 2,2-dimetilcromeno sobre o anel A ²¹.

Por sua vez, a forma enólica da flavanona no espectro de massas da substância **5**, contribuindo para com a fragmentação que envolve a expulsão de um radical fenila ³⁰, produz o fragmento-anel A, embora não abundante, carregando o referido substituinte a $m/z = 229$ (5%), conforme o Quadro 2.1.7, p.59.

Finalmente, um levantamento bibliográfico levou-nos a identificar o constituinte isolado de *Pongamia glabra* ²⁷, a **isolonchocarpina (5)**, com cujos dados espectrométricos coincidem perfeitamente os nossos de acordo com a Tabela 2.2.0- .1, p.58.

Tabela 2.2.0 - Dados de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ / TMS) e RMNC¹³ (75 MHz, CDCl₃ / TMS) de isolonchocarpina (5):

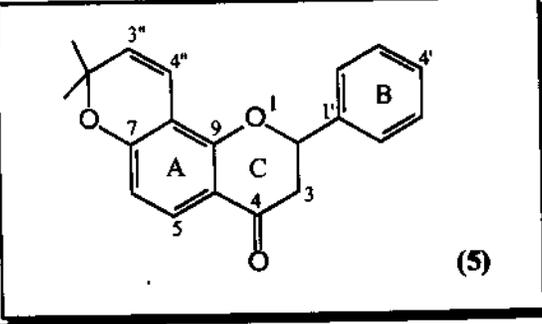
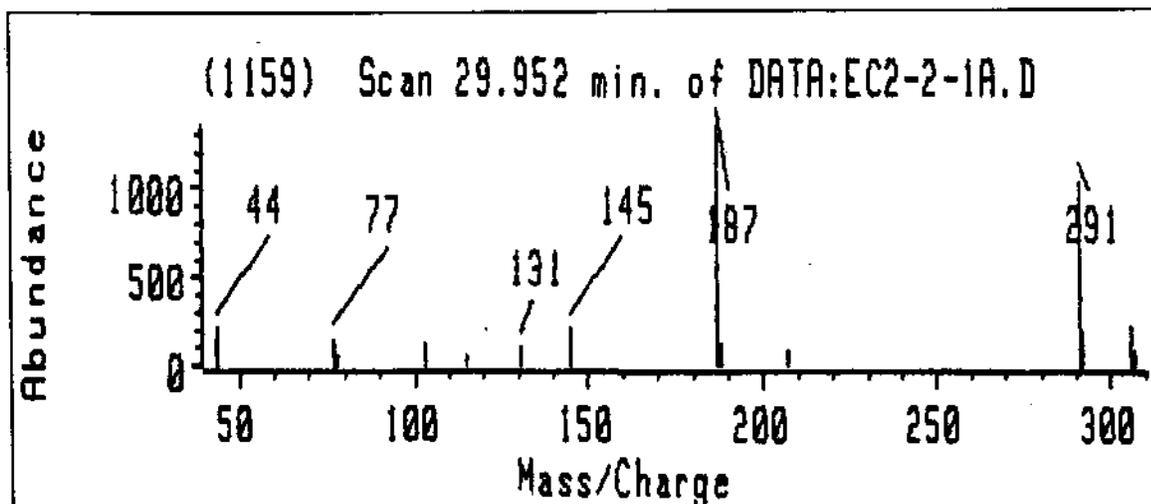
					
H	δ [multiplicidade, J(Hz)]		H	δ [multiplicidade, J(Hz)]	
2	5,49 (1H, dd, 3 e 13)		2',3',4', 5', 6'	7,40- 7,51 (5H, m)	
3eq	2,85 (1H, dd, 3 e 17)		CH ₃ - 2''	1,45 (3H, s)	
3ax	3,00 (1H, dd, 13 e 17)		CH ₃ - 2''	1,47 (3H, s)	
5	7,74 (1H, d, 9,0)		3''	5,60 (1H, d, 10)	
6	6,49 (1H, d, 9)		4''	6,67 (1H, d, 10)	
C	δ	C	δ	C	δ
2	80,0 (CH)	8	109,8 (C ₀)	CH ₃ - 2''	28,2
3	44,5 (CH ₂)	9	158,2 (C ₀)	CH ₃ - 2''	28,5
4	191,3 (C=O)	10	115,9 (C ₀)	2''	79,6 (C ₀)
5	128,8 (CH)	1'	139,5(C ₀)	3''	129,3 (CH)
6	111,6 (CH)	2',6'	126,4(CH)	4''	116,3 (CH)
7	160,2 (C ₀)	3',4',5'	129,2(CH)		

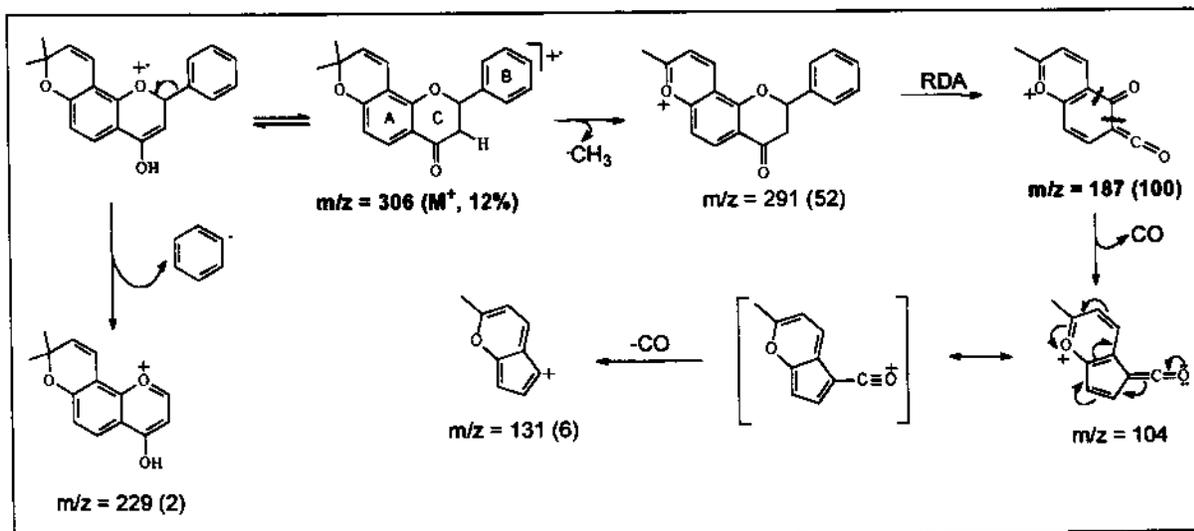
Tabela 2.2.1- Dados dos espectros de massas, IV e atividade ótica da isolonchocarpina (5).

EM, m / z (%): Quadro 2.1.7, p.59).				
306(M ⁺ , 12), 291(52), 187(100), 159(4), 131(6), 77(8), 51(2), u.m.a.				
IV, ν _{máx} cm ⁻¹ (KBr): E5d, p.108				
C=O	gem- dimetil	C=C	C=C- cis	benzeno mono-substituído
1684	1376 e 1359	1637	729	757 e 698
[α] _D (c = 1,6 mg / ml, CDCl ₃ , l = 0,5 dm): - 85 ⁰ (lit.: -125 ⁰) ²⁷				

E5a- Espectro de massas da isolonchocarpina (5).



Quadro 2.1.7 - Racionalização mecânica da fragmentação da isolonchocarpina (5), no espectrômetro de massas^{4b,21,35}

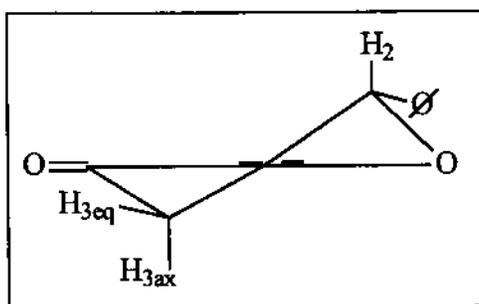


- Análise Conformacional do Anel Heterocíclico

Tem se observado que as flavanonas naturais possuem a configuração absoluta 2S²⁷. Nós determinamos a estrutura da flavanona (5) através da interpretação dos dados de RMN¹H e EM, como discutido no capítulo 1, tendo-a identificado como *isolonchocarpina*²⁷, cuja rotação específica levógira é aproximadamente coincidente com a do nosso constituinte (Tabela 2.2.1, p.58).

A análise minuciosa dos referidos dados espectrométricos, no que diz respeito aos H do anel C e à conformação deste anel, levou-nos à seguinte conclusão:

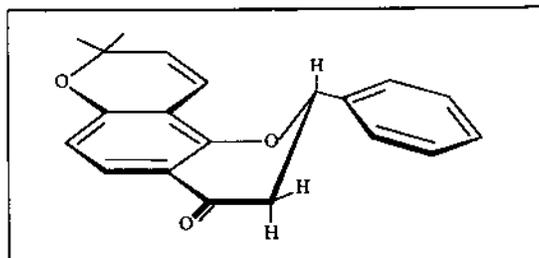
- o hidrogênio fixado em C-2, representado pelos sinais a 5,49 ppm desdobrados em um duplo dubleto ($J = 13$ e 3 Hz), compõe a porção X de um sistema de spins ABX no qual, os outros 2H fixados no C-3 aparecem como duplos dubletos a 2,85 e 3,02 ppm com $J_{gem} = 17$ Hz e $J_{vic} = 3$ e 13 Hz, respectivamente, atribuídos aos H-3eq e H-3ax, Quadro 2.1.8.



Quadro 2.1.8- Conformação preferida do anel C de flavanonas²⁷.

As magnitudes destas constantes de acoplamentos estão em completo acordo com a equação de Karplus, bem como, com os valores para os H em C-2 e C-3 em outras flavanonas. Assim, o elevado valor do acoplamento *trans*-diaxial (13 Hz), demonstra que o anel fenila fixado em C-2, está na posição equatorial, onde o anel heterocíclico o qual suporta o C-2, encontra-se na conformação meia-cadeira²⁷, Quadro 2.1.8a.

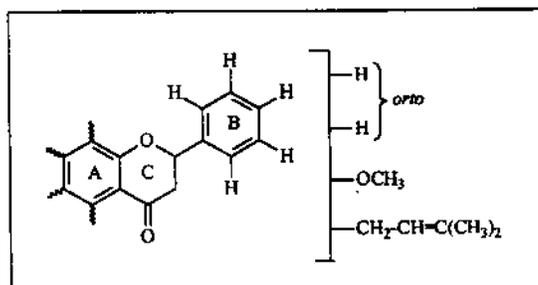
Quadro 2.1.8a- Conformação meia-cadeira do anel heterocíclico e posição equatorial do anel fenila assumidas em *isolonchocarpina* (5)²⁷.



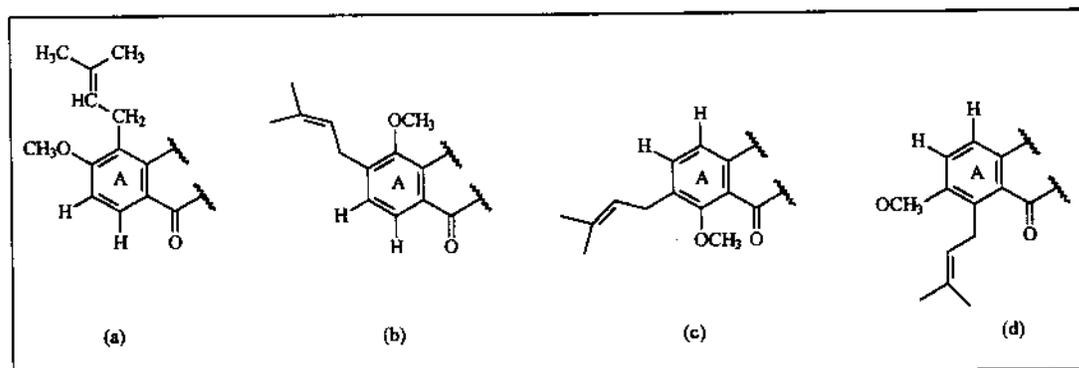
2.1.6- Flavanona [isoderricina A (6)]

No espectro de RMN¹H do constituinte 6 (Tabela 2.2.2, p.62, E6, p.109), observamos o par de duplos dubletos com $J = 17$ e 3 Hz e 17 e 13 Hz a $2,85$ e $3,00$ ppm, respectivamente; integrando cada um deles $1H$, caracterizam a porção AB de um sistema de três spins acoplados. Relativamente mais desblindado, $1H$ cujo sinal se desdobra em um duplo dubleto com $J = 13$ e 3 Hz a $5,45$ ppm, caracteriza, portanto, a porção X daquele sistema. Por sua vez, na região da frequência de absorção de H aromáticos, um acoplamento em orto é evidenciado pelos dubletos com $J = 9$ Hz a $6,62$ e a $7,82$ ppm, integrando cada um $1H$, enquanto que, um multipletto a $7,33$ - $7,50$ ppm, integrando $5H$, denota o típico derivado benzênico mono-substituído. Por outro lado, um intenso e típico singletto, integrando $3H$ a $3,97$ ppm, é atribuído a um grupo metoxila aromático. Finalmente, as bandas múltiplas de absorção remanescentes, um alargado dubleto com $J = 7$ Hz integrando $2H$ a $3,35$ ppm e um multipletto integrando $1H$ a $5,16$ - $5,22$ ppm, associadas à banda simples, representada por um intenso e alargado singletto, integrando $6H$ a $1,65$ ppm, denotam claramente um típico substituinte isoprenila.

Temos a partir destes dados, a montagem de um notável núcleo flavanônico:



Os 2H em posição relativa *orto*, permitem estabelecermos quatro possíveis regioisômeros:



Entretanto, admitindo-se o postulado universalmente aceito, no qual a rota biossintética de flavonóides (Quadro I.1, p.5) ⁶, invariavelmente resulta em função mono-oxigenada na posição C-7, resta-nos somente a alternativa *a*.

Tabela 2.2.2- Dados de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ / TMS) e RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃ / TMS) da isoderricina A (6):

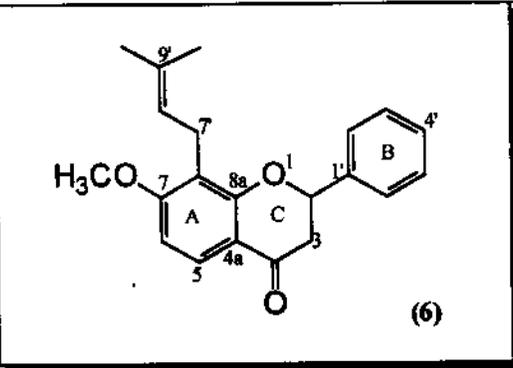
					
H	δ [multiplicidade, J(Hz)]		H	δ [multiplicidade, J(Hz)]	
2	5,45 (1H, dd, 3 e 13)		2',3',4',5', 6'	7,33- 7,50 (5H, m)	
3eq	2,85 (1H, dd, 3 e 17)		7"	3,35 (2H, d, 7Hz)	
3ax	3,00 (1H, dd, 13 e 17)		8"	5,16- 5,22 (1H, m)	
5	7,82 (1H, d, 9,0)		(CH ₃) ₂ -9"	1,65 (6H, s)	
6	6,22 (1H, d, 9)		OCH ₃ -7	3,97 (3H, s)	
C	δ	C	δ	C	δ
2	79,3 (CH)	8	131,8 (C ₀)	7'	22,2 (CH ₂)
3	44,4 (CH ₂)	9	160,1 (C ₀)	8'	104,9 (CH)
4	191,4 (C=O)	10	115,3 (C ₀)	9'	127,7 (C ₀)
5	126,3 (CH)	1'	139,3 (C ₀)	CH ₃ -9'	25,8 (CH ₃)
6	121,9 (CH)	2',6'	125,9 (CH)	OCH ₃ -7	55,8 (CH ₃)
7	163,3 (C ₀)	3',4',5'	128,6 (CH)		

Tabela 2.2.3- Dados dos espectros de massas, IV e atividade ótica de isoderricina A (6).

EM, m / z (%) , Quadro 2.1.9, p.64.		
322(M ⁺ ,33), 307(24), 279(42), 218(71), 203(62), 175(100), 163(38%), 131(19%),104(10), 78(10), 77(16) u.m.a.		
IV, ν_{max} cm⁻¹ (KBr), E6c, p.110		
C=O	gem-dimetila	benzeno mono-substituído
1682	1336 e 1315	764 e 698
[α]_D (c = 17,5 mg / ml, CDCl ₃ , l = 0,5 dm): -92 ⁰ (lit.: -91,1 ⁰) ²⁸		

Através da espectrometria de massas, também podemos racionalizar a natureza e localização, sobre o anel A, dos referidos substituintes ^{4a,21, 35a} isoprenila e metoxila, os quais, assim, tornam-o a parte mais estável da molécula. Para esta análise, o fragmento a m/z 218 (a 71%, compreende o segundo mais abundante), é o principal diagnóstico produzido pela favorável clivagem RDA de flavanonas (Quadro 2.1.9, p.64). Este fragmento, envolvendo a eliminação da muito estável molécula de monóxido de carbono e sucessivamente do radical metila, bem como, o fragmento a m/z 245 (5%), que, por sua vez, é produzido pela característica forma enólica de flavanonas ³⁰, são os principais responsáveis pela produção do íon pico base a m/z 175. O último, eliminando um radical metila do grupo metoxila ^{35a} e a cadeia alifática lateral como uma molécula neutra, tem conseqüentemente reduzida intensidade relativa (5%) o que favorece a formação do fragmento pico base (p.64, E6a.1c, p.112). Outro importante fragmento, para a análise em questão, é produzido a m/z 307 (24%), consecutivo ao íon molecular, pela característica abstração de um radical metila da cadeia lateral isoprenila, cuja estrutura é assim, altamente conjugada ^{35a}.

Todavia, a análise comparativa dos nossos dados correspondentes à espectrometria de massas com os da literatura gerou alguns conflitos. Lá, Mors e col.³⁶ em um estudo fitoquímico no qual, discutem e interpretam dados do comportamento dos pares chalcona-flavanona sob o espectrômetro de massas, detectaram como pico base para o composto isoderricina A (6), o fragmento a m/z 190 que, por sua vez, fragmenta-se produzindo o pico a m/z 175 (95%).

Em nosso caso, o pico a m/z 190 (66%) é um intermediário cuja eliminação da muito estável molécula de CO fornece o íon fragmento, também conseqüentemente muito estabilizado, a m/z 175 (100%). Assim, temos em comum somente a rota de fragmentação, cuja evidência nós obtivemos também a partir da técnica de espectrometria de massas sobre espectrometria de massas do fragmento a m/z 190 (Quadro 2.1.9, p.64, E6a.1a, p. 111).

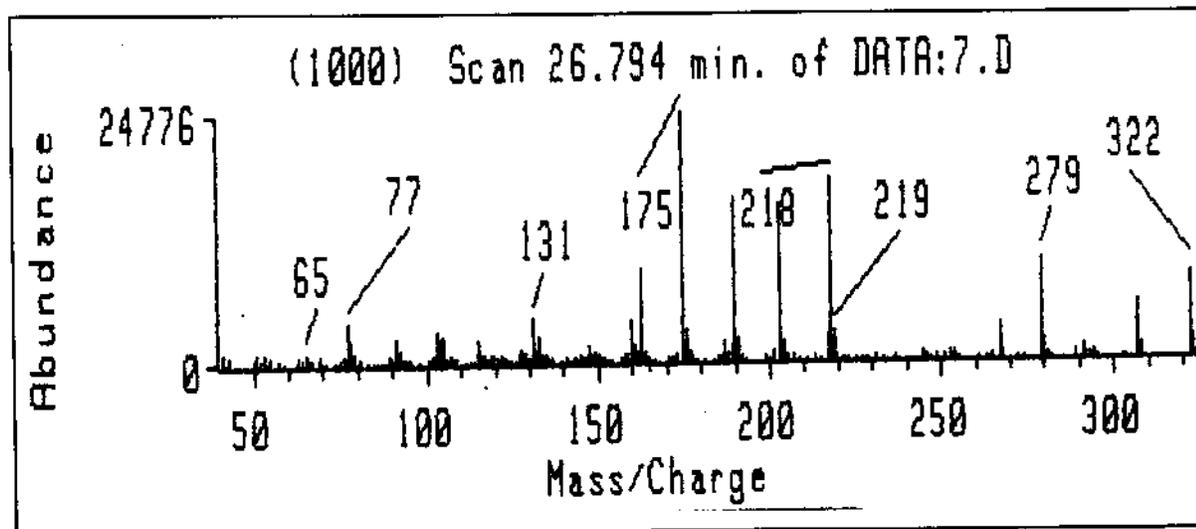
Depois, aqueles autores ³⁶, propuseram de modo plausível a origem do fragmento a m/z 203 a partir do fragmento a m/z 307, envolvendo a ruptura das ligações do anel heterocíclico e conseqüentemente a deslocalização da carga positiva do oxigênio-éter para o oxigênio-carbonílico.

Além desta alternativa, também detectamos a origem do fragmento m/z 203 a partir do, aducto RDA, fragmento a m/z 218 (p.66), fato este denotado, ainda, pelo método de EM/EM do fragmento a m/z 218.

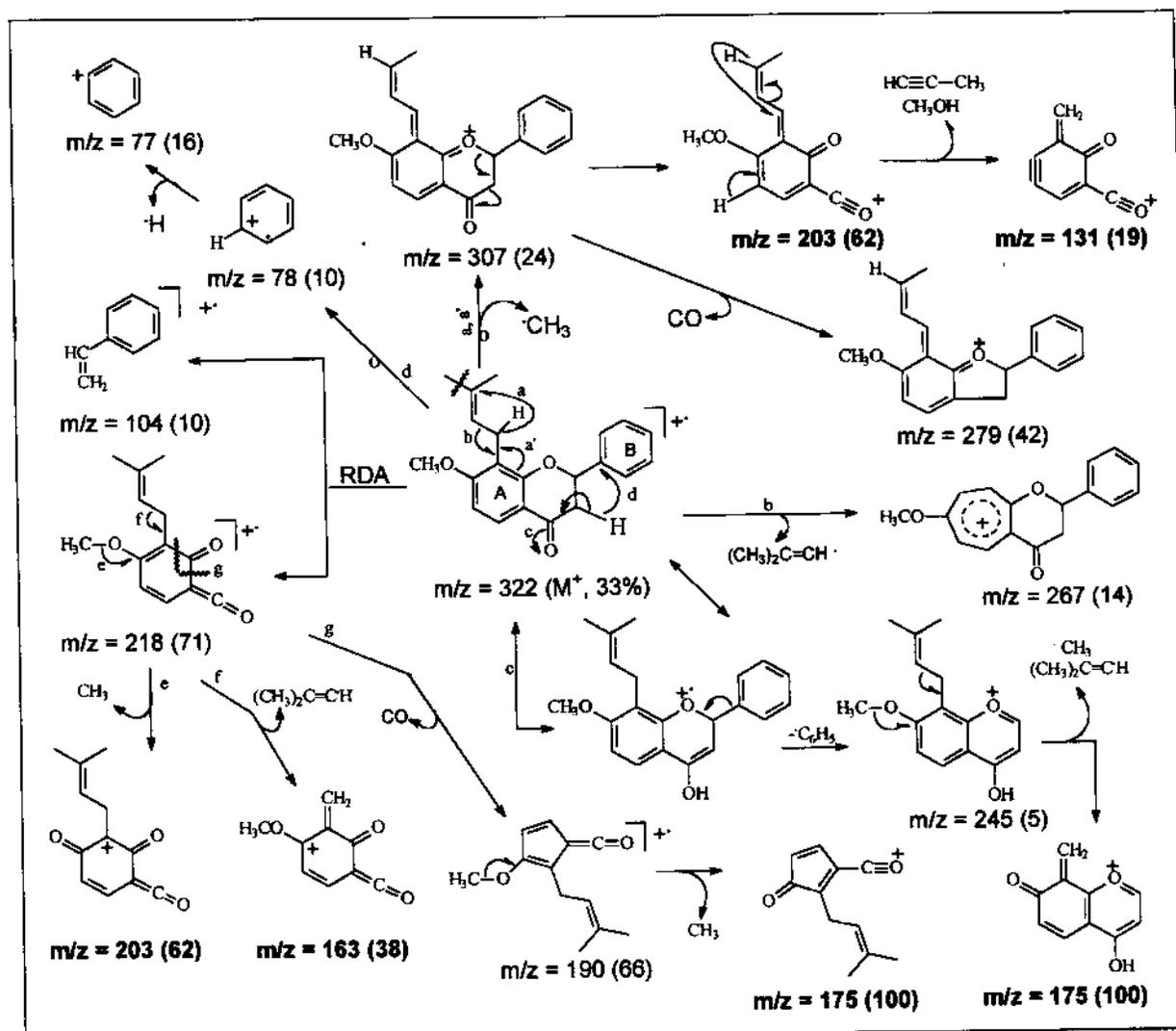
Entretanto, naquele estudo ³⁶, a origem do íon fragmento a m/z 163 é atribuída a partir da espécie a m/z 203, o que opõe-se ao nosso quadro mecanístico (p.64). Assim, mais uma vez, a referida indicação não é notória em nossos dados, ou seja, é ausente o fragmento a m/z 163, no espectro da fragmentação do íon 203 (E6a.1b, p.111).

Por outro lado, na fragmentação de m/z 203, denota-se a presença do fragmento a m/z 131 (19%) no referido espectro [p.111 (b) e 112 (d)], levando-nos a propor a sua respectiva origem de acordo com o Quadro mecanístico 2.1.9 (p.64).

E6a- Espectro de massas da isoderricina A (6).



Quadro 2.1.9- Racionalização mecânica da fragmentação da isoderricina A (6), no espectrômetro de massas ^{4a,21,36}



Além disso, este mecanismo é aceitável, já que a fragmentação do íon a m/z 218, também produz o fragmento a m/z 131, o que é possível pela eliminação daquelas moléculas neutras (p.64).

Talvez, Mors e col.³⁶ não admitiram aí, a possível eliminação, além do hidrocarboneto C_3H_4 , da molécula neutra de metanol, a partir do íon a m/z 203, por um processo concertado, gerando assim, o fragmento a m/z 131 ao contrário de m/z 163.

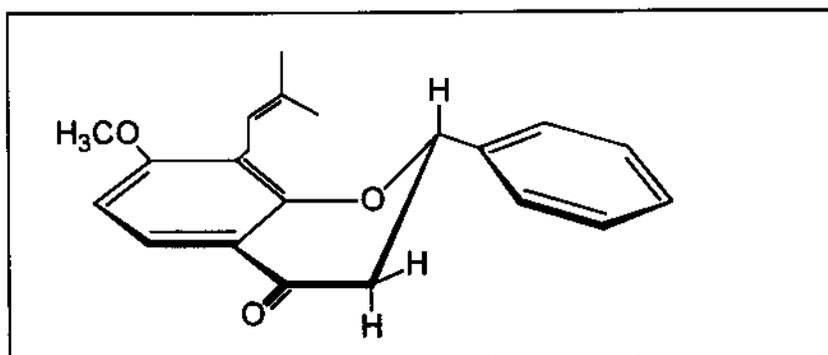
Finalmente, uma pesquisa bibliográfica, levou-nos a identificar o constituinte isolado de *Dahlstedtia pentaphyla*²⁸, cujos dados espectrométricos coincidem com os nossos, de acordo com o acima discutido.

- Análise Conformacional do Anel Heterocíclico

Conforme os argumentos descritos à flavanona anterior, a flavanona **6** apresentando a configuração absoluta $2S$ ²⁷, foi identificada como **isoderricina A**²⁸ cuja atividade ótica levorotatória é aproximadamente coincidente à do nosso constituinte (Tabela 2.2.3, p.62). Ainda, no que diz respeito aos H do anel heterocíclico e à conformação deste anel, obtivemos a seguinte conclusão:

- o H fixado em C-2 cujo sinal se desdobra em um duplo dubleto com $J = 13$ e 3 Hz a 5,45 ppm, compõe a porção X de um sistema de três spins acoplados no qual a porção AB é composta pelos H-3eq e H-3ax, representados, respectivamente, pelos duplos dubletos com $J_{gem} = 17$ e $J_{vic} = 3$ Hz a 2,85 ppm e $J_{gem} = 17$ e $J_{vic} = 13$ Hz a 3,00 ppm. Assim, a conformação adotada pelo anel heterocíclico é a forma de meia-cadeira, na qual o anel fenila sobre o C-2 ocupa a posição equatorial (Quadro 2.1.8, p.60 e 2.2.0, abaixo).

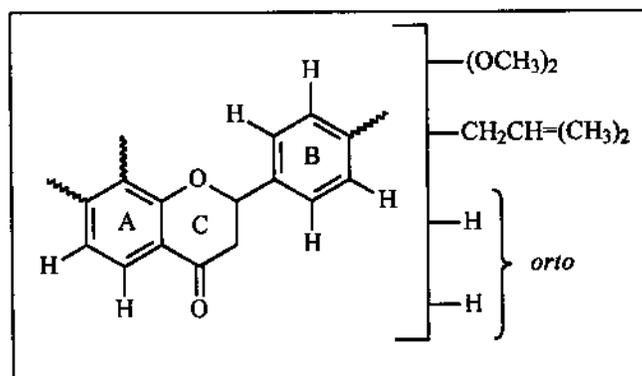
Quadro 2.2.0- Conformação meia-cadeira do anel heterocíclico e posição equatorial do grupo fenila, assumidas em **isoderricina A (6)**²⁷:



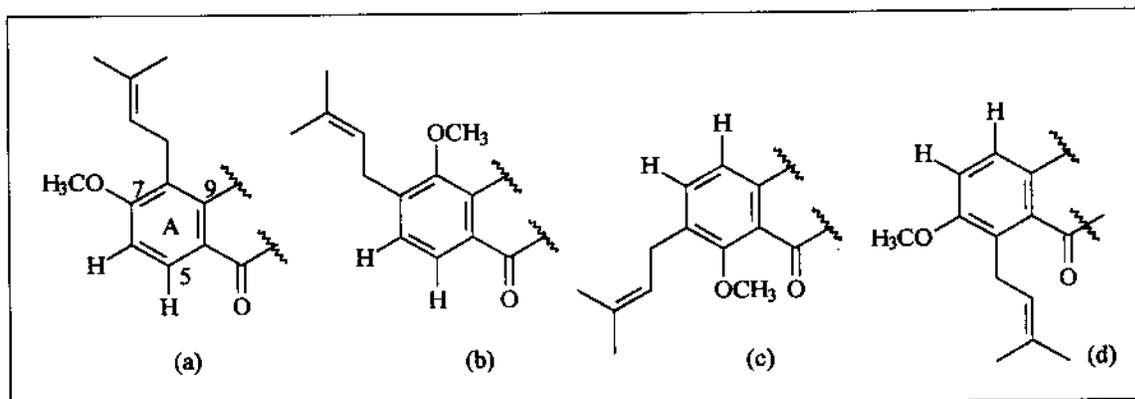
2.1.7- Flavanona [4'-metoxiisoderricina A (7)]

No espectro de RMN ^1H do composto 7 (Tabela 2.2.4, p.69 e E7, p.113), observamos o típico par de duplos dubletos com $J = 17$ e 3 Hz e 17 e 13 Hz, cada um integrando 1H a $2,80$ e $3,00$ ppm, respectivamente, caracterizam a porção AB de um sistema de três spins acoplados. Relativamente mais desprotegido, comparece o H cuja banda de absorção se desdobra em duplo dubleto, com $J = 13$ e 3 Hz, a $5,40$ ppm, compõe a porção X daquele sistema de spins acoplados. Na região da frequência de absorção de H aromáticos, um acoplamento em *orto*, caracteriza-se pelo par de dubletos com $J = 9$ Hz, cada um, integrando 1H a $6,61$ e $7,81$ ppm. Ainda nesta região, outro par de dubletos com $J = 9$ Hz, agora, cada um integrando 2H a $6,92$ e $7,38$ ppm, caracterizando um sistema de quatro spins em *orto* acoplados, denotam a presença de um típico anel benzênico *para*-substituído. Finalmente, as bandas de absorção remanescentes, primeiro, dois intensos e típicos singletos, cada um integrando 3H a $3,83$ e $3,89$ ppm, caracterizam dois grupos substituintes metoxila, enquanto que, um singeto compreendendo 6H a $1,65$ ppm, adicionado a um dubleto com $J = 7$ Hz a $3,32$ ppm, integrando 2H e a um multipletto integrando 1H a $5,14$ - $5,19$ ppm, denotam a presença do substituinte isoprenóide (3,3-DMA).

Destes dados temos consecutivamente, a montagem de um notável núcleo flavanônico:



Os 2H em posição relativa *orto*, permitem estabelecermos quatro possíveis regioisômeros, a saber:



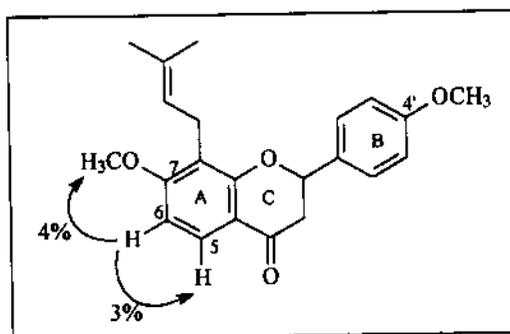
Entretanto, a rota biossintética de flavonóides ⁶ (Quadro 1.2, p.5), sistematicamente nos conduz às estruturas mono-oxigenadas somente na posição C-7 e, portanto, resta-nos apenas a estrutura *a*.

Em adição, sustenta esta conjuntura os dados do experimento NOE ^{4a}. Aí, sem ambiguidades, além de localizarmos sobre o anel A a exata posição dos grupos substituintes isoprenila e metoxila, nos permite, também, atribuir a banda de absorção a 3,89 ppm à OCH₃ sobre o anel A no referido espectro de RMN ¹H. Assim, a irradiação do H sobre o C-6, produz aumento nas integrais dos sinais de absorção dos H sobre os carbonos-orto, um em C-5, β-C=O, e os outros de um grupo metoxia, em C-7, indicando portanto, que esta posição, C-7, oferece maior efeito de desproteção aos seus H metoxílicos, dada a sua vizinhança mais congestionanda, a 3,89 ppm, do que a C-4', cujo grupo substituinte metoxila tem seus H, ligeiramente mais protegidos, ressonando apenas sob o efeito de uma corrente de anel benzênico a 3,83 ppm. (Tabela 2.2.4, E7b, p.114 e Quadro 2.2.1 abaixo).

Tabela 2.2.4- Principais NOE observados sobre a estrutura 7.

Irradiação (δ ppm)	Sinal com aumento de intensidade (δ ppm) [%]
H-6	H-5 (7,81) [3] OCH ₃ (3,89) [4]

Quadro 2.2.1- Esquemática dos principais NOE observados sobre a estrutura 7.



Por outro lado, no decurso da espectrometria de RMN ¹³C na investigação estrutural da substância dimetoxiisoprenilflavanona 7, observamos, além dos típicos sinais os quais caracterizam esta classe de substâncias naturais, os C-2, -3 e -4, (Tabela 2.2.4, p.69 e E7c, p.114), as valiosas informações quanto o presente padrão de substituição. Os deslocamentos químicos destes C foram também comparados com os de compostos modelos e, por conseguinte, pela consideração do conhecido efeito de grupos substituintes, tais como as metoxilas, sobre as frequências de ressonâncias destes C, Quadro 2.2.2, p.68.

Assim, o átomo de C-2, metínico e carbinólico, comparece a 79,2 ppm (lit.: 75,0 - 80,3 ppm). Mais blindado, por sua vez, o C-3 metilênico comparece a 44,3 ppm (lit.: 42,8 - 44,6 ppm). Finalmente, relativamente o mais desblindado no espectro, comparece o C-4, com cujo sinal de frequência de absorção a 191,9 ppm (lit.: 189,5 - 191,6 ppm) caracteriza um C carbonílico³³.

De acordo com a literatura³³, quando um metoxi-grupo é introduzido sobre o C-7 do núcleo flavanona, o próprio sinal deste carbono é desblindado por *ca.* de 29,9 ppm, enquanto que as frequências de ressonâncias dos C-6 e -8 sofrem um deslocamento diamagnético de *ca.* de 11,4 e 17,2 ppm, respectivamente. Por sua vez, os átomos de C-5 e C-8a são ligeiramente afetados (+1,6 e +1,9 ppm, respectivamente) e, por fim, o C-4a (+6,2 ppm). Assim, de um modo geral, em derivados de benzeno simples, O átomo de C-*ipso* sustentando um grupo metoxila é desblindado por *ca.* de 30,2 ppm, enquanto que os C-*orto* e -*para* ao grupo metoxila são blindados por 15,5 e 8,9 ppm, respectivamente. Efeitos semelhantes são também observados quando um metoxi-grupo é introduzido na posição C-4' do anel B de flavanonas. O Quadro 2.2.2 ilustra estes dados em analogia aos obtidos para 4'-metoxiisoderricina A (7) e isoderricina A (6).

Quadro 2.2.2- Deslocamentos químicos dos C de isoderricina A (6) e de 4'-metoxiisoderricina A (7) em analogia com os de flavanonas e 7'- e/ou 4'-metoxiflavanonas²⁵.

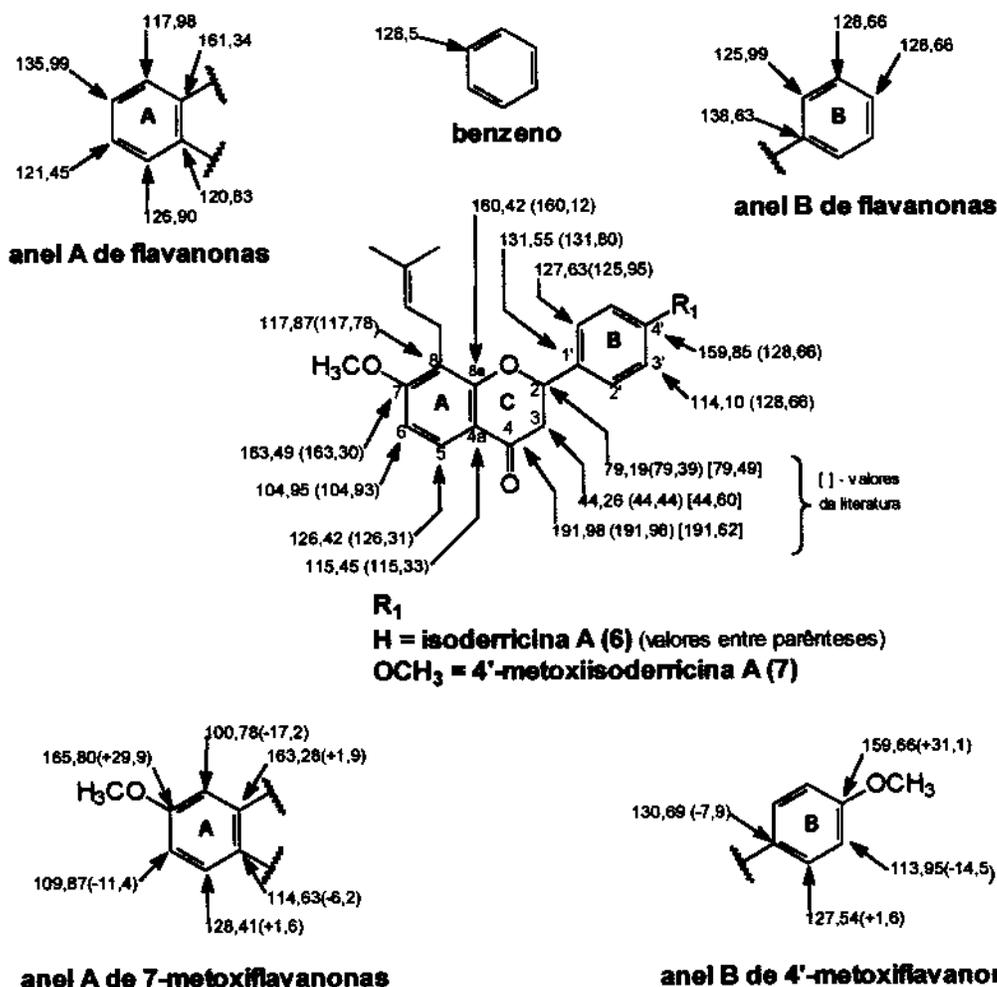


Tabela 2.2.4- Dados de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) e RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS) de 4'-metóxiisoderricina A (7).

H	δ [multiplicidade, J (Hz)]		H	δ [multiplicidade, J (Hz)]	
2	5,40 (1H, dd, 13 e 3)		2',6'	7,39 (2H, d, 9)	
3 eq	2,36 (1H, dd, 17 e 3)		7'	3,34 (2H, d, 7)	
3 ax	3,01 (1H, dd, 17 e 13)		8'	5,17- 5,14(1H, m)	
5	7,82 (1H, d, 9)		CH ₃ -9'	1,64 (3H, s)	
6	6,62 (1H, d, 9)		CH ₃ -9'	1,65 (3H, s)	
3',5'	6,94 (2H, d, 9)		OCH ₃ -4'	3,83 (3H, s)	
			OCH ₃ -7'	3,89 (3H,s)	
C	δ	C	δ	C	δ
2	79,1 (CH)	8	117,9 (C ₀)	7'	22,1 (CH ₂)
3	44,3 (CH ₂)	8a	160,4* (C ₀)	8'	122,0 (CH)
4	191,9 (C ₀)	1'	131,5 (C ₀)	9'	131,9 (C ₀)
4a	115,4 (C ₀)	2',6'	127,6 (CH)	2CH ₃ -9'	25,9 (CH ₃)
5	126,4 (CH)	3',5'	114,1 (CH)	OCH ₃ -4'	55,3 (CH ₃)
6	104,9 (CH)	4'	159,8* (CH)	OCH ₃ -7	55,9 (CH ₃)
7	163,5 (C ₀)				

(*)- valores intercambiáveis.

Tabela 2.2.5- Dados dos espectros de massas, IV e UV da 4'-metoxiisoderricina A (7).

EM, m/z (%): 352 (M ⁺ , 70), 337 (6), 309 (100), 297 (23), 245 (2), 218 (22), 203 (36), 190 (42), 175 (74), 163 (52), 161 (18), 134 (39), 131 (8), 119 (23), 91 (34), 65 (16) u.m.a. Quadro 2.2.3, p.74.		
IV, ν _{máx} cm ⁻¹ (KBr): E7e, p.115		
C=O	gem-dimetila	benzeno <i>para</i> -dissubstituído
1676	d, 1374	ausência de forte absorção a 690 e 750
UV (c = 10 mg/ml), λ _{máx} nm: 230 e 290		

- Fragmentação das flavanonas isoderricina A (6) e 4'-metoxiisoderricina A (7) dirigida pelo padrão de substituição, no espectrômetro de massas. Uma análise estrutural.

Os dados da espectrometria de massas^{4b,21,28,35a} da flavanona-dioxigenada 7, similares ao da flavanona mono-oxigenada anterior, 6, confirma-nos a natureza e a localização dos referidos grupos substituintes sobre os respectivos anéis aromáticos. Para isto, os fragmentos aductos RDA, a m/z 218 (22%) e 134 (39%) são os principais diagnósticos (E7a, p.73, Quadro 2.2.3, p.72).

Assim, evidencia-se agora no espectro de massas de 7, a muito superior abundância relativa do fragmento carregando o anel B, a m/z 134 (39%), comparada à do fragmento análogo na flavanona 6, anterior, 10% (p.66). Esta elevação de intensidade reflete, por conseguinte, a natureza dos respectivos fragmentos, claramente justificado pelo agora presente grupo metoxila, doador de elétrons, que torna este fragmento, cujo anel B, é mais estável devido a sua maior conjugação, mais abundante. Em outras palavras, este fragmento, a m/z 134, produzido pela típica clivagem RDA de flavanonas^{4b,21}, passa a ser mais competitivo perante o co-fragmento a m/z 218 carregando o anel A, dada a introdução daquela função oxigenada em C-4'. Portanto, a comparação com os análogos a m/z 218 e 134 da flavanona anterior, demonstra-nos a competitividade destes fragmentos produzidos pela referida clivagem, dirigida pelo padrão de substituição daquelas moléculas, Quadros 2.1.9, p.64 e 2.2.3, p.72).

Por conseguinte, o efeito gerado pelo adicional grupo substituinte 4'-metoxila, no quadro mecanístico da espectrometria de massas da flavanona 7, em analogia à flavanona 6, anterior, é a que, agora, o fragmento carregando o anel A, a m/z 218, não é mais o responsável pela produção do íon pico base a m/z 175, o que é devido à origem de outra estrutura fragmentária mais estável a m/z 309 (100%). Impedindo a, antes favorável, clivagem RDA, esta espécie conserva aqui os dois anéis aromáticos, onde o anel B, agora está mais estável (p. 64 e 72).

Por outro lado, entretanto, tendo a abundância relativa reduzida como já mencionado, o fragmento-anel A, a m/z 218, é um dos principais responsáveis ainda, pela geração do 2^o mais intenso pico no espectro de massas a m/z 175 (74%), na estrutura 7, enquanto que no espectro da estrutura 6, o fragmento análogo, constitui o pico base sustentando também, o intacto grupo isoprenila^{35a,36}, mas tendo favoravelmente eliminado o radical fenila-anel B (p.64 e 72).

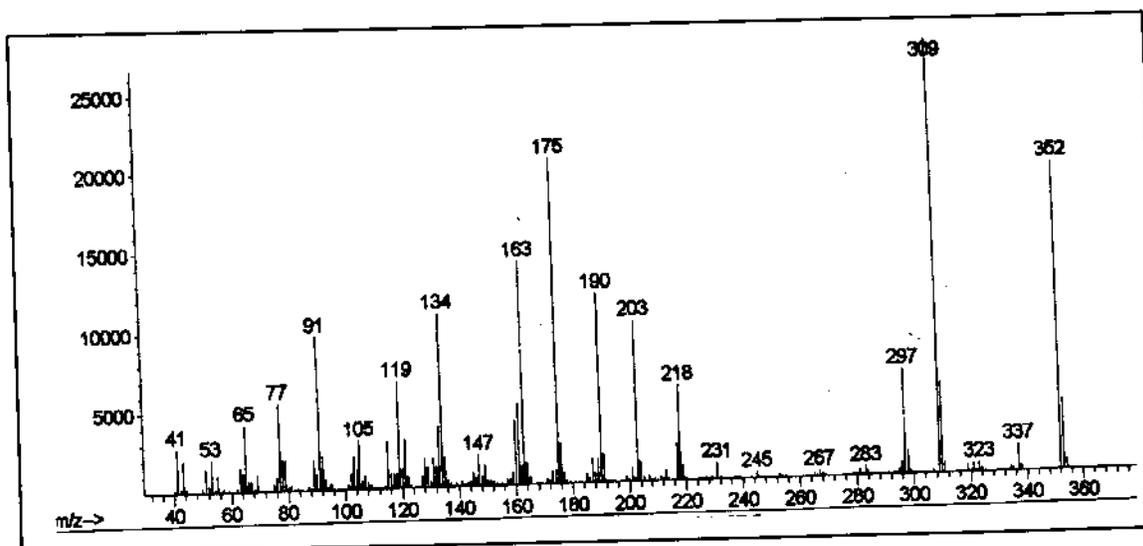
Finalmente, outro importante diagnóstico para o grupo 4'-metoxila sobre a estrutura 7, na espectrometria de massas, provém ainda da típica forma enólica de flavanonas³⁰. Este tautômero é alternativamente (E7a.1b, p.117) responsável pelo segundo mais abundante fragmento, a m/z 175 (74%), o qual é produzido pela eliminação de uma molécula de 5 átomos de C via uma reação concertada (p.72). Já que, o seu análogo (m/z 175), no espectro de massas da estrutura 6, corresponde ao também alternativo pico base (E6a.1c, p.112 e 64), aqui, na estrutura 7, sua abundância relativa reduzida deve-se também ao referido grupo adicional. Eliminando o radical fenila 4'-oxigenado, no equilíbrio enólico da estrutura 7, este radical lá contribui para com a estabilidade do íon molecular, cuja

abundância relativa (70%) é também substancialmente superior comparada aos 33% da estrutura 6 (p.66 e 74).

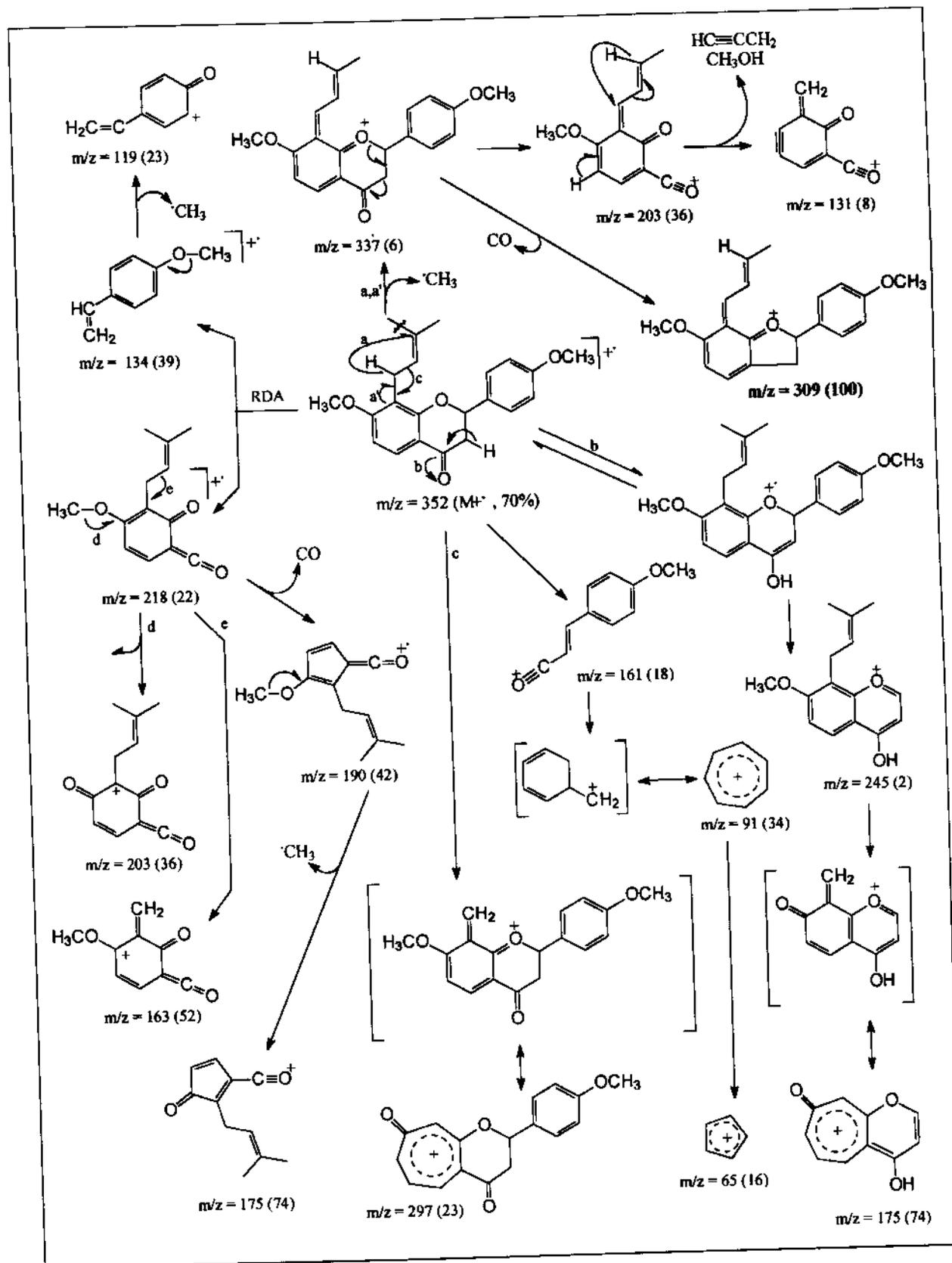
Concluimos então a partir dos espectros de massas dos referidos compostos, que a abundância relativa dos fragmentos é, de fato, competitiva devido à presença ou ausência de substituintes capazes de influir nas suas estabilidades e conseqüentemente, definir a rota de fragmentação (fragmentos produzidos via RDA, a partir do íon molecular, das flavanonas, destacam-se à este argumento). Por outro lado, a redução da abundância relativa dos fragmentos, é aqui atribuída não somente à competitividade, como também, ao seu rápido rearranjo eliminando estáveis moléculas neutras simples ou de cadeia longa, e conservando a propriedade estável através dos grupos substituintes em sistemas altamente conjugado (por exemplo, as espécies iônicas a m/z 337 e a 245, geradoras dos mais estáveis fragmentos, contendo um íon oxônio).

Dado a este quadro químico mecanístico, denotamos a espectrometria de massas, como poderosa ferramenta quer seja na confirmação, quer seja, na elucidação do padrão de substituição em derivados análogos tais sustentando os grupamentos hidroxílico, metoxilicos, isoprenóides e outros⁹, comuns em produtos naturais.

E7a- Espectro de massas de 4'-metoxiisoderricina A (7).



Quadro 2.2.3- Racionalização mecânica da fragmentação de 4'-metoxiisoderricina A (7), no espectrômetro de massas. 4b,21, 35a,36

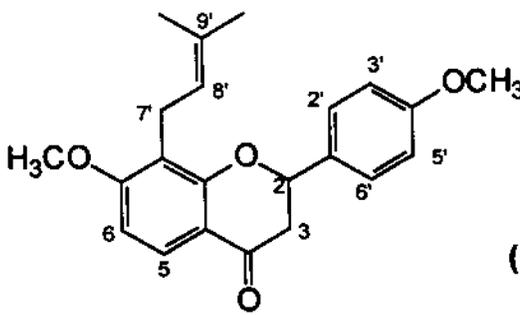


2.1.7.2- Outras medidas espectrométricas sustentáveis à identificação de 4'-metoxiisoderricina A (7).

- Experimento HMQC ²⁸

No espectro de detecção inversa de deslocamento químico heteronuclear, HMQC (E7d, p.115), observamos as respectivas correlações, C-H, a uma ligação ($^1J_{C-H}$) as quais caracterizam os H dos seguintes grupos: dois C-metilas e dois O-metilas, dois metilênicos, quatro metínicos que aos pares, são quimicamente equivalentes e, finalmente, outros três grupos metínicos, dois aromáticos e um centro quiral. Tabela 2.2.6.

Tabela 2.2.6- Dados do espectro de HMQC da flavanona 4'-metoxiisoderricina A (7).

			
H	δ	C correlacionado	δ
2	5,40	2	79,1
3eq	2,36	3	44,3
3ax	3,01	3	44,3
5	7,82	5	126,4
6	6,62	6	104,9
3',5'	6,94	3',5'	114,1
2',6'	7,39	2',6'	127,6
7'	3,34	7'	22,1
8'	5,14-5,19	8'	122,0
CH ₃ -9'	1,64	CH ₃ -9'	25,9
CH ₃ -9'	1,65	CH ₃ -9'	25,9
OCH ₃ -4'	3,83	OCH ₃ -4'	159,8
OCH ₃ -7	3,89	OCH ₃ -7	163,5

- Dados dos espectros de absorção na região do IV e UV da flavanona 4'-metóxiisoderricina A (7).

A análise dos dados do espectro de absorção na região do infravermelho (E7e, p.115), da flavanona 7, nos confere a presença das principais bandas de absorções típicas dos sistemas C=O, α,β -saturada a 1674 cm^{-1} , dimetil-gem, um duplete a 1374 cm^{-1} e um anel benzênico *para*-substituído já que a banda correspondente ao mono-substituído não comparece a 690 e 750 cm^{-1} .

Temos assim, a presente classe das flavanonas, preniladas, também evidenciada pela intensa banda de absorção a 230 nm atribuída ao sistema anel-A benzoíla e, pela menos intensa a 290 nm atribuída ao sistema anel-B cinâmico α,β -saturado (E7f, p.116).

- Análise Conformacional do Anel Heterocíclico

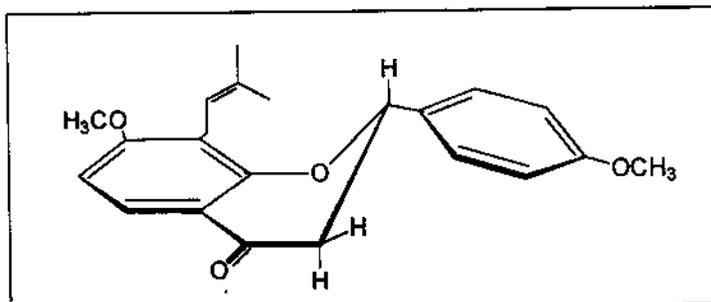
Como já referido às flavanonas anteriores, a literatura tem nos mostrado que as flavanonas naturais possuem a configuração absoluta 2S²⁷. Todavia, a configuração absoluta da flavanona 8 ainda não está definida. Por outro lado, determinamos a estrutura da flavanona 7 através da interpretação dos dados de RMN¹H e EM, como discutido no capítulo 1, tendo-a identificado como 4'-metoxiisoderricina A⁷, um derivado da flavanona anterior isoderricina A.

A análise minuciosa do referido espectro de RMN¹H, no que diz respeito aos H do anel heterocíclico e à conformação deste anel, levou-nos à seguinte conclusão:

- o H fixado sobre o C-2, cuja banda de absorção a $5,40\text{ ppm}$ é representada por duplo duplete com $J = 13$ e 3 Hz , compõe a porção X de um sistema de spins acoplados do tipo ABX no qual, os outros 2H fixados em C-3 aparecem como duplos dubletos a $2,36$ e $3,01\text{ ppm}$ com $J_{\text{gem}} = 17\text{ Hz}$ e $J_{\text{vic}} = 13$ e 3 Hz , respectivamente, atribuídos aos H-3eq e H-3ax, Quadro 2.1.8, p.62.

As magnitudes destas constantes de acoplamentos estão em completo acordo com a equação de Karplus, bem como, com os valores para os H em C-2 e -3 em outras flavanonas²⁷. Assim o elevado valor do acoplamento *trans*-diaxial (13 Hz), demonstra que o anel fenila fixado em C-2, está na posição equatorial, onde o anel heterocíclico o qual suporta o C-2, encontra-se na conformação meia-cadeira³², Quadro 2.2.4, p.75.

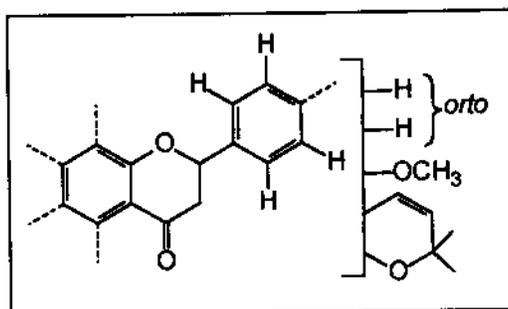
Quadro 2.2.4- Conformação meia-cadeira do anel heterocíclico e posição equatorial do anel fenila, assumidas em 4'-metoxiisoderricina A (7).



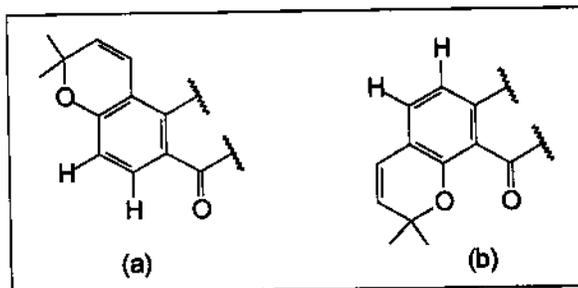
2.1.8- Flavanona [4'-metoxiisolonchocarpina (8)]

No espectro de RMN¹H do composto 8 (Tabela 2.2.7, p.77 e E8, p.118) comparece o típico par de duplos dubletos com $J = 17$ e 3 Hz e 17 e 13 Hz a $2,80$ e $3,00$ ppm, respectivamente; cada um integrando $1H$, caracterizam a porção AB de um sistema de spins acoplados no qual, a porção X, é representada por um duplo duplete com $J = 13$ e 3 Hz, integrando $1H$ a $5,42$ ppm. Este sistema denota, portanto, a natureza alifática dos referidos núcleos. Por outro lado, na região de frequência de absorção dos H aromáticos, um acoplamento em *orto* é evidenciado pelos dubletos com $J = 8$ Hz, cada um integrando $1H$, a $5,42$ e $7,73$ ppm. Já, a destacável presença de um anel benzênico *para*-dissubstituído é sustentada por acoplamento em *orto*, cujos dubletos, com $J = 9$ Hz integram, cada um, $2H$ a $6,94$ e $7,39$ ppm. As bandas de absorção remanescentes, um típico e intenso singleto integrando $3H$ a $3,84$ ppm, evidencia um grupo substituinte metoxila, enquanto que, finalmente, os sinais representados pelos dubletos com $J = 10$ Hz, cada um integrando $1H$ a $5,54$ e $6,16$ ppm, adicionados aos sinais que constituem dois singletos, cada um integrando $3H$ a $1,44$ e $1,46$ ppm, claramente evidenciam a presença do grupo substituinte isoprenila oxidativamente ciclizado (2,2-dimetilcromeno).

A partir destes dados, temos por conseguinte, a montagem de um esqueleto flavanônico.



Os dois H em posição relativa *orto*, permitem estabelecermos dois possíveis regioisômeros, a saber:



Entretanto, admitindo-se o postulado aceito, no qual a rota biossintética de flavonóides (Quadro I.1, p.5) ⁶ invariavelmente resulta em função mono-oxigenada em C-7, resta-nos somente a alternativa *a*.

Além disso, a presença de um H cuja frequência de ressonância está a 7,73 ppm, no espectro de RMN¹H, devido a sua posição-β ao grupo C=O, é possível somente no isômero *a*.

Por outro lado, a racionalização do mecanismo de fragmentação da flavanona 8, no espectrômetro de massas, em analogia ao mecanismo de fragmentação da flavanona original 5, demonstra a evidente presença do adicional grupo 4'-metoxila, bem como a do substituinte 2,2-dimetilcromeno, comum às duas substâncias, Quadros 2.1.7, p.59 e 2.2.5, p.78).

Portanto, o espectro de massas da estrutura 8 (E8a, abaixo), constitui-se de poucos fragmentos principais e estes, são os diagnósticos que evidenciam o adicional grupo 4'-metoxila. Assim, o íon molecular aparece com sua abundância relativa acrescida de 4%, embora pouco significativa (16%), este acréscimo é devido ao referido grupo o qual contribui para com a estabilidade deste íon. Este fato é ainda sustentado pelo decréscimo na abundância relativa do fragmento a *m/z* 321 (30%, comparado aos 52% do fragmento análogo da estrutura 5), produzido, a partir do íon molecular, através da típica eliminação de um radical metila do substituinte 2,2-dimetilcromeno ⁴⁵. Todavia, este fragmento, como na flavanona análoga 5, é o responsável pela produção do íon que constitui o pico base a *m/z* 187.

Outro efeito gerado pelo referido grupo adicional, 4'-metoxila, é presenciada pela agora possível clivagem RDA. Ainda que pouco significativa para a estrutura 8, este mecanismo é completamente ausente na fragmentação da estrutura 5

Tabela 2.2.7- Dados dos espectros de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ / TMS) e RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃ / TMS) de 4'-metoxiisolonchocarpina (8).

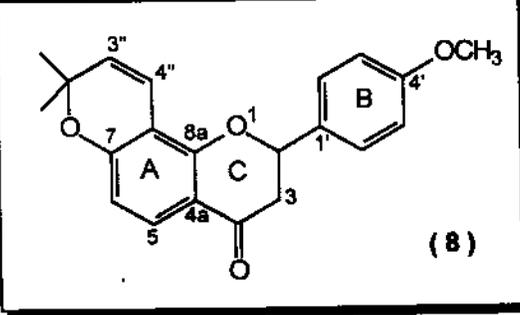
					
H	δ [multiplicidade, J (Hz)]		H	δ [multiplicidade, J (Hz)]	
2	5,42 (1H, dd, 13 e 3)		3',5'	6,94 (2H, d, 9)	
3 eq	2,80 (1H, dd, 17 e 3)		3''	5,54 (1H, d, 10)	
3 ax	3,00 (1H, dd, 17 e 13)		4''	6,16(1H, d, 10)	
5	7,78 (1H, d, 9)		CH ₃ -2''	1,44 (3H, s)	
6	6,48 (1H, d, 9)		CH ₃ -2''	1,46 (3H, s)	
2',6'	7,39 (2H, d, 9)		OCH ₃ -4'	3,84 (3H, s)	
C	δ	C	δ	C	δ
2	79,8 (CH)	7	160,0 (C ₀)	4'	159,9 (CH)
3	44,4 (CH ₂)	8	109,7 (C ₀)	3''	129,0 (CH)
4	191,1 (C ₀)	8a	157,9 (C ₀)	4''	116,1 (CH)
4a	114,98 (C ₀)	1'	128,1 (C ₀)	2''	131,9 (C ₀)
5	131,2 (CH)	2',6'	127,8 (CH)	CH ₃ -2''	28,3 (CH ₃)
6	111,4 (CH)	3',5'	114,3 (CH)	CH ₃ -2''	28,6 (CH ₃)

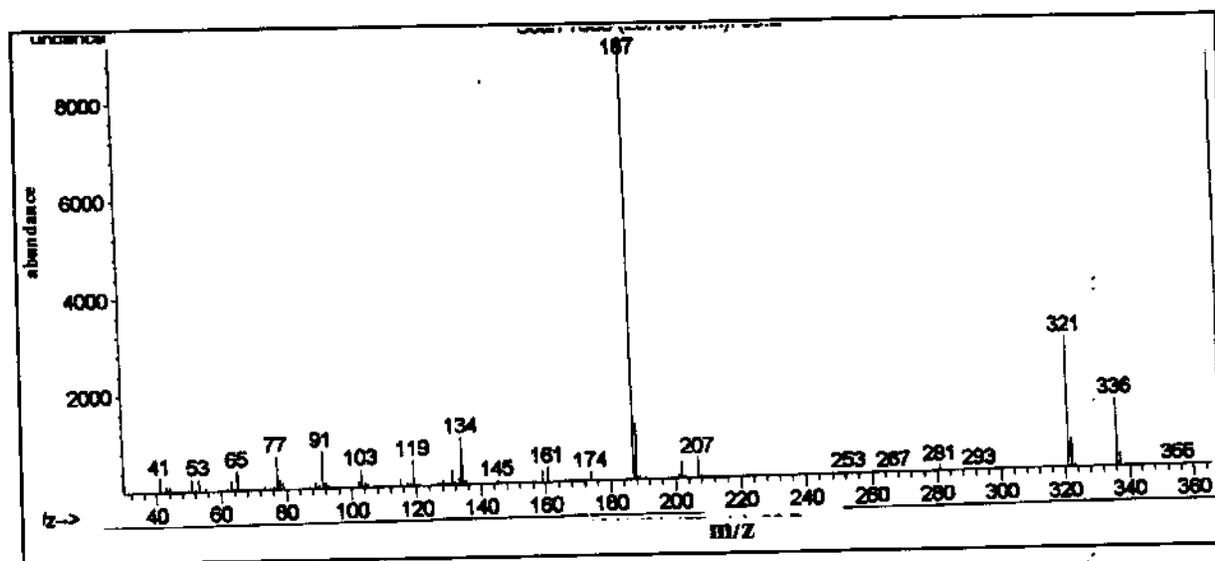
Tabela 2.2.8- Dados dos espectros de massas, IV e UV 4'-metoxiisolonchocarpina (8).

EM, m/z (%): 336 (M ⁺ , 16), 321 (30), 202 (3), 187 (100), 134 (10) u.m.a. Quadro 2.2.5, p.78.		
IV, ν _{máx} cm ⁻¹ (KBr): E8d, p.121		
C=O	gem-dimetila	benzeno <i>para</i> -dissubstituído
1673	d, 1374	ausência de forte absorção a 690 e 750
UV (c = 10 mg/ml), λ _{máx} nm (log ε): 270 e 315		E8e, p.121

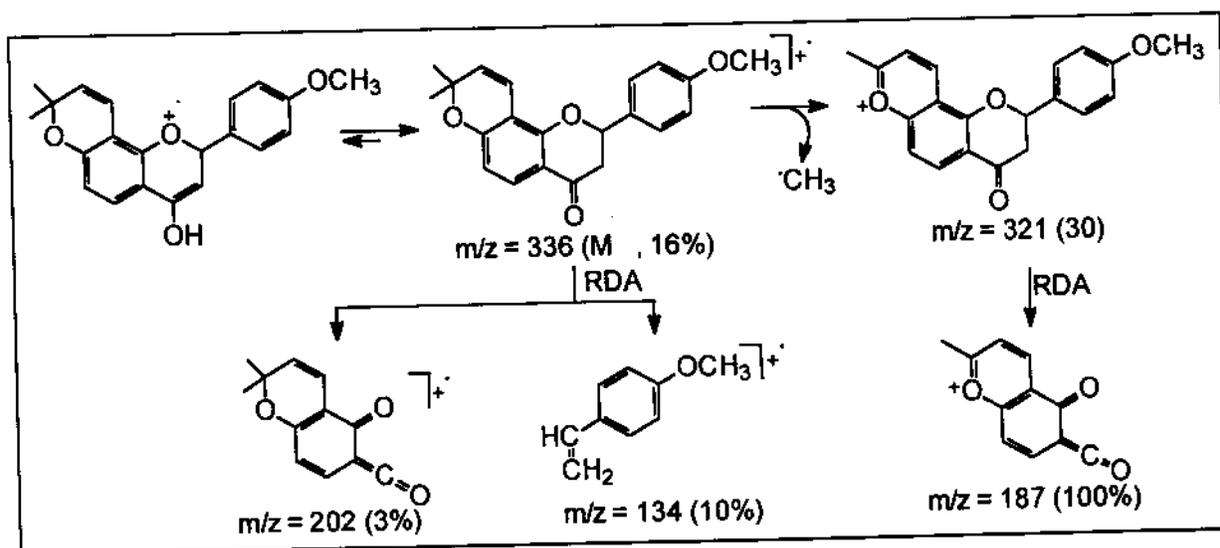
análoga e, entre os dois possíveis aductos RDA, o fragmento majoritário a m/z 134 (10%), carrega o referido substituinte que, assim, contabiliza para com a sua estabilidade.

Por sua vez, agora, nenhum importante fragmento é produzido pela típica forma enólica de flavanonas e, por dedução, o equilíbrio é favoravelmente deslocado para o tautômero que constitui o íon molecular (Quadro p.61 e abaixo).

E8a- Espectro de massas de 4'-metoxiisolonchocarpina (8).

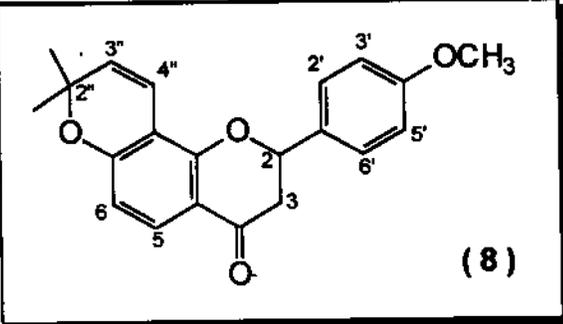


Quadro 2.2.5- Racionalização mecanística da fragmentação de 4'-metóxiisolonchocarpina (8), no espectrômetro de massas ^{4b, 21,35}



No espectro de correlação inversa de deslocamento químico heteronuclear, HMQC ²⁸ (E8c, p.120) da flavanona **8**, observamos as respectivas correlações, C-H, a uma ligação (¹J_{C-H}) as quais caracterizam os H dos seguintes grupos: dois C-metilas e dois O-metilas, um metilênico, quatro metínicos que aos pares, são quimicamente equivalentes e, finalmente, outros três grupos metínicos, dois aromáticos e um centro quiral, de acordo com a Tabela 2.2.9, abaixo.

Tabela 2.2.9- Dados do espectro de HMQC de 4'-metóxiisolonchocarpina (**8**).

			
H	δ	C correlacionado	δ
2	5,42	2	79,8
3eq	2,80	3	44,4
3ax	3,00	3	44,4
5	7,73	5	131,2
6	6,48	6	111,4
3',5'	6,94	3',5'	114,3
2',6'	7,39	2',6'	127,8
3''	5,54	3''	129,0
4''	6,66	4''	116,1
CH ₃ -2''	1,64	CH ₃ -2''	28,3
CH ₃ -2''	1,65	CH ₃ -2''	28,6
OCH ₃ -4'	3,84	OCH ₃ -4'	55,6

- Dados dos espectros de absorção na região do IV e UV da flavanona 4'-metóxiisolonchocarpina (8**).**

A análise dos dados do espectro de absorção na região do infravermelho (E8d, p.121), da flavanona **8**, nos confere a presença das principais bandas de absorções típicas dos sistemas C=O, α,β-saturada a 1674 cm⁻¹, dimetil-gem, um duplete a 1374 cm⁻¹ e a ausência das bandas a 690 e 750 cm⁻¹, as quais representam um anel benzênico mono-substituído.

Temos assim, a presente classe das flavanonas, preniladas, também evidenciada pela intensa banda de absorção a 270 nm atribuída ao sistema anel-A

benzoíla e, uma mera inflexão ou um ombro a 315 nm atribuída ao sistema anel-B cinâmico α,β -saturado (E8e, p.121).

- Análise Conformacional do Anel Heterocíclico

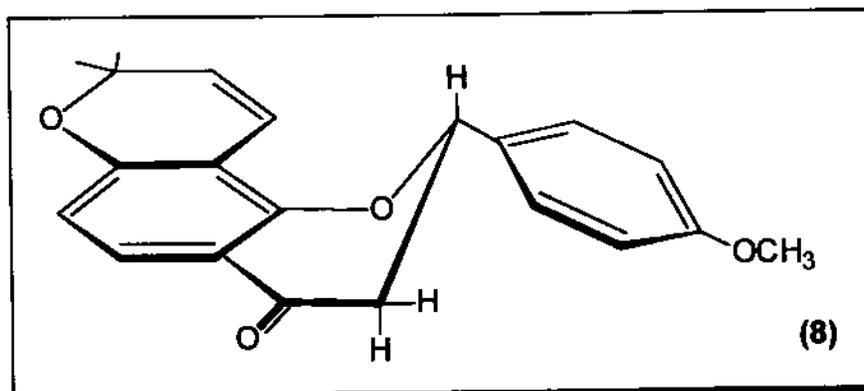
Como já referido às flavanonas anteriores, a literatura tem nos mostrado que as flavanonas naturais possuem a configuração absoluta 2S^{31,32}. Entretanto, a configuração absoluta da flavanona 8 não está ainda definida. Por outro lado, determinamos a estrutura da flavanona 8 através da interpretação dos dados de RMN¹H e EM, como discutido no capítulo 1, tendo-a identificado como 4'-metoxiisolonchocarpina⁷, um derivado da flavanona isolonchocarpina (5).

A análise minuciosa do referido espectro de RMN¹H, no que diz respeito aos H do anel heterocíclico e à conformação deste anel, levou-nos à seguinte conclusão:

- o H fixado sobre o C-2, cuja banda de absorção a 5,42 ppm é representada por duplo dubleto com $J = 13$ e 3 Hz, compõe a porção X de um sistema de spins acoplados do tipo ABX no qual, os outros 2H fixados em C-3 aparecem como duplos dubletos a 2,80 e 3,00 ppm com $J_{gem} = 17$ Hz e $J_{vic} = 13$ e 3 Hz, respectivamente, atribuídos aos H-3eq e H-3ax, Quadro 2.1.8, p.62.

As magnitudes destas constantes de acoplamentos estão em completo acordo com a equação de Karplus, bem como, com os valores para os H em C-2 e -3 em outras flavanonas²⁷. Assim o elevado valor do acoplamento *trans*-diaxial (13 Hz), demonstra que o anel fenila fixado em C-2, está na posição equatorial, onde o anel heterocíclico o qual suporta o C-2, encontra-se na conformação meia-cadeira²⁷, conforme o Quadro 2.2.7, abaixo.

Quadro 2.2.7- Conformação meia-cadeira do anel heterocíclico e posição equatorial do anel fenila, assumidas em 4'-metoxiisolonchocarpina (8)²⁷.



CAPÍTULO 3 Parte Experimental

3.1- Métodos Espectrométricos

Os espectros de RMN¹H, RMN¹³C, HMQC e NOE, foram obtidos nos espectrômetros Varian- Gemini 300 BB e Inova 500.

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro CG/MS 5988 AHP, por impacto de elétrons (70 ev) e os de alta resolução e EM/EM em espectrômetro VG-AUTO SPEC-FISSONS.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetros Perkin-Elmer modelo 1600 (FTIR) ou BOMEN série II, em pastilhas de KBr (para sólidos) ou em filmes sobre cela de NaCl (para líquidos). A referência utilizada foi a absorção em 1601 cm⁻¹ de um filme de poliestireno ou o ar atmosférico.

Os espectros de UV foram obtidos no decurso das análises qualitativas no cromatógrafo (HPLC) HP-500, série II, acoplado a detector de UV.

Os valores de rotação ótica ($[\alpha]_D$) foram obtidos em um polarímetro Carl Zeiss Jena Polamart A com lâmpada de mercúrio (546 nm) e, posteriormente, corrigidos para a lâmpada de sódio e para a temperatura de 20 °C, segundo as relações:

$$\alpha_{Hg} = 1,175 \alpha_{Na} ;$$

$$[\alpha]_{obs} = \alpha_{Na} / [1 + 0.000143 (T - 20)] \text{ e, finalmente}$$

$$[\alpha]_D^{20} = [\alpha]_{obs} / c \times l, \text{ onde:}$$

c = concentração da amostra (g/ml)

l = comprimento da cela (0,5 dm)

T = temperatura ambiente (°C)

$[\alpha]_D^{20}$ = rotação específica corrigida

3.2- Métodos Cromatográficos

Realizamos as cromatografias em camada delgada analítica (CCD) em sílicagel GF₂₅₄, sobre suporte de vidro (espessura de 0,25 cm) ou de alumínio e detectamos as substâncias sob irradiação de luz ultravioleta (254 e 365 nm) e nebulização com solução de ácido acético : ácido sulfúrico : anisaldeído (100,0 : 2,0 : 1,0 ml), seguida de revelação por aquecimento da cromatoplaça. As CCD preparativa realizamos em sílicagel PF₂₅₄, sobre suporte de vidro (espessura de 1mm) e a detecção e revelação dos compostos como acima mencionado. As cromatografias em coluna "Flash"³⁷ e em coluna clássica foram empacotadas com sílicagel 200-400 e 70-230 mesh, respectivamente, utilizando-se cerca de 50 g de sílica por cada grama de amostra analisada, em coluna clássica e, no caso de coluna "Flash", conforme a literatura³⁷.

3.3- Coleta e Tratamento das Raízes

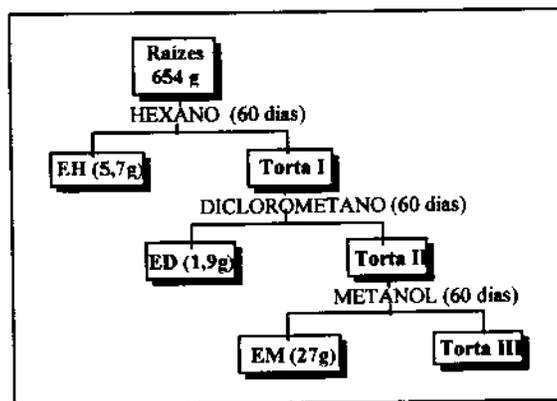
Coletamos as raízes de *L. campestris* em março de 1996 e em julho de 1997, da mesma árvore, no campus da Unicamp, sob a orientação da Profa. Dra. Ana M. G. A. Tozzi² do Departamento de Botânica - Unicamp. O cerne e a casca das raízes foram lavadas com água, cortadas, secas ao ar livre e em estufa por cerca de 72 horas à 45^o. Em seguida, foram moídas, pesadas e, seus extratos hexânico, diclorometânico e metanólico, obtivemos por extração contínua (Soxhlet) ou não-continua, conforme a Tabela 2.3.1 e o Esquema 1:

Tabela 2.3.1- Extratos obtidos das raízes de *L. campestris*⁷.

1 ^a coleta:		
Fonte	Extrato	Peso do extrato (g)
miolo (654g)	hexânico (H)	*
	diclorometânico (D)	1,9
	metanólico (M)	26,7
casca (11g)	hexânico	*
casca (200g)	diclorometânico ^a	**
2 ^a coleta:		
miolo (301g)	diclorometânico	1,8
casca (67g)	diclorometânico ^a	**

- (*) - reunidos após CCD analítica fornecendo-nos 7g do extrato.
 (**) - reunidos após CCD analítica fornecendo-nos 3,6 g do extrato.
 (a) - por percolação.

Esquema 1- Extratos obtidos das raízes da 1^a coleta (miolo) de *L. campestris*.



EH = extrato hexânico; ED = extrato diclorometânico; EM = extrato metanólico.

3.4- Fracionamento do extrato D-miolo (1^a e 2^a coleta)

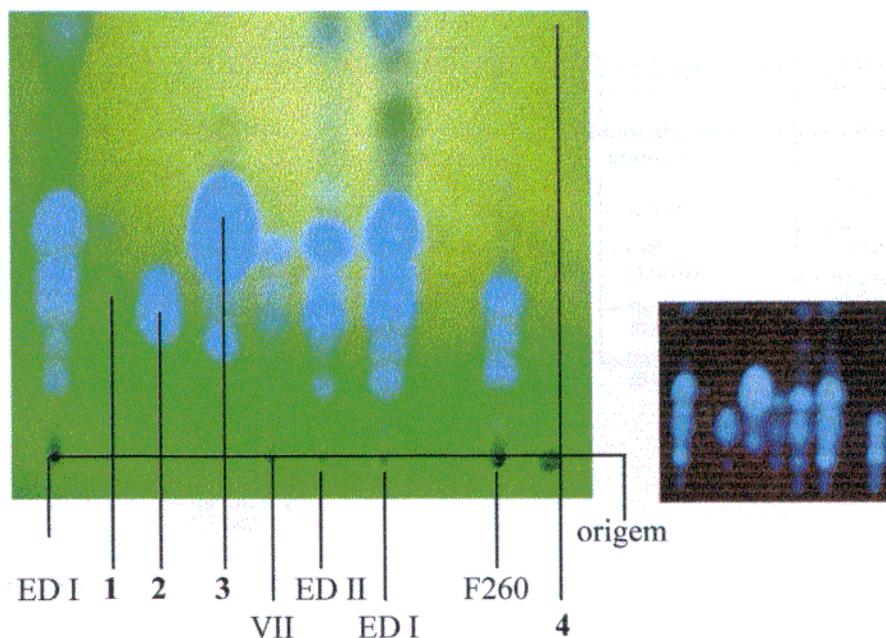
Uma coluna "Flash"³⁷ com diâmetro de 5 cm, foi empacotada com silicagel para iniciarmos o fracionamento sucessivo de 1,77 e 1,65g de amostra (Esquema 2 e 3). Como eluente na primeira análise, iniciamos com diclorometano e aumentando

gradativamente a polaridade com metanol, obtivemos 165 frações de 50 ml cada. Estas foram posteriormente analisadas por CCD e as semelhantes, agrupadas. A seguir as frações agrupadas foram purificadas por CC e/ou CCD (comum ou contínua). A priori, para prosseguirmos a análise de cada fração agrupada, baseamos na quantidade e complexidade da mistura.

No fracionamento da segunda amostra do extrato diclorometânico (1,65 g), como eluente utilizamos diclorometano 100% e prosseguimos como acima descrito (Esquema 3).

Ilustrando, o Quadro 3.4.1 apresenta uma fotografia do desenvolvimento cromatográfico em camada delgada analítica, revelado somente sob a luz da lâmpada de UV (254 e 365 nm), dos extratos diclorometânicos do miolo da 1ª e 2ª coleta, das frações 260 e VIIb e das substâncias 1- 4, isoladas até aquele momento. A importante observação é a estável composição de flavonóides nos referidos extratos, após o intervalo de 16 meses entre as coletas. Esta composição é representada principalmente pelos flavonóis 2 e 3, pela chalcona 4 (mais apolar, encontra-se acima da área fotografada) e pela flavanona 5 (também mais apolar).

Quadro 3.4.1- Cromatograma analítico dos extratos diclorometânicos, de frações e das substâncias isoladas das raízes de *L. campestris*.



legenda: ED I e II = extrato diclorometânico do miolo da 1ª e 2ª coleta → origem das substâncias 1-5.
 (1) = medicarpina; (2) = 4'-metoxikaranjina; (3) = karanjina; (4) = 4'-metoxilonchocarpina

VII (19,7 mg) = banda retirada da CCD da fração reunida F11-15 (56 mg) → origem da isolonchocarpina (5).

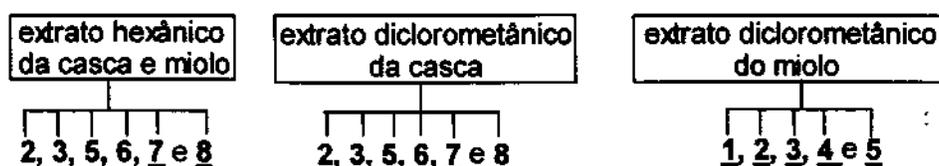
F260 (948 mg) = a mais polar fração, da cromatografia em coluna Flahs do ED II.

Eluente: CH₂Cl₂ 100%.

3.7- Análise Qualitativa dos Extratos das Raízes de *L. campestris*⁷ e seus Respectivos Constituintes Via CLAE

A análise qualitativa dos extratos hexânico, diclorometânico do miolo e da casca das raízes de *L. campestris*, demonstrou que seus principais constituintes são igualmente distribuídos em cada extrato e, variando apenas a concentração em cada extrato, a grande maioria destes constituintes compreendem as substâncias isoladas e identificadas, por co-injeção via CLAE³⁸, no extrato de origem e nos demais extratos (Quadro 3.7.3, p.87). Ilustrando, a Figura 3.1, resume os dados destas análises.

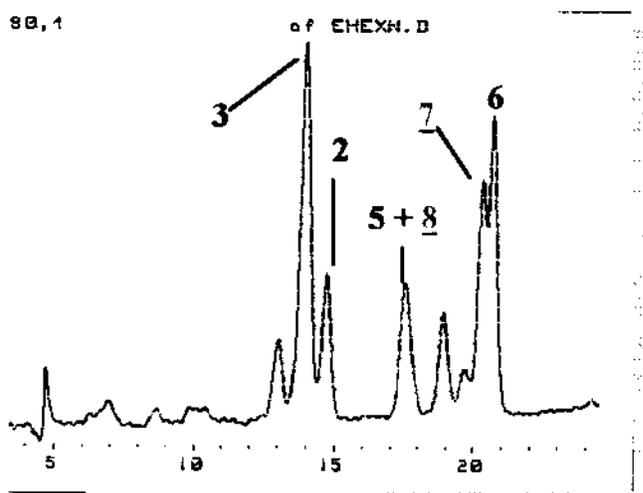
Figura 3.1- Extratos estudados e seus constituintes identificados por co-injeção em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*.



(*)- números grifados representam os constituintes obtidos a partir deste extrato. (**)- veja as estruturas no Quadro 2.1.1, p.38.

Assim, restringimos nossa discussão ao extrato hexânico, que majoritariamente, constitui-se de seis dos oito flavonóides isolados e dentre estes, as duas novas 4'-metoxiflavanonas 7 e 8, Quadro 3.7.2, abaixo. As substâncias 1 e 4, ausentes neste extrato, foram igualmente co-injetadas e identificadas nos extratos de origem. Todavia, a substância 1, a medicarpina, não foi identificada no extrato diclorometano do miolo da 2ª coleta, por CCD, antes deste ser reunido ao mesmo extrato remanescente da 1ª coleta; o Quadro 3.4.1, p.83, exemplifica esta análise.

Quadro 3.7.2- Cromatograma do extrato hexânico* das raízes de *L. campestris* e a identificação dos constituintes isolados.



(*)- números grifados representam os constituintes obtidos a partir deste extrato, veja Quadro 3.7.4, p.88-89.

Para a análise qualitativa do extrato hexânico, fizemos as co-injeções dos padrões das substâncias isoladas em amostras do extrato. Através da comparação do tempo de retenção dos picos de cada padrão pode-se identificá-los nos cromatogramas.

Realizamos a seleção da fase móvel utilizando-se uma alíquota do extrato hexânico. Nos primeiros testes, manteve-se a fase móvel constante e variou-se o comprimento de onda do detector de UV. Após a seleção do λ , realizamos os testes para a escolha do eluente mais apropriado, Tabela 3.2.

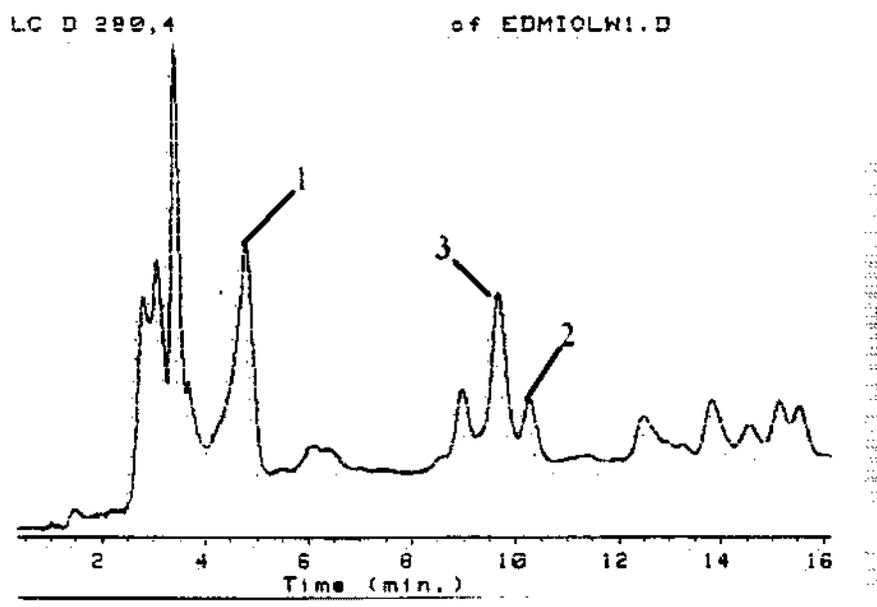
Tabela 3.2- Fase móvel e comprimento de onda selecionados para o extrato hexânico.

λ (nm)	eluente*
230	MeOH:H ₂ O (70:30)
254	MeOH:H ₂ O (70:30)
280	MeOH:H ₂ O (70:30)
(*)- gradiente 1 a 30'.	

Assim, para a eluição do extrato hexânico através da coluna cromatográfica, mostrada no Quadro 3.7.2, anterior, a melhor fase móvel foi CH₃OH : H₂O (70:30) com λ a 280 nm, gradiente de eluição de 1 a 30' e fluxo de 0,4 ml/min.

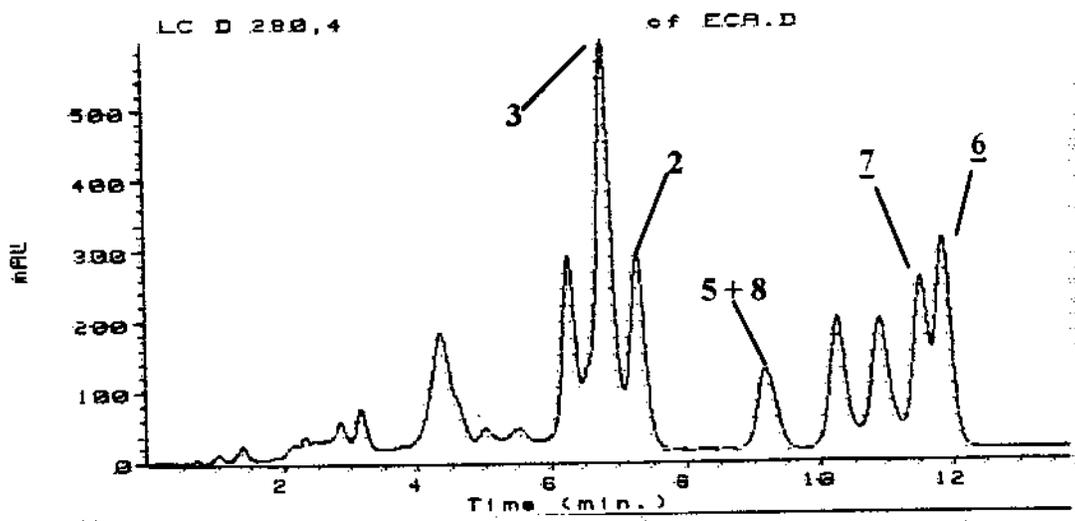
A título ilustrativo, o Quadro 3.7.3 seguinte apresenta os cromatogramas dos extratos diclorometânico do miolo (a) e da casca (b) das raízes de *L. campestris*. Por sua vez, o Quadro 3.7.4, p.88-89, apresenta as co-injeções das flavanonas 7 e 8 no extrato hexânico a partir do qual foram isoladas.

Quadro 3.7.3 (a)- Cromatograma do extrato diclorometânico do miolo* e a identificação dos constituintes isolados de *L. campestris*⁷.



(*)- origem dos constiuintes identificados pelos picos.

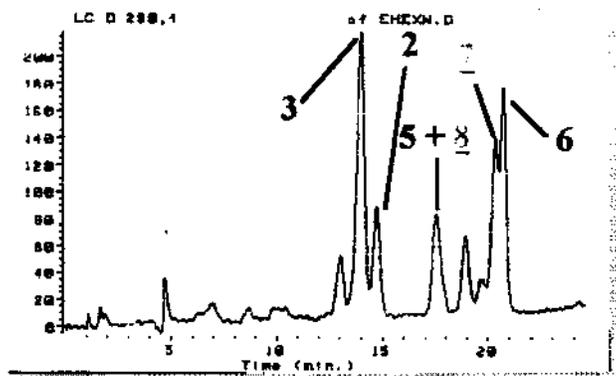
Quadro 3.7.3 (b)- Cromatograma do extrato diclorometânico da casca** e a identificação dos constituintes isolados de *L. campestris*⁷.



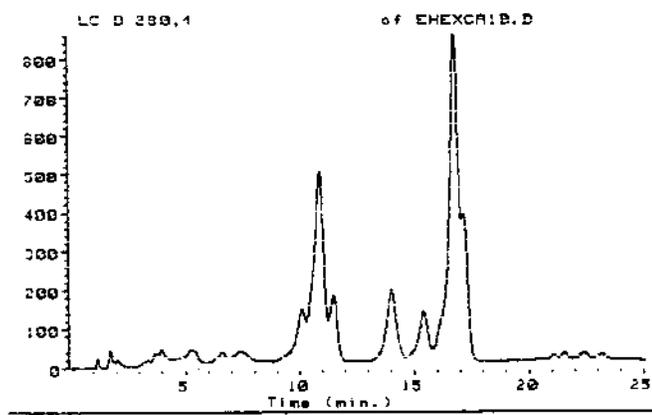
(**)- os números grifados representam os compostos obtidos a partir deste extrato.

Finalmente, o Quadro 3.7.4, a seguir, ilustra as co-injeções das flavanonas 7 e 8 no extrato hexânico de origem.

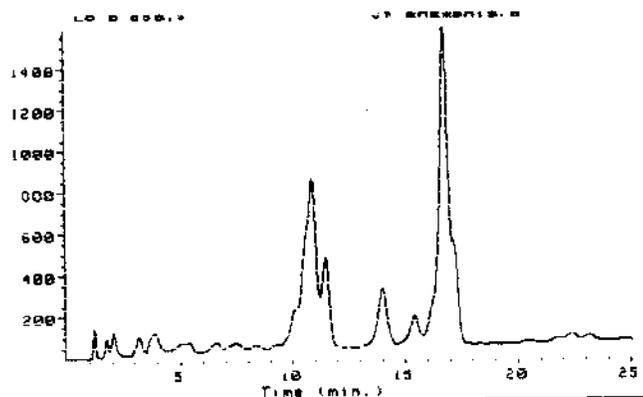
Quadro 3.7.4- Co-injeções das flavanonas 7 (a) e 8 (b) no extrato hexânico do qual foram isoladas.



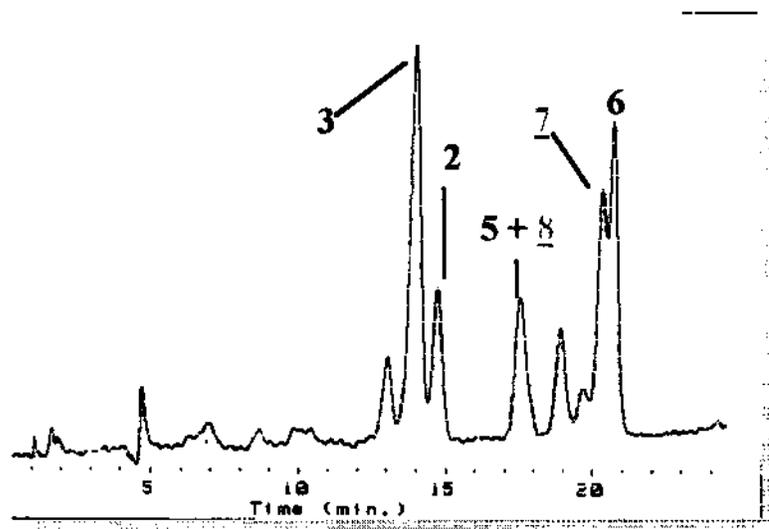
(a)- Extrato hexânico (280 nm)



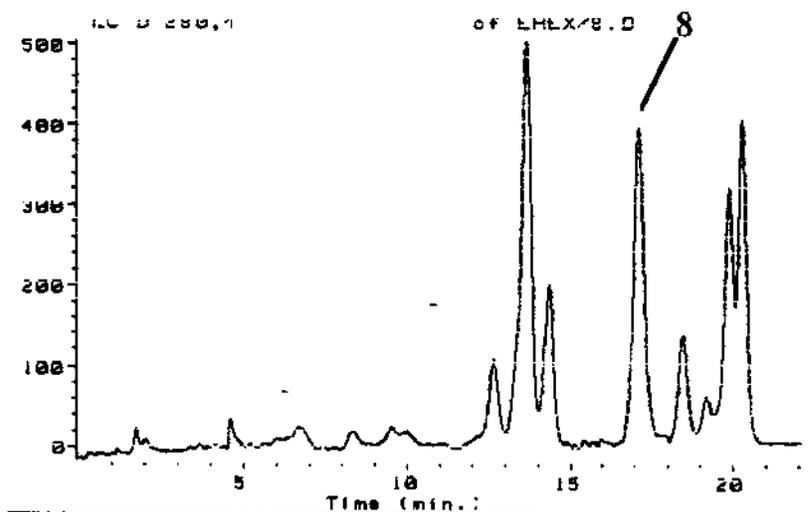
(a)- Extrato hexânico + flavanona 7 (280 nm)



(a)- Extrato hexânico + flavanona 7 (230 nm)



(b)- Extrato hexânico (280nm)



(b)- Extrato hexânico + flavanona 8 (280nm)

CAPÍTULO 4 Atividade Biológica

4.1- Introdução

Veja "Atividade dos flavonóides nos organismos vegetais e animais", p.7 e, p.10, respectivamente.

4.2- Ensaio de Bioautografia dos Extratos das Raízes de *L. campestris*

Realizamos ensaios biológicos, *in vitro*, com os três extratos da primeira coleta (Tabela 2.3.1, p.88), conforme o protocolo descrito por Towers e col.³⁸ com os fungos *Alternaria alternata* (CCT1250), *Aspergillus niger* (CCT1435), *Candida albicans* (CCT0776), *Cladosporium cladosporioides* (CCT5039) e *Rhizopus oryzae* (CCT4964) e com a bactéria *Bacillus subtilis* (CCT0089). Entretanto, nenhum dos extratos apresentaram atividade fungicida ou bactericida com os referidos microrganismos.

4.3- Bioensaio de citotoxicidade com a flavanona 4'-metoxiisoderricina A (7)

Enviamos aos cuidados do CPQBA, a nova flavanona, 4'-metoxiisoderricina A (7), para ser submetida aos ensaios de atividade citotóxica, *in vitro*, contra as linhagens de células cancerosas de pulmão (A 549), de cólon (WiDR) e de Leucemia (K 562), conforme a seção experimental seguinte⁴⁰.

4.3.1- Seção experimental

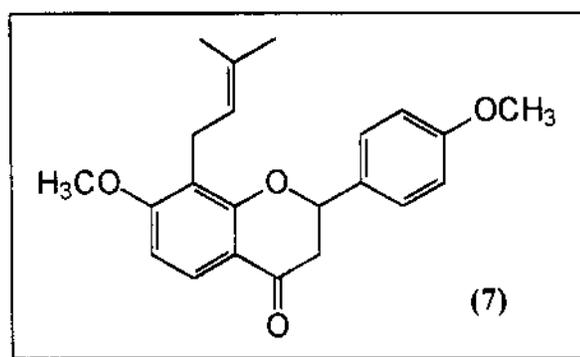
O ensaio foi realizado de acordo com a literatura de bioensaio de citotoxicidade com MTT, que está baseado na redução metabólica do sal de tetrazolium (solúvel) em formazan (insolúvel) por produtos da atividade dehidrogenase mitocondrial de células cancerosas, usando as linhagens das células humanas acima citadas, cujo período de incubação nas diversas concentrações foi de 48 h⁴⁰.

4.3.2- Resultados e Discussão

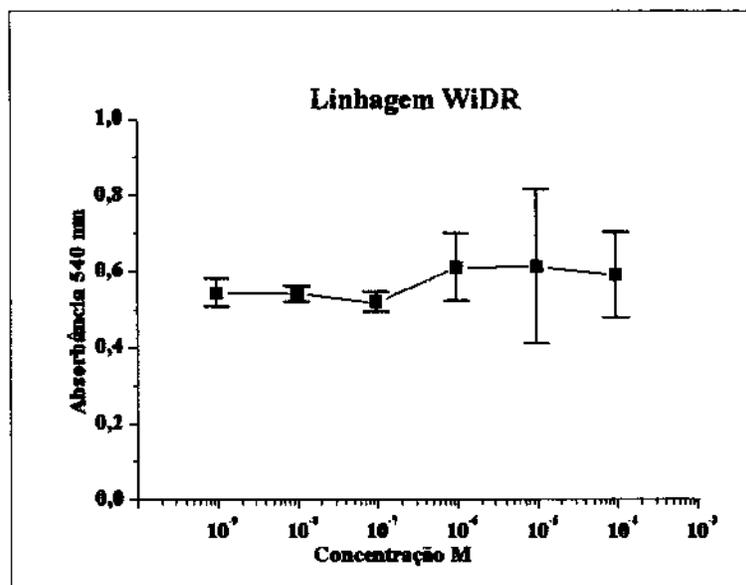
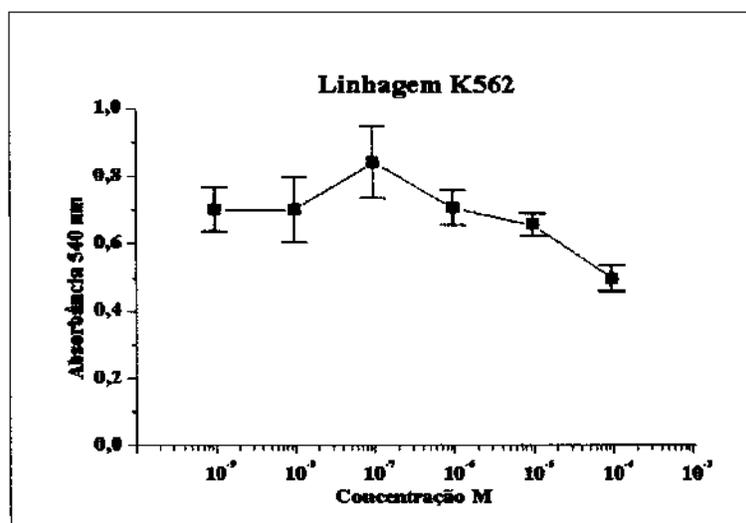
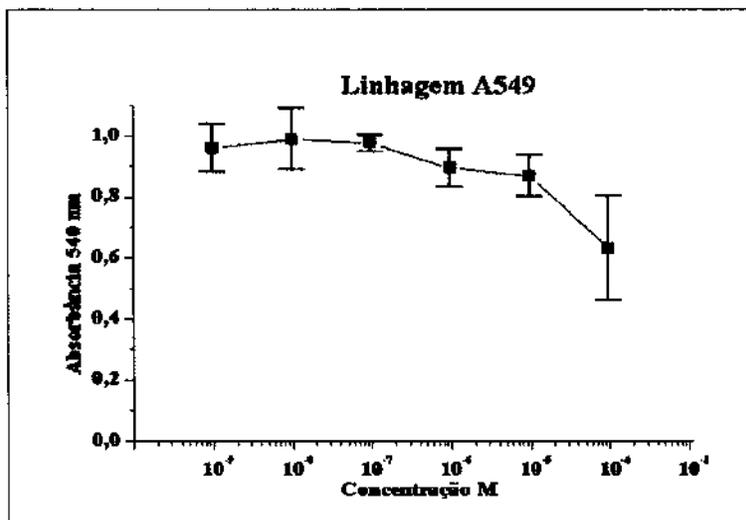
Uma classe de enzimas ativada durante o metabolismo celular a nível mitocondrial, a *dehidrogenase*, é a responsável por cujos produtos desta atividade conduzirem a redução do sal de tetrazolium (amarelo) em formazan (roxo-violeta). Assim, a atividade celular e, por conseguinte, o desenvolvimento *in vitro* destas células cancerosas, pode ser monitorada através do espectro de absorção na região da luz ultravioleta, exatamente a 540 nm. A permanência da cor amarela no meio de cultura, nas concentrações utilizadas, denota a inibição da referida enzima e da célula como um todo e, portanto, a atividade da substância-teste⁴⁰. Todavia, neste ensaio, a referida substância, a flavanona 4'-metoxiisoderricina A (7), Figura 4.1,

p.91, não apresentou a atividade citotóxica desejada, o que ficou constatado a partir da curva de absorvância em função da concentração (M), os gráficos 4.1-4.3, p.94. Lá, a cor roxo-violeta se pronuncia naquelas desejáveis concentrações (10^{-9} - 10^{-3} M) da substância testada. Talvez, nas concentrações acima de 10^{-3} M, porém não desejáveis, a referida curva pode ser decrescente naqueles gráficos (substância teste ativa) ,o que é mais evidente nos ensaios com as células cancerosas de pulmão (A 459) e de leucemia (K562), de acordo com os Gráficos 4.3, p.92.

Figura 4.1- Estrutura da flavanona [4'-metoxiisoderricina A (7)] testada nos ensaios de citotoxicidade ⁴⁰.



Gráficos 4.1-4.3- Atividade enzimática das células cancerosas de pulmão (A549), leucemia (K562) e de cólon (WiDR), respectivamente.



CAPÍTULO 5

Correlações Taxonômicas de *L. campestris*⁷ e *D. mollis*^{3,6}

5.1- Introdução

Enquanto diferentes grupos biogenéticos de metabólitos secundários raramente se acumulam na mesma espécie vegetal, um grupo pode substituir outro em taxons morfológicamente relacionados. Assim, o uso de micromoléculas como marcadores sistemáticos gerais do reino vegetal, requer postulados unificadores de seus padrões de evolução. Dois postulados desta natureza — a contração do caminho do chiquimato e o bloqueio de enzimas oxidativas — são ilustrados com a ajuda de considerações sistemáticas acêrca dos gêneros *Derris-Lonchocarpus* (Leguminosae), envolvendo além de química, morfologia, ecologia e/ou geografia. Do ponto de vista químico⁴, foi sugerido que o perfil de flavonóides pode ajudar na problemática diferenciação das espécies dos gêneros *Derris-Lonchocarpus*, correlacionando, os flavonóides, biogeneticamente e deduzindo os seus graus de oxidação (uma expressão indireta do potencial redox de cada espécie — ou taxons — para com os seus constituintes moleculares) e metilação (uma reação posterior, a qual determina uma seqüência reacional e, assim, influencia a natureza dos metabólitos acumulados)⁶.

De acordo com o acima exposto, podemos quimicamente correlacionar as espécies *L. campestris*⁷ e *D. mollis*^{3,6} (ou *L. mollis*) através dos valores de O/M os quais foram obtidos a partir dos constituintes flavonóides delas então isolados. Assim, fundamentado-se na rota biossintética de flavonóides⁶ (Quadro 1.1, p.5) e nos padrões de substituição das estruturas flavonoídicas constituintes das duas espécies, 1- 8, em *L. campestris* (Quadros 2.1.1, p.38 e 5.1, abaixo)⁷ e 1- 6, em *D. mollis*³) obtivemos os seguintes resultados:

-Para *D. mollis*: oxidação ($17/6 = 2,8$); metilação ($7/6 = 1,1$), ou O/M = 2,8/1,1.

-Para *L. campestris*: oxidação ($1/8 = 0,12$); metilação ($5/8 = 0,62$), ou O/M = 0,1/0,6.

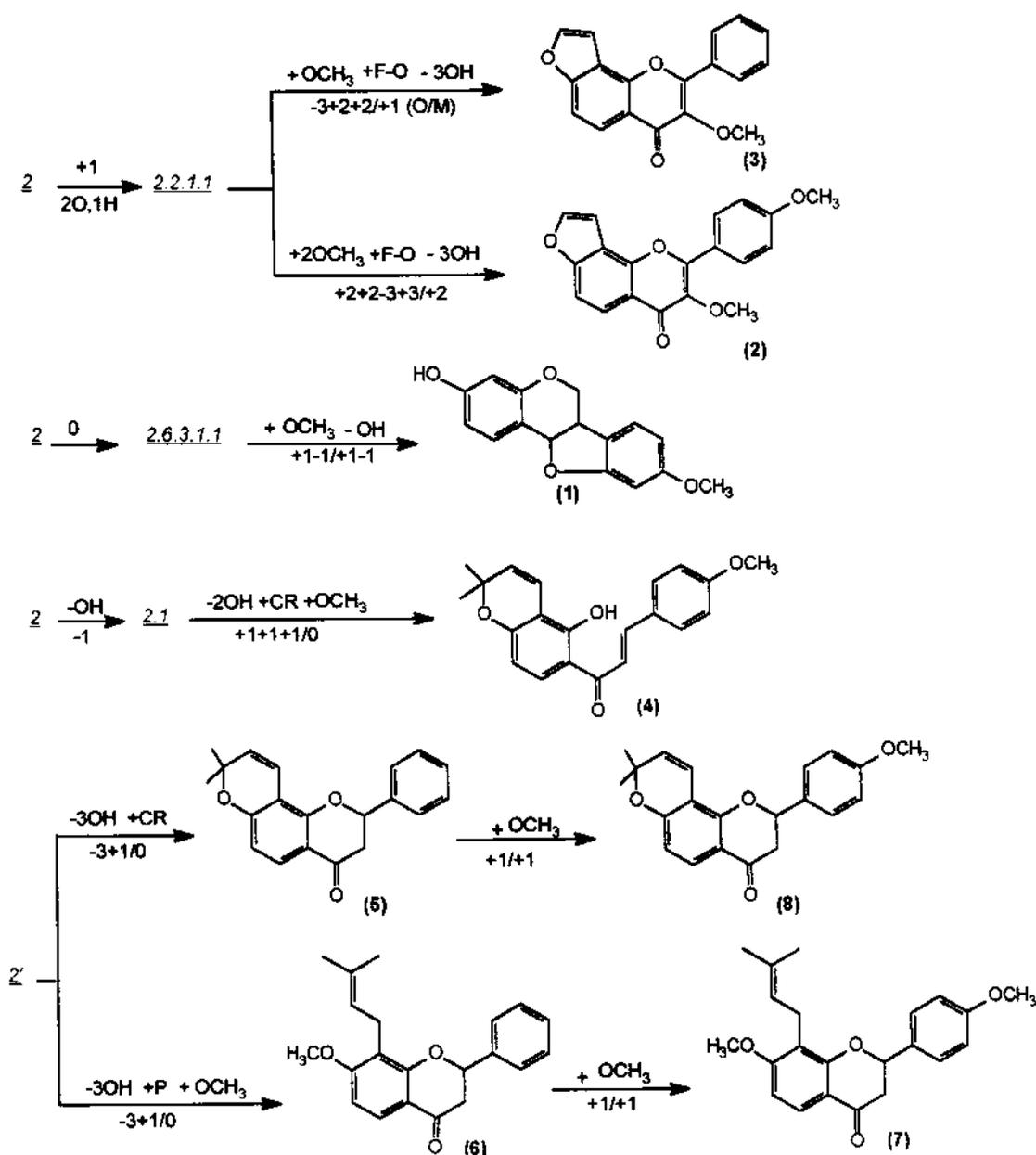
O quadro 5.1, a seguir, apresenta as etapas biossintéticas, as quais introduzem os valores de O/M, desde a fase chalcona-flavanona até a estrutura final, dos flavonóides isolados de *L. campestris*⁷.

Em adição, admitindo-se a correlação gráfica dos valores de oxidação versus metilação, referida na literatura⁶, na qual a razão O/M entre os taxons do gênero *Lonchocarpus*, inclusive *L. mollis*^{3,6}, é comparada, aproveitamos este mesmo gráfico e, nele inserimos os valores de O/M dos flavonóides da espécie *L. campestris*⁷ obtidos conforme o Quadro 5.1.

Lá, naquele gráfico⁶, no qual as espécies *L. campestris* e *L. mollis* se enquadram, concluímos que estas duas espécies são de fato distintas, já que os valores de O/M calculado para a segunda espécie é de 2,8 / 1,1, enquanto que para a primeira, estes valores encontram-se muito próximos à origem dos eixos, ou seja, 0,12 / 0,62.

Por outro lado, a diversidade estrutural dos flavonóides de *L. campestris*⁷, muito pronunciada (pterocarpano, chalcona, flavanonas e flavonóis) se comparada com a sua ausência nas estruturas dos flavonóides de *L. mollis*³, da qual foram somente isolados flavonas e flavonóis furanóidicos, também contribui para com a aqueles discrepantes valores de O/M e, por conseguinte, com a distinção destas duas espécies.

Quadro 5.1- Etapas biossintéticas envolvendo os respectivos valores de oxidação e metilação (O/M), das estruturas flavonoidicas (1 - 8) isoladas de *L. campestris*⁷.



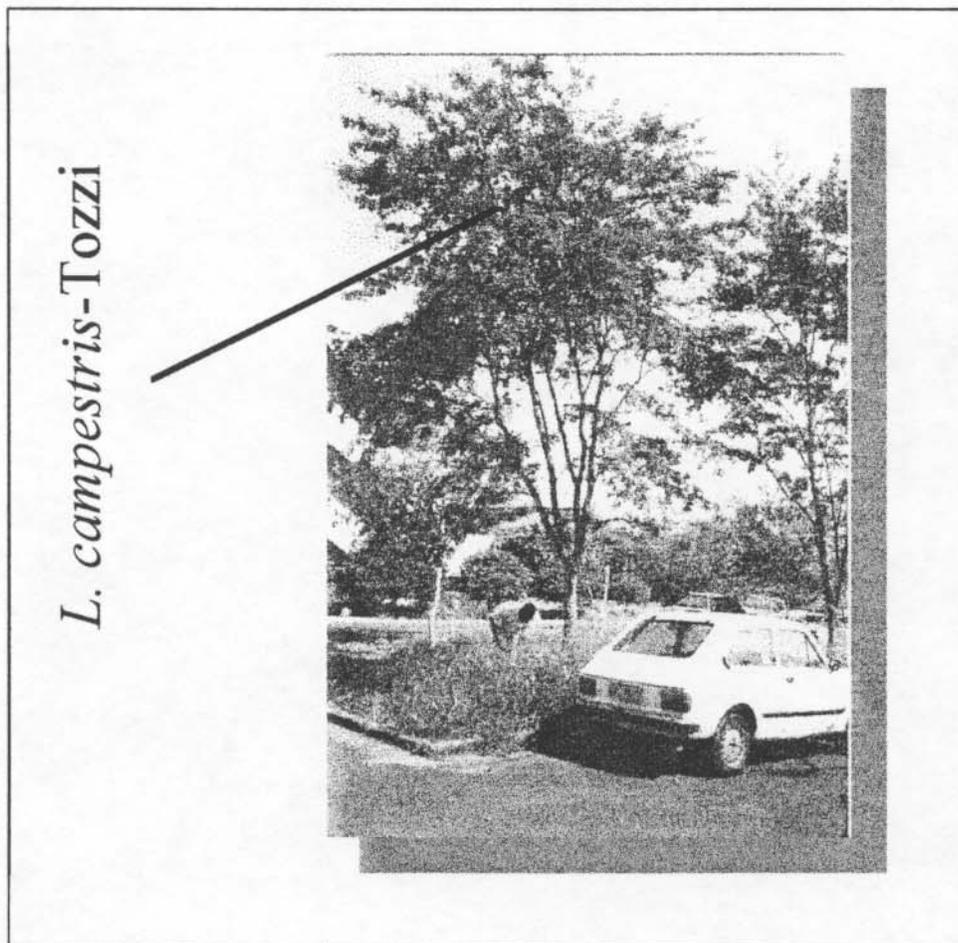
legenda: nos grifados em *itálico* representam as estruturas do Quadro I.1, p.5.

F-O = furano-oxigênio; CR-O = cromeno-oxigênio; P = prenila.

O Quadro 5.2 a seguir, sumariza os dados obtidos das análises taxonômicas destas duas espécies.

Quadro 5.2- Espécies *Lonchocarpus campestris*⁷ e *L. mollis*^{3,6} arranjadas de acordo com o valores de O/M de seus flavonóides, com indicação da posição infragenérica, morfologia e ecogeografia.

Sub- gênero	Espécie	O/M	Flores	aspecto	Habitat	Região
<i>Lonchocarpus</i>	<i>L. campestris</i>	+0,3/+0,6	pareadas	árvore	floresta	Am. do Sul
<i>Lonchocarpus</i>	<i>L. mollis</i>	+2,5/+1,1	pareadas	árvore	savana	Am. do Sul



CONCLUSÃO FINAL

O estudo fitoquímico dos extratos das raízes da espécie *L. campestris*⁷, família Leguminosae, possibilitou o isolamento e a identificação de oito flavonóides dentre os quais, duas novas flavanonas como já se referiu.

A análise qualitativa dos extratos via CLAE, demonstrou que a maioria dos picos nos referidos cromatogramas, puderam ser identificados e, portanto, obtivemos a maioria dos principais constituintes flavonoídicos das raízes de *L. campestris*.

A variedade e a diversidade estrutural dos flavonóides de *L. campestris* é representada pelas classes dos pterocarpanos, chalconas, flavonóis e das flavanonas, carregando os mais comuns grupos substituintes de produtos naturais, tais com OH, OCH₃, 3,3-DMA e 2,2-dimetilcromeno. Estas características são, por sua vez, principalmente encontradas nas espécies da família Leguminosae e, flavonóides prenilados são mais freqüentemente encontrados nas raízes e cascas destas plantas¹.

A mais abundante classe de flavonóide isolado de *L. campestris*, representa a mais abundante classe de flavonóides prenilados nas Leguminosae de acordo com os recentes registros. Outra importante característica dos flavonóides desta espécie, no âmbito da família Leguminosae, é a perda do grupo 5-OH, em uma das etapas da rota biossintética de todos os compostos isolados¹.

A consideração dos valores de O/M⁶, obtidos a partir da biossíntese dos flavonóides das espécies *L. campestris*⁷ e *L. mollis*³, apresentando uma grande discrepância, indicou-nos a distinção entre as espécies e, assim, confirmando a hipótese de Tozzi².

Finalmente, embora é geralmente aceito que a fitoquímica pode trazer uma contribuição à taxonomia de plantas, o inverso é também verdadeiro; sistemática de planta proporciona fitoquímica com conjuntos sobre onde encontrar interessantes novos compostos e sobre a identidade das substâncias encontradas. Estes conjuntos baseiam-se no fato que metabólitos de plantas geralmente tende a ocorrer dentro de uma taxa natural a níveis infragenérico, genérico e algumas vezes até mesmo a mais alto níveis em uma série de estruturas aproximadamente relacionadas¹.

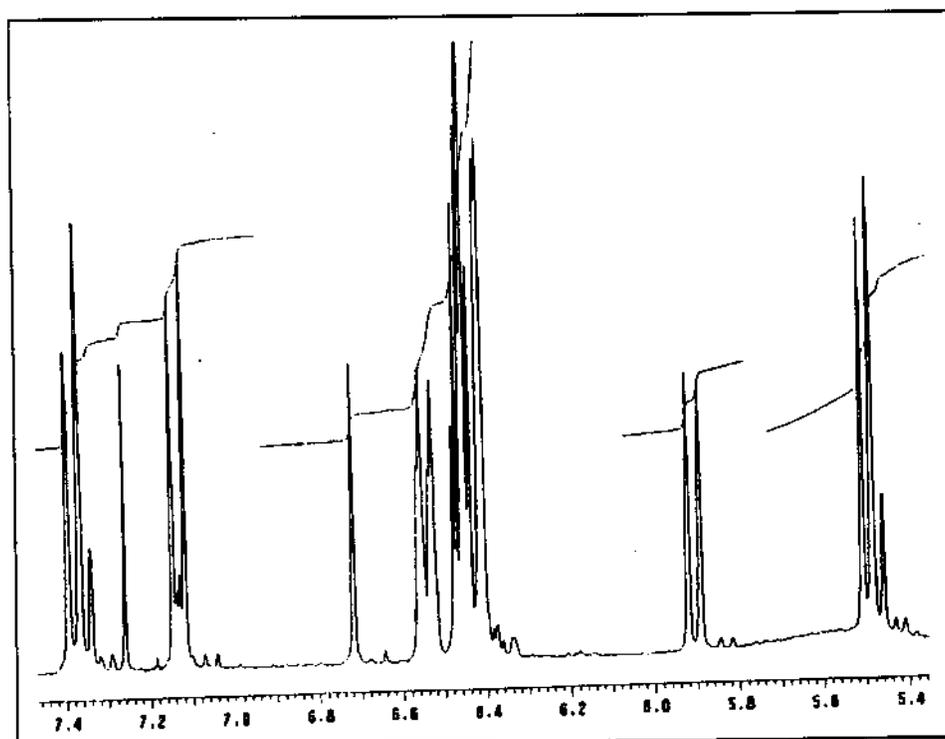
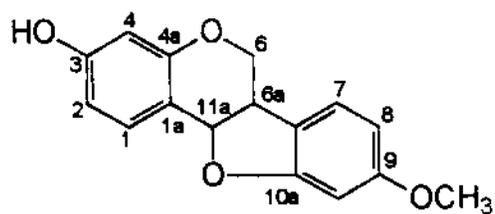
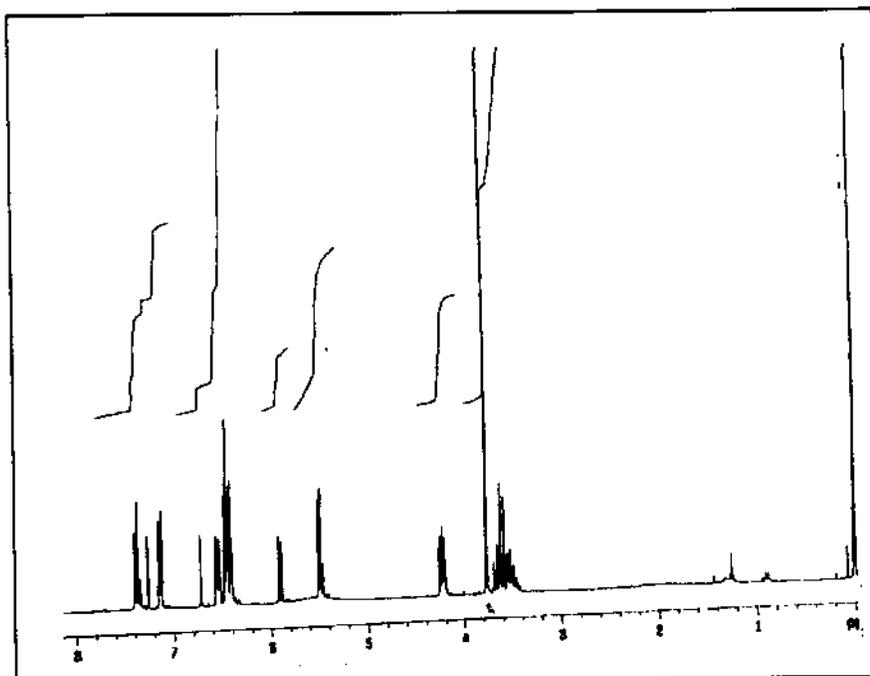
O ponto de vista atual é que flavonóides e isoflavonóides exibem uma importante função ecológica; destes compostos pode se obter proteção contra doenças e animais herbívoros. Assim, dados quimiossistemáticos sobre os flavonóides das Leguminosae podem também contribuir com outras áreas de pesquisas tais como a bioquímica ecológica e de proteção de safras¹.

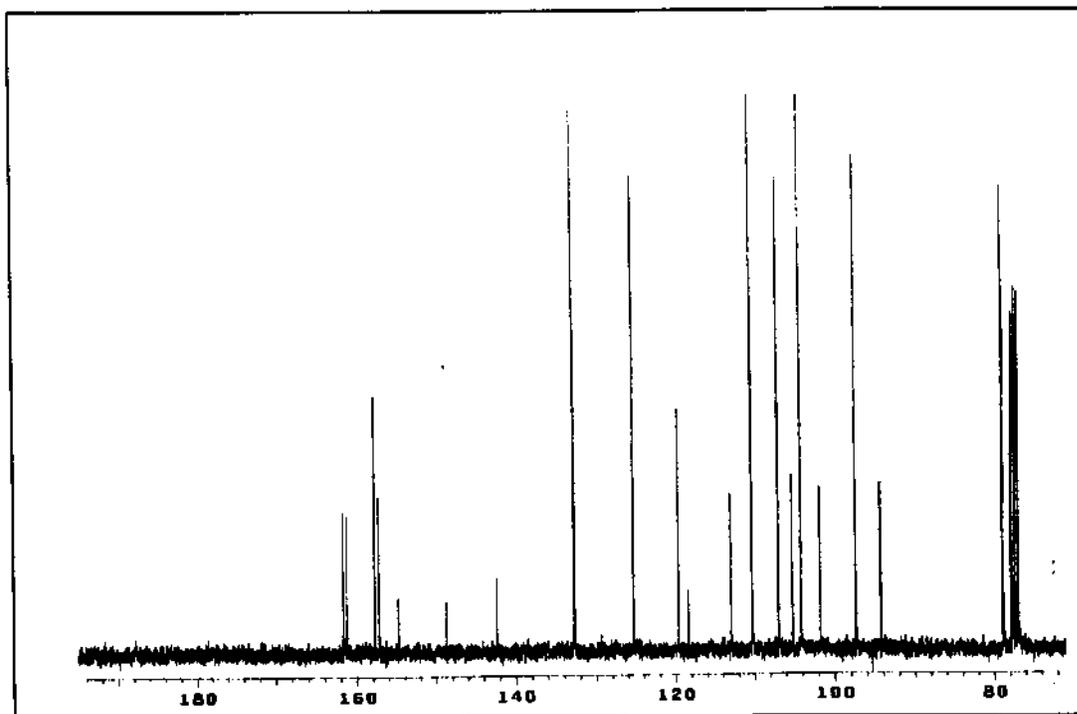
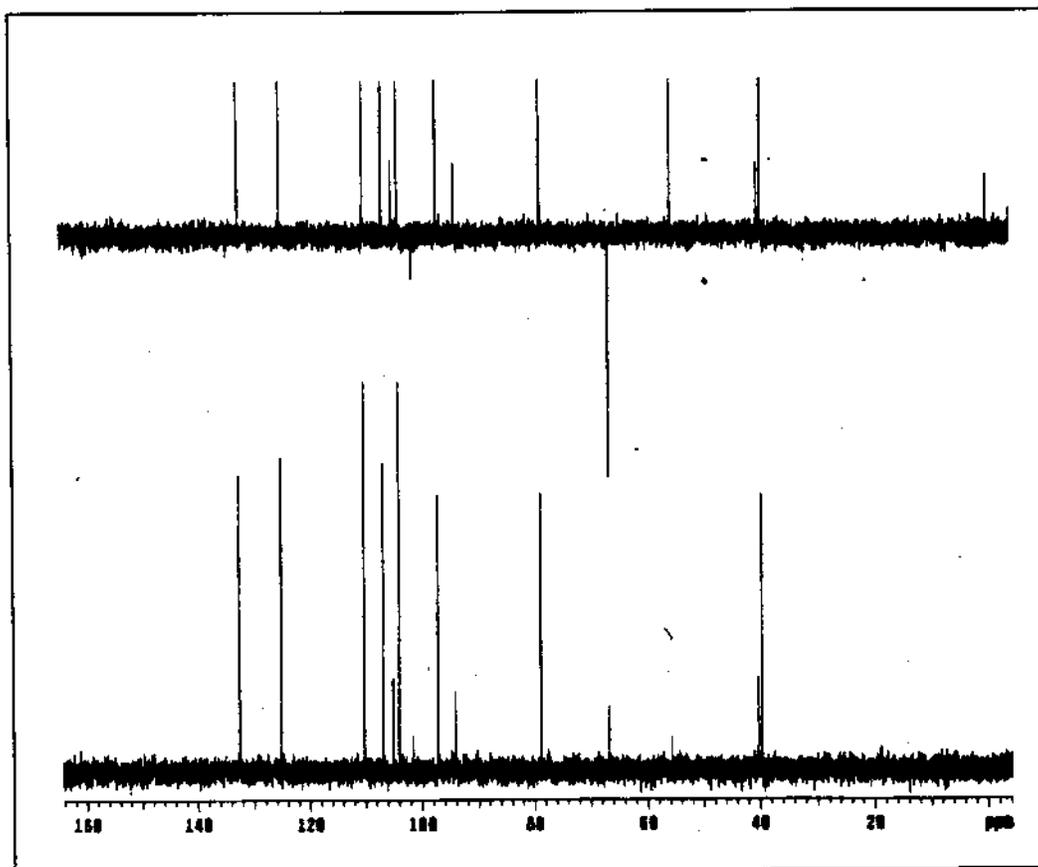
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- HEGNAUER, R., GRAYER-BARKMEUER, R.J., "Relevance Of Polysaccharides And Flavonoids For The Classification Of The Leguminosae: A Chemotaxonomic Approach", Phytochemistry, 34, 1, 3, 1993.
- 2- TOZZI, A.M.G.A., "Estudos Taxonômicos Dos Gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil", Tese de Doutorado, Instituto de Biologia-Unicamp, S.P., 1989.
- 3- LYRA, D.A., De MELLO, J.F., MONACHE, G.D., MONACHE, F.D., MARINI-BETTOLO G.D., "Flavonoids From *Derris mollis*", Gazz. Chim. Ital., 109, 93, 1979.
- 4- HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H., "The Biochemical Systematic Of Flavonoids", In: HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H., The Flavonoids, N.Y., Academic Press, 1975, cap. 19, p.1057.
- 4a- MARKHAM, K.R. MABRY, T.J., "Ultraviolet- Visível And Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Of Flavonoids", In: HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H., The Flavonoids, N.Y., Academic Press, 1975, cap. 2, p. 62 e 1057.
- 4b- MARKHAM, K.R. MABRY, T.J., "Mass Spectroscopy Of Flavonoids", In: HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H., The Flavonoids, N.Y., Academic Press, 1975, cap. 3, p.78.
- 5- BOHLMANN, F.B., ZDERO, T., "Naturally Ocurring Acetylenes", N.Y., Academic Press, 1973, cap.6, p.340.
- 6- GOMES, C.M.R., GOTTLIEB, O.R., BETTOLO, G.B.M., MONACHE, F.D., POLHILL, R.M., "Systematic Significance Of Flavonoids In *Derris* And *Lonchocarpus*", Biochem. Syst. And Ecol., 9 (2/3): 129, 1981.
- 7- Magalhães, A.F., Firmino, C.A., MAGALHÃES, E.G., TOZZI, A.M.G.A., Trabalho Apresentado na "XX Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática E Ecologia Micromoleculares", R.J., 1998, (livro de resumo no prelo).
- 8- TAHARA, S., IBRAHIM, R.K., "Prenylated Isoflavonoids — An Update", Phytochemistry, 38, 5, 1073, 1995.
- 9- BARRON, D., IBRAHIM, R.K., "Isoprenylated Flavonoids — A Survey", Phytochemistry, 43, 5, 921, 1996.
- 10- GRAYER, R.J., HARBORNE, J.B., "A Survey Of Antifungal Compounds from Higher plants — 1982-1983", Phytochemistry, 37, 1, 1994.
- 11- BROUILLARD, R., "Flavonoids And Flowers Colour", In: HARBORNE, J.B., The Flavonoids, Advances In Research, London., Chapman And Hall, 1988, cap. 16, 524.
- 12- HARBORNE, J.B., "Introduction To Ecological Biochemistry", Academic Press, N.Y., 1988.
- 13- KOES, R.E., QUATTROCCHIO, F., MOL, J.N.M., BioEssays, 16, 123, 1994.
- 14- HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H., " " , In: HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H., The Flavonoids, Academic Press, N.Y., 1 e 2, 1975.
- 15- SIMMONDS, M.S.J., BLANEY, W.M., MONACHE, F.D., BETTOLO, G.B.M., J. Chem. Ecol., 16, 365, 1990.

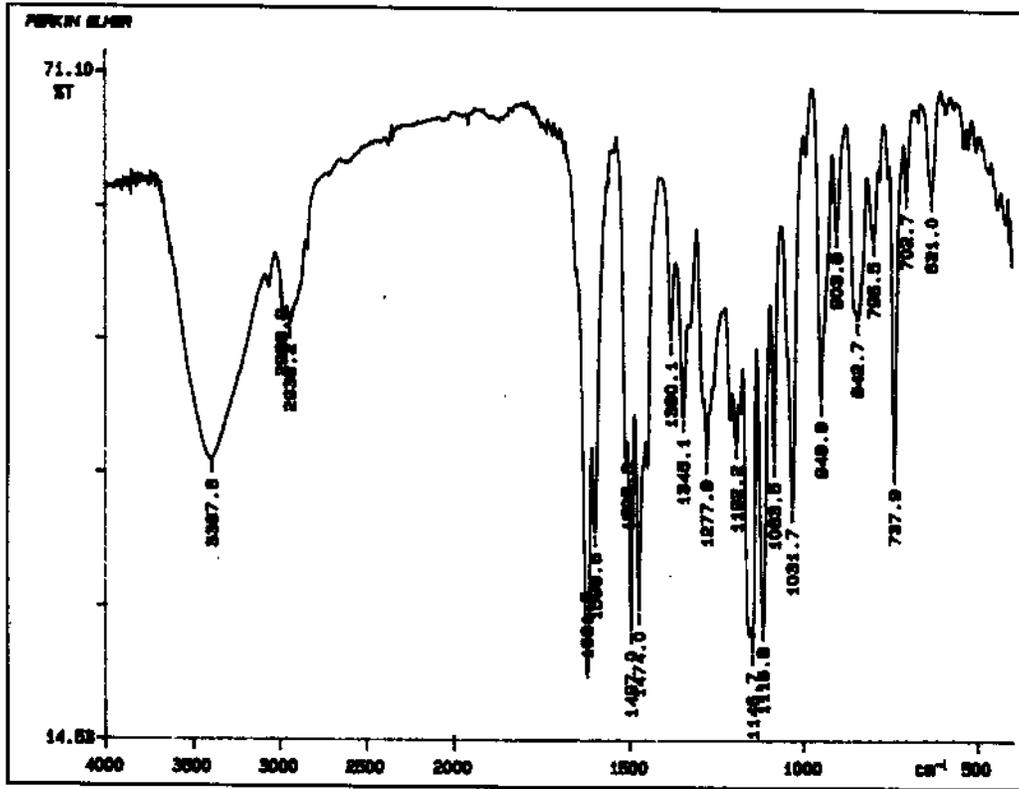
- 16- YAMAHARA, J., MOCHIZUKI, M., CHISAKA, T., FUJIMORA, H., TAMAI, TAMAI, Y.,
 "The Antiulcer Action Of Vexibinol", Chem. Pharm. Bull., **38**, 1039, 1990.
- 17- OSHIMA, Y., KONNO, C., HIKINO, H., YKUTA, H., " Structure Of Moracenin C, A
 Hypotensive Principle Of Morus Roots And Barks", Heterocycle, **20**, 585,
 1980.
- 18- ARISAWA, M., SHIMIZU, M., SATOMI, Y., NISHINO, A., NISHINO, H., IWASHIMA,
 A., Phytoterapy Res., **9**, 222, 1995.
- 19- HU, C.Q. CHEN, K., SHI, Q., KILKUSKIE, R.E., CHENG, Y.C., LEE, K.H.,
J. Nat. Prod., **57**, 42, 1994.
- 20- FRANKL, E., KANNER, J., GERMAN, J.B., PARKS, E., KINSELLA, J.E., "Lancet",
342, 1007, 1993, In: GORDON, H.M., "Dirtary Antioxidants In Disease
 Prevension", Natural Products Reports, 1996.
- 21- BRÁS FILHO, R., "Estudo Químico Da *Apuleia leiocarpa*", Tese de Doutorado,
 Departamento de Química, U.F.R.R.J., R.J., 1971.
- 22- BAX, A., G.A., MORRIS, J. Magn. Reson., **42**, 501, 1981.
- 23- KESSLER, H., BERMEL, W., GRIESINGER, C., "Recognition Of NMR Proton Spin
 System Of Cyclosporin A Via Heteronuclear Proton-Carbon Long-Range
 Coupling", J. Am. Chem. Soc., **107**, 1083, 1984.
- 24- DAVIS, A.L., CAI, Y., DAVIES, A.P., "¹H And ¹³C NMR Assignment Of Theaflavin,
 Theaflavin Monogallate And Theaflavin Digallate", Mag. Res. Chem., **33**,
 549, 1995.
- 25- COOK, J.T., OLLIS, W.D., SUTHERLAND, I.O., GOTTLIEB, O.R., " Pterocarpan
 From *Dalbergia Spruceana*", Phytochemistry, **17**, 1419, 1978.
- 26- SINGHAL, A.K., BARUA, C.N., SHARMA, R.P., BARUAH, N.J., "A Chalcone And
 As Isoflavone From *Millettia Pachycarpa* Seeds", Phytochemistry, **22**, 4,
 1005, 1983.
- 27- SATAM, P.G.N., BRING, N.V., "Ocorrence Of (-)-Isolonchocarpin &
 Demethoxykanigin In Karanja (*Pongamia glabra*) Seeds Oil", Indian J.
 Chem., **11**, 209, 1973.
- 28- GARCEZ, F.R., SCRAMIN, S., NASCIMENTO, M.C., MORS, W.B., "Prenylated
 Flavonoids As Evolutionary Indicators in The Genus *Dahlstedtia*",
Phytochemistry, **27**, 4, 1079, 1988.
- 29- SCHMID, R.D., RÜDIGER, M., McREYNOLDS, J.H., VANDER VELDE, G.,
 NAKATANI, N., RODRIGUEZ, E., MABRY, T.J., "GC-MS Of
 Perdeuteriomethylated Flavonoids Aglycones", Phytochemistry, **12**, 2765,
 1973.
- 30- PELTER, A. STAITON, P., BARBER, M., "The Mass Spectra Of Oxygen
 Heterocycles. II. The Mass Spectra Of Some Flavonoids", J. Heterocycl.
 Chem., **2**, 262, 1965.
- 31- McMURRY, T.B.H., MARTIN, E., "3-Hydroxy-9-Methoxy And 3-Methoxy-9-
 Hydroxypterocarpan", Phytochemistry, **11**, 3283, 1972.
- 32- CHALMERS, A.A., "¹³C NMR OF Pterocarpan", Tetrahedron, **33**, 1735, 1977.
- 33- PELTER, A., WARDS, S., GRAY, I., "The Carbon-13 Nuclear Magnetic Spectra
 Of Flavonoids And Related Compounds", J.C.S., Perkins Trans. **1**, 2475,
 1976.

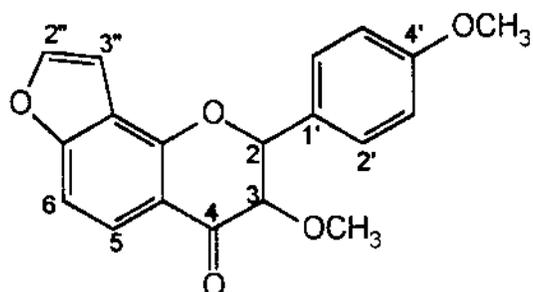
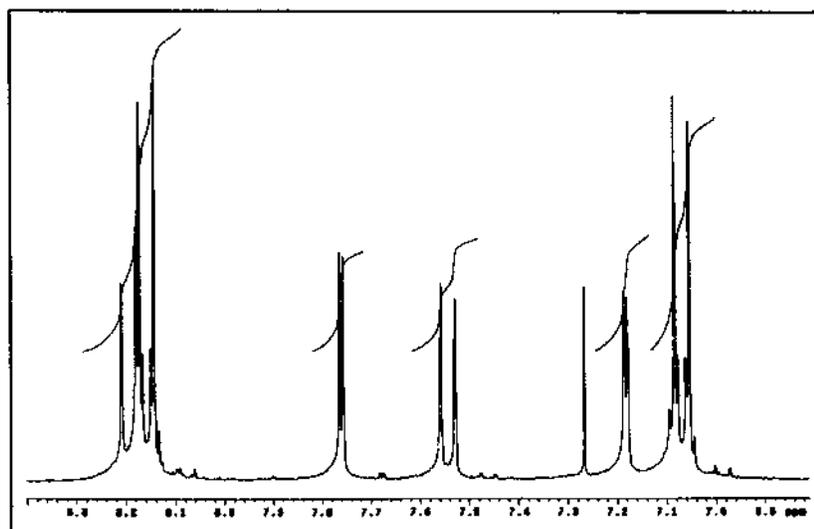
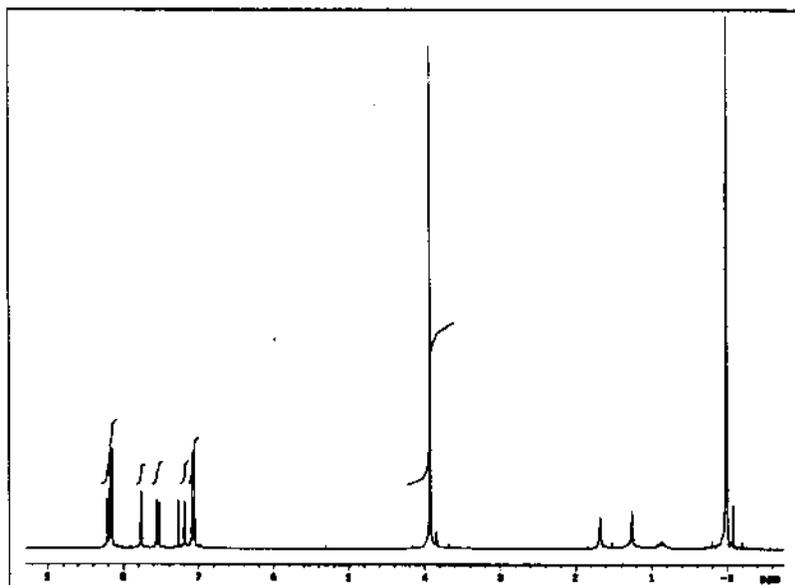
- 34- PACHLER, K.G.R., UNDERWOOD, W.G.E., "A Proton Magnetic Resonance Study Of Some Pterocarpan Derivatives (The Conformation Of The 6a,11a-Diido-6H-Benzofuro[3,2-c][1]- Benzopyran Ring System" Tetrahedron, 23, 1817, 1967.
- 35- BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D.H., "Mass Spectrometry Of Organic Compounds", San Francisco, Holden-Day, 258, 1967.
- 35a- BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D.H., "Mass Spectrometry Of Organic Compounds", San Francisco, Holden-Day, 260, 1967.
- 36- NASCIMENTO, M.C., MORS, W.B., "Chalcone Of Root Bark Of *Derris sericea*", Phytochemistry, 11, 3023, 1972.
- 37- STILL, W.C., KHAN, M., MITRA, A., "Rapid Chromatografic Technique For Preparatives Separations With Moderate Resolution", J. Org. Chem., 43, 2923, 1978.
- 38- KOUPAI-ABYAZANI, M.R., McCALLUM, J., BOHM, B.A., "Identification Of The Constituent Flavonoid Units In Sainfoin Proanthocyanidins By Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", J. Chromatogr., 594, 117, 1992.
- 39- SAXENA, G., FAMER, S., TOWERS, G.H.N., HANCOCK, R.E.W., "Use Of Specific Dyes In The Detection Of Antimicrobial Compounds From Crude Plants Extracts Using A Thin Layer Chromatography Agar Ovelay Technique", Phytochem. Analys., 6, 125, 1995.
- 40- ALLEY, M.C., SCUDIERO, D.A., MONKS, A., HURSEY, M.L., CZERWINSKI, M.J., FINE, D.L., ABBOTT, B.J., MAYO, J.G., SHOEMAKER, R.TH., BOYD, M.R., "Feasibility Of Drug Screening With Panels Of Human Tumor Cell Lines Using A Microculture Tetrazolium Assay", Cancer Res., 48, 589, 1988.

E1- Espectro de RMN¹H da medicarpina (1).

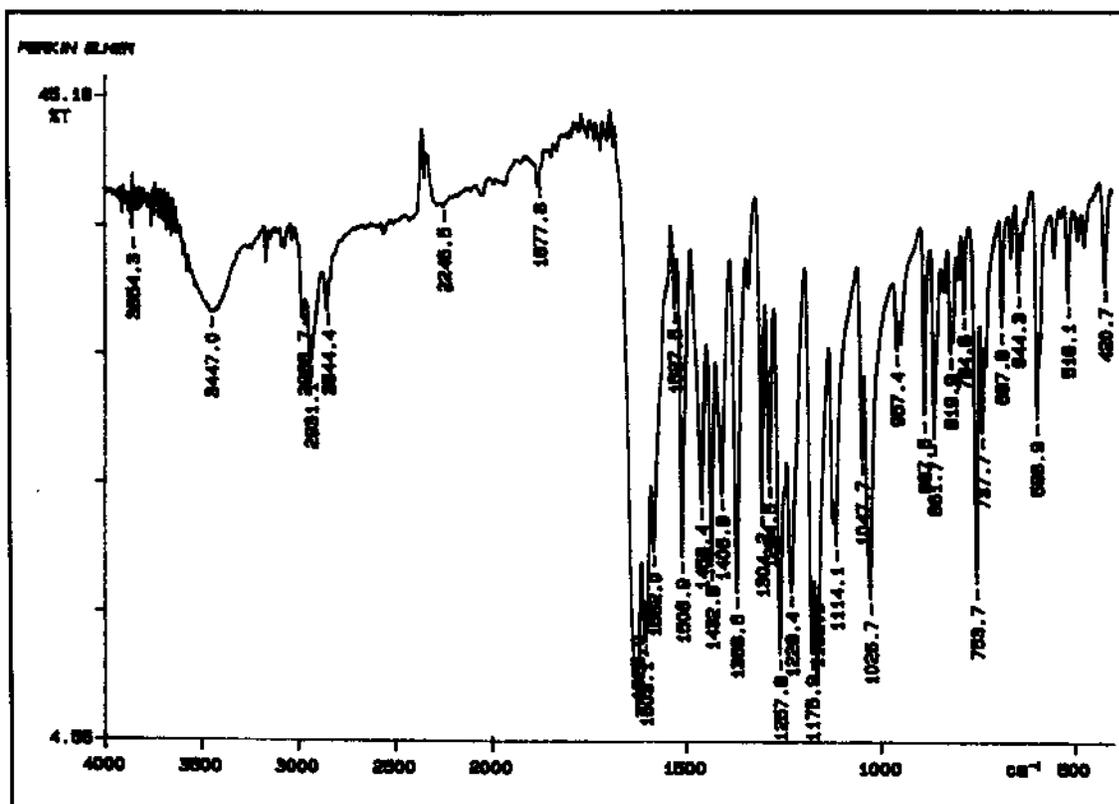
E1a- Espectro de RMN ^{13}C da medicarpina (1).**E1b- Espectro de DEPT 90° e 135° da medicarpina (1).**

E1c- Espectro de IV da medicarpina (1).

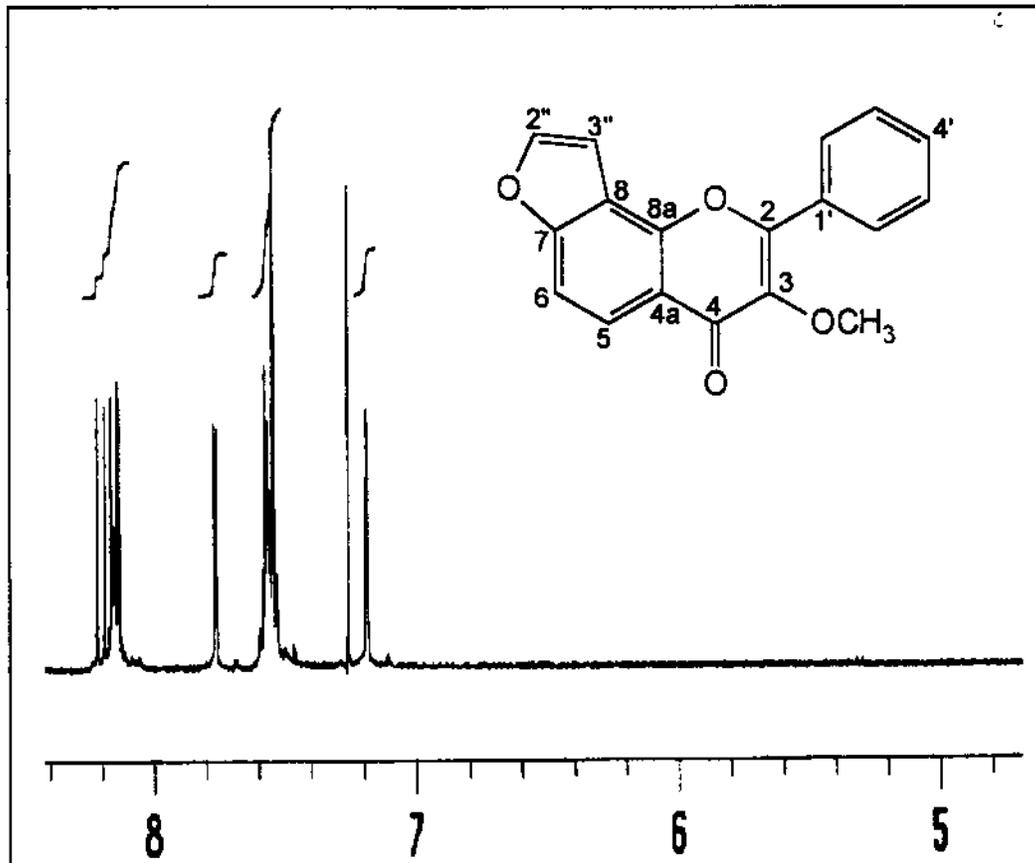
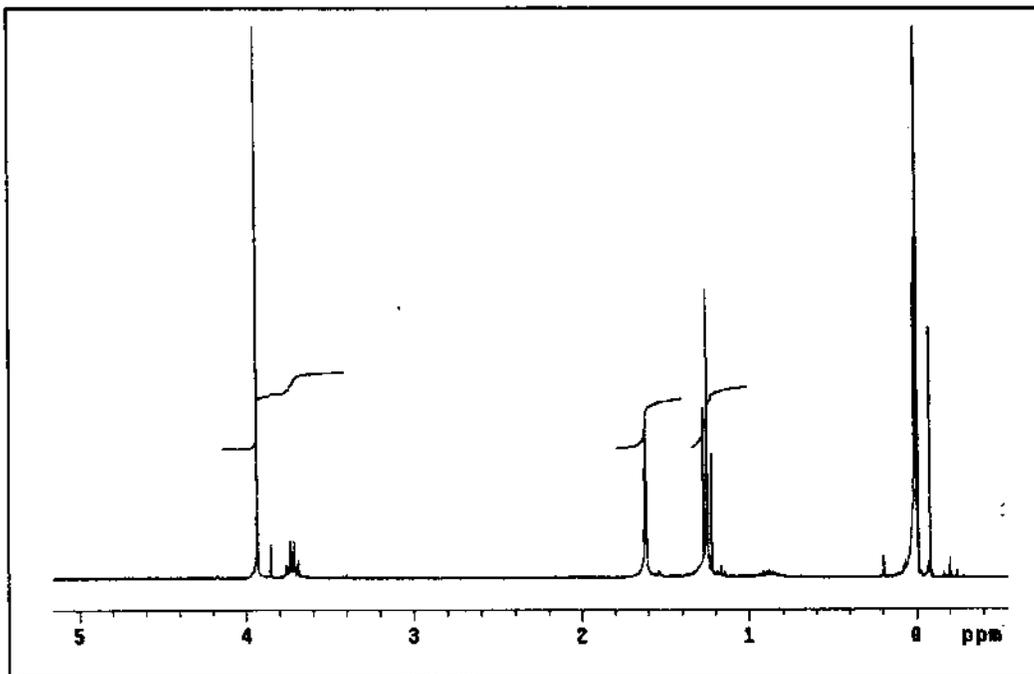


E2- Espectro de RMN ^1H de 4'-metóxicaranjina (2).

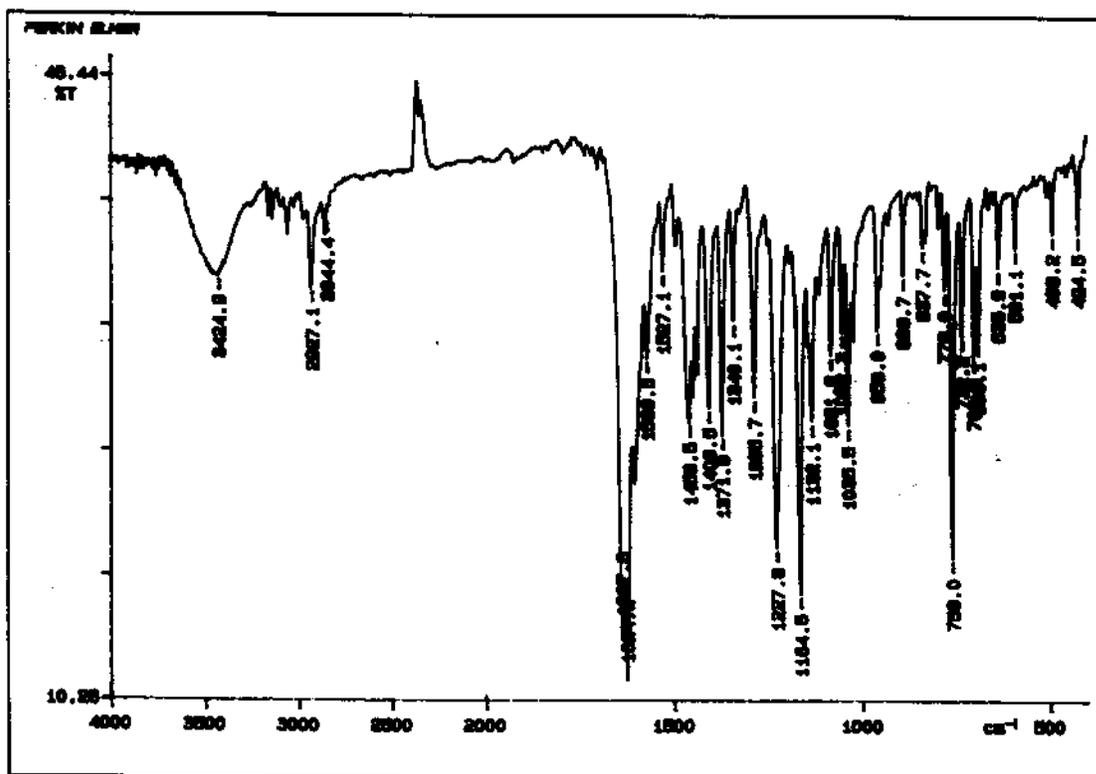
E2a- Espectro de IV de 4'-metóxicaranjina (2).



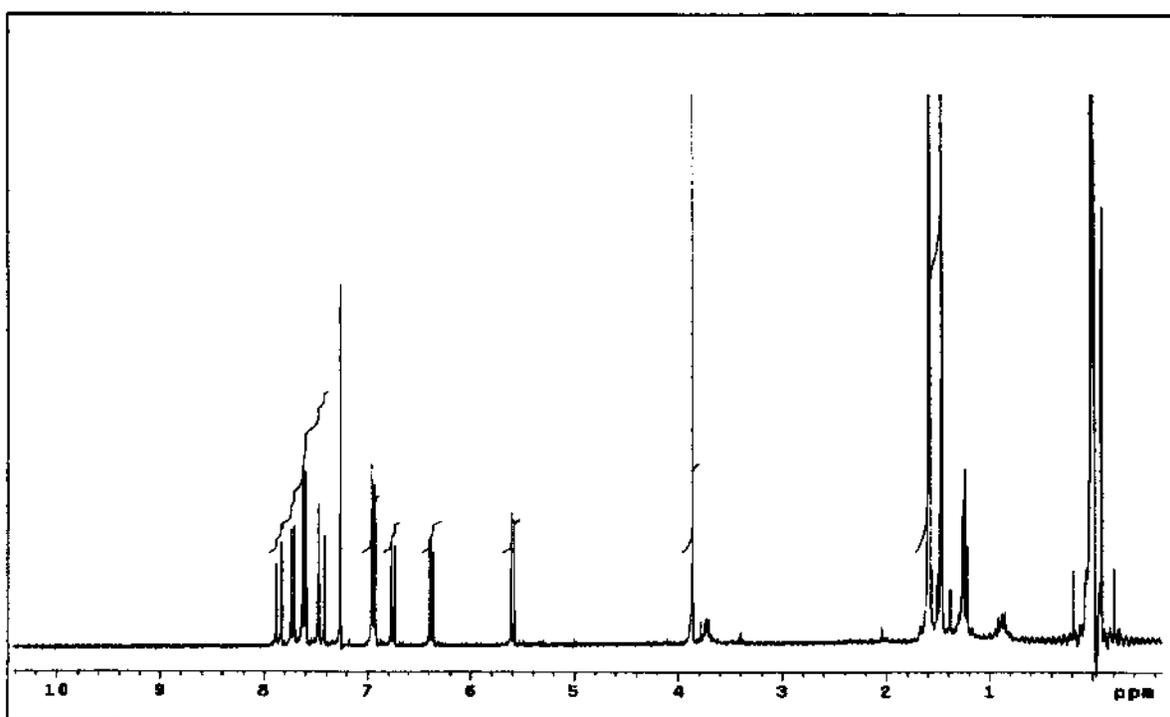
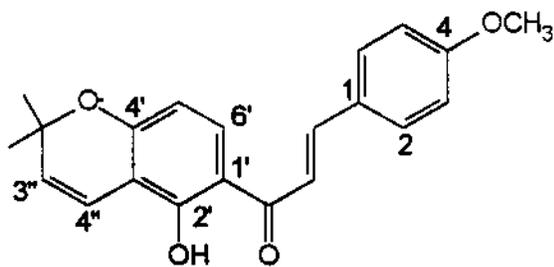
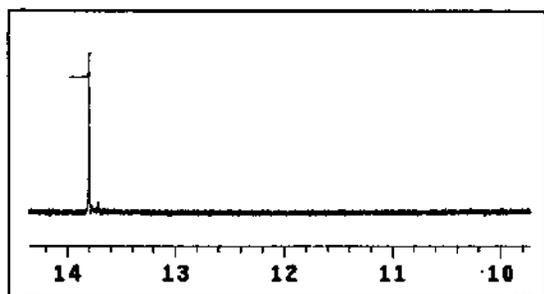
E3- Espectro de RMN¹H da karanjina (3)

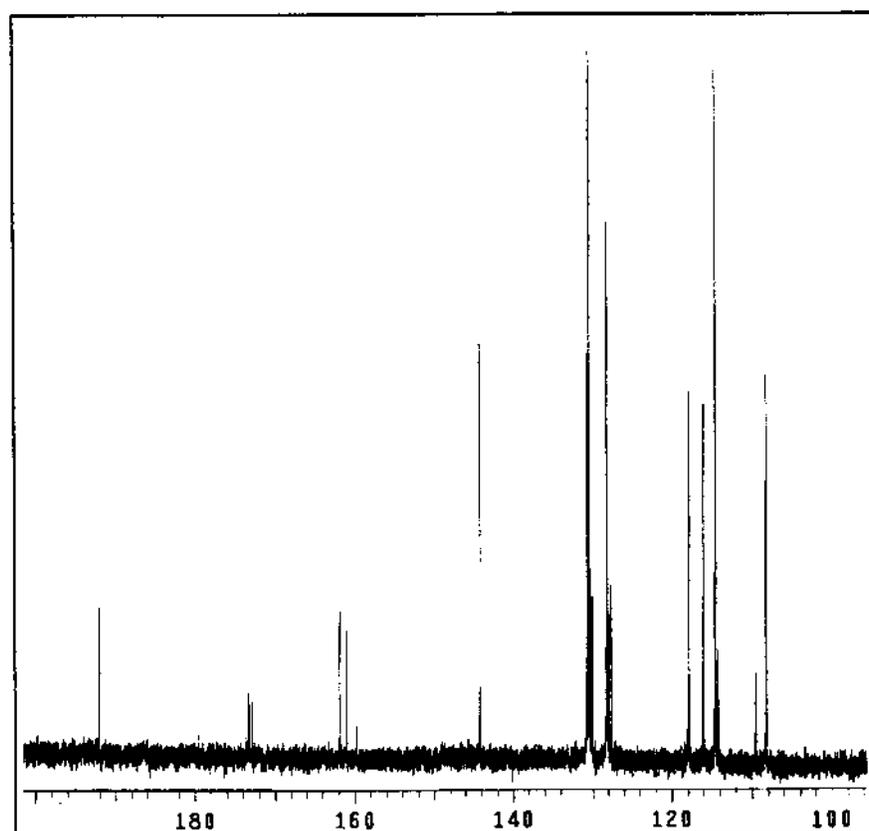
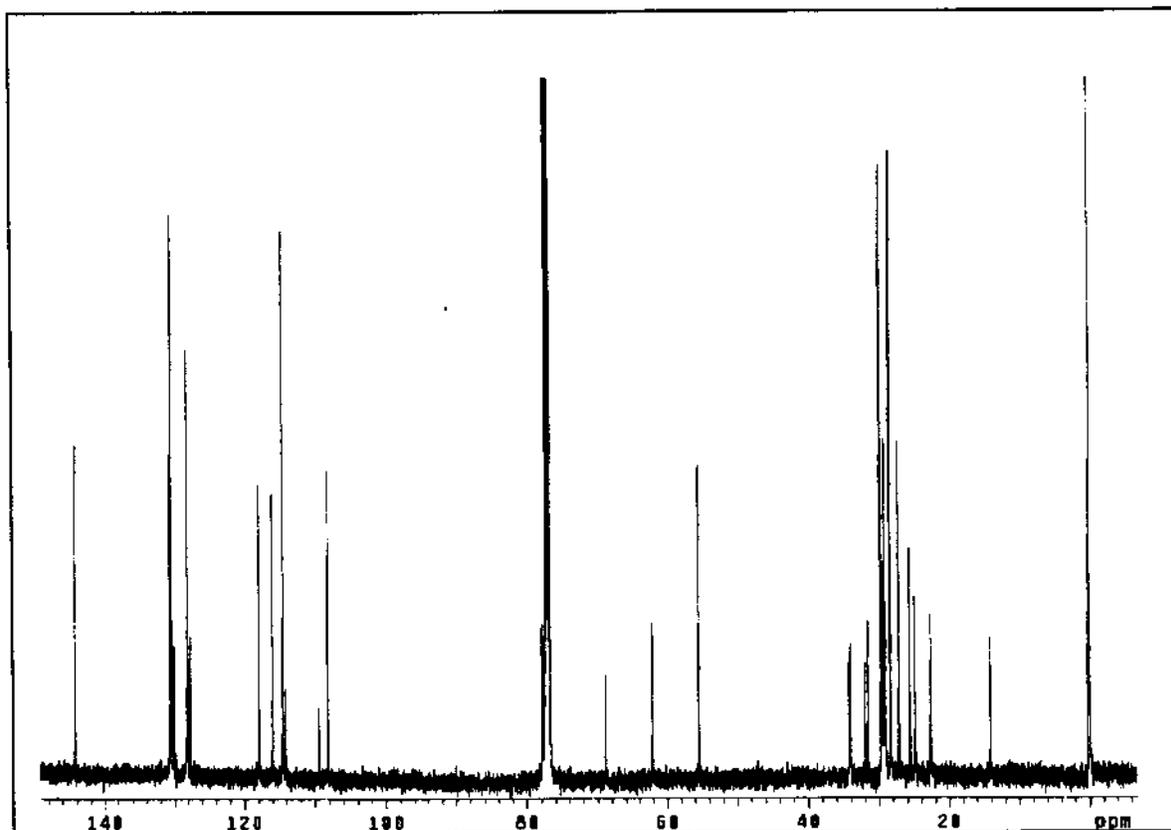


E3b- Espectro de IV da karanjina (3)

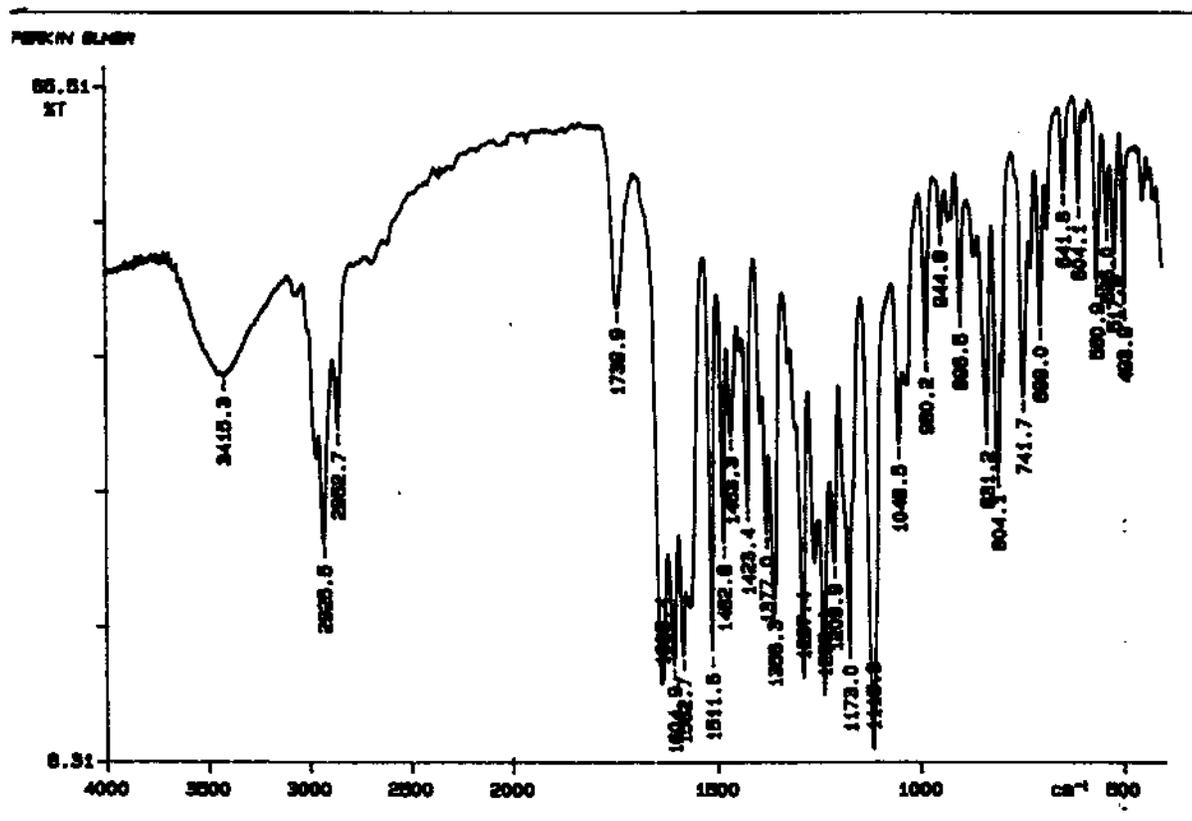


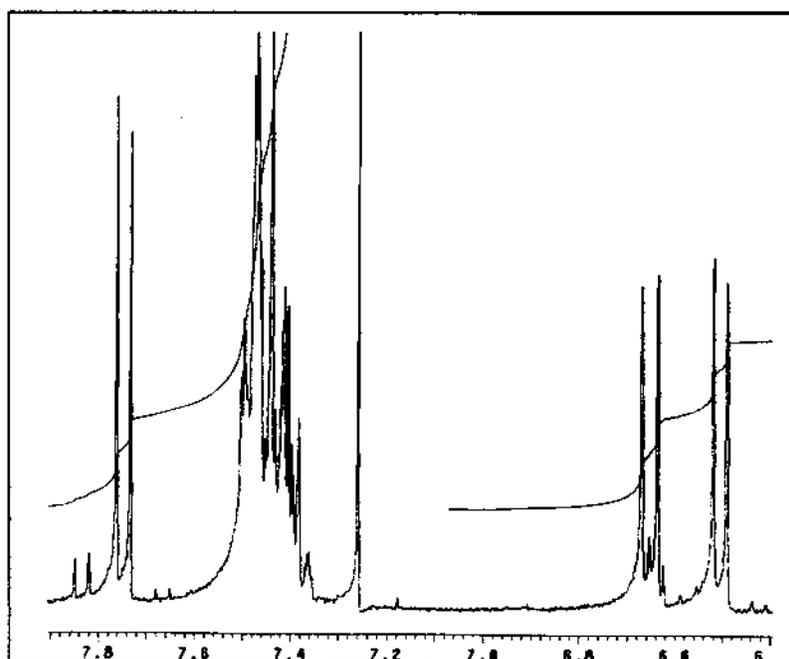
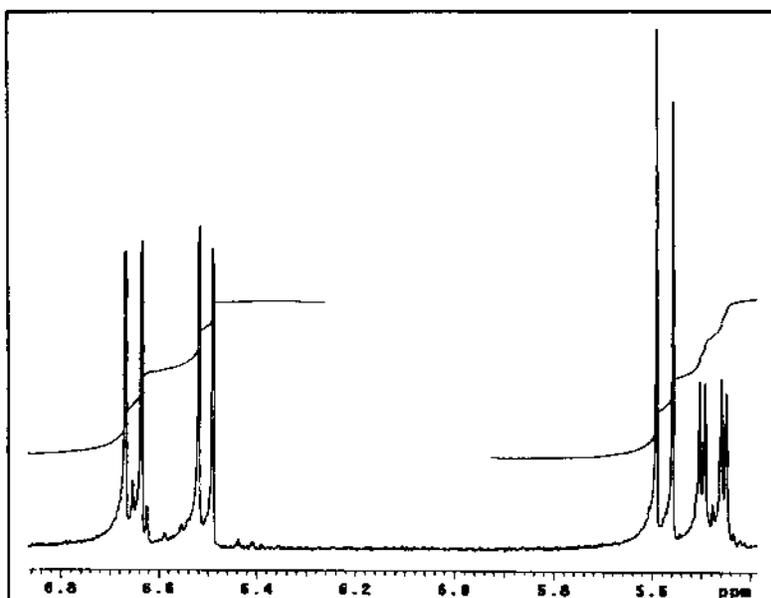
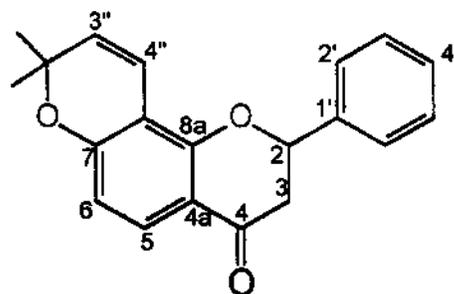
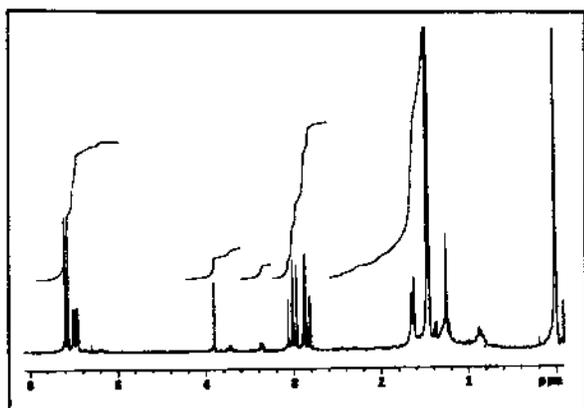
E4- Espectro de RMN ¹H da 4'-metóxilonchocarpina (4).



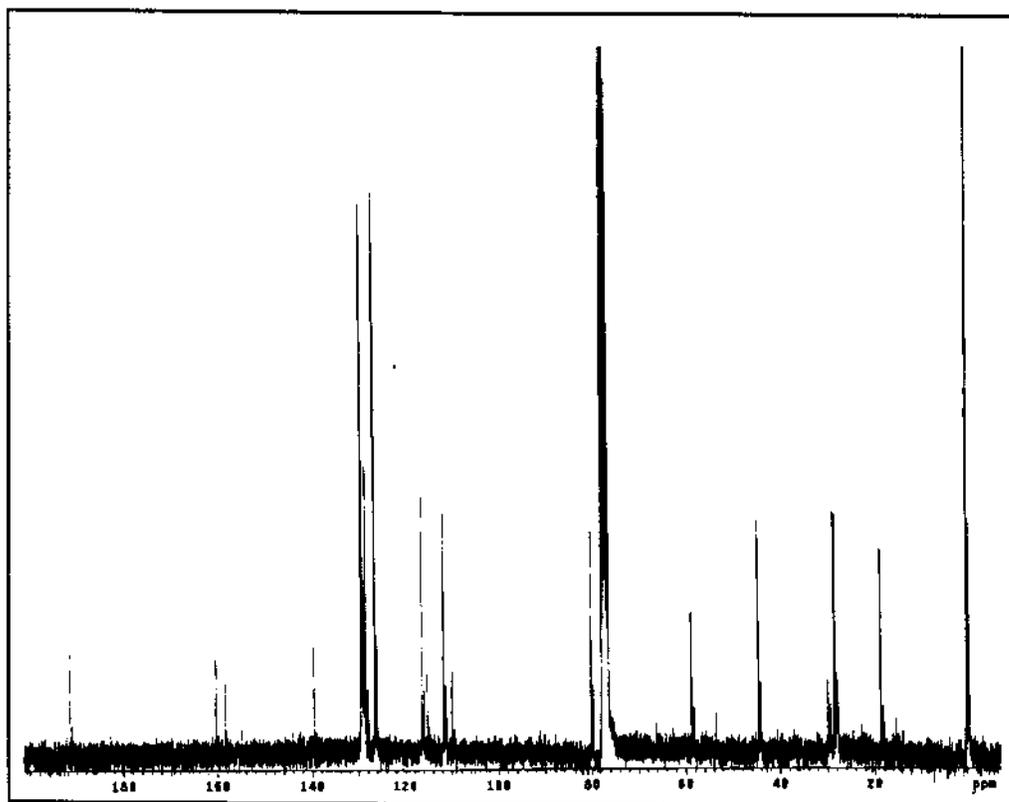
E4b- Espectro de RMN ^{13}C da 4'-metóxilonchocarpina (4).

E4d - Espectro de IV da 4'-metóxilnonchocarpina (4).

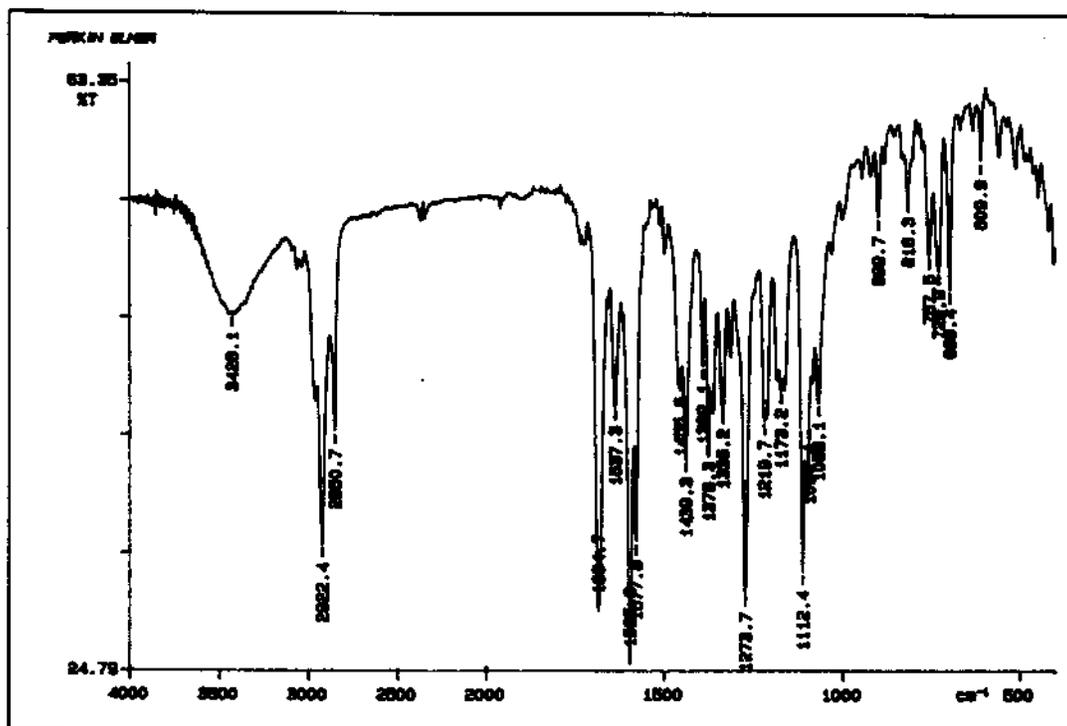


E5- Espectro de RMN ^1H da isolonchocarpina (5).

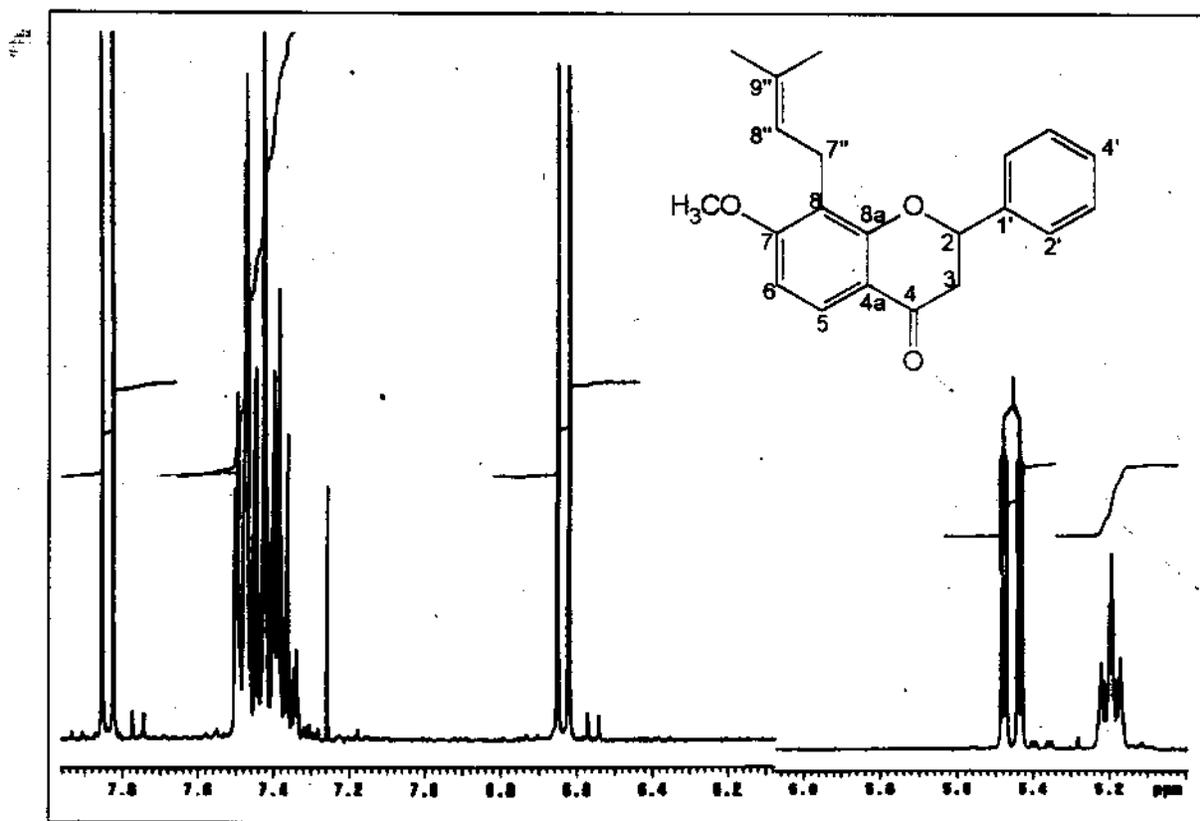
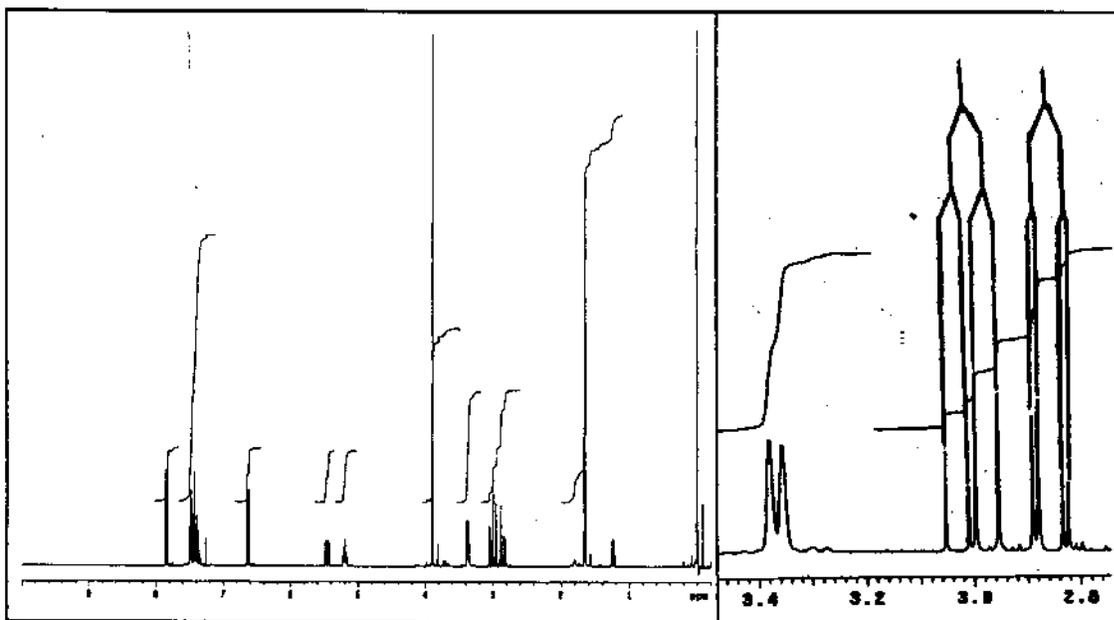
Ec- Espectro de RMN ¹³C (5).



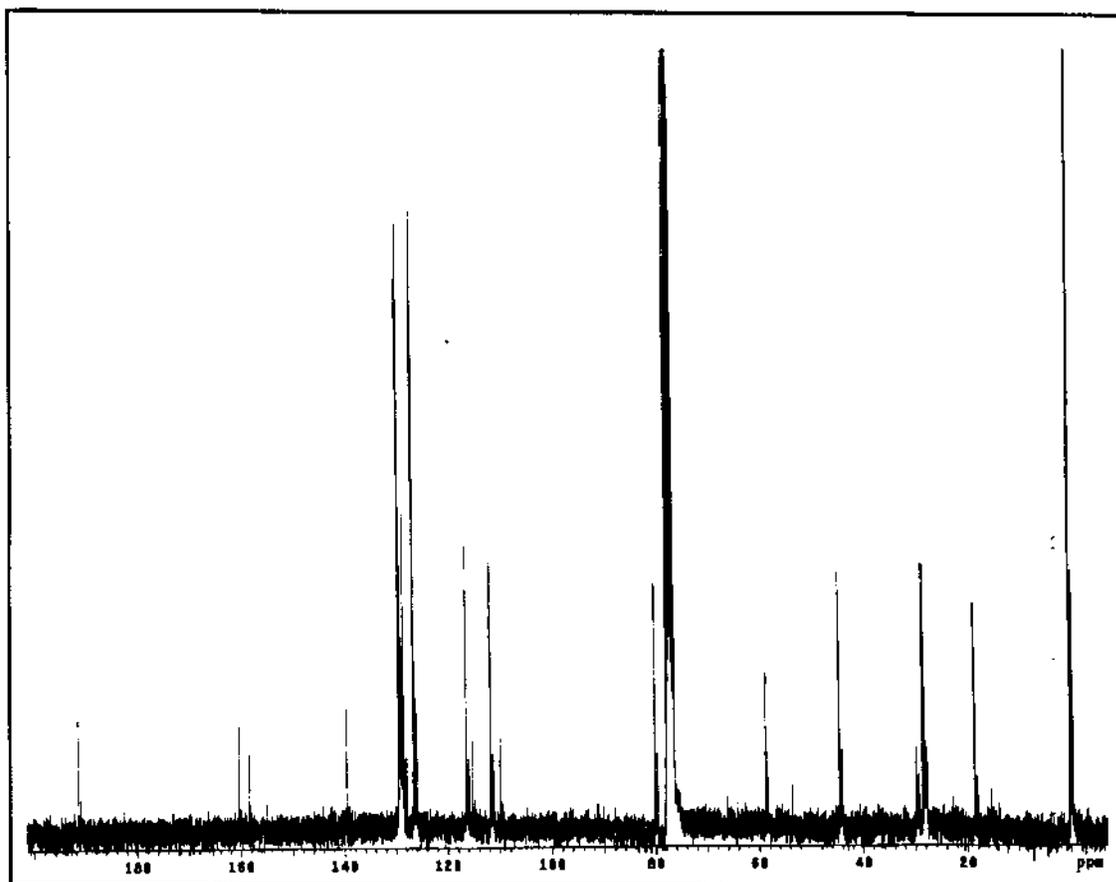
E5d- espectro de IV da isolonchocarpina (5).



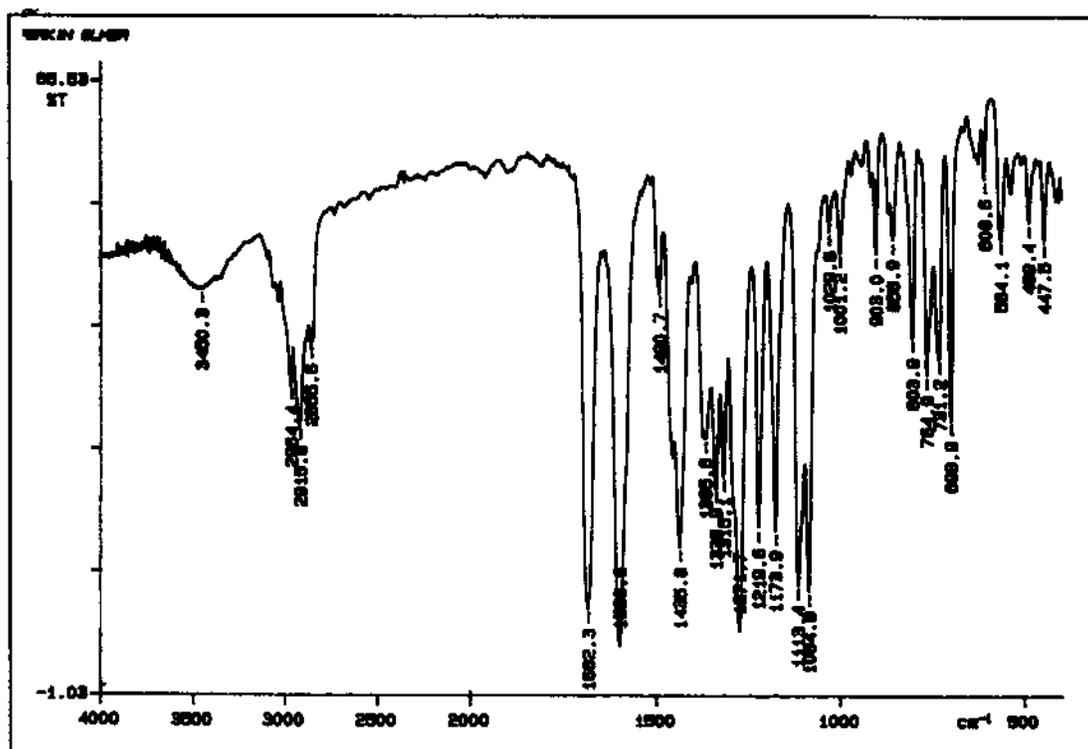
E6- Espectro de RMN ¹H da isoderrina A (6).



E6b- Espectro de RMN ¹³C da isoderricina A (6).

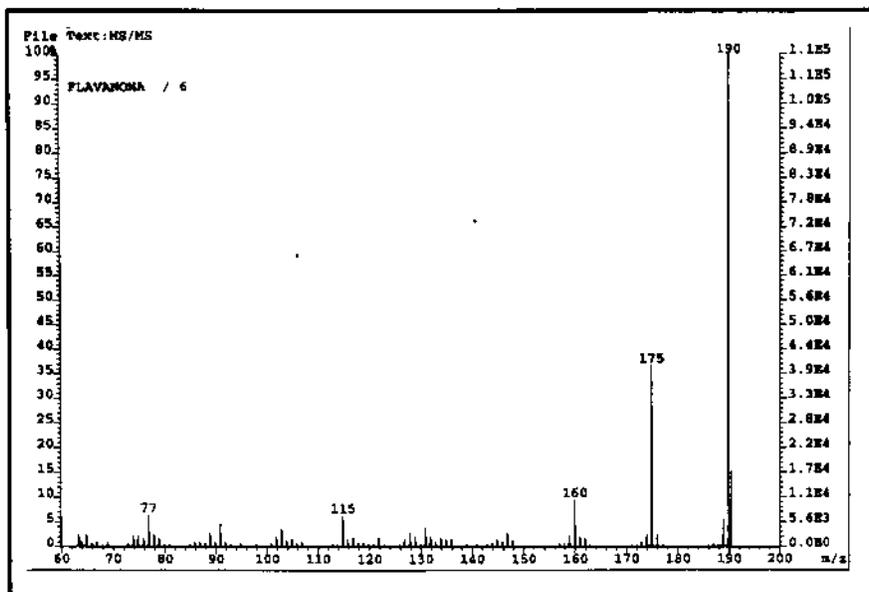


E6c- Espectro de IV da isoderricina A (6).

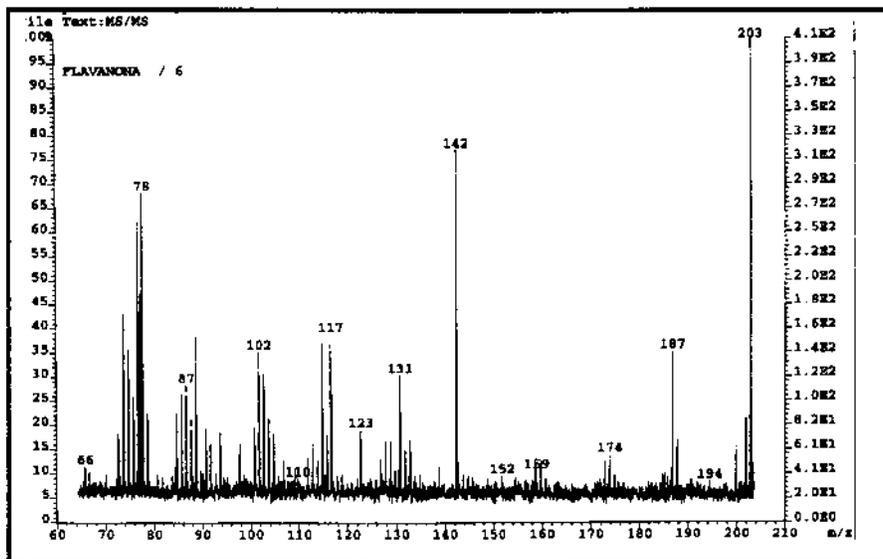


E6a.1- EM/EM dos íons fragmentos a m/z 190 (a), 203 (b), 245 (c) e 307 (d) da isoderricina A (6).

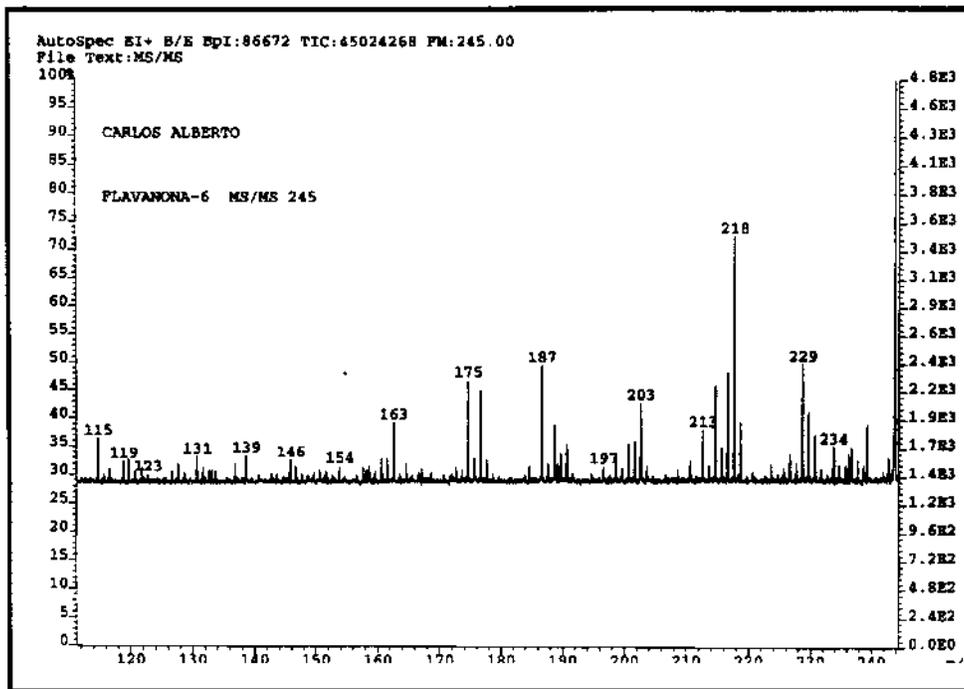
(a)



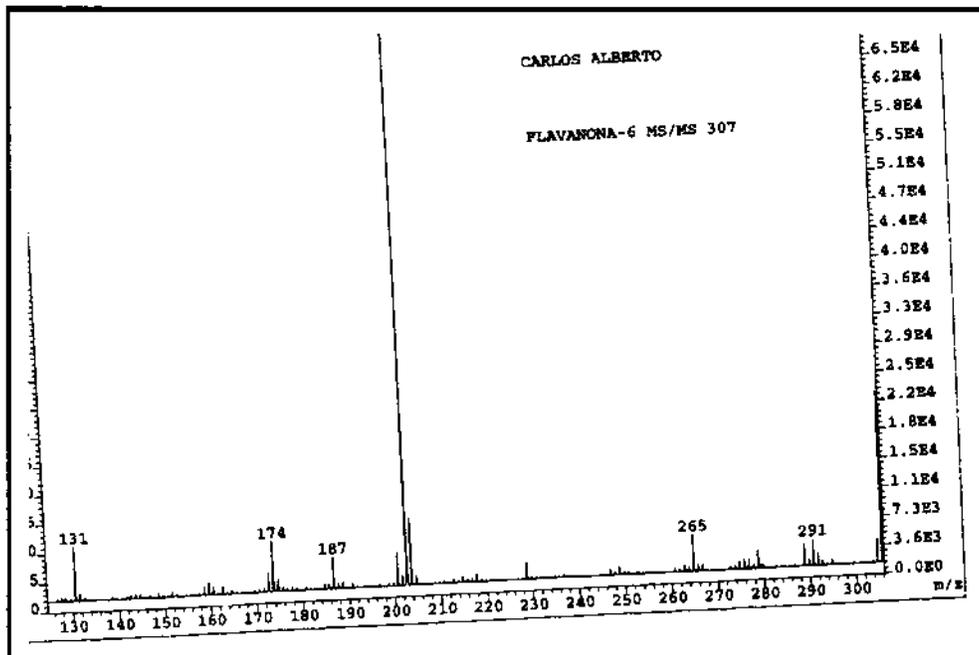
(b)



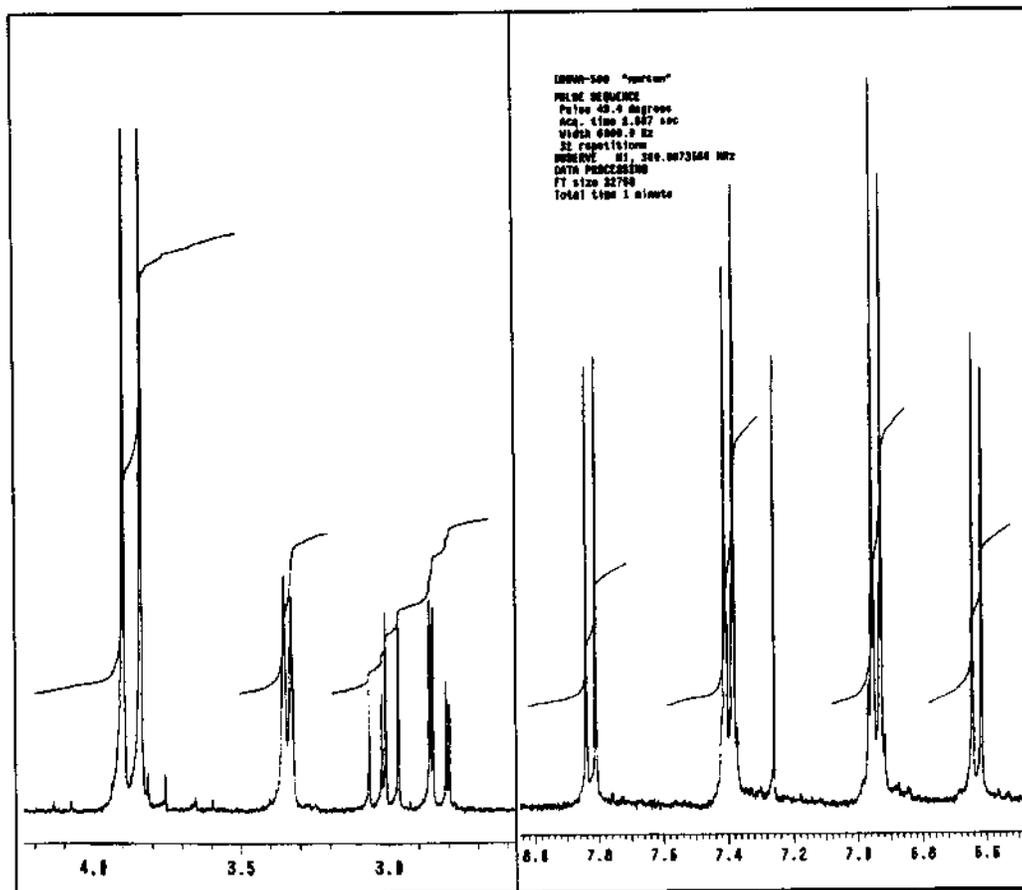
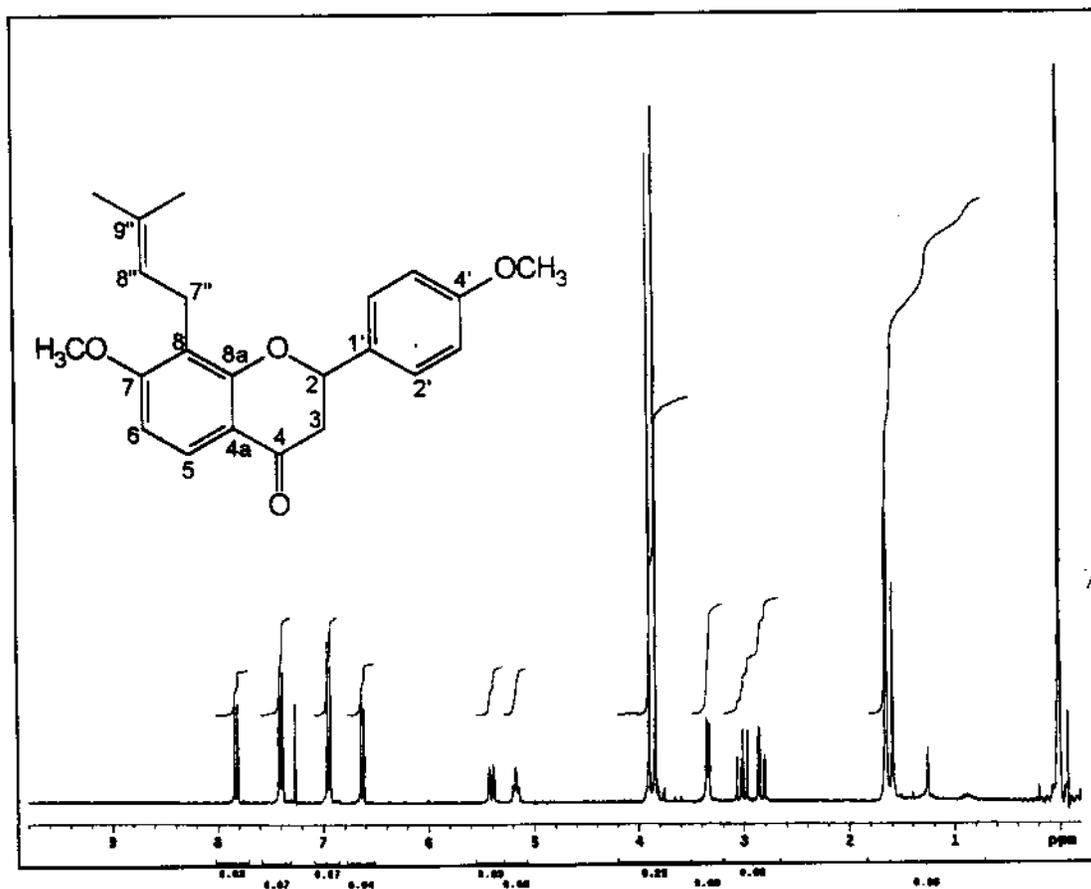
(c)

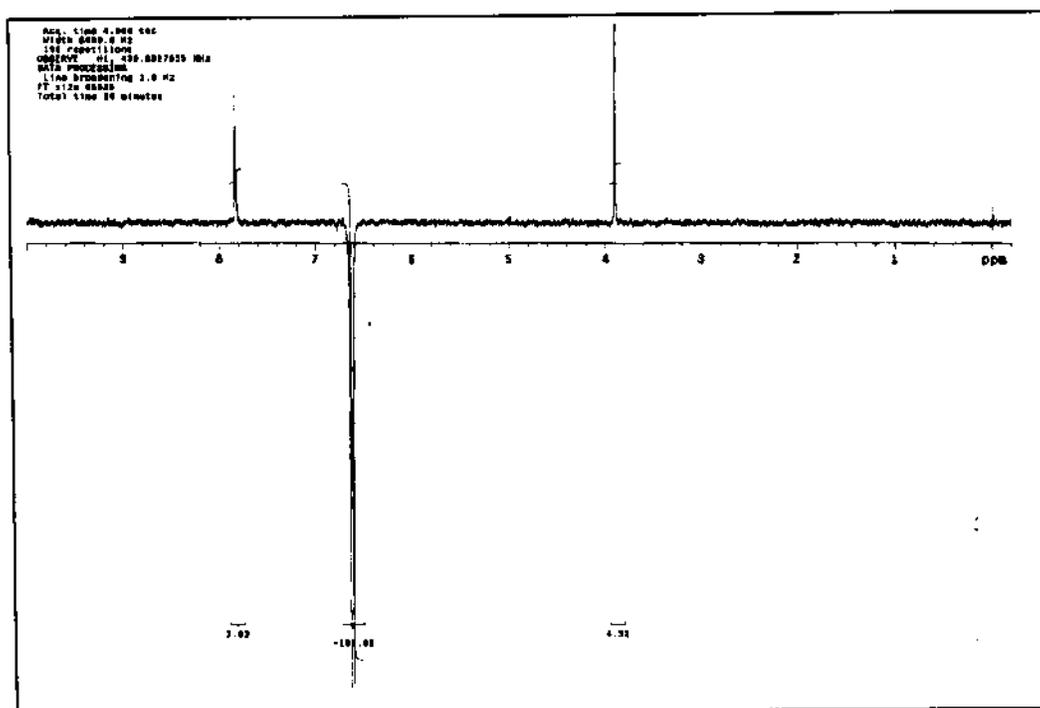
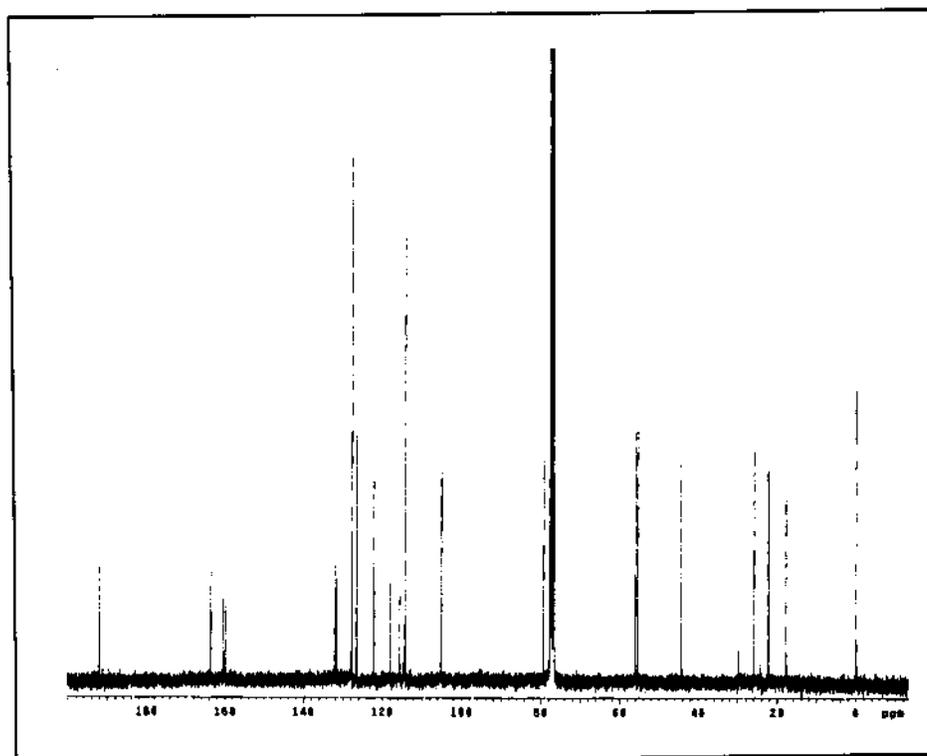


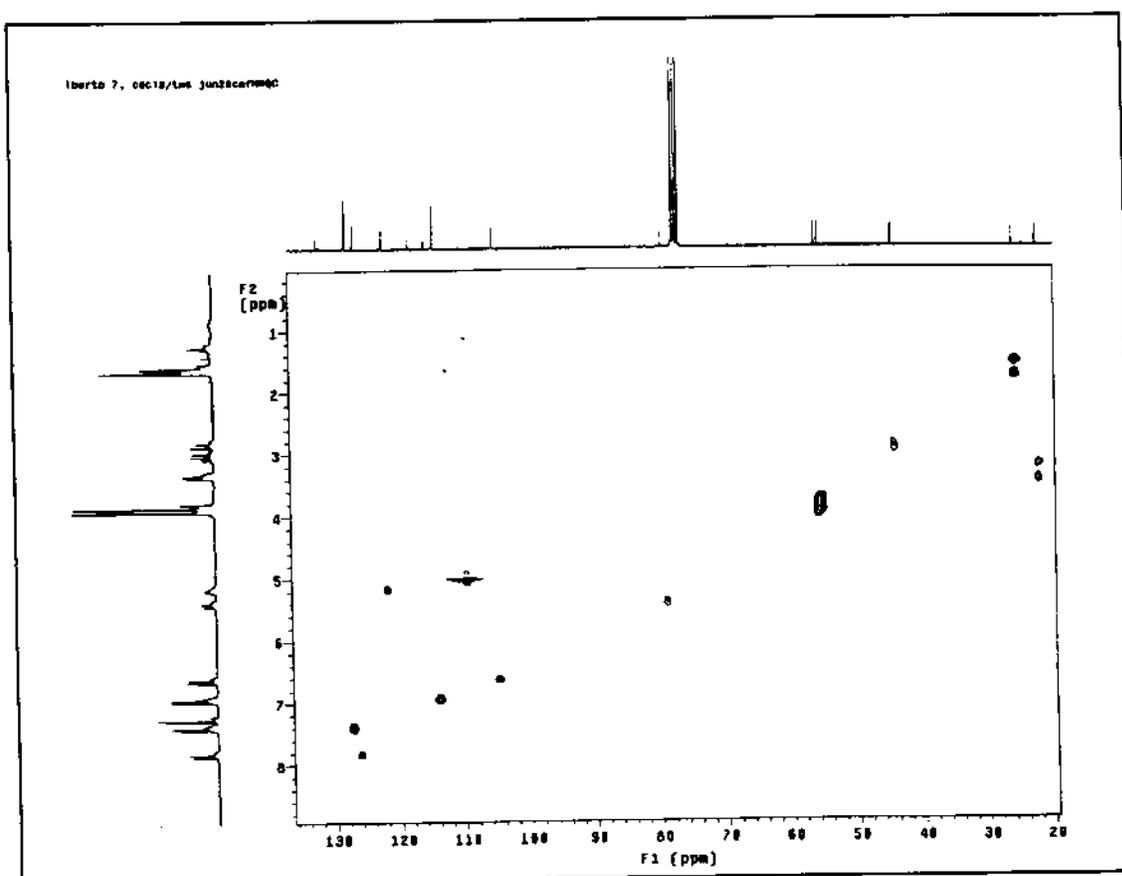
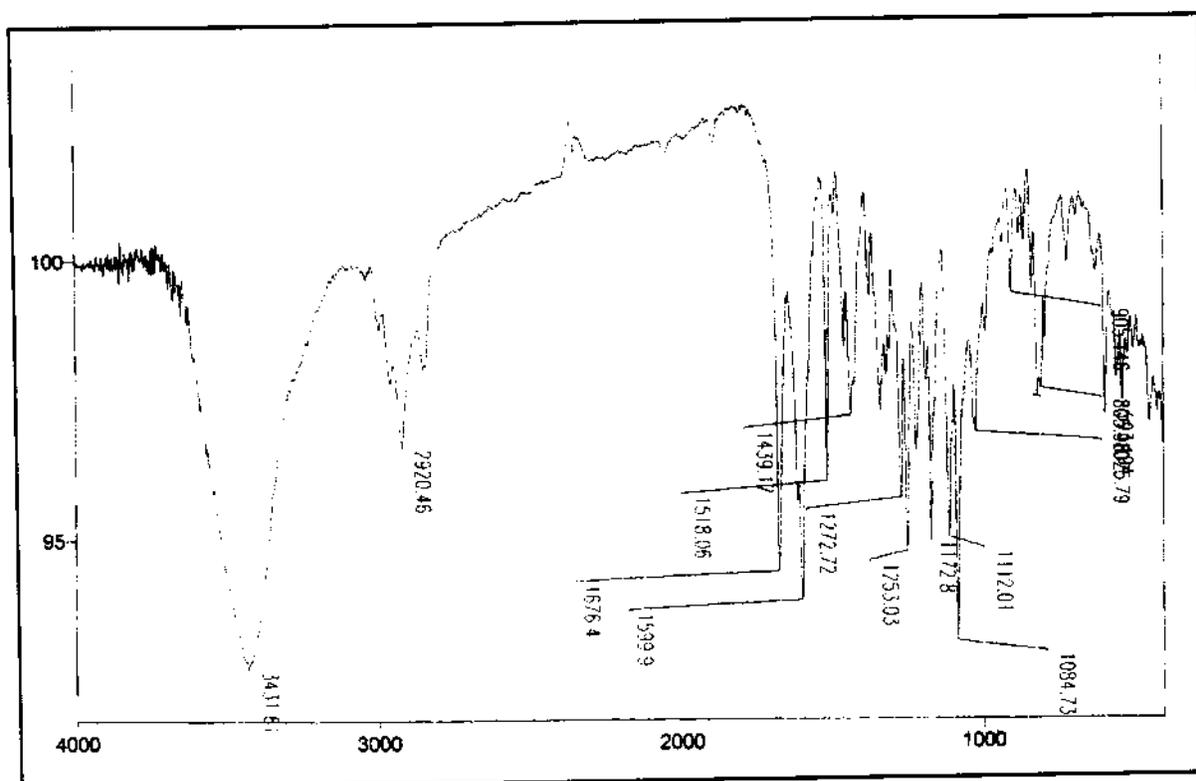
(d)



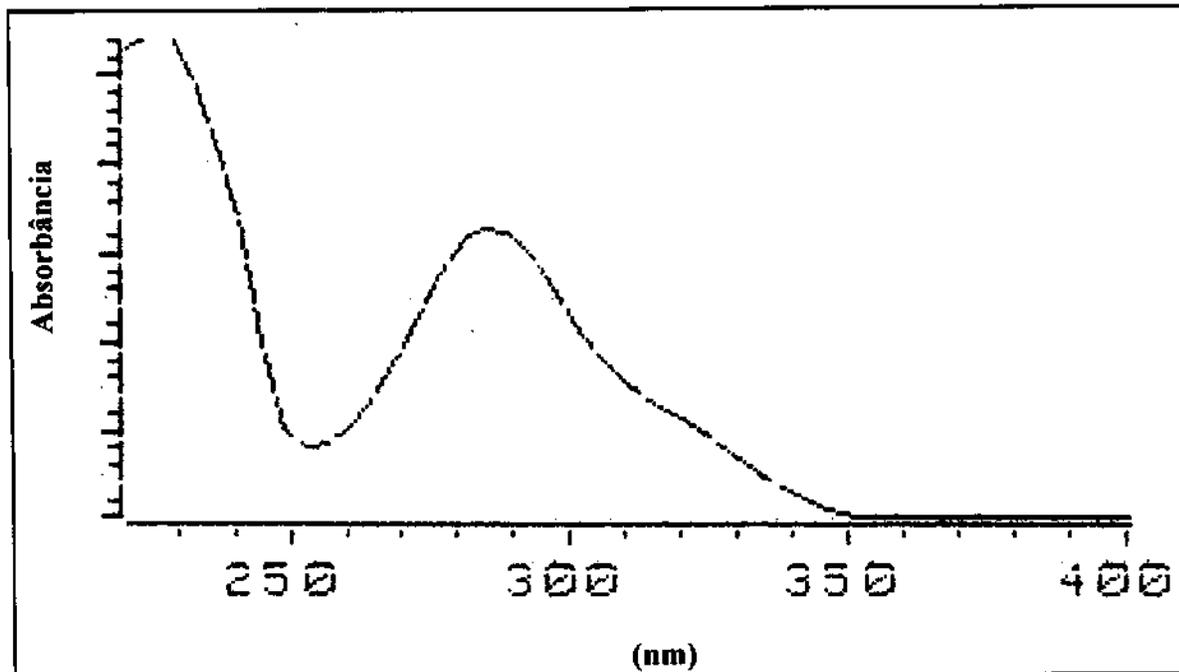
E7- Espectro de RMN ¹H da 4'-metóxiisoderrricina A (7).



E7b- Espectro NOE de 4'-metóxiisoderricina A (7).**E7c- Espectro de RMN ¹³C da 4'-metóxiisoderricina A (7).**

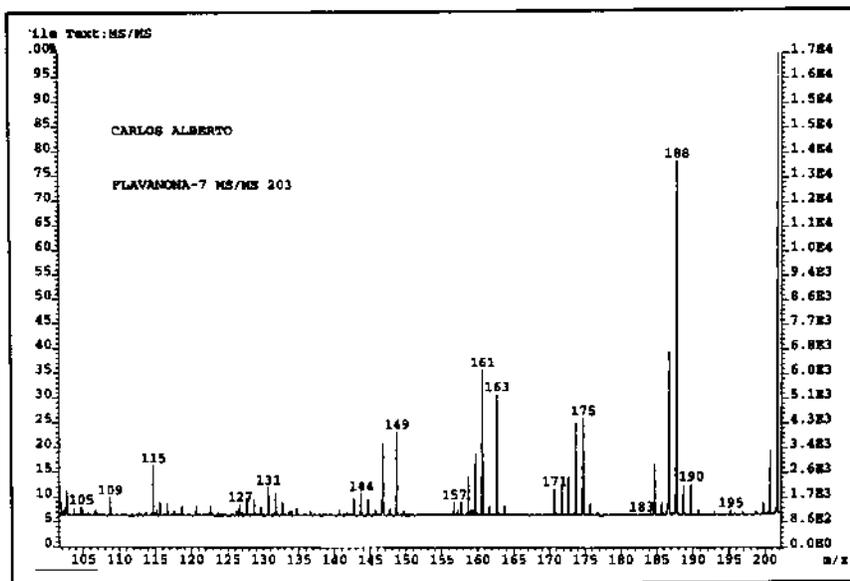
E7d- Espectro de HMQC da 4'-metóxiisoderricina A (7).**E7e- Espectro de IV da 4'-metóxiisoderricina (7).**

E7f- Espectro de UV da 4'-metóxiisoderricina A (7).

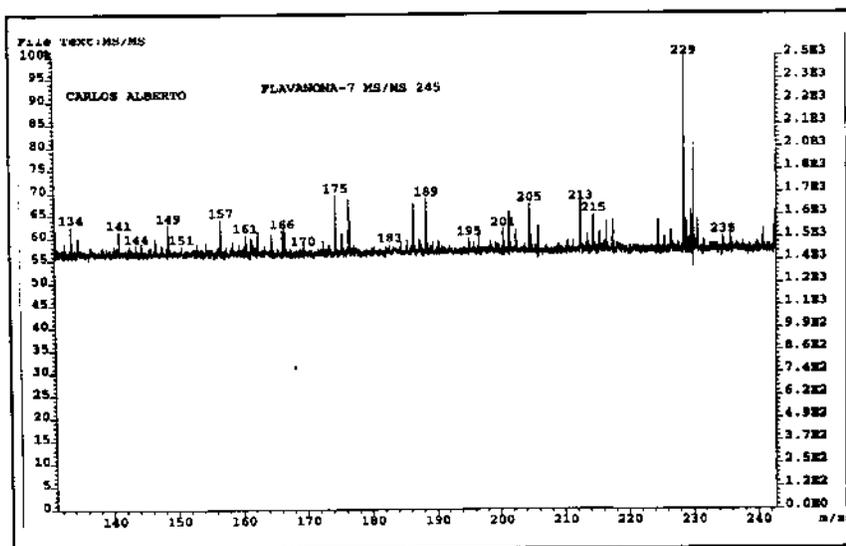


E7a.1- EM/EM dos íons fragmentos a m/z 203 (a), 245 (b) e 337 (c), respectivamente, de 4'-metóxiisoderricina A (7).

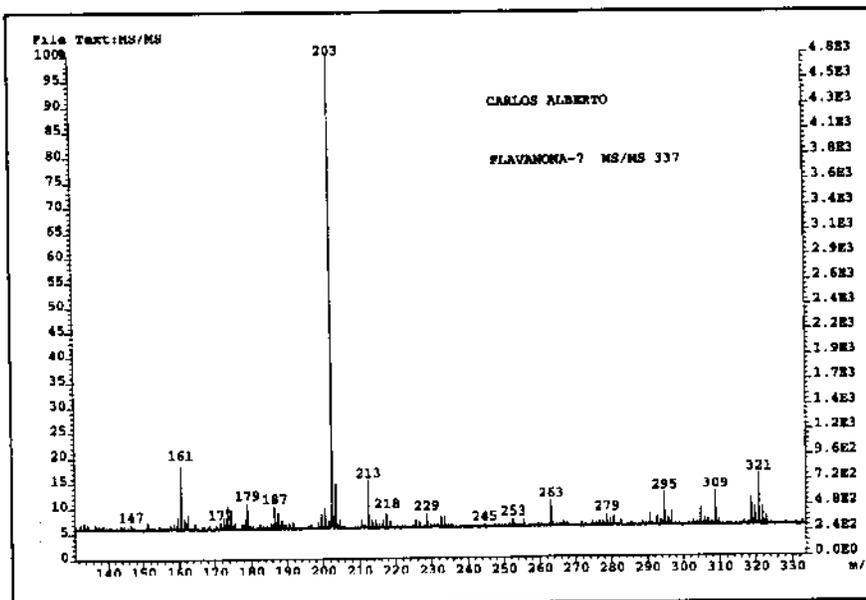
(a)



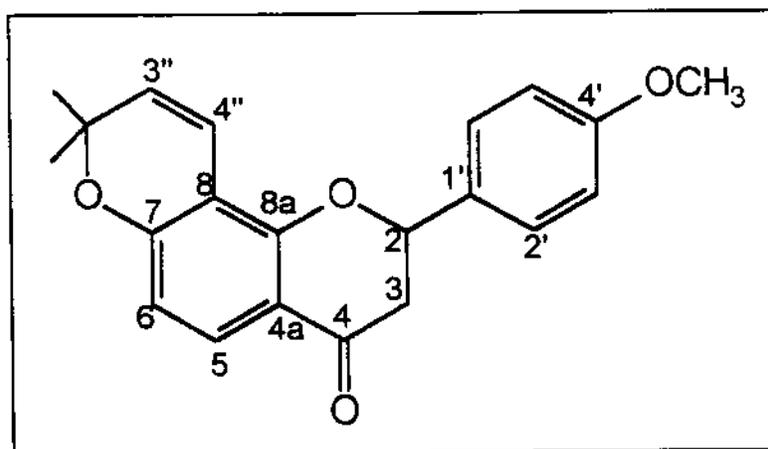
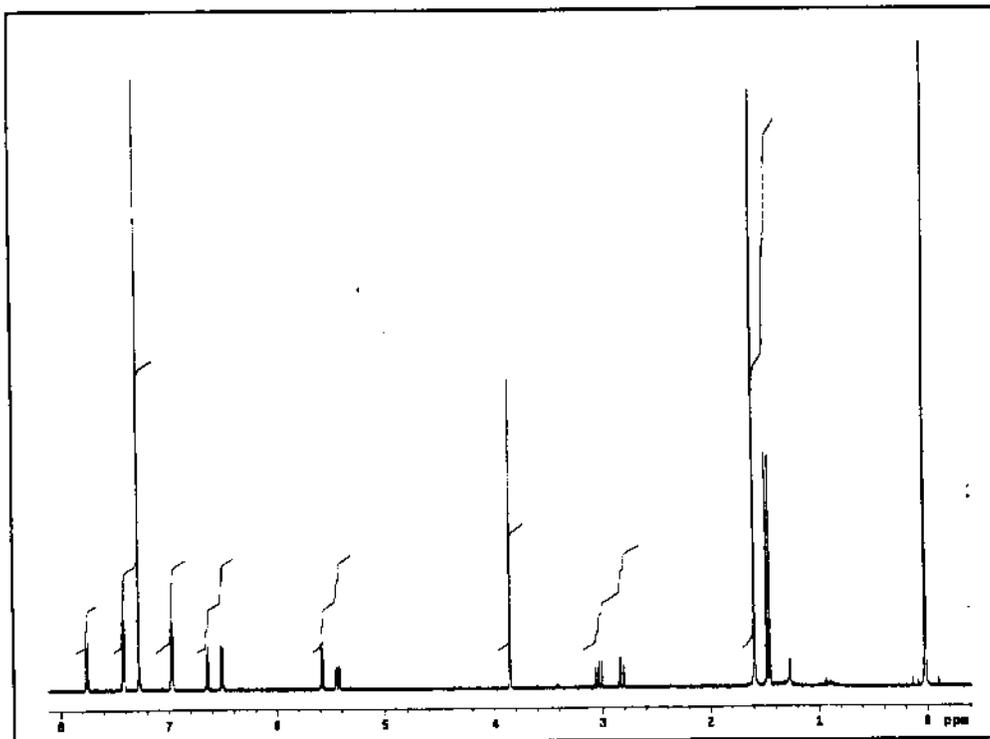
(b)



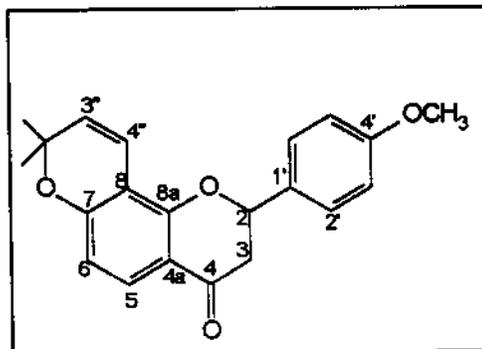
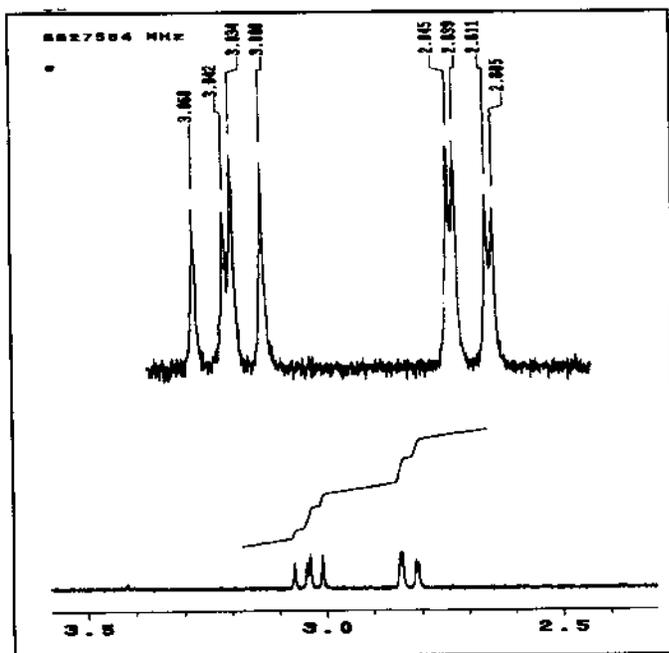
(c)



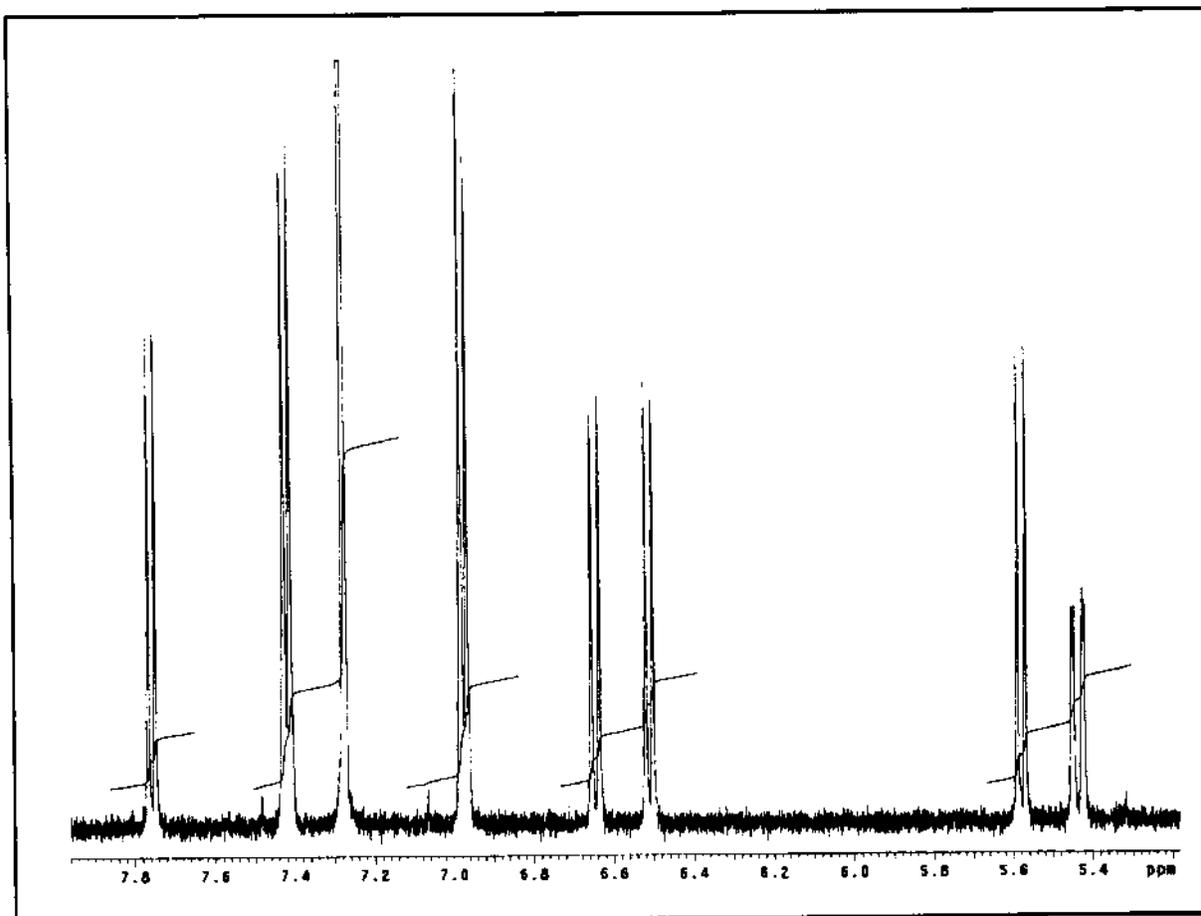
E8- Espectro [e expansões (a) e (b)] de RMN ^1H da 4'-metóxiisolonchocarpina (**8**).



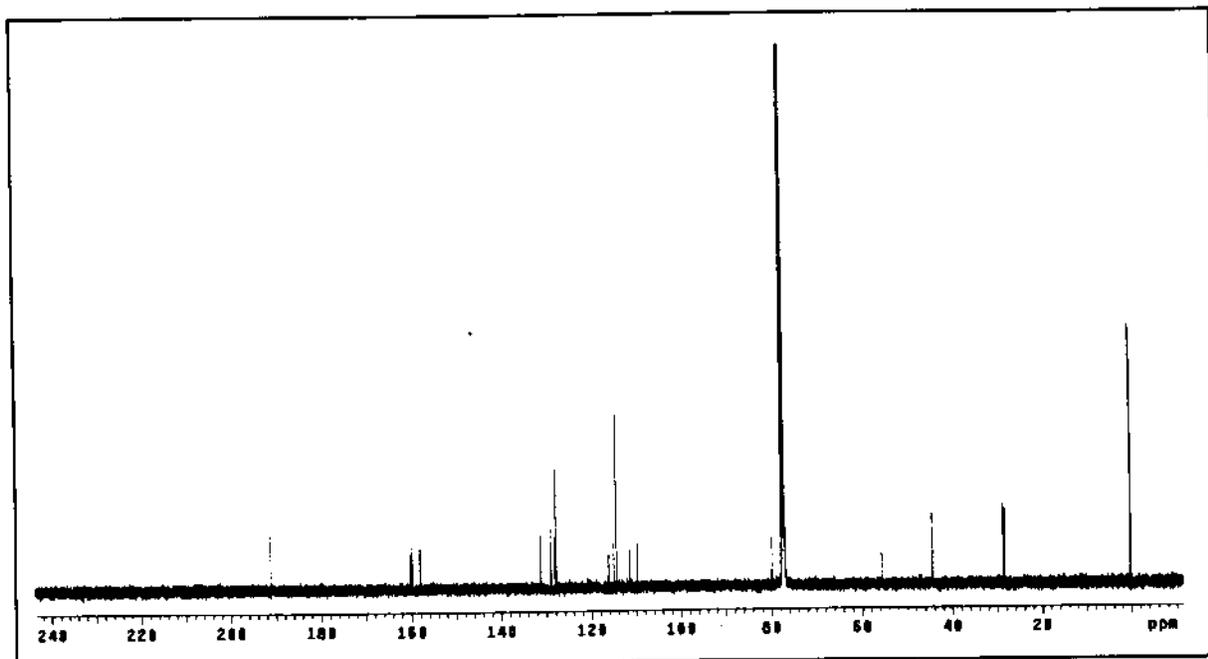
(a)



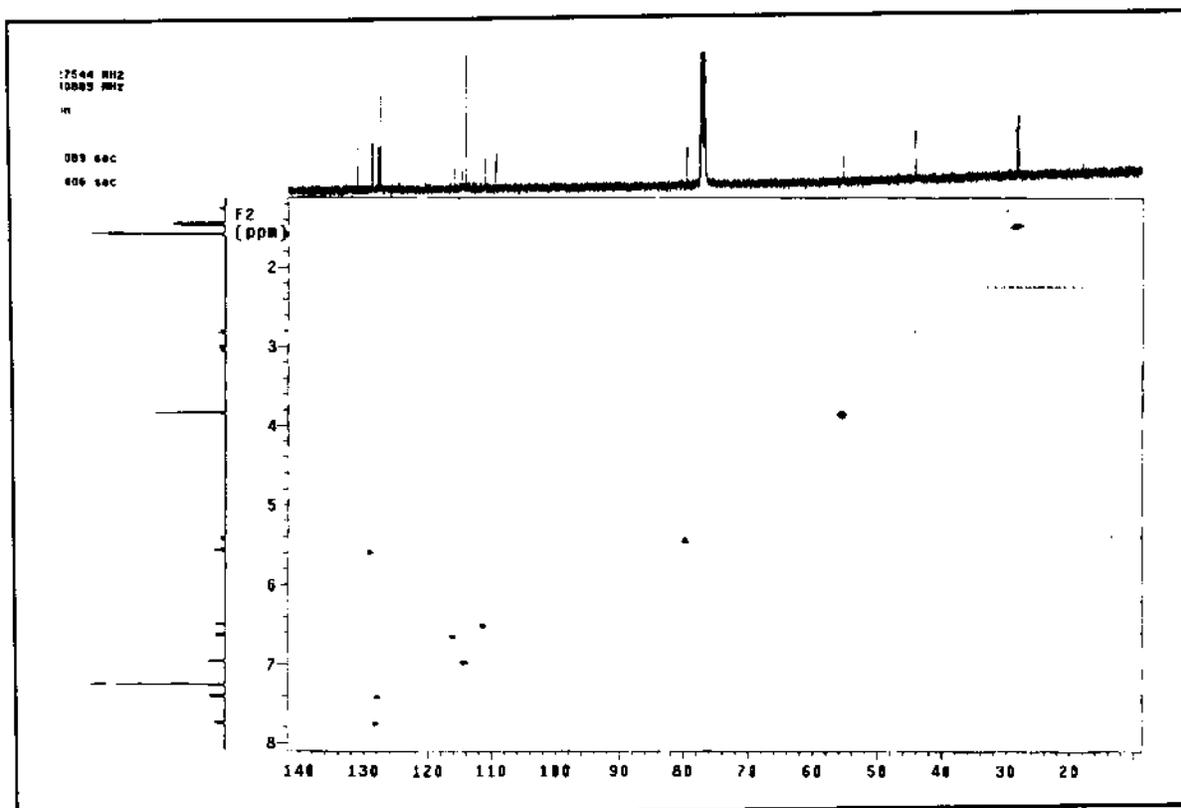
(b)

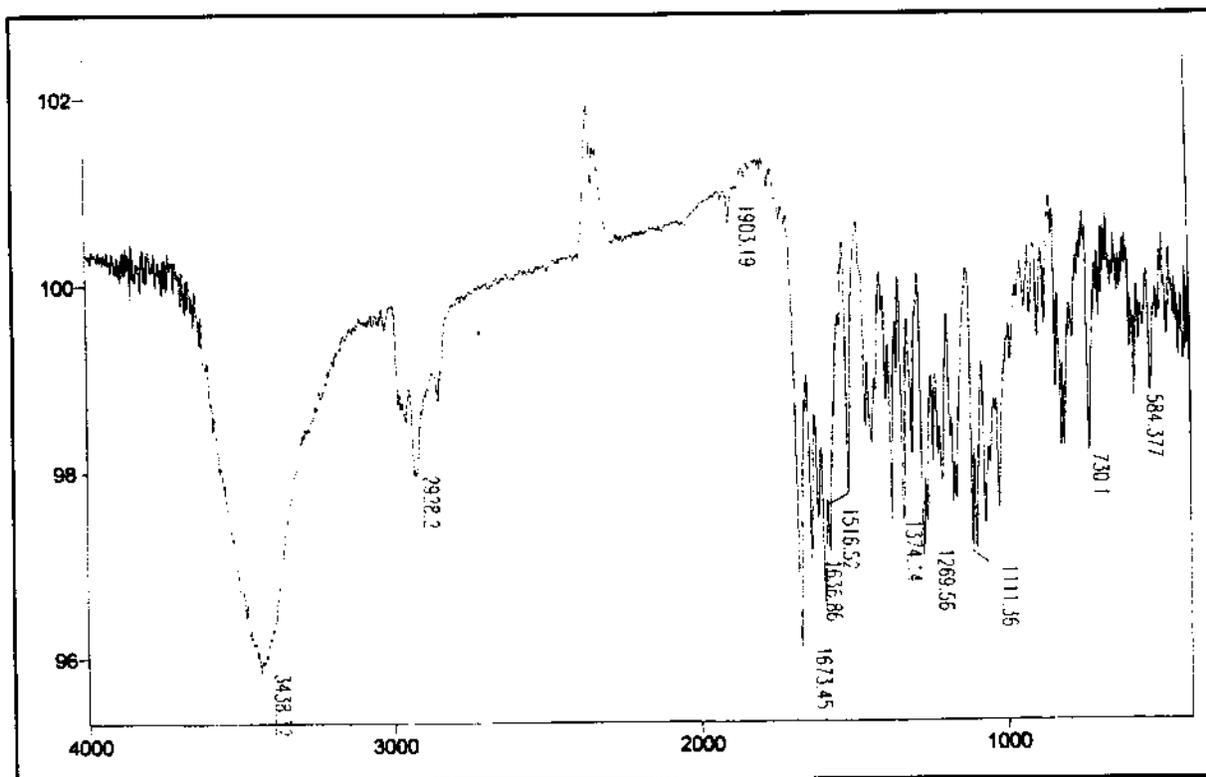


E8b- Espectro de RMN ¹³C da 4'-metóxiislonchocarpina (8).



E8c- Espectro de HMQC da 4'-metóxiislonchocarpina (8).



E8d- Espectro de IV da 4'-metóxiisolonchocarpina (8).**E8e- Espectro de UV da 4'-metóxiisolonchocarpina (8).**