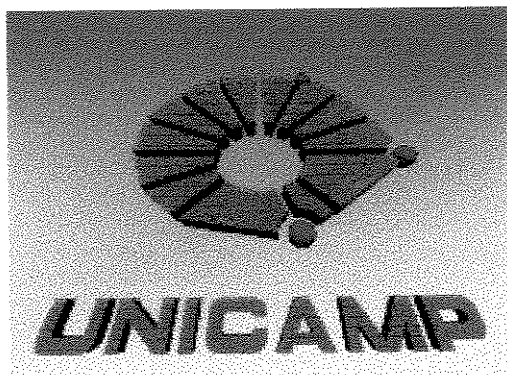




Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

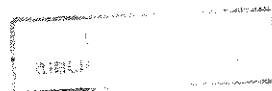
**Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus dipteroneurus*
Pittier e *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo-
Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade
Biológica**

Dissertação de Mestrado

**Aluna: María del Pilar Caramantín Soriano 973887
Orientadora: Profa. Dra. Eva Gonçalves Magalhães**

Campinas, Março de 1999

9916438



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

Soriano, Maria del Pilar Caramantín
S68e Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus dipteroneurus* Pitter e
Lonchocarpus montanus A. M. G. Azevedo – isolamento, determinação
estrutural e atividade biológica / Maria del Pilar Caramantín So-
riano. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Eva Gonçalves Magalhães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Insti-
tuto de Química.

1. Flavanóides quimiosistemática. 2. Testes biológicos. 3. CLAE.
I. Magalhães, Eva Gonçalves. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. II. Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	UNICAMP
	S68e
V.	Ex.
TEMP. BC	38602
PROC.	229/99
G	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	31/08/99
N.º CPD	

CM-00125815-8

Resumo

**Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus dipteroneurus* Pittier e *Lonchocarpus montanus*
A.M. G. Azevedo – Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica**

María del Pilar Caramantín Soriano, Eva Gonçalves Magalhães

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

O estudo fitoquímico do extrato metanólico das raízes de *Lonchocarpus dipteroneurus* Pittier resultou no isolamento da *sacarose* na forma de seu derivado peracetilado e uma mistura de compostos nitrogenados. Nenhum composto flavonoídico foi detectado através da análise dos extratos éter de petróleo e diclorometânico. Posteriormente constatou-se que o espécime estudado não se tratava de um *Lonchocarpus*. O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico das raízes de *Lonchocarpus montanus* A.M. Azevedo resultou no isolamento de quatro flavonóides conhecidos: *derriobtusona A* **53**, *(E)-7-OMe pongamol* **55**, *lanceolatina B* **56**, e *medicarpina* **57**, que foram caracterizadas pelos respectivos dados espectroscópicos (UV, IV, EM, RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY, NOE, HSQC, HMBC). Vale ressaltar que a **Derriobtusona A** é um auronol metilado de ocorrência bastante rara. Foi o primeiro auronol encontrado na natureza e anteriormente isolado apenas de *L. obtusus*. Foram feitos testes de bioautografia com os extratos e os flavonóides isolados das raízes de *L. montanus* frente a fungos e bactérias quando verificou-se que todos eles são ativos contra *Staphylococcus aureus*. Através do bioensaio de letalidade com *Artemia salina*, observou-se que tanto os extratos como os flavonóides isolados possuem atividade citotóxica.

Abstract

Phytochemistry of *Lonchocarpus dipteroneurus* Pittier and *Lonchocarpus montanus* A.M. Azevedo- Isolation, Structural Determination and Biological Activity

María del Pilar Caramantín Soriano, Eva Gonçalves Magalhães

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

Acetylation of methanolic extract from *Lonchocarpus dipteroneurus* Pittier roots followed by chromatographic analysis furnished peracetylated *sucrose* and a mixture of nitrogenated compounds. However the dichloromethane extract from *Lonchocarpus montanus* A.M. Azevedo roots was submitted to chromatographic analysis allowing the isolation of four flavonoids: *derriobtusone A* **53**, *(E)-7-OMe pongamol* **55** *lanceolatine B* **56** and *medicarpine* **57** which have been isolated before from other sources. The molecular structures were characterized by means of their respective spectral data (UV; IR; MS; NMR ^1H , NMR ^{13}C , NOE) including bidimensional experiments (COSY, HSQC, HMBC). **Derriobtusone A** represents the first auronol found in nature. It had formerly been isolated from *L. obtusus*, another brazilian species closely related to *L. montanus*. The extracts from roots of *L. montanus* A.M. Azevedo were tested against some bacteria and fungi by bioautography method when it was verified activity against *Staphilococcus aureus*. The extracts of *L. montanus* A.M. Azevedo roots and isolated flavonoids showed activity in the *Brine Shrimp* bioassay.

Curriculum Vitae

1. Graduação

Curso de Ciências Química pela Faculdade de Ciências da Universidad Nacional de Ingenieria – UNI, Lima, Peru.

Período: Set. 1990 – Julho 1995

2. Resumos Publicados

2.1 M.D.P.C. Soriano, M. Sannomiya, A.F. Magalhães, A.M.G.A. Tozzi & E.G. Magalhães. Flavonoides Aislados de *Lonchocarpus montanus* A. M.G. Azevedo. IV Simpósio Internacional de Química Orgánica de Productos Naturales y sus Aplicaciones. Talca- Chile, 1-4 de Dezembro de 1998.

2.2 A.F. Magalhães, A.M.G.A. Tozzi , E.G. Magalhães, **M.D.P.C. Soriano** & M. Sannomiya. Ocorrência de Pongamol nas raízes de *Lonchocarpus montanus* A. M.G. Azevedo. XV Simpósio de Plantas Medicinais. Águas de Lindóia-Brasil-, 13-17 de Outubro de 1998.

2.3 A.F. Magalhães, A.M.G.A. Tozzi , A.L.T.G. Ruiz, E.G. Magalhães & **M.D.P.C. Soriano**. Análise por CLAE dos extratos Éter de Petróleo de *Lonchocarpus atropurpureus* e *Lonchocarpus dipteroneurus*. XX Reunião Anual sobre Evolução , Sistemática e Ecologia Micromoleculares – VII Jornada de Iniciação Científica em Biodiversidade. Rio de Janeiro - Brasil, 19-21 de Agosto de 1998.

5. Estágios

Pontificia Universidad Católica del Perú – PUCP, Departamento de Ciências
- Seção Química. Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica de Produtos
Naturais. Lima – Peru

Período: Fevereiro – Março de 1995

Atividade: Screening Fitoquímico de Oito Plantas

6. Iniciação Científica

Universidad Nacional de Ingenieria - UNI , Faculdade de Ciências – Escola
Profissional de Química. Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica de
Produtos Naturais. Lima – Peru

Período: Julho de 1994 – Janeiro de 1995 e Abril – Agosto de 1995

*Para DEUS pela vida,
Por todo seu amor
e por tudo o que
fui, sou e serei.*

*Para meus pais Gregória e
Fernando, pela vida, pelo
amor, união, carinho e pela
constante motivação.*

*Para meus irmãos: Doris, Rosa, Jorge,
Hilda e Alicia pelo carinho, união,
amizade e constante torcida.*

*Para meus avós Antonio, Honoria, Luciano e
Izabel; minhas sobrinhas Winnie Ann e Michael,
meu cunhado Arturo, meu primo Jorge e meu
padrinho Juan pelo carinho, amizade e
constante torcida.*

Agradecimentos

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

Ao CNPq pela concessão das Bolsas de Estudo.

À Prof^a. Dra. Eva Gonçalves Magalhães pela acertada orientação, dedicação, apoio e amizade, além do carinho constante durante o decorrer deste trabalho. Assim também ao Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães pelo apoio, amizade e interesse para o sucesso deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Ana Maria G. Azevedo Tozzi pela coleta, identificação botânica da planta e discussões complementares.

Ao corpo docente do Dpto. De Química Orgânica – IQ-UNICAMP pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial as técnicas do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear: Sônia Crisóstomo, Sônia Fanelli e Paula Pilli pelo excelente trabalho técnico e à técnica do Laboratório de Ultravioleta: Cláudia Marteli.

À Maria pela amizade e apoio técnico.

À Sônia Cláudia do Nascimento Queiros técnica responsável pelo Laboratório de CLAE pela amizade e ajuda durante os trabalhos com CLAE.

Aos colegas do laboratório : Catarina, Rosana, Elaine, Carolina, Raquel, Regina, Denise, Clara, Samisia, Mariza, Paulo, Cláudio, Laverde, Bira, André, Renato e Giordano pelos bons momentos compartilhados, colaboração e amizade; á Vália, Gelson, Luiz Marcos e Carlos pelo companheirismo, convívio agradável e amizade e em especial, á Marisa, Celira, Ana Lúcia e Míriam pela união, companheirismo, carinho, incentivo e amizade constante.

Á Valquiria, Juliana, Luiz Augusto, Márcio, Jaqueline, Karin, Gliseida, Anita, Erich, Ruben, Alberto, Maria de Jesús Santa, Clara, Marlene, Celina, Rolando, Rodolfo, Maria da Paz, Nelson, Luz Elena, Servio, Pilar, José, Monica, Daniel, Dania, Humberto, Percy, Gaspar, Enrique, Carlos, Nilo, Gino, Raúl, Berenice, Agustín e Teresa pela amizade, constante motivação e convívio amistoso.

Este trabalho de pesquisa foi apresentado nos seguintes congressos:

- 1) Aderbal Farias Magalhães (PQ) , Ana Maria G.A.Tozzi (PQ), Eva Gonçalves Magalhães (PQ) **María del Pilar Caramantín Soriano (PG)** & Miriam Sannomiya (PG). Isolamento e determinação estrutural de 4 flavonóides do extrato diclorometânico das raízes de *Lonchocarpus montanus* A. M.G. Azevedo. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1999.
- 2) **M.D.P.C.Soriano**, M. Sannomiya, A. F. Magalhães, A.M.G.A.Tozzi & E.G.Magalhães. Flavonóides Aislados de *Lonchocarpus montanus* A. M.G. Azevedo. IV Simpósio Internacional de Química Orgânica de Productos Naturales y sus Aplicaciones. Talca- Chile, 1-4 de Dezembro de 1998.
- 3) A. F. Magalhães, A.M.G.A. Tozzi , E.G.Magalhães, **M.D.P.C.Soriano** & M. Sannomiya. Ocorrência de Pongamol nas raízes de *Lonchocarpus montanus* A. M.G. Azevedo. XV Simpósio de Plantas Medicinais. Águas de Lindóia-Brasil-, 13-17 de Outubro de 1998.
- 4) A. F. Magalhães, A.M.G.A. Tozzi , A.L.T.G.Ruiz, E.G.Magalhães & **M.D.P.C.Soriano**. Análise por CLAE dos extratos Éter de Petróleo de *Lonchocarpus atropurpureus* e *Lonchocarpus dipteroneurus*. XX Reunião Anual sobre Evolução , Sistemática e Ecologia Micromoleculares – VII Jornada de Iniciação Científica em Biodiversidade. Rio de Janeiro - Brasil, 19-21 de Agosto de 1998.

“ A beleza da vida é muito maior que os problemas que não conseguem destruí-la. É questão de enxergar, ou de querer enxergar. “

Romeu Santini

Índice

	Páginas
Lista de Quadros	XV
Lista de Tabelas	XVI
Lista de Figuras	XVIII
Lista de Fluxogramas	XXI
Lista de Abreviaturas	XXIII
 Introdução Geral	 1
 Capítulo I: Estudo Fitoquímico de <i>Lonchocarpus dipteroneurus</i> Pittier	 12
1. Introdução	12
2. Materiais e Métodos	16
2.1 Obtenção de Material Vegetal	17
2.2 Obtenção dos Extratos e Isolamento dos Componentes	17
3. Resultados e Discussões	22
Sacarose Peracetilada	23
 Anexo A : Tabelas	 26
Anexo B : Figuras	27

Capítulo II: Estudo Fitoquímico de <i>Lonchocarpus montanus</i> A.M.G.Azevedo	29
1. Introdução	29
2. Materiais e Métodos	31
2.1. Obtenção de Material Vegetal	33
2.2. Obtenção dos Extratos e Isolamento dos Componentes	33
3. Resultados e Discussões	42
3.1 Derriobtusona A (53).....	44
3.2 (<i>E</i>)-7-OMe Pongamol (55).....	49
3.3 Lanceolatina B (56).....	53
3.4. Medicarpina (57).....	54
Anexo C : Tabelas	57
Anexo D : Figuras	63
Capítulo III: Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ..	82
1. Introdução	82
2. Materiais e Métodos	83
2.1 Análise Qualitativa	85
3. Resultados e Discussões	85
3.1 <i>Lonchocarpus dipteroneurus</i> Pittier	85
3.2 <i>Lonchocarpus montanus</i> A.M.G.Azevedo	90

Capítulo IV : Testes Biológicos	92
1. Introdução	92
2. Materiais e Métodos	
2.1 Bioensaio de Bioautografia	93
2.2 Bioensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> (“Brine Shrimp Letality Test”)	95
3. Resultados e Discussões	
3.1 Bioensaio de Bioautografia	97
3.2 Bioensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> (“Brine Shrimp Letality Test”)	97
Capítulo V :Considerações Finais	98

Lista de Quadros

Páginas

Capítulo I

1. Exemplos de Flavonóides isolados das espécies <i>L. guilleminiana</i> e <i>L. sericeus</i>	14
2. Flavanonas e Flavonóis isolados de <i>L. atropurpureus</i>	15
3. Aminoácidos não protéicos isolados das sementes de <i>L.</i> <i>dipteroneurus</i>	16
4. Racionalização do Caminho de Fragmentação de Sacarose Peracetilada no Espectrômetro de Massas	25

Capítulo II

1. Flavonóides isolados de <i>L. obtusus</i>	31
2. Compostos isolados do Extrato Diclorometânico das raízes de <i>L.</i> <i>montanus</i> A.M.G.Azevedo	43
3. Racionalização do Caminho de Fragmentação de Derriobtusona A 53 no Espectrômetro de Massas	48
4. Racionalização do Caminho de Fragmentação de (<i>E</i>)-7-OMe Pongamol 55 no Espectrômetro de Massas.....	52
5. Racionalização do Caminho de Fragmentação de Lanceolatina B 56 no Espectrômetro de Massas	56

Lista de Tabelas

Páginas

Anexo A

- | | |
|---|----|
| 1. Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de Sacarose Peracetilada. | 26 |
|---|----|

Capítulo II

- | | |
|---|----|
| 1. Frações obtidas da coluna flash do Extrato Diclorometânico das raízes de <i>L. montanus</i> A.M.G.Azevedo..... | 34 |
|---|----|

Anexo C

- | | |
|--|----|
| 1. Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Derriobtusona A 53 . | 57 |
| 2. Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Derriobtusona A 53 | 57 |
| 3. Correlações observadas no espectro de COSY (H-H) para Derriobtusona A 53 | 58 |
| 4. Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n) para Derriobtusona A 53 | 58 |
| 5. Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de (<i>E</i>)-7-OMe Pongamol 55 | 59 |
| 6. Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de (<i>E</i>)-7-OMe Pongamol | |

55	59
7. Correlações observadas no espectro de COSY (H-H) para (<i>E</i>)-7- OMe Pongamol 55	60
8. Correlações observadas no espectro de HSQC (H-C, J^1) para (<i>E</i>)- 7-OMe Pongamol 55	60
9. Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Lanceolatina B 56 .	61
10. Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) de Lanceolatina B 56 .	61
11. Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Medicarpina 57	62
11. Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) de Medicarpina 57	62

Capítulo IV

1. Resultados do Teste com <i>Artemia salina</i> dos extratos e de alguns compostos isolados das raízes de <i>L.. montanus</i> A.M.G.Azevedo..	97
---	-----------

Lista de Figuras

	Páginas
Capítulo I	
1. Estrutura de Sacarose Peracetilada	24
Anexo B	
1. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de Sacarose Peracetilada 45	27
2. Espectro de Massas (IE, 70 eV) de Sacarose Peracetilada 45 ...	28
Capítulo II	
1. Partes de uma espécime de <i>L. montanus</i>	30
Anexo D	
1. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Derriobtusona A 53.....	63
2. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) (a) e DEPT (90 E 135 °) (b) de Derriobtusona A 53.....	64
3. Gráficos de Contorno COSY (a) e HSQC (b) de Derriobtusona A 53	65

4. Gráfico de Contorno HMBC (a) e Espectro de Massas (IE, 70 eV) (b) de Derriobtusona A 53	66
5. Espectro de UV (a) e Espectro de IV (b) de Derriobtusona A 53	67
6. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de (E)-7-OMe Pongamol 55.....	68
7. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de (E)-7-OMe Pongamol 55.....	69
8. DEPT (a) e Diferença de NOE (b) de (E)-7-OMe Pongamol 55	70
9. Gráfica de Contorno COSY de (E)-7-OMe Pongamol 55.....	71
10. Gráficas de Contorno HSQC (a) e HMBC (b) de (E)-7-OMe Pongamol 55	72
11. Espectro de Massas (IE, 70 eV) de (E)-7-OMe Pongamol 55 .	73
12. Espectro de UV (a) e Espectro de IV (b) de (E)-7-OMe Pongamol 55	74
13 RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Lanceolatina B 56.....	75
14. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Lanceolatina B 56.....	76
15. Espectro de Massas (IE, 70 eV) de Lanceolatina B 56.....	77
16. Espectro de UV (a) e Espectro de IV (b) de Lanceolatina B 56	78
17. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Medicarpina 57.....	79
18 RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de Medicarpina 57.....	80
19 Espectro de UV de Medicarpina 57.....	81

Capítulo III

1. Cromatogramas do Ext. Éter de Petróleo das raízes de <i>L. dipteroneurus</i> Pittier	86
2. Cromatogramas dos Extratos Éter de Petróleo de <i>L. dipteroneurus</i> Pittier e <i>L. atropurpureus</i>	87

3. Espectros UV dos Extratos Éter de Petróleo de <i>L. dipteroneurus</i> Pittier e <i>L. atropurpureus</i>	88
4. Cromatogramas dos Extratos Éter de Petróleo de <i>L.</i> <i>dipteroneurus</i> Pittier	89
5. Cromatograma dos extratos das raízes de <i>L. montanus</i> A.M.G.Azevedo	90
6. Espectros UV do Extrato Diclorometânico das raízes de <i>L.</i> <i>montanus</i> A.M.G.Azevedo.....	91

Capítulo IV

1. Procedimento para diluição da amostra no Teste com <i>Artemia</i> <i>salina</i>	96
---	----

Lista de Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etila
BAW	n-butanol/ácido acético/água
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada analítica
CCP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlação homonuclear (HxH)
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
EDM	Extrato diclorometânico
DEPT	Experimento de RMN ¹³ C utilizando transferência de polarização
Ext.	Extrato
EM	Espectro de massas
EEP	Extrato éter de petróleo
EMA	Extrato metanólico acetilado
EtOH	Etanol
eV	Eletron volts
Fig.	Figura
HMBC	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (H x C) a três ligações
HSQC	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (H x C) a uma ligação
Hz	Hertz
Hex	n-Hexano
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>L.</i>	<i>Lonchocarpus</i>

M⁺	Íon molecular
m/z	Relação massa carga
m	Multiplete
MeOH	Metanol
P.A.	Para análise
Pág.	Página
p.f.	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
NOE	Efeito Nuclear Overhauser
n-BuOH	n-Butanol
RM N¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RDA	Retro Diels-Alder
s	Singleto
s.d.	Solvente de desenvolvimento
t	Tripleto
tt	Triplo tripleto
T_R	Tempo de retenção
Tab.	Tabela
UV	Ultravioleta
λ_{máx}	Comprimento de onda

Introdução

Geral

1. A família Leguminosae

A família *Leguminosae* (ou *Fabaceae*) é uma das maiores dentre as dicotiledôneas sendo superada somente por *Compositae* e *Orchidaceae*. Ela compreende cerca de 670 gêneros e 17 500 espécies espalhadas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais^{1,2,3}. Esta família está subdividida em 3 sub-famílias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae*, as quais são tratadas como famílias independentes por alguns taxonomistas, dentre eles Hutchinson⁴.

Várias espécies da sub-família *Papilionoideae* já foram estudadas sob o ponto de vista químico e todas elas forneceram flavonóides entre os quais encontram-se 95% dos isoflavonóides naturais conhecidos até agora. A ocorrência de derivados prenilados é mais uma característica estrutural dos flavonóides isolados de *Papilionoideae*, englobando espécies de vários gêneros tais como : *Pongamia*, *Milletia*, *Piscidia*, *Derris*, *Lonchocarpus* etc. cujos caracteres morfológicos dificultam o estabelecimento de uma taxonomia infragenérica.

Gottlieb e colaboradores analisaram o significado sistemático dos flavonóides isolados de espécies pertencentes aos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus*, tomando por base os valores médios de O/M (oxidação versus metilação) dos seus flavonóides como uma medida indireta do potencial redox das respectivas espécies, em busca de uma solução mais geral para os problemas que envolvem a classificação botânica destes gêneros⁵.

Neste contexto nosso grupo de pesquisa vem estudando as espécies *Lonchocarpus* que ocorrem no Brasil visando o isolamento principalmente de flavonóides a fim de comparar os dados fitoquímicos com a classificação botânica proposta por Ana Maria G. Azevedo Tozzi. Os resultados obtidos até agora com o estudo de 3 espécies pertencentes ao sub-gênero *Punctati* e 4 espécies do sub-gênero *Lonchocarpus* são coerentes com a

¹ LEWIS, G.P. & OWEN, P.E. Legumes of the Ilha de Maracá, Royal Botanic Gardens Kew, Whitstable Litho Ltd., Whitstable, Kent, Great Britain, 6-7, 1989.

² JOLY, A.B. Botânica Introdução à Taxonomia Vegetal. 4ta. Ed., São Paulo: Ed. Nacional, 371-382, 1977.

³ HEYWOOD, J. The Leguminosae-A Systematic Purview in Harborne, J.B. Boulter D., Turner, B.L. Chemotaxonomy of the Leguminosae. London: Academic, 1-29, 1971.

⁴ HUTCHINSON, J. The Genera of Flowering Plants, London: Oxford Univ., 1 : 221-489, 1967.

⁵ 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 (213): 129, 1981.

taxonomia proposta e reúnem o isolamento de 50 flavonóides entre os quais 31 são novos^{6,7,8,9 e 10}.

2. Flavonóides

Os flavonóides compreendem uma classe de metabólitos secundários que encontram-se tanto livres quanto glicosilados e ocupam uma posição predominante entre os fenóis naturais. O interesse nos flavonóides está no fato de muitos deles apresentarem cores belas e brilhantes atuando como pigmentos presentes em várias partes das plantas assim como devido à importância desses compostos tanínicos no couro, na fermentação do chá, na manufatura do cacau e na qualidade nutricional e sabor dos alimentos. Além disso, estes compostos têm apresentado um espectro amplo de atividades biológicas agindo como antioxidantes, fungicidas, bactericidas, anti-tumorais, etc¹¹.

A distribuição ubíqua dos flavonóides em plantas e a relativa estabilidade química os tornam marcadores taxonômicos particularmente úteis.

Os flavonóides são constituídos por um esqueleto básico contendo 15 átomos de carbono envolvendo 2 anéis fenila (anéis **A** e **B**) ligados por uma unidade propanoídica e apresentam uma grande diversidade estrutural. As várias classes de flavonóides se caracterizam pela natureza da unidade propanoídica, ora ciclizando no anel **C** (Ex: flavonas e auronas), ora mantendo-se como uma cadeia aberta (Ex: chalcona, dibenzoilmetano).

⁶ SALES, B.H.L.N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth)-Leguminosae e Síntese de β -hidroxichalconas-Campinas, 1994, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.

⁷ BLANCO, I.S. Flavonóides de *Lonchocarpus muehlbergianus* e Síntese de flavanas 4-oxigenadas-Campinas, 1995, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

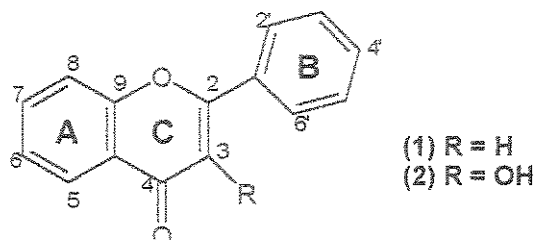
⁸ NOGUEIRA, M.A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae-Isolamento, Determinação Estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal-Campinas, 1998, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

⁹ RUIZ, A.L.T.G. Estudo Fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth e de *Lonchocarpus atropurpureus* Benth-Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica-Campinas, 1998, Tese de Mestre em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

¹⁰ FIRMINO, C.A. Estudo Fitoquímico das raízes de *Lonchocarpus campestris*- Tozzi-Campinas, 1998, Tese de Mestre em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

¹¹ HARBORNE, J.B. The Flavonoids Advances in Research since 1986, Chapman & Hall, London, Cap. 9, 1996.

Até agora foram isolados cerca de 4 000 flavonóides de várias partes da planta estudadas (flores, folhas, sementes, frutos, caules e raízes) sendo que a maioria é constituída por derivados de flavonas (1) e flavonóis (2). Apenas cerca de 30 flavonóides naturais pertencem à classe das auronas.



Nas últimas três décadas os métodos de degradação química clàssicamente empregados na determinação estrutural de produtos naturais foram substituído pelas análises de dados espectroscópicos (IV,UV,RMN e EM) os quais são bem explorados para a determinação estrutural de flavonóides^{6, 7e 12}.

2.1 Biossínteses de Flavonóides

O interesse na biossínteses de flavonóides foi estimulado pelos estudos sobre os aspectos genéticos relacionados com a cor das flores. Através de especulações químicas várias espécies foram levantadas para explicar a origem dos esqueletos básicos desta classe de compostos; posteriormente checadas através dos estudos com substratos marcados mais recentemente trabalhando-se com plantas inteiras nos tecidos vegetais.

O começo dos estudos enzimáticos sobre a biossíntese dos flavonóides foi marcado pela descoberta da primeira enzima: fenilalanina amonia-liase. As dificuldades que envolvem o isolamento de enzimas foram superadas pelo uso de cultura de suspensão de células de plantas¹³.

Atualmente sabe-se que os flavonóides são originados biogeneticamente pela condensação de uma cadeia poliacetídica (encadeiamento de três unidades do éster CoA do

⁶ SALES, B.H.L.N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth)-Leguminosae e Síntese de β -hidroxichalconas-Campinas, 1994, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.

⁷ BLANCO, I.S. Flavonóides de *Lonchocarpus muehlbergianus* e Síntese de flavanas 4-oxigenadas-Campinas, 1995, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

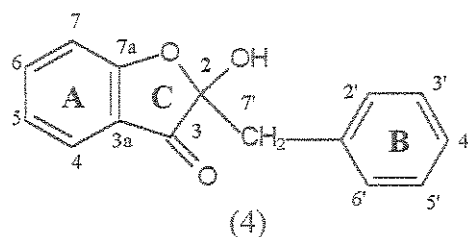
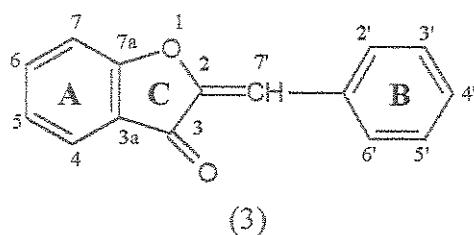
¹² AGRAWAL, P.K. Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Science Publishing Company Inc, Ansterdan, Cap. 1 e 5, 1989.

¹³ HARBORNE, J.B. The Flavonoids Advances in Research since 1986, Chapman & Hall, London, Cap. 9, 1975.

ácido malônico) com uma do éster CoA do ácido cinâmico, gerando uma chalcona. Através de uma série de reações enzimáticas envolvendo oxidações, reduções e alquilações formam-se os diversos tipos de flavonóides. No Quadro 1 apresenta-se um resumo da Biossíntese de alguns flavonóides⁶.

2.1 Auronas e Auronóis

As auronas são flavonóides altamente coloridos derivados da 2-benzildenecoumaranona (3). A maior parte das auronas naturais apresentam configuração Z. Algumas carecem da ligação olefínica e são designadas como auranonas (diidrauronas) e auranóis (diidrauronóis)¹². Quimicamente os auronóis podem ser considerados como auronas hidratadas pois são 2-hidroxi-2-benzilcoumaranonas (4).



As propriedades espectroscópicas de RMN ¹H e RMN ¹³C das auronas vem sendo regularmente exploradas^{11, 12 e 14}, entretanto tem-se poucos dados relacionados com

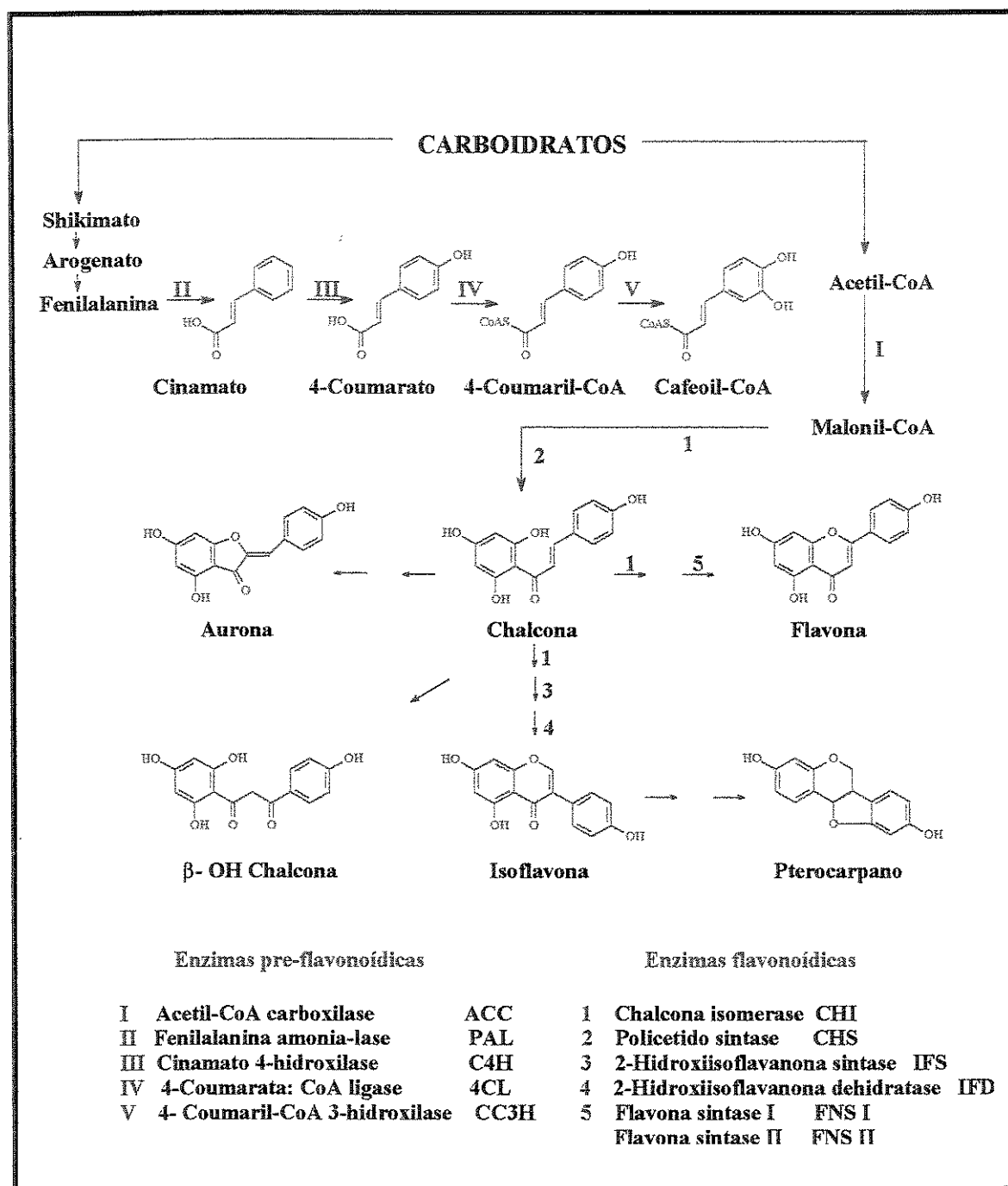
⁶ SALES, B.H.L.N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth)-Leguminosae e Síntese de β-hidroxichalconas-Campinas, 1994, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.

¹¹ HARBORNE, J.B. The Flavonoids Advances in Research since 1986, Chapman & Hall, London, Cap. 9, 1996.

¹² AGRAWAL, P.K. Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Science Publishing Company Inc, Ansterdan, Cap. 1 e 5, 1989.

¹⁴ PELTER, A., WARD, R.S., HANSER, R. & KHALIEF, F. Analysis of the Tautomeric Structures of Auronols by ¹³C NMR and Comparison with the Isomeric Flavonols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*. 12 : 3182-3185, 1981.

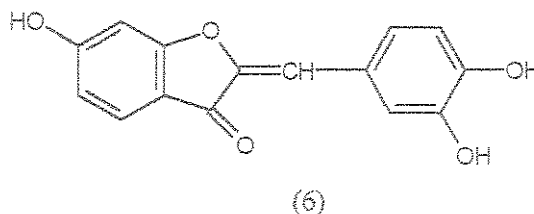
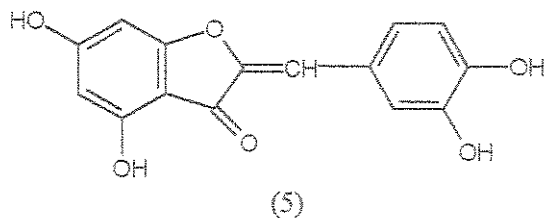
QUADRO 1: Biossíntese de alguns Flavonóides



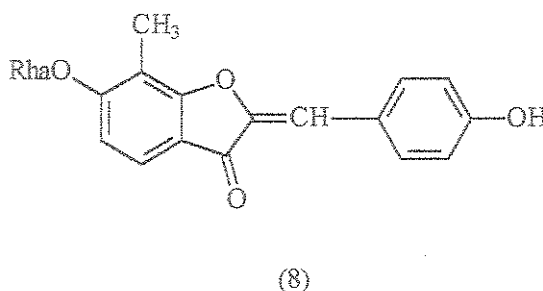
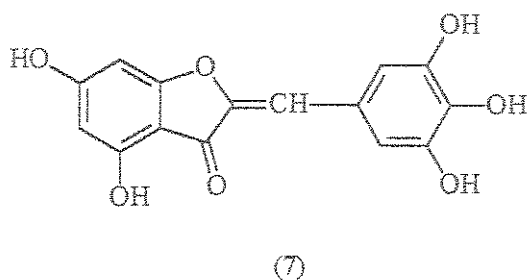
as análises dos seus espectros de massas¹⁵.

O espectro UV da maioria das auronas mostra quatro máximos de absorção, dois abaixo e dois acima de 300 nm¹⁶.

El-Habashy et al. (1989) reportaram a ocorrência de auresidina (5) e sulfuretina (6) em várias espécies de *Cyperus* e em *Pycneus sundtii* (ambas da *Cyperaceae*)¹¹.



Embora bracteatina (7) seja uma aurna bem conhecida, seu recente isolamento de *Asplenium kaulfussii* por Imperato (1989) representa a primeira ocorrência de uma aurna numa samambaia.



Em flavonóides, a C-metilação ocorre esporadicamente na natureza, até agora somente uma aurna C-metilada foi descrita: 6,4'-dihidroxi-7-metil aurna 6-O-ramopiranosida (8). Mohan e Joshi (1989) reportaram duas auronas (8) e (9) ambas isoladas do cerne de *Pterocarpus marsupium* (Fabaceae)¹⁷.

Pare et al. (1991) isolaram "cephaloceron" de plantas inteiras de *Cephalocereus senilis* (Cactaceae). Eles constataram que a estrutura deste pigmento vermelho ligeiramente

¹⁵ GARCÍA, H., IBORRA, S., PRIMO, J. & MIRANDA, M.A. Intermolecular Reactions of Radical Cations in the Gas Phase. Mass Spectral Evidence for an Ion-Molecule Process Leading to the Dimerization of Aurones. *Org. Mass Spectrom.* 24 (2) : 429-430, 1989.

¹⁶ SCOTT, A. I., Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press Ltd., London, Cap. 4, 1964.

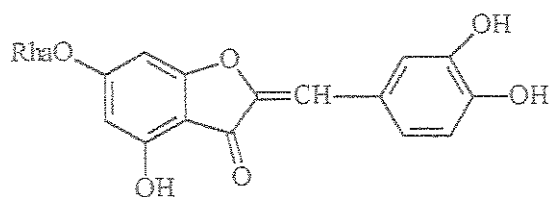
¹⁷ MOHAN, P. & JOSHI, T. Two Anthochlor Pigments from Hertwood of *Pterocarpus marsupium*. *Phytochemistry*, 28 (9) : 2529-2530, 1989.

Capítulo

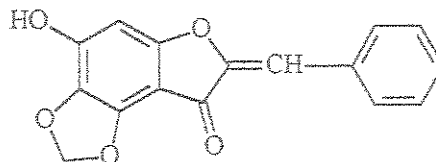
I

Introdução Geral

sensível é 4,5- metilenodioxi - 6 - hidroxí auroná (10). O composto mostrou atividade contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

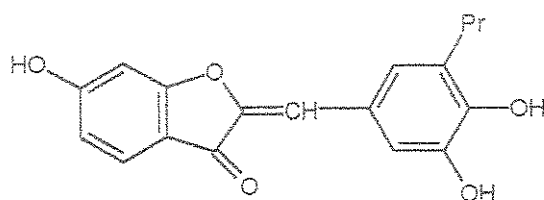


(9)

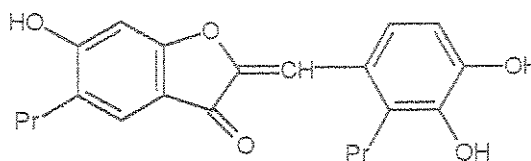


(10)

Entre os compostos isolados por Hano et al. (1990) da espécie venenosa *Antiaris toxicaria* estão as duas primeiras auronas C-preniladas de ocorrência natural: "Anti- arona-A" (11) e "Anti-arona B" (12).

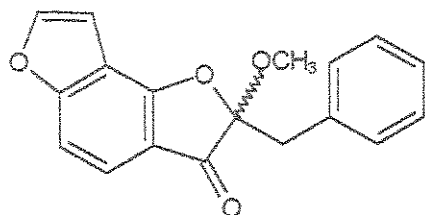


(11)

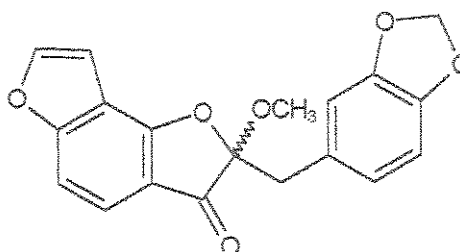


(12)

Um estudo detalhado do cerne da madeira da espécie mexicana *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae) revelou a presença dos auronóis (13) e (14) e da α -hidroxidiidrochalcona (17). A resistência da madeira ao ataque de fungos motivou a investigação da atividade fungicida dos cinco compostos isolados (13,14,15,16 e 17) verificando-se que todos eles são ativos contra *Lenzites trabea* sendo (17) , o composto mais ativo¹¹.

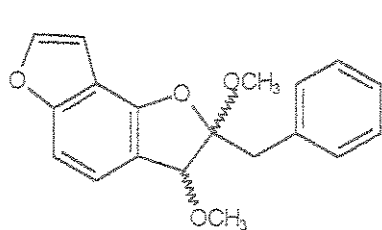


(13)

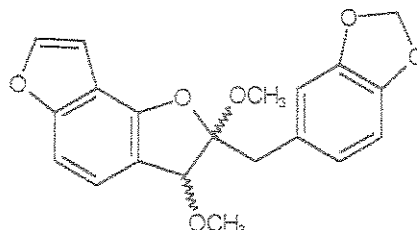


(14)

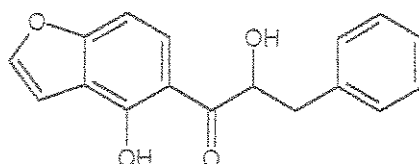
¹¹ HARBORNE, J.B. The Flavonoids Advances in Research since 1986, Chapman & Hall, London, Cap. 9, 1996.



(15)

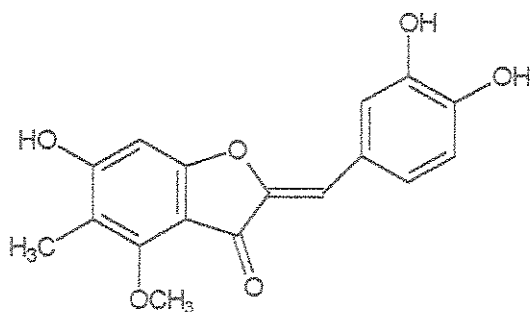


(16)

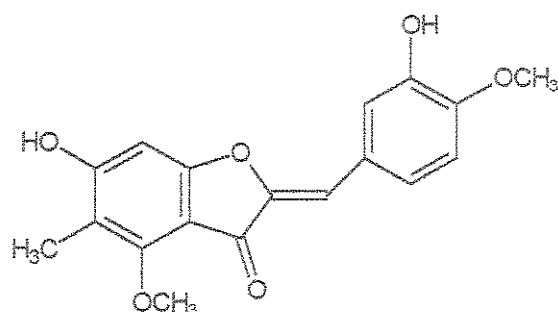


(17)

Seabra et al. (1995)¹⁸ reportaram o isolamento e identificação de 6,3',4'-trihidroxi-4-metoxi-5-metilaurona (**18**) de *Cyperus capitativo*. Uma nova análise da mesma espécie de *Cyperus*¹⁹ conduziu ao isolamento de mais duas auronas metoxiladas: 6,3'-diidroxi-4,4'-dimetoxi-5-metilaurona (**19**) e 4,6,3',4'-tetrametoxiaurona (**20**). Estes compostos (**18**, **19** e **20**) foram as primeiras auronas isoladas de órgãos subterrâneos de *Cyperus spp.*



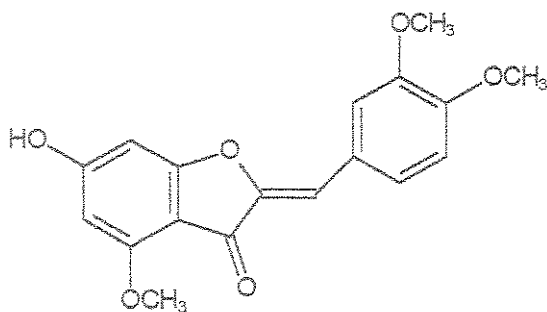
(18)



(19)

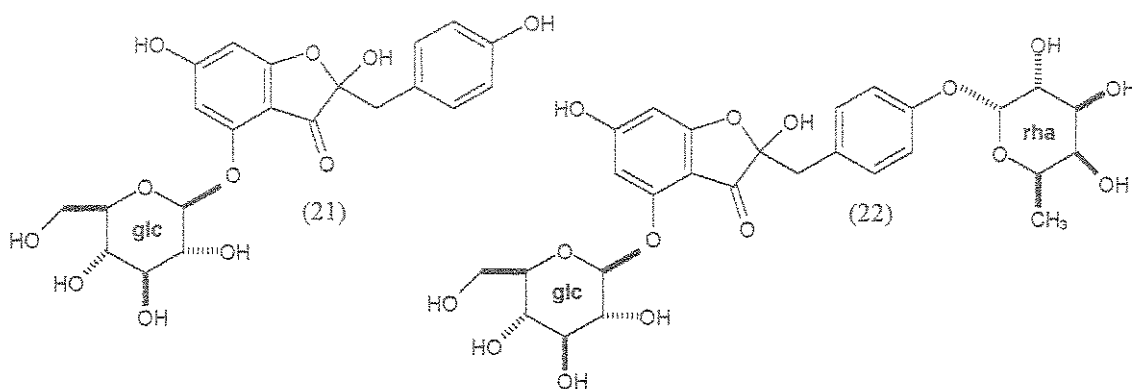
¹⁸ SEABRA, R.M., MOREIRA, M.M., COSTA, M.A.C. & PAÚL, M.I. 6,3',4'-Trihydroxy-4-methoxy-5-methylaurone from *Cyperus capitatus*, *Phytochemistry*, 40 (5) : 1579-1580, 1995.

¹⁹ SEABRA, R.M., ANDRADE, P.B., FERRERES, F. & MOREIRA, M.M. Methoxylated Aurones from *Cyperus capitatus*. *Phytochemistry*, 45 (4) : 839-840, 1997.



(20)

Yoshikawa et al. (1998)^{20 e 21} relataram a ocorrência de dois novos auronóis glicosilados: Hovetrichosides C (21) e Hovetrichoside D (22) da casca de *Hovenia trichocarea*.



No começo deste século, uma série de auronas tais como (3) ou (25) foram sintetizadas por Auwers et al. através da condensação de 3(2H)-benzofuranonas substituídas (23) com arilaldeídos (24). As primeiras auronas de ocorrência natural entretanto foram reportadas por Geissman et al. (1943)²² trinta anos depois. As auronas contribuem na pigmentação das flores devido às suas cores amarelo ouro brilhantes. Contudo elas receberam pequena atenção comparado às flavonas e isoflavonas amplamente pesquisadas. Existem poucos métodos gerais para síntese de auronas e suas atividades

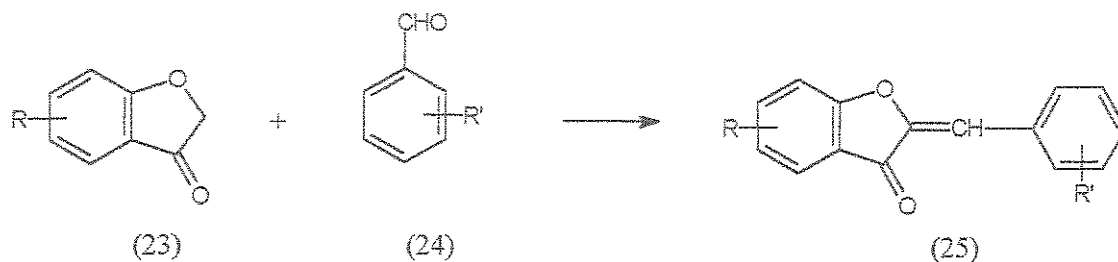
²⁰ LI, X.C., CAI, L. & WU, C.D. Antimicrobial Compounds from *Ceanothus Americanus* Against Oral Pathogens, *Phytochemistry* 102 : 97-102, 1997.

²¹ YOSHIKAWA, K., EIKO, K., MIMURA, N., KONDO, Y. & ARIHARA, S., HOVETRICHOSIDES C-G. Five New Glycosides of Two Auronols, Two Neolignans and a Phenylpropanoid from the Bark of *Hovenia trichocarea*. *J. Nat. Prod.* 61 (6) : 786-790, 1998.

²² GOLSACK, R.J. & SHANNON, J.S. Proximity Effects in the Electron Impact Mass Spectra of Aurones and Related Compounds. *Org. Mass Spectrom.* 18 (11) :545-555, 1980.

biológicas são ainda menos avaliadas, apesar do fato de serem estruturas isoméricas das flavonas que têm manifestado um espectro amplo de ações biológicas incluindo atividade anti-proliferativa.

Nestes últimos anos o interesse pela química dos derivados flavonoidicos de rara ocorrência natural vem aumentando devido à recente descoberta de suas poderosas propriedades inibitórias²². Os químicos orgânicos estão a procura de métodos gerais e convenientes para a síntese de auronas. Varma et al. (1992) propuseram uma síntese simples e com rendimentos altos de auronas que acontece em condições suaves sobre superfície de alumina²³. Já Botta et al. (1996) sintetizaram auronas e auronóis a partir da biotransformação de chalconas usando cultura de suspensão de células de *Cassia dihybotrya*²⁴.



3. OBJETIVOS

🔍 Comparar o perfil dos metabólitos secundários presentes nas raízes do *L. dipteroneurus* e *L. montanus* A.M.G. Azevedo procurando estabelecer uma correlação entre a quimiotaxonomia e a classificação botânica proposta por Ana Maria G. Azevedo Tozzi em seu estudo sobre a ocorrência de espécies *Lonchocarpus* no Brasil.

🔍 Analisar qualitativamente por CLAE todos os extratos obtidos.

²² GOLSACK, R.J. & SHANNON, J.S. Proximity Effects in the Electron Impact Mass Spectra of Aurones and Related Compounds. *Org. Mass Spectrom.* 18 (11) :545-555, 1980.

²³ VARMA, R.S & VARMA, M. Alumina-Mediated Condensation, A simple Synthesis of Aurones. *Tetrahedron Letters*, 33 (40) :5937-5940, 1992.

²⁴ BOTTA, B., MONACHE, G.D., DEROSA, M.C., SWRRIA, R., VITALI, A., VINCIGUERRA, V., MENENDEZ, P. & MISITI, D. *Heterocycles*. 43 (7) : 1415-1421, 1996.

¶ Fazer ensaios biológicos preliminares (com os extratos brutos e compostos isolados) para avaliar a atividade antimicrobiana (teste de Bioautografia) com fungos e bactérias e a toxicidade (Teste de Letalidade com *Artemia salina*).

Esta tese está dividida em cinco capítulos:

Capítulo I : Estudo fitoquímico das raízes de *Lonchocarpus dipteroneurus* Pittier, isolamento e determinação estrutural de sacarose peracetilada do extrato metanólico.

Capítulo II: Estudo fitoquímico das raízes de *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo, isolamento e determinação estrutural de flavonóides do extrato diclorometânico.

Capítulo III: Análise qualitativa através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de *Lonchocarpus dipteroneurus* Pittier e *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo visando obter o perfil cromatográfico dos extratos das raízes.

Capítulo IV: Testes Biológicos: bioensaios de bioautografia (com bactérias e fungos) e letalidade com *Artemia salina* aplicados aos extratos das raízes de *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo e aos flavonóides isolados do extrato diclorometânico.

Capítulo V: Considerações Finais.

1. Introdução

Lonchocarpus dipteroneurus é uma espécie nativa da Venezuela ¹. É uma árvore pequena de flores desconhecidas, glabros com ramos compridos e lenticelas marrom a cinza, pequenas e densas. Conhecido entre os nativos como “grifo”. A espécie estudada encontra-se cultivada no Parque Ecológico da UNICAMP ao lado do *L. atropurpureus*, outra espécie também cultivada que está sendo estudada em nosso grupo. Estas duas espécies são alocadas no mesmo sub-gênero *Lonchocarpus* e na mesma seção *Lonchocarpus* ao lado das espécies nativas *L. guilleminiana* e *L. sericeus* que já foram estudadas e forneceram uma série de chalconas, flavanonas e flavonóis ² (Quadro 1). O estudo químico do extrato éter de petróleo das raízes de *L. atropurpureus* mostra a predominância de flavanonas e flavanonóis (Quadro 2) como esperado pela quimiotaxonomia ³.

A espécie *Lonchocarpus dipteroneurus* é classificada da seguinte forma:

Família:	<i>Leguminosae(Fabaceae)</i>
Subfamília :	<i>Papilionoideae(Faboidae)</i>
Tribo:	<i>Milletieae</i>
Gênero:	<i>Lonchocarpus</i>
Subgênero:	<i>Lonchocarpus</i>
Seção:	<i>Lonchocarpus</i>
Espécie:	<i>Lonchocarpus dipteroneurus</i> Pittier

¹ PITTIER, H. The Middle American Species of *Lonchocarpus*. Contributions from the United States National Herbarium 20 (2): 90, 1917.

² SALES, B.H.L.N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth) - Leguminosae e Síntese de β -hidroxichalconas. Campinas, 1994, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

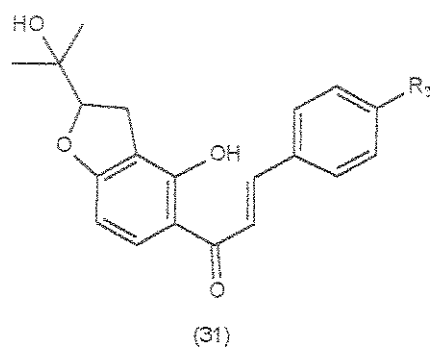
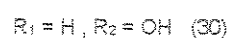
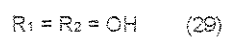
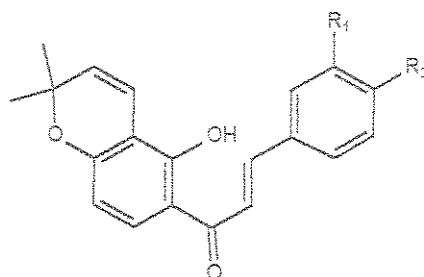
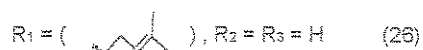
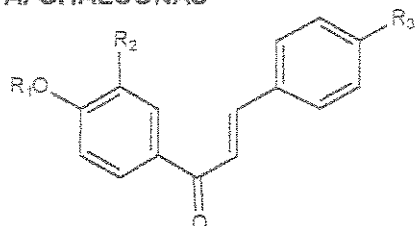
³ RUIZ, A.L.T.G. Estudo Fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth e de *Lonchocarpus atropurpureus* Benth - Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica. Campinas, 1998, Tese de Mestre em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

As sementes de várias espécies *Lonchocarpus* possuem aza-açúcares e amino ácidos não protéicos , sendo que nas sementes do *L. dipteroneurus* foi detectado a presença de arginina, PPN e enduracididina ⁴ (Quadro 3).

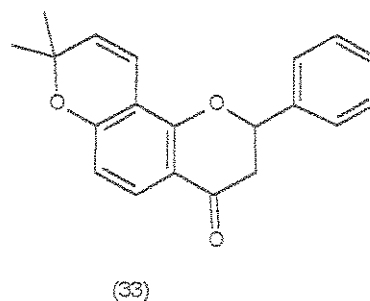
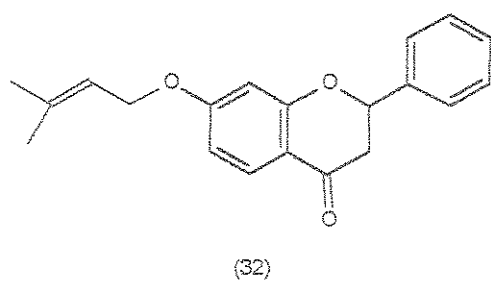
⁴ EVANS, S. V. , FELLOWS, L.E. & BELL, E.A. Distribution and Systematic Significance of Basic Non-Protein Amino Acids and Amines in the Tephrosieae. **Biochemical Systematic and Ecology** 13 (3) : 271-302, 1985.

Quadro 1 : Exemplos de Flavonóides isolados das espécies *L. guilleminiana* e *L. sericeus*²

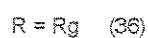
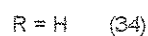
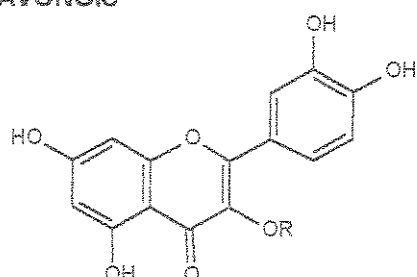
A. CHALCONAS



B. FLAVANONAS

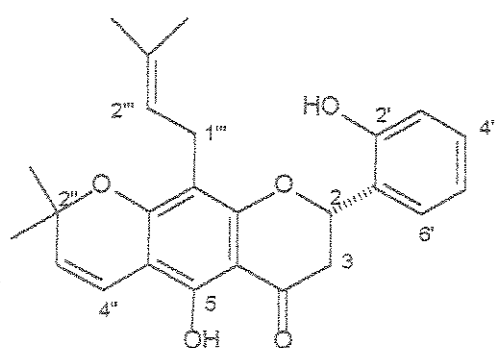


C. FLAVONÓIS

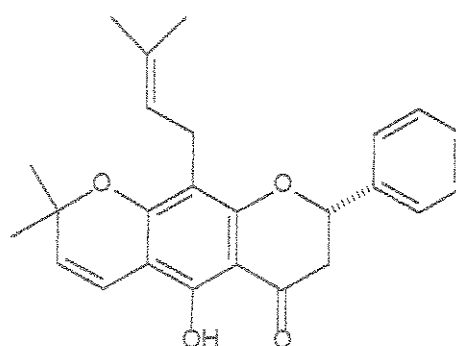


Quadro 2 : Flavanonas e Flavonóis isolados de
*L. atropurpureus*³

A. FLAVANONAS

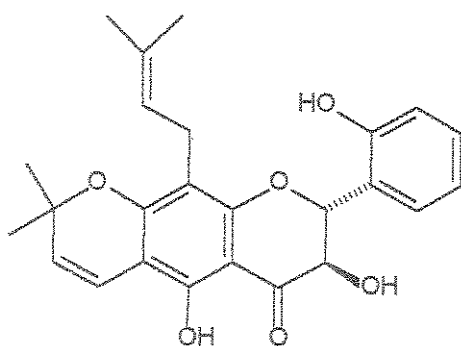


Minimiflorina (37)

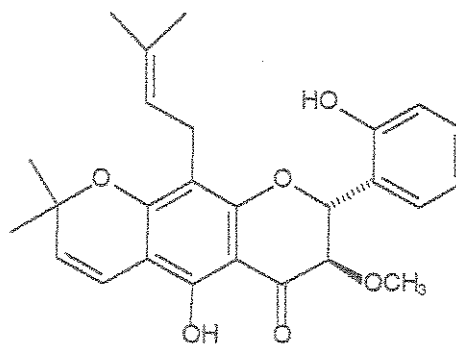


Mundulina (38)

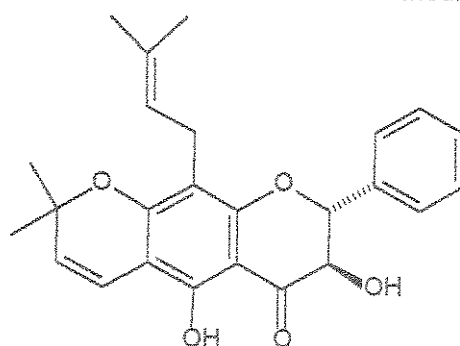
B. FLAVANONÓIS



Inédito (39)

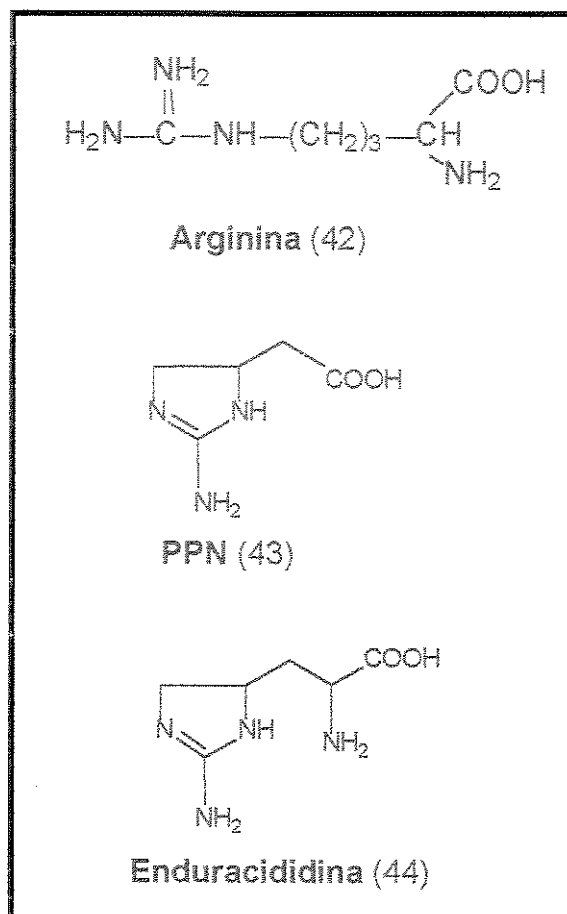


Inédito (40)



Mundulinol (41)

Quadro 3: Aminoácidos não protéicos isolados das sementes de *L. dipteroneurus*⁴



2. Materiais e Métodos

O espectro de RMN ^1H (totalmente desacoplado) foi obtido em equipamento Bruker AP-300 com campo de 7 Tesla a temperatura ambiente, sendo os compostos isolados dissolvidos em clorofórmio deuterado Merck.

As análises de CG/EM foram feitas em cromatógrafo gasoso CG Hewlett - Packard HP 5890 série 2 com uma coluna DB-5 (5% difenil, 95% dimetil polisiloxane), sob as seguintes condições: injetor a 290 °C, coluna a 50°C com razão de aquecimento de 15 °C

/min até 290 °C permanecendo assim por 10 min e interface com espectrômetro de massa HP 5970 a 285 °C.

As placas de CCD (Sílica gel GF₂₅₄, Merck sobre vidro) e as cromatofolhas de alumínio silicagel GF₂₅₄ 0,2 nm (Art. 1.05554, Merck) foram reveladas sob luz UV (254 e 364 nm) e nebulizadas com solução de anisaldeído modificada (etanol/anisaldeído/ácido sulfúrico/ác. acético 90:5:5:1) seguido de aquecimento das placas cromatográficas. As placas de CCP e CCD sobre suporte de vidro (espessura de 1 mm) foram preparadas no laboratório com sílica gel GF₂₅₄ (Merck).

As colunas de troca iônica e filtração em gel foram preparadas respectivamente com resina DOWEX - 50W (Sigma 50x8 – 400) e Sephadex Hipofilico LH-20-100 (Sigma).

2.1 Obtenção de Material Vegetal

Segmentos das raízes de *L. dipteroneurus* foram coletadas em março de 1997 no Parque Ecológico (UNICAMP) sob a orientação da Prof. Dr. A.M.G.Azevedo Tozzi (Dpto. De Botânica, IB da UNICAMP), especialista em taxonomia de Leguminosae.

2.2 Obtenção dos Extratos e Isolamento de Componentes

As raízes foram lavadas, cortadas em pedaços menores e secas numa estufa a 45 °C, seccionadas e moídas em moinho de faca Willey, fornecendo 195,7g de pó que foi extraído sucessivamente em Soxhlet com cada um dos seguintes solventes: éter de petróleo, diclorometano e metanol. Inicialmente se fez um estudo com pequena quantidade de raiz para observar o comportamento dos extratos em CCD. Assim, 26,4g de pó da raiz foi extraído sucessivamente com cada um dos seguintes solventes: éter de petróleo, diclorometano e metanol, obtendo-se:

Ext. Seco de Éter de Petróleo (EEP) = 0,0807 g

Ext. Seco de Diclorometano (EDM) = 0,1443 g

Ext. Seco de Metanol = 1,1505 g

Em seguida prosseguiu-se a extração com 176g de pó da raiz que resultou em:

Ext. Seco de Éter de Petróleo (EEP) = 0,4315 g

Ext. Seco de Diclorometano (EDM) = 1,1716 g

Ext. Seco de Metanol = 8,7655 g

deixando-se o material extraindo durante 160 horas com cada um dos solventes.

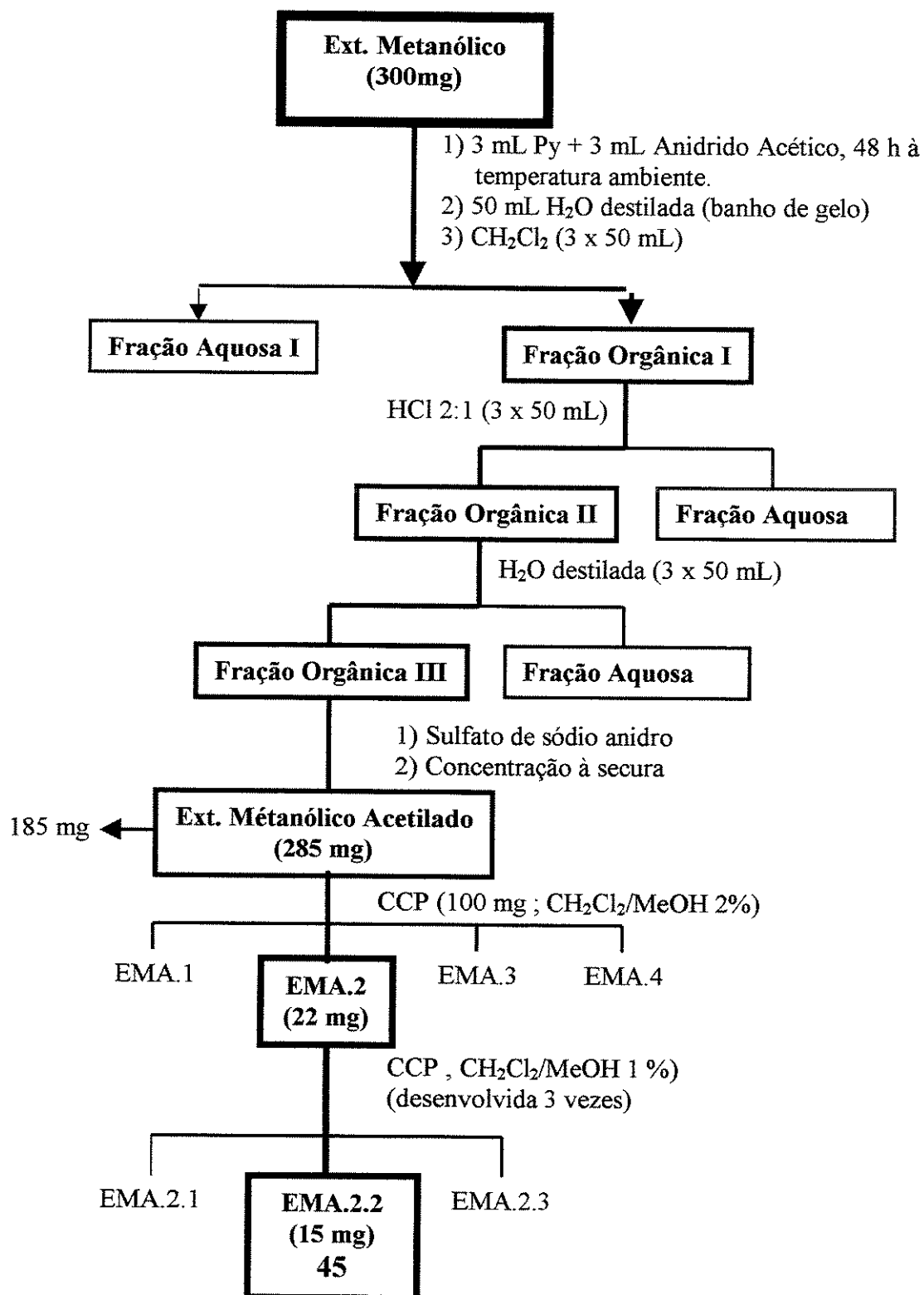
O extrato diclorometânico (1g) foi fracionado em coluna de sílica gel, eluída inicialmente com diclorometano aumentando a polaridade do eluente pela adição gradual de metanol até metanol puro, coletou-se 222 frações (cada uma de 30 mL) que após serem analisadas por CCD foram reunidas em 58 grupos.

Devido à alta polaridade do extrato metanólico, este foi acetilado para facilitar o isolamento de compostos em sílica gel; conseguiu-se somente isolar Sacarose peracetilada (45). A metodologia empregada apresenta-se no Fluxograma 1.

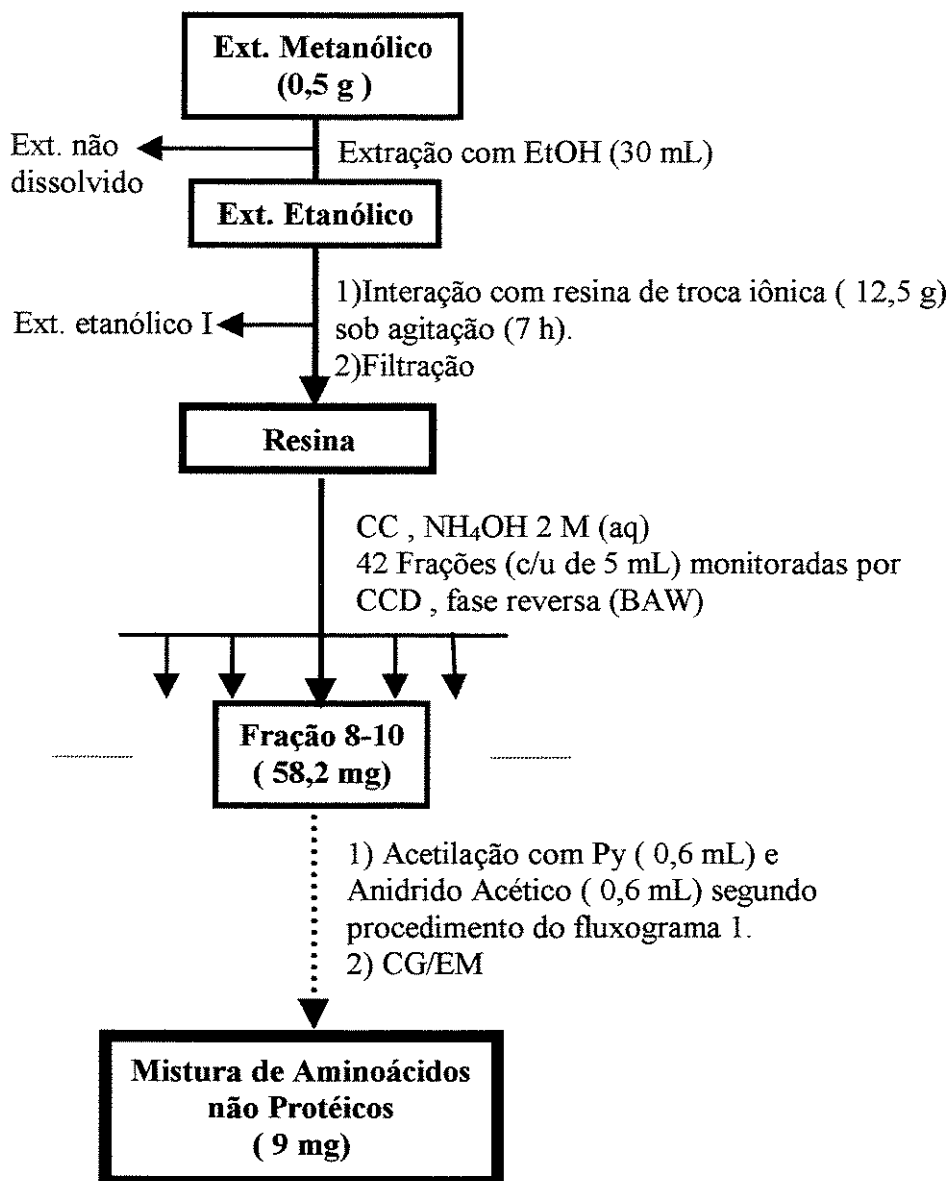
Na procura de aza-açúcares, aminoácidos não protéicos e flavonóides glicosilados, extraiu-se uma parte do extrato metanólico com EtOH e o novo extrato obtido foi deixado interagir com resina de troca iônica sob agitação. Uma vez filtrada, a resina foi colocada numa coluna de vidro e eluída com uma solução de NH_4OH 2M fornecendo 42 frações, das quais 8-10 apresentaram um melhor desenvolvimento em CCD de fase reversa (s.d. : BAW) e quando reveladas com ninidrina mostraram de 4 a 5 manchas arroxeadas. Estas frações foram então acetiladas e analisadas por CG/EM, indicando a presença de aminoácidos não protéicos (Fluxograma 2).

Outra parte do extrato metanólico (2 g) foi cromatografada em coluna de Sephadex LH-20 (50 x 2 cm) eluída com MeOH, fornecendo 62 frações. Através de CCD (s.d. : BAW), a fração 14 mostrou ser a menos complexa; quando revelada com anisaldeído modificado apresentou uma mancha principal de cor verde musgo e quando revelada com ninidrina apresentou a mesma mancha principal de cor laranja. Logo, 14 foi acetilado e cromatografado por CCP (s.d. : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%) fornecendo sacarose peracetilada 45 (Fluxograma 3).

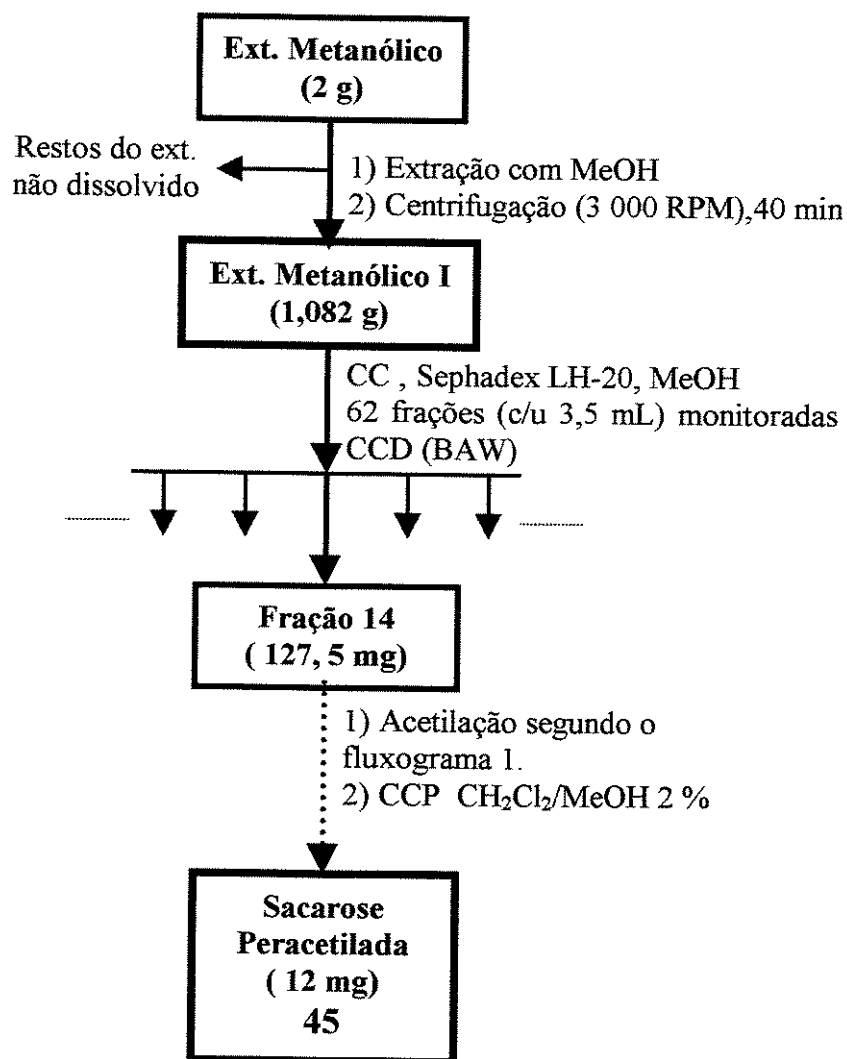
Numa nova tentativa de isolar aminoácidos não protéicos, 2 g do extrato metanólico foram tratados novamente com resina de troca iônica, mas neste caso o extrato amoniacal foi acetilado e metilado ao mesmo tempo para então ser analisado por CG/EM resultando ainda numa mistura complexa.



Fluxograma 1: Procedimento para acetilar o Extrato Metanólico e isolar a Sacarose Peracetilada 45

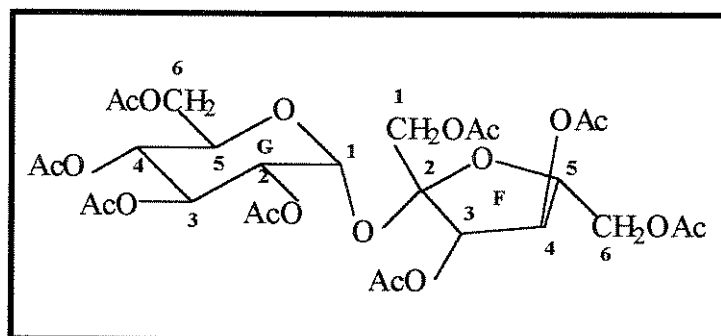


Fluxograma 2: Procedimento para separar Aza-Açúcares do Extrato Metanólico



Fluxograma 3: Procedimento para isolar flavonóides glicosilados do Extrato Metanólico

O-β-D-frutofuranosil-(2 → 1)-α-D-glicopiranosídeo peracetilado
Sacarose peracetilada 45



Aspecto físico: óleo amarelo

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): Anexo A, Tab. 1, Pág. 26 ; Anexo B, Fig. 1, Pág. 27.

EM (Anexo B, Fig. 2, Pág. 28): *m/z* (%) : 678 [M⁺] (ausente no espectro), 331 (24), 211(48), 169 (70), 127 (9), 109 (38), 97 (6), 43 (100).

3. Resultados e Discussões

As placas analíticas de CCD dos extratos das raízes de *L. dipteroneurus* não mostraram manchas distintas fortemente reveladas sob lâmpada UV como vem sendo observado para os extratos das espécies de *Lonchocarpus* estudados em nosso grupo de pesquisa (por exemplo *L. atropurpureus*) que são ricos em compostos flavonoídicos.

Em relação as demais espécies *Lonchocarpus* estudadas até agora, os baixos rendimentos obtidos com os extratos éter de petróleo (0,432 g) e diclorometânico (1,172 g) nos chamou a atenção.

Todas as tentativas de isolar compostos por CCP tanto do extrato éter de petróleo quanto do extrato diclorometânico sempre resultaram na obtenção de quantidades insignificantes de misturas (1 - 2 mg) impossibilitando qualquer proposta de elucidação estrutural.

Estes dados levantaram dúvidas quanto a identificação botânica de *L. dipteroneurus* Pittier. Mesmo assim continuamos nossa pesquisa visando o isolamento de compostos glicosilados e aminoácidos não protéicos . Então decidimos trabalhar com o extrato metanólico do qual tínhamos boa quantidade. Nosso grupo de pesquisa não tem uma metodologia implantada para isolar compostos deste tipo , então tentamos diferentes

métodos como : CC usando resina de troca iônica ou sephadex e estudando as frações por CLAE e CG/EM (derivado acetilado) e até reagindo com cloroformato de metila (as frações que revelaram com ninidrina) na tentativa de detectar a presença de aminoácidos não protéicos por CG/EM. Apesar de todas as tentativas isolamos apenas sacarose peracetilada e uma mistura de compostos nitrogenados provavelmente tratando-se de aminoácidos não protéicos devido à coloração característica após revelação com ninidrina e espectros de massas (CG/EM) apresentando picos moleculares com valores ímpares. Nenhum dos espectros de massa correspondem aos de aminoácidos isolados das sementes.

A fim de ter mais material vegetal em março deste ano fizemos uma nova coleta das raízes de *L. dipteroneurus*. O cromatograma (obtido por CLAE) do extrato éter de petróleo desta nova coleta apresentou um perfil cromatográfico totalmente diferente do anterior (Capítulo III, Fig. 4, Pág. 89). Esta diferença levantou novamente suspeita sobre a classificação botânica. Depois de um estudo extenso e minucioso a botânica A.M.G.Azevedo Tozzi corroborou que as duas raízes coletadas (uma em março de 1997 e a outra em março de 1998) são de plantas diferentes, e nenhuma pertence ao gênero *Lonchocarpus*. Este dado justifica o porque do não termos conseguido isolar nenhum flavonóide da primeira raiz coletada. Diante desta situação em junho de 1998 começamos a trabalhar com o extrato diclorometânico das raízes de *L. montanus* A.M.G.Azevedo (uma espécie brasileira inédita) cedida cordialmente por Míriam Sannomiya (aluna de doutorado de nosso grupo de pesquisa quem atualmente está trabalhando com o extrato éter de petróleo). Até o momento isolamos 4 flavonóides dos quais 2 pertencem a classes de flavonóides escassamente distribuídos na natureza.

Sacarose Peracetilada 45

O espectro de RMN ^1H (Anexo B, Fig. 1, Pág. 27) da sacarose peracetilada apresentou sinais em δ 2,02 e 2,18 (s) referentes às metilas dos grupos acetil, em 4,88 (dd, $J = 3,7$ e 10,3 Hz) ; 5,08 (t, $J = 9,7$ Hz) e 5,69 (d, $J = 3,7$ Hz) referentes aos hidrogênios H-2 , H-4 e H-1 do resíduo glicose. Estes dados foram confirmados pela literatura ⁵ (Anexo A, Tab. 1, Pág. 26) e pelos dados espectroscópicos da sacarose P.A. peracetilada .

⁵ NISHIDA, T., ENZELL, C.R. & MORRIS, G.A. Concerted use of homo and hetero-nuclear 2D NMR: ^{13}C and ^1H assignment of sucrose octacetate, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 24: 179-182, 1986.

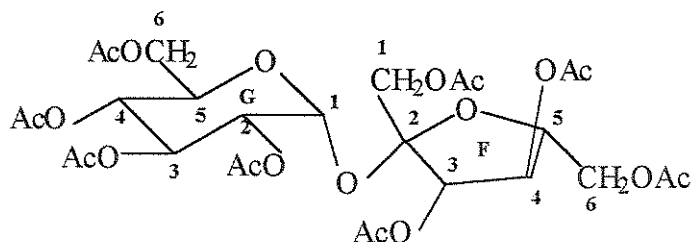
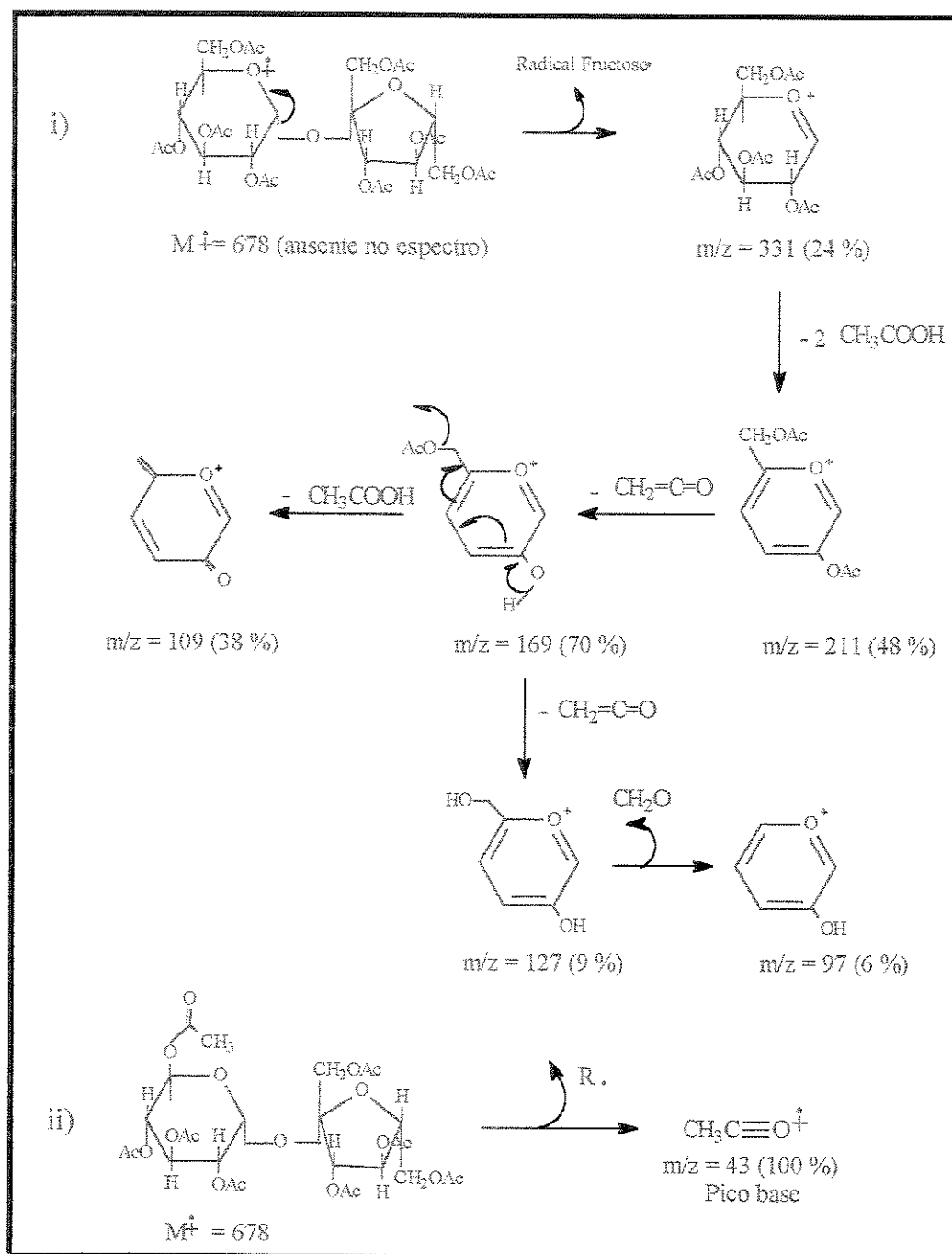


Fig. 1 : Estrutura de Sacarose Peracetilada

O espectro de massas da sacarose (Anexo B, Fig. 2, Pág. 28) mostrou os mesmos padrões de fragmentação da sacarose P.A. peracetilada. No Quadro 4 se apresenta uma proposta de fragmentação de sacarose peracetilada no Espectrômetro de Massas.

Quadro 4: Racionalização do Caminho de Fragmentação de Sacarose Peracetilada 45 no Espectrômetro de Massas



Anexo

A

Tabela 1 : Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de Sacarose Peracetilada 45

Sinal	$^1\text{H}_A$	$^1\text{H}_B$	C^1H_3_A	C^1H_3_B
G1	5,69	5,69	-	-
G2	4,87	4,88	2,10	2,10
G3	5,44	-	2,02	2,02
G4	5,08	5,08	2,05	2,05
G5	4,28*	-	-	-
G6	4,14* , 4,28*	-	2,10	2,10
F1	4,17	-	2,12	2,12
F2	-	-	-	-
F3	5,47	-	2,18	2,18
F4	5,36	-	2,11	2,11
F5	4,21	-	-	-
F6	4,35 , 4,29	-	2,12	2,12

A : dados da literatura¹ em CDCl_3 a 299,943 MHz

B : dados experimentais em CDCl_3 a 300,067 MHz

¹ NISHIDA, T., ENZELL, C.R. & MORRIS, G.A. Concerted use of homo and hetero-nuclear 2D NMR: ^{13}C nad ^1H assignment of sucrose octaacetate, **Magnetic Resonance in Chemistry**, 24: 179-182, 1986.

Anexo

B

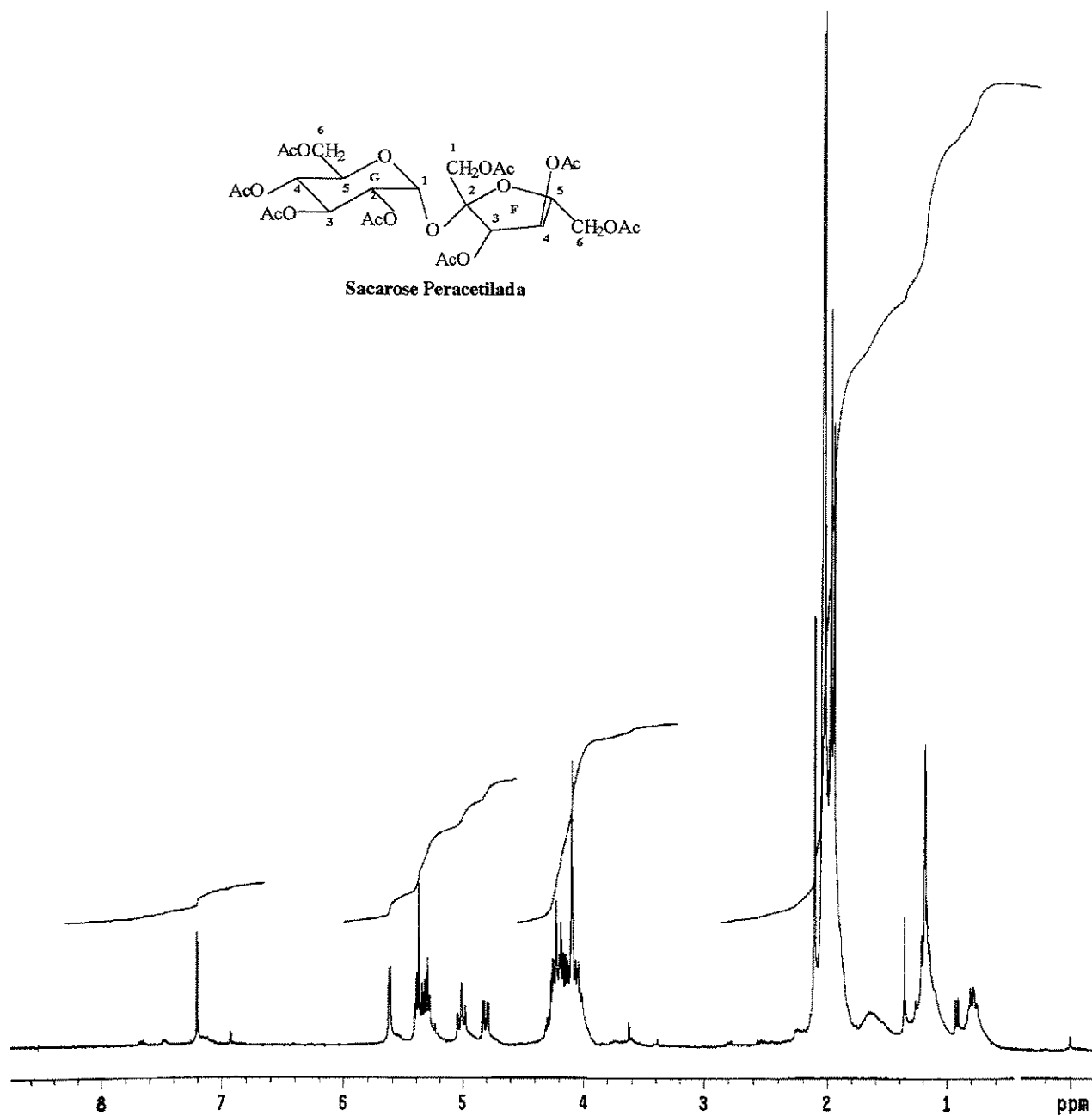


Figura 1: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de Sacarose Peracetilada **45**

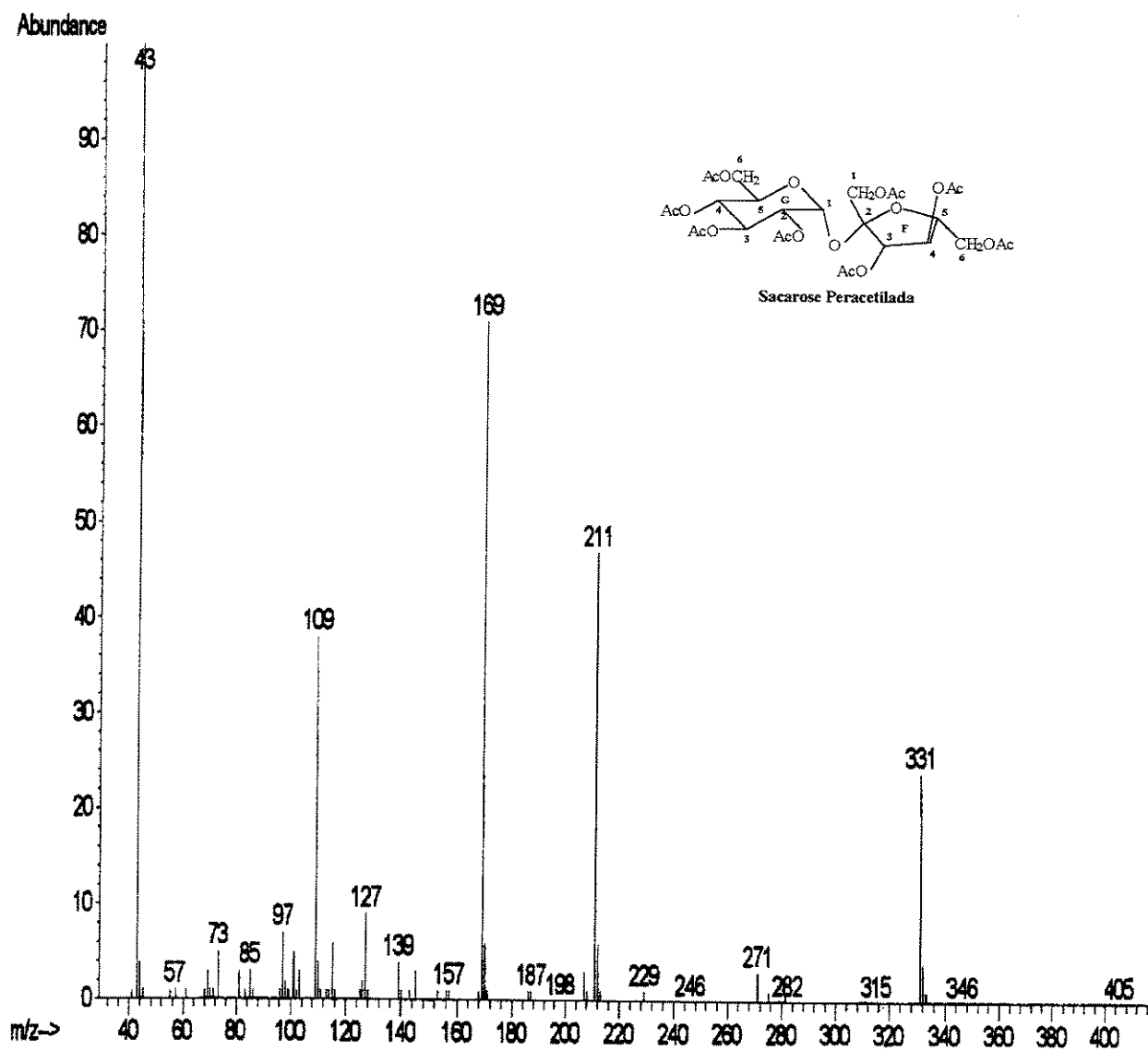


Figura 2: Espectro de Massas (IE, 70 eV)
de Sacarose Peracetilada 45

Capítulo

II

1. Introdução

A espécie *Lonchocarpus montanus* A.M.G.Azevedo é uma árvore de 5-8m de altura e tronco de 10-40 cm de diâmetro, com ramos lenhosos, congesta e finamente subestriados, subesfoliativos, escamosos, acinzentados, geralmente com lenticelas de tamanho e forma variados, pubérulos a glabros, quando velhos sem folhas; ramos jovens estriados, lenhosos, subangulares, densamente curto-vilosulos a esparso pubérulos, curtos de 2-10 cm comprimento e com 1-5 folhas; gema globosa, densamente moliserícea com tricomas canescentes e amarelados a rufescentes, sempre terminando os ramos; estípulas lenhosas (Fig. 1). É conhecido popularmente como “Cabelouro o carrancudo” na Bahia. *L. montanus* foi encontrado na Bahia (Chapadão Ocidental e Almadina), em Minas Gerais (Serra da Mantiqueira e Serra de Ouro Branco), e em Goiás (Chapada dos Veadeiros). Portanto a distribuição geográfica da espécie está associada a formações serranas. A espécie apresenta afinidades com *L. obtusus*, *L. macrocarpus* e *L. denudatus*. *L. montanus* é uma espécie com características próprias que a identificam facilmente tais como aspecto dos ramos e das folhas, o tipo de inflorescência, a estrutura floral e o fruto¹. Trata-se de uma espécie nativa inédita recentemente classificada por Ana Maria G.A.Tozzi. A única espécie nativa pertencente à seção Unguiflorae anteriormente estudada foi *L. obtusus*² que forneceu vários flavonóides incluindo um novo derivado de aurona então denominado de Derriobtusona A 53 (Quadro 1).

A planta *Lonchocarpus montanus* é classificada da seguinte forma :

- Família : Leguminosae (Fabaceae)
- Subfamília : Papilionoideae (Faboidae)
- Tribo : Millettieae
- Gênero : *Lonchocarpus*
- Subgênero : *Lonchocarpus* subg. *Lonchocarpus*
- Seção : *Lonchocarpus* sect. *Unguiflorae*

¹ TOZZI, A.M.G.A. Estudos Taxonômicos dos gêneros *Lonchocarpus kunth* e *Deguelia aubl.* No Brasil - Campinas, 1989, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Biologia, UNICAMP.

² NASCIMENTO, M.C, DIAS, R.L.V. & MORS, W. Flavonoids of *Derris obtusa*: Aurones and Auronols, *Phytochemistry*, 15 (15): 1553-1558, 1976.

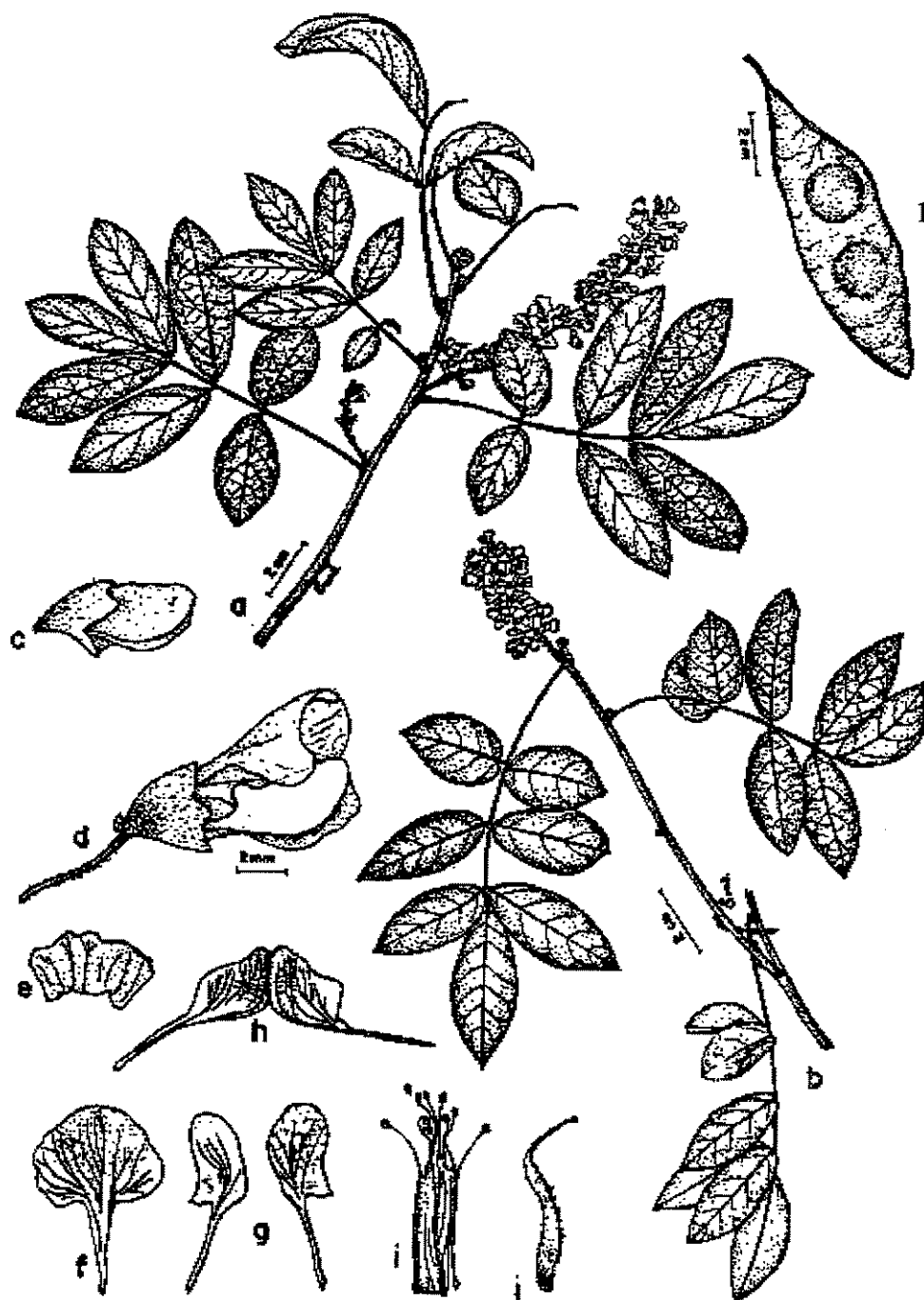
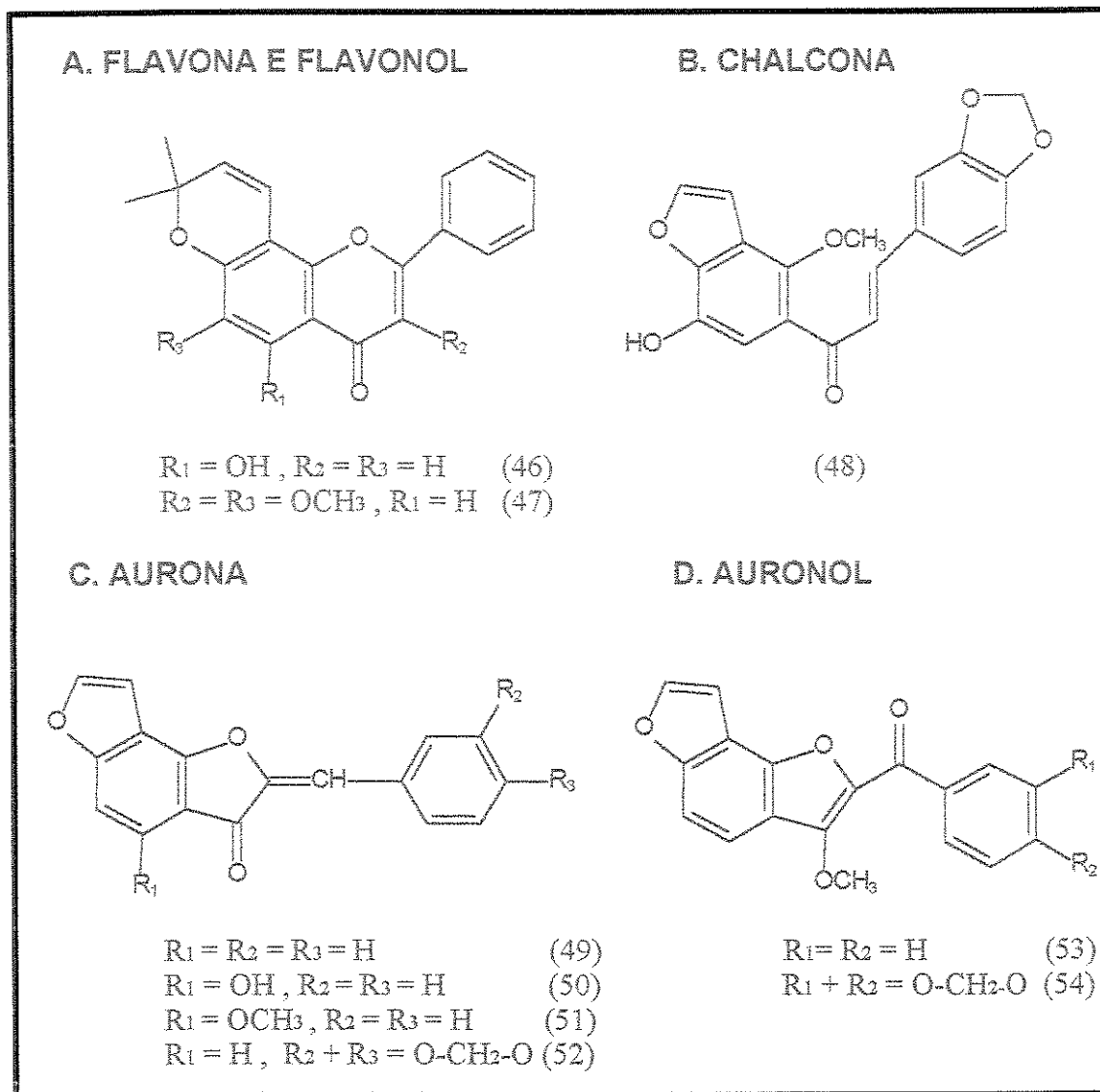


Figura 1¹: Partes de uma espécie de *L. montanus*

- a) ramo com inflorescência (GLAZIOU 14658) ; b) ramo com inflorescência (GLAZIOU 12597) ; c) botão floral ; d) flor ; e) cálice ; f) estandarte ; g) assas ; h) quilha ; i) androceu ; j) gineceu (GLAZIOU 14658) ; l) fruto (HARLEY 22003)

Quadro 1: Flavonóides isolados de *L. obtusus*²

Espécie : *Lonchocarpus montanus* A.M.G.Azevedo

2. Materiais e Métodos

A maioria dos espectros monodimensionais de RMN (1H e de ^{13}C totalmente desacoplado e DEPT) e bidimensionais (HSQC, HMQC e COSY) foram adquiridos em equipamento INOVA 500 (VARIAN) com campo de 11 Tesla, a temperatura ambiente, sendo os compostos isolados dissolvidos em clorofórmio deuterado grau espectroscópico

da Merck e só alguns espectros de RMN (^1H e de ^{13}C totalmente desacoplado) foram obtidos em equipamento Bruker AP-300 com campo de 7 Tesla.

As análises de CG/EM foram feitas em cromatógrafo gasoso CG Hewlett - Packard HP 5890-II com uma coluna DB-5 (5% difenil, 95% dimetil polisiloxane) sob as seguintes condições: injetor a 290°C, coluna a 50°C com razão de aquecimento de 15°C /min até 290°C permanecendo assim por 10 min e interface com espectrômetro de massa HP 5970 a 285°C.

Os espectros de absorção no ultravioleta e visível (UV-VIS) foram registrados tanto no espectrofotômetro HP 8452A Diode Array Spectrophotometer (56) quanto no CARY 5G UV-VIS NIR Spectrophotometer (53, 56 e 57). O solvente utilizado foi metanol grau HPLC e cela de quartzo de 1cm. Os valores de absorvidade molar (ϵ) foram calculados por :

$$\epsilon = A / l.c \text{ , onde } \epsilon = \text{absorvidade molar}$$

c = concentração molar do composto

l = caminho ótico da cela

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram adquiridos em um espectrofotômetro Perkin Elmer 1600 (FTIR) em pastilhas de KBr (para sólidos) ou filme sobre cela de NaCl (para líquido) utilizando diclorometano grau espectroscópico.

Os pontos de fusão foram determinados em uma placa aquecedora tipo Kofler, acoplada a um microscópio modelo Thermopan (C. Reichert Optische Werke A.G.).

As placas de CCDA (Merck Sílica gel GF₂₅₄, sobre vidro) e as cromatofolhas de alumínio silicagel GF₂₅₄ 0,2 nm (Art. 1.05554, Merck) foram reveladas sob luz UV (254 e 364 nm) e nebulizadas com solução de anisaldeído modificada (etanol/anisaldeído/ácido sulfúrico/ác. acético 90:5:5:1) seguido de aquecimento das placas cromatográficas. As placas de CCDP e CCDA sobre suporte de vidro (espessura 1 mm) foram preparadas no laboratório com sílica gel GF₂₅₄ (Merck).

As cromatografias em coluna foram realizadas em coluna relâmpago (flash) (50 x 5,7 cm) utilizando sílica gel 60 (40-63 μm , 175g) da Merk³.

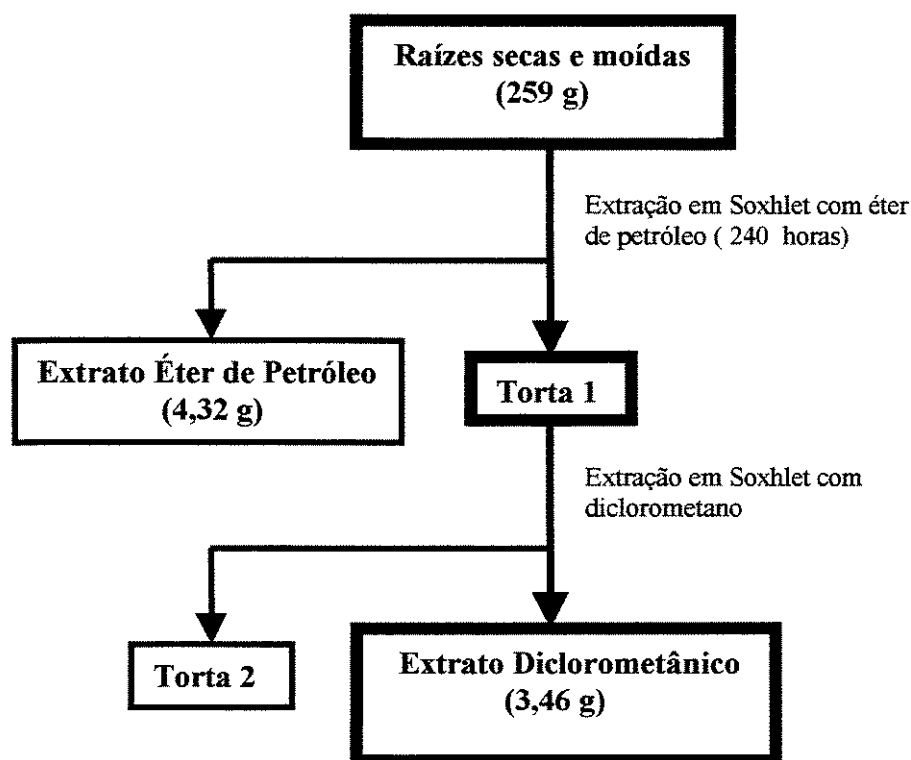
³ STILL, W. C., KAHN, M. & MITRA, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.*, 43 (14): 2923-2925, 1978.

2.1. Obtenção de Material Vegetal

Segmentos de raízes (259g) de um espécime de *L. montanus* foram coletados na Chapada dos Veadeiros (Goiás - Brasil) pelo botânico Benedito Pereira em 1998 e identificados pela Profa. Dra. Ana Maria de Azevedo Tozzi (Depto. Botânica - IB - UNICAMP).

2.2. Obtenção dos Extratos e Isolamento dos Componentes

Segmentos das raízes foram secas, moídas e logo extraídas sucessivamente em Soxhlet com éter de petróleo e diclorometano fornecendo **4,32g** do extrato éter de petróleo (EEP) e **3,46g** do extrato diclorometânico (EDM). Ver Fluxograma 1.



Fluxograma 1: Extração em Soxhlet das raízes de *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo

O extrato EDM (100 mg) foi fracionado em CCP desenvolvida com CHCl_3 100% resultando em 4 frações. A fração 3 (24,8 mg) foi purificada por CCP desenvolvida com Hex/AcOEt/ CHCl_3 (35:5:5) fornecendo um sólido branco-amarelado (5,3 mg) posteriormente identificado com **Derriobtusona A**, **53**. As outras frações foram obtidas em pequena quantidade e não foram analisadas.

Assim, o extrato EDM (2,4 g) foi fracionado em coluna flash com sílica gel 60 inicialmente eluída com éter de petróleo. A polaridade do eluente foi aumentada pela adição gradual de CHCl_3 seguido de MeOH até MeOH puro, fornecendo 501 frações (cada uma de 30 mL). Estas frações foram monitoradas por CCD e reunidas em 49 grupos (Tab. 1).

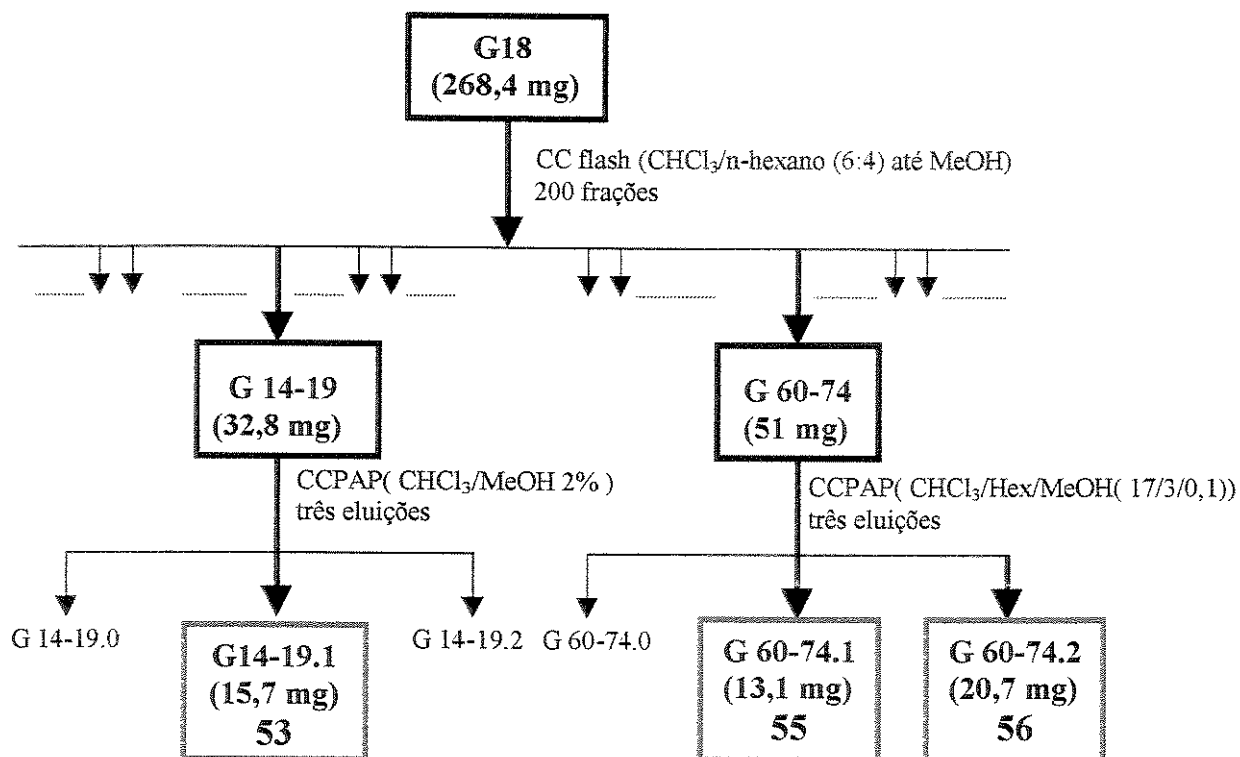
TABELA 1 : Frações obtidas da coluna flash do Extrato Diclorometânico das raízes de *L. montanus* A.M.G. Azevedo

Frações	Grupo (G)	Massa (mg)	Eluente	Compostos isolados
1-15	1	27,4	EP/ CHCl_3 (1:1)	Derriobtusona A, (E)-7-OMe Pongamol e Lanceolatina B.
16-24	2	13,2		
25-28	3	7		
29-43	4	15,9		
44-51	5	4,7		
52-58	6	4,2		
59-64	7	3,3		
65-73	8	5,8		
74-78	9	3,4		
79-91	10	7,6		
92-93	11	1,3		
94-95	12	1,9		
96-101	13	11,2		
102-105	14	7,9		
106-112	15	18,7		
113-121	16	41,1		
122-125	17	26,6		
126-135	★†18	268,4		
136-143	19	199,1	EP/ CHCl_3 (3:7)	Lanceolatina B e (E)-7-OMe Pongamol
144-147	20	59,8		
148-153	21	82,3		
154-161	★22	45,3		
162-167	23	19,9		
168-193	24	38,3	EP/ CHCl_3 (3:7)	Medicarpina
194-265	★25	64,8		

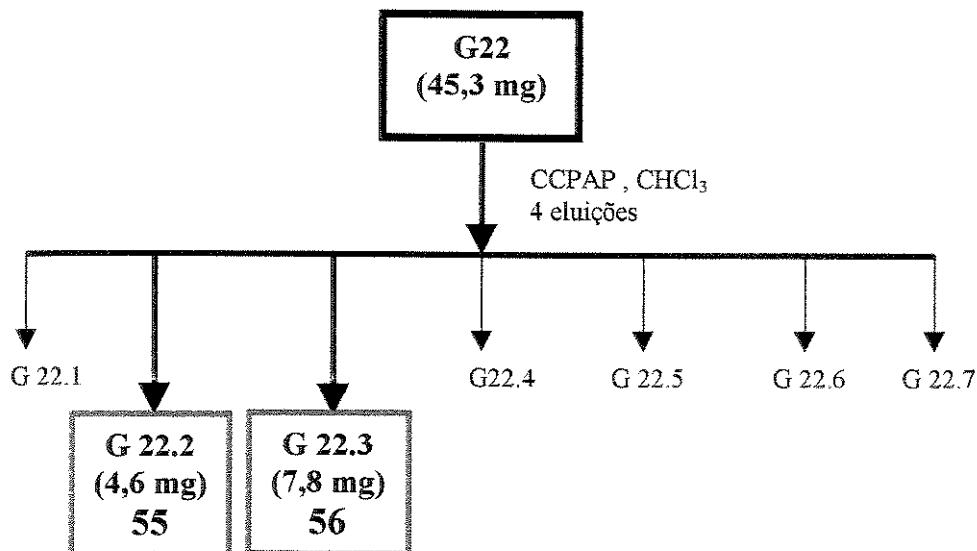
Frações	Grupo (G)	Massa (mg)	Eluente	Compostos Isolados
266-295	☆26	51,6	CHCl ₃ 100%	Medicarpina
296-300	☆☆27	244,9	CHCl ₃ / MeOH 2,5%	
301-305	☆☆28	200,3		
306-313	☆☆29	90,7		
314-321	30	48,3		
322-329	31	33,9	CHCl ₃ /MeOH 4%	
330-331	32	7,7		
332-335	33	15,7		
336-341	34	24,6	CHCl ₃ /MeOH 6%	
342-351	35	73,4		
352-359	36	35,9		
360-367	37	17,7	CHCl ₃ /MeOH 8%	
368-374	38	24,3		
375-378	39	8,1		
379-385	40	12,9		
386-411	41	49,4	CHCl ₃ /MeOH 18%	
412-418	42	32,9	CHCl ₃ /MeOH 25%	
419-425	43	19,2		
426-429	44	12,5	CHCl ₃ /MeOH 30%	
430-441	45	7	CHCl ₃ /MeOH 40%	
442-457	46	23,3	CHCl ₃ /MeOH 70%	
458-481	47	48,1	CHCl ₃ /MeOH 80%	
482-500	48	13,8	MeOH 100%	
501	49	50		

☆ Grupos de frações estudadas, ☆☆ Mistura complexa de compostos, † Submetido a coluna flash.

Os fluxogramas a seguir mostram em detalhes todo o processo de isolamento. Os valores entre parêntesis correspondem às massas expressas em miligramas e as subfrações destacadas aos produtos naturais isolados e identificados, cujos dados físicos são mostrados em seguida.

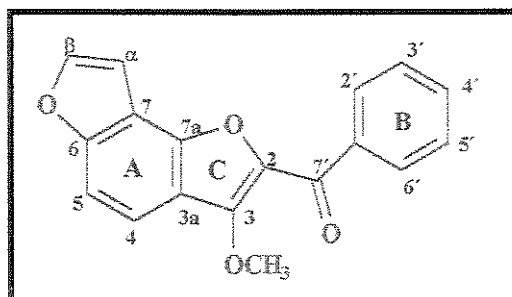


Fluxograma 2: Metodologia de isolamento de Derriobtusona A **53**, (*E*)-7-OMe Pongamol **55** e de Lanceolatina B **56**



Fluxograma 3: Metodologia de isolamento de (*E*)-7- OMe Pongamol **55** e de Lanceolatina B **56**

3-metoxi-[α , β : 6,7]-furanoauronol
Derriobtusona A



Aspecto Físico: cristais grandes na forma de agulha creme (EtOH, solvente de cristalização)

P.F.: 132° C , o mesmo valor que a literatura²

UV (Anexo D, Fig. 5, Pág. 67) ($c = 0,076 \times 10^{-5}$ M; MeOH; $l = 1$ cm) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) , (log ϵ) : 224 (2,29); 260 (2,11) ; 326 (2,12).

IV (Anexo D, Fig. 5, Pág. 67) (**filme, cm^{-1}**): 1 613, 1 593, 1 560, 1 440, 1 049, 758, 724, 691.

RMN ^1H (Anexo D, Fig. 1, Pág. 63) (**500 MHz, CDCl_3**): Anexo C, Tab. 1, Pág. 57.

RMN ^{13}C e DEPT (Fig. 2, Pág. 64) (**125 MHz, CDCl_3**): Anexo C, Tab. 2, Pág. 57.

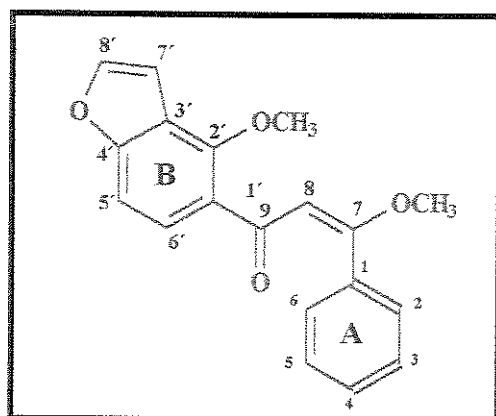
EM (Anexo D, Fig. 4 , Pág. 66) **m/z (%)**: 292 [M^+] (80) , 277 (13) , 275 (22), 263 (8), 215 (9), 187 (11), 144 (27), 11(35), 105 (58), 77 (100), 51 (25).

COSY (Anexo D, Fig. 3, Pág. 65) : Anexo C, Tab. 3, Pág. 58.

HSQC e HMBC (Anexo D, Fig. 3 (Pág. 65) e Fig. 4 (Pág. 66)) : Anexo C, Tab. 4, Pág. 58.

² NASCIMENTO, M.C, DIAS, R.L.V. & MORS, W. Flavonoids of *Derris obtusa*: Aurones and Auronols, *Phytochemistry*, 15 (15): 1553-1558, 1976.

(E) - 2'- metoxi-[8',7': 4',3']-furano-7-metoxichalcona
(E)-7-OMe Pongamol



Aspecto Físico: óleo amarelo

UV (Anexo D, Fig. 12, Pág. 74) ($c = 2,27 \times 10^{-5}$ M; MeOH; $l = 1$ cm) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) , (log ϵ)
: 243 (4,15) , 296 (3,95).

IV (Anexo D, Fig. 12, Pág. 74)(filme, cm^{-1}): 1 653, 1 600, 1 587, 1 560, 1 063.

RMN ^1H (Anexo D, Fig. 6, Pág. 68) (500 MHz, CDCl_3): Tab. 5, Pág. 59

RMN ^{13}C (Anexo D, Fig. 7, Pág. 69) (125 MHz, CDCl_3): Tab. 6, Pág. 59

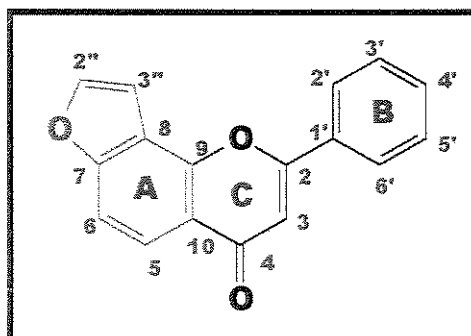
EM (Anexo D, Fig. 11, Pág. 73) m/z (%): 308[M^+] (46), 307 (47), 291 (72), 277 (25),
263 (37), 231 (5), 175 (90), 161 (100), 149 (39), 133 (20), 115 (24), 105(77), 91(31),
77(34), 57 (50).

DEPT e NOE : Anexo D, Fig. 8, Pág. 70.

COSY (Anexo D, Fig. 9, Pág. 71) : Anexo C, Tab. 7, Pág. 60.

HSQC e HMBC (Anexo D, Fig. 10, Pág. 72) : Anexo C, Tab. 8, Pág. 60.

(2'', 3'':7, 8)-Furanoflavona
Lanceolatina B



Aspecto Físico: cristais grandes na forma de agulhas incolores (Acetona/Éter etílico)

P.F.: 128-131° C (lit⁴ 134-137° C)

UV (Anexo D, Fig. 16, Pág. 78) ($c = 4,9 \times 10^{-5}$ M; MeOH; $l = 1$ cm) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) , ($\log \epsilon$)
: 264 (4,19) , 298 (4,07)

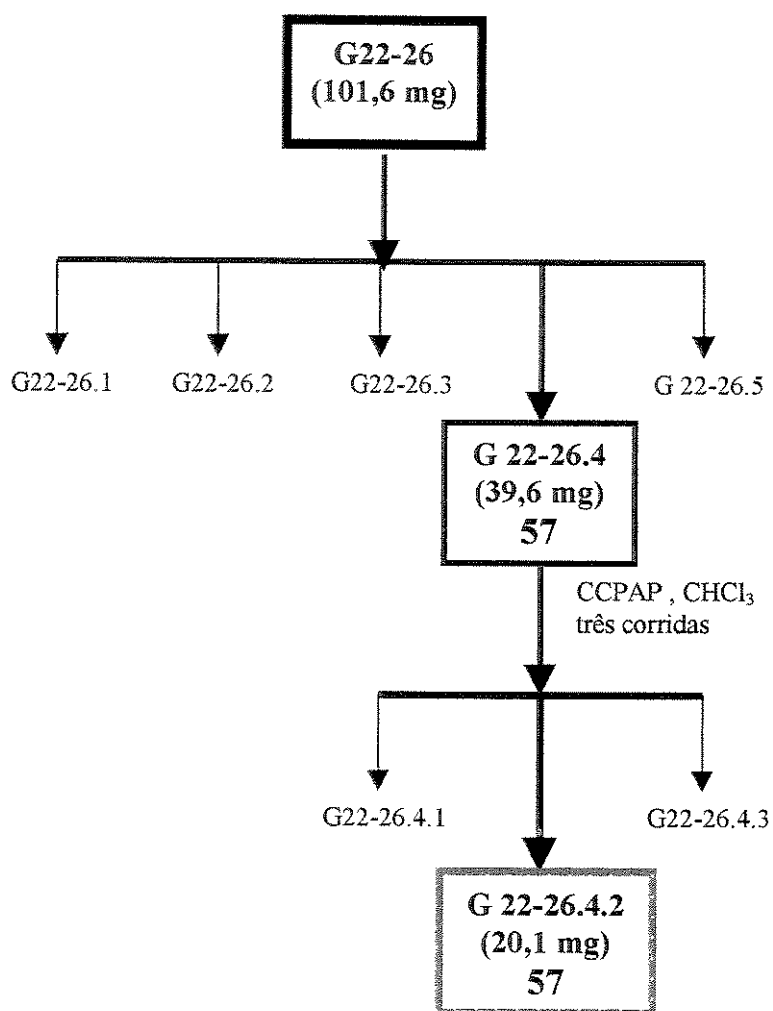
IV (Anexo D, Fig. 16, Pág. 78)(KBr, cm^{-1}): 1 640, 1 607, 1 448, 1 361, 1 070, 850, 758.

RMN ¹H (Anexo D, Fig. 13, Pág. 75) (500 MHz, CDCl_3): Tab. 9 , Pág. 61

RMN ¹³C (Anexo D, Fig. 14, Pág. 76) (125 MHz, CDCl_3): Tab. 10, Pág. 61

EM (Fig.15, Pág. 77) m/z (%): 262 [M^+] (94), 234 (21), 160 (1 00), 132 (19), 102 (15), 76 (48).

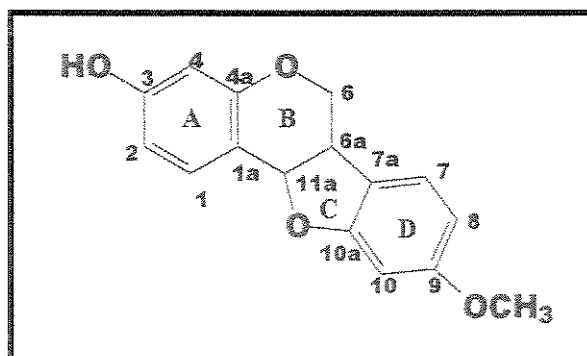
⁴ GARCEZ, F.R., SCRAMIN, S., NASCIMENTO, M.C. & MORS, W. Prenylated Flavonoids as Evolutionary Indicators in the Genus *Dahlstedtia*, *Phytochemistry*, 27 (4): 1079-1083, 1988.



Fluxograma 4: Metodologia de isolamento de Medicarpina 57

3-hidroxi-9-metoxi-pterocarpano

Medicarpina



Aspecto Físico: cristais creme grandes

P.F.: não determinado

UV (Anexo D, Fig. 19, Pág. 81) ($c = 5,4 \times 10^{-5}$ M; MeOH; $l = 1$ cm) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) , ($\log \epsilon$)

: 282 (3,88) , 287 (3,93) , 311 (3,2)

RMN ^1H (Anexo D, Fig. 17, Pág. 79) (**500 MHz, CDCl_3**): Tab. 11, Pág. 62

RMN ^{13}C (Anexo D, Fig. 18, Pág. 80) (**125 MHz, CDCl_3**): Tab. 12, Pág. 62

3. Resultados e Discussões

Do extrato diclorometânico das raízes de *L. montanus* foram isolados quatro flavonóides (Quadro2), sendo um auronol metilado (**Derriobtusona A** , 53), uma β -OH chalcona metilada ((*E*)-7-OMe Pongamol, 55) , uma flavona (**Lanceolatina B**, 56) e um pterocarpano (**Medicarpina** , 57). Estes compostos já foram isolados de outras espécies dos géneros *Lonchocarpus* e *Tephrosia*. Tanto o auronol metilado quanto a β - OMe chalcona pertencem a classes de flavonóides raramente encontrados na natureza.

As respectivas estruturas moléculares foram determinadas pelos dados espectroscópicos de RMN ^1H , diferença de NOE, RMN ^{13}C , EM, IV e UV. Quanto as propriedades espectrais de RMN se explorou também a análise dos espectros bidimensionais (COSY, HMBC e HSQC). As características espectrais dos flavonóides já estão documentadas na literatura (HARBORNE⁵, 1996 e AGRAWAL⁶, 1989) e vem sendo amplamente exploradas pelo nosso grupo de pesquisa (SALES⁷,1994; BLANCO⁸, 1995; NOGUEIRA⁹, 1998; RUIZ¹⁰, 1998 e FIRMINO¹¹, 1998).

⁵ HARBORNE, J.B. The Flavonoids Advances in Research since 1986, Chapman & Hall, London, Cap. 9, 1996.

⁶ AGRAWAL, P.K. Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Science Publishing Company Inc, Amsterdam, Cap. 1 e 5, 1989.

⁷ SALES, B.H.L.N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth) - Leguminosae e Síntese de β -hidroxichalconas - Campinas, 1994, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química , UNICAMP.

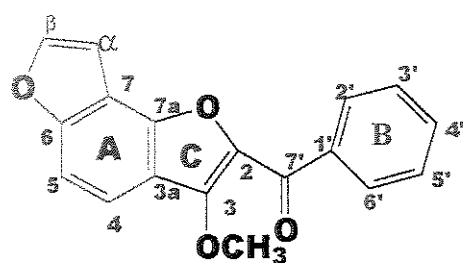
⁸ BLANCO, I.S. Flavonóides de *Lonchocarpus muehlbergianus* e Síntese de flavanas 4-oxigenadas - Campinas, 1995, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química , UNICAMP.

⁹ NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae - Isolamento, Determinação Estrutural , Atividade Biológica e Análise Sazonal - Campinas, 1998, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

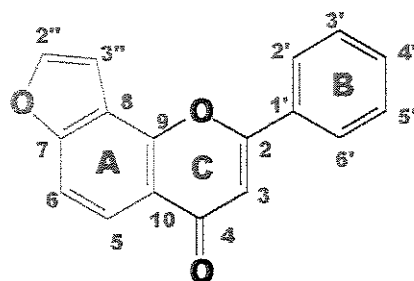
¹⁰ RUIZ, A.L.T.G. Estudo Fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth e de *Lonchocarpus atropurpureus* Benth - Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica - Campinas, 1998, Tese de Mestre em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

¹¹ FIRMINO, C.A. Estudo Fitoquímico das raízes de *Lonchocarpus campestris*-Tozzi- Campinas, 1998, Tese de Mestre em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

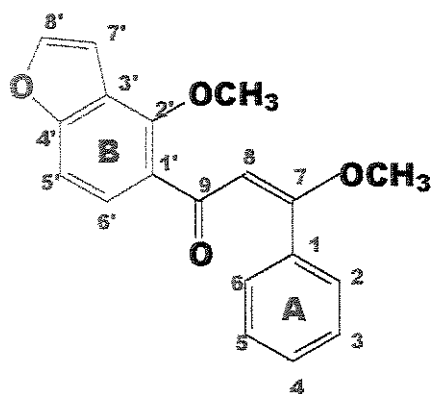
Quadro 2 : Compostos isolados do Extrato Diclorometânico das raízes de *L. montanus*
A.M.G.Azevedo



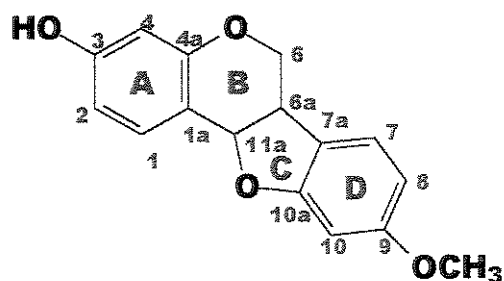
Derriobtusona A 53



Lanceolatina B 56



(E)-7-OMe Pongamol 55

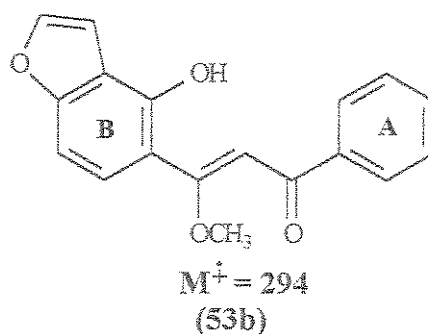
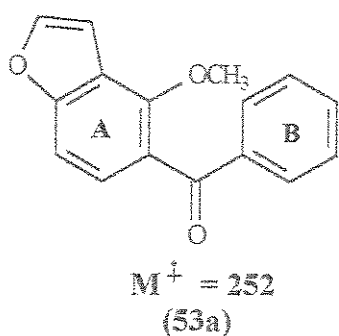


Medicarpina 57

A seguir descreveremos a elucidação estrutural dos compostos isolados:

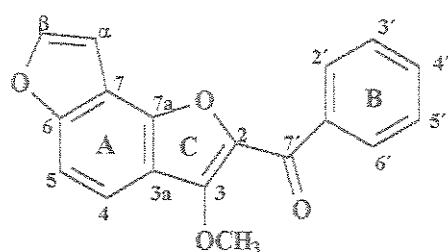
3.1 DERRIOBTUSONA A 53

A integração dos sinais no espectro de RMN ^1H (Anexo D, Fig. 1, Pág. 63; Anexo C, Tab.1, Pág. 57) mostrou nove hidrogênios além dos três hidrogênios de um grupo metoxílico (s , $\delta = 4,2$) ligado a anel aromático. Os sinais em δ 7,11 (1H, dd , $J = 2$ Hz e $J = 1$ Hz) e 7,73 (1H, d , $J = 2$ Hz) sugerem a presença de um anel furano enquanto que o dublete em δ 7,71 (1H, d , $J = 9$ Hz) e o duplo dublete em 7,52 (1H, dd , $J = 9$ Hz e $J = 1$ Hz) são referentes a dois hidrogênios aromáticos acoplados em orto. Já o multiplete em δ 7,52-7-55 (2H, m), o triplo tripleto em δ 7,62 (3H, tt , $J = 7,5$ Hz, $J = 2$ Hz e $J = 1$ Hz) e o sinal em δ 8,03 (2H, m) referem-se aos hidrogênios de um anel aromático monossustituído. A análise dos espectros de RMN ^{13}C (totalmente desacoplado e DEPT 90° e 135° , Anexo D, Fig. 2, Pág. 64) nos permitiu detectar 7 CH , 1 OCH_3 e 6 sinais de C quaternários sendo que um deles corresponde a um grupo carbonila (δ 183,8). Com estes sugerimos a estrutura da benzofuranona **53a**, entretanto comparando os nossos dados de RMN com o espectro simulado para **53a** através do programa ACD Labs verificamos que os sinais não coincidem.

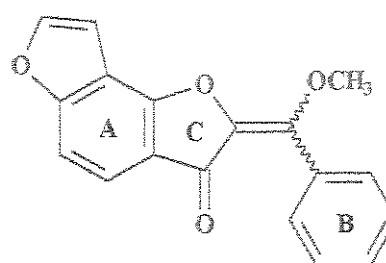


O espectro de massas para **53** (Anexo D, Fig. 4, Pág. 66) apresentou pico relativo ao íon molecular M^+ 292 (80,4 %). O pico base em $m/z = 77$ (100%) e o pico $m/z = 105$ (58 %), confirmam a presença de um anel aromático monossustituído ligado a um grupo carbonila.

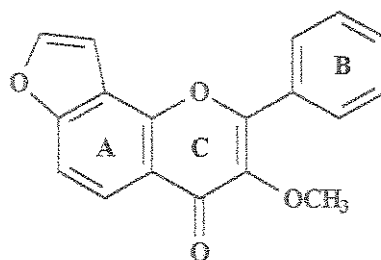
Logo, o composto **53** tem 40 u.m.a.a mais do que **53a**, o que poderia implicar na presença de 1 átomo de oxigênio e 2 átomos de carbono. Novamente sugerimos várias estruturas possíveis para **53**; pensamos num derivado de pongamol do tipo **53b** já que o pongamol encontra-se como composto principal no extrato éter de petróleo das raízes de *L. montanus* A.M.G. Azevedo, entretanto o seu peso molecular é 294. Pensando na hipóteses de um terceiro anel (anel C) temos várias estruturas isoméricas com peso molecular de 292 tais como as estruturas **53**, **53c** e **53d**.



(53)



(53c)

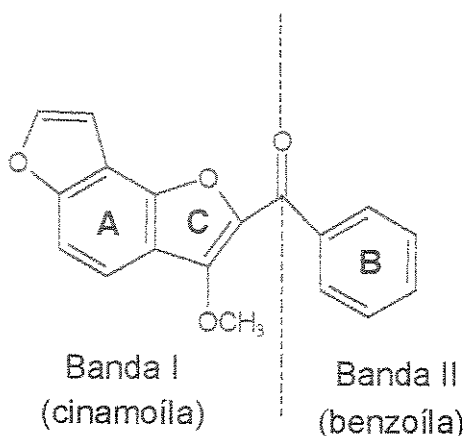


(53d)

A estrutura **53d** foi descartada porque corresponde à Karanjina⁹, uma flavona já isolada em nosso grupo de pesquisa, cujos dados espectrais não coincidem.

No espectro de UV as absorções com $\lambda_{\text{max}} = 224$, 260 e 326 nm (Anexo D, Fig.5, Pág. 67) referem-se aos grupos cromóforos benzoíla e cinamoíla presentes no esqueleto de um auronol e de uma flavona:

⁹ NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae - Isolamento, Determinação Estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal - Campinas, 1998, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.



Nesta elucidação estrutural, a análise do espectro de massas foi uma ferramenta importante, sugerindo a estrutura de um auronol, uma vez que não forneceu os picos correspondentes aos fragmentos do clivagem RDA do anel C característico de flavonas. Estes dados nos levaram a concluir que se trata do auronol **53**. Um pico muito interessante no espectro de massas foi o de $[M-17]$ que presumivelmente provem da perda do radical OH. No Quadro 3, apresentamos uma proposta do caminho de fragmentação do composto **53**. Com base apenas nos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C , não pensamos imediatamente em propor um esqueleto como dos auronóis, por que esta classe de flavonóides é bastante rara. Uma vez sugerida a estrutura do composto **53** fizemos um minucioso levantamento bibliográfico descobrindo que trata-se do primeiro auronol (**Derriobtusona A**) encontrado na natureza, previamente isolado apenas de *Lonchocarpus obtusus*² quando foram obtidos apenas os espectros de UV, IV, RMN ^1H (100 MHz) e de Massas (70 eV). Além disso, foi também o primeiro auronol isolado em nosso grupo de pesquisa em 10 anos de trabalho com isolamento e determinação estrutural de flavonóides. Até o momento, a literatura reporta o isolamento de apenas 30 auronas.

Os experimentos bidimensionais HSQC (Anexo D, Fig.3 , Pág. 65 ; Anexo C, Tab.4, Pág.58) e HMBC (Anexo D, Fig. 4 , Pág. 66 ; Anexo C, Tab.4, Pág. 58) permitiram

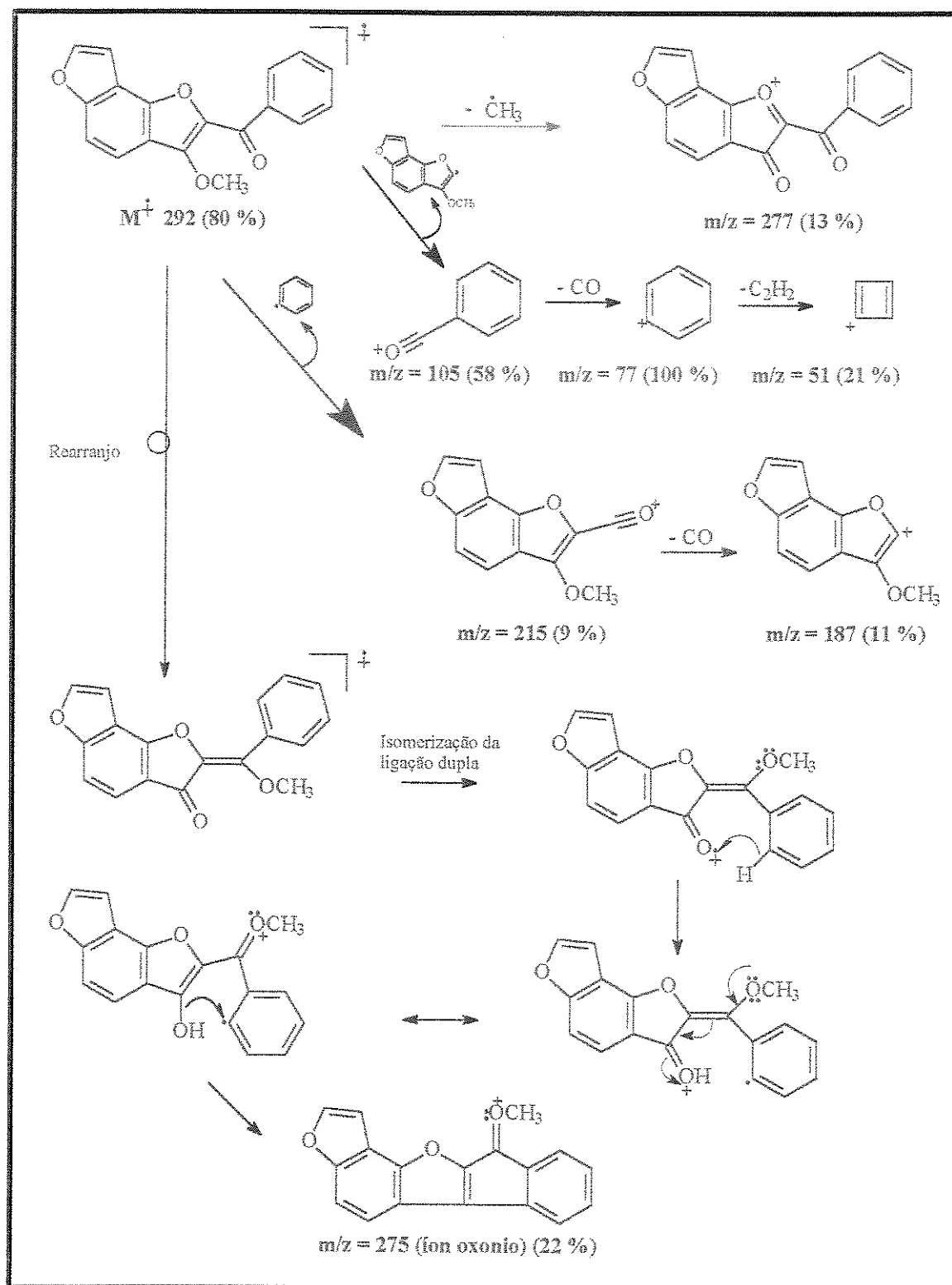
² NASCIMENTO, M.C, DIAS, R.L.V. & MORS, W. Flavonoids of *Derris obtusa*: Aurones and Auronols, *Phytochemistry*, 15 (15): 1553-1558, 1976.

atribuir os deslocamentos químicos de todos os carbonos no espectro de RMN ^{13}C que não haviam sido publicados anteriormente².

O espectro COSY (Anexo D, Fig. 3, Pág. 65) confirma as correlações esperadas dos acoplamentos $^nJ_{\text{H-H}}$ conforme indicado na Tab. 4 (Anexo C, Tab. 3 , Pág. 58).

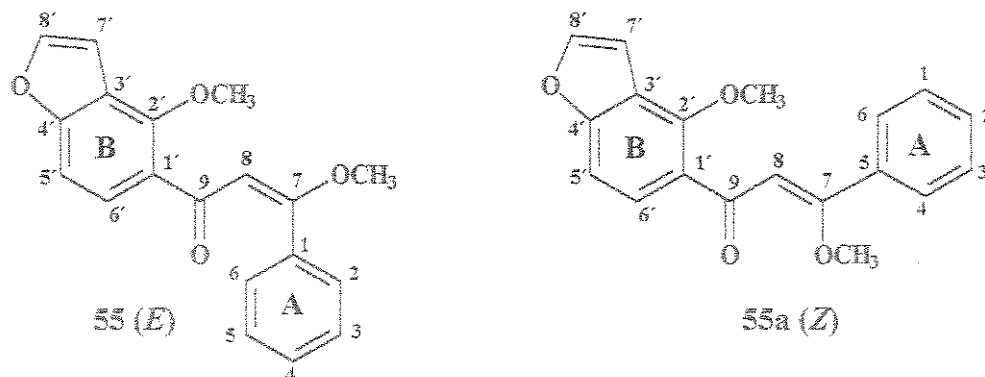
² NASCIMENTO, M.C, DIAS, R.L.V. & MORS, W. Flavonoids of *Derris obtusa*: Aurones and Auronols, **Phytochemistry**, 15 (15): 1553-1558, 1976.

Quadro 3: Racionalização do Caminho de Fragmentação de Derriobtusona A 53
No Espectrômetro de Massas



3.2 (*E*)-7-OMe Pongamol 55

As β -MeO chalconas são formadas pela metilação dos dibenzoilmetanos na forma enólica (β -OH chalconas). Isolamos dois compostos deste tipo: **55** e **55a**.

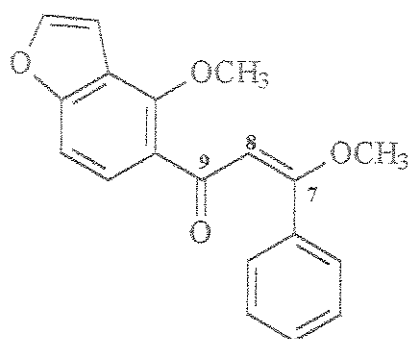


A nítida presença da mistura natural de **55** e **55a** é observada pelo espectro de RMN ¹H (Anexo D, Fig. 6, Pág. 68), onde todos os sinais aparecem duplicados com intensidades numa relação de 9 : 1 dos isômeros *E* : *Z*. Já no espectro de RMN ¹³C (Anexo D, Fig. 7, Pág. 69) observou-se praticamente apenas o composto **55**, não detectando **55a**.

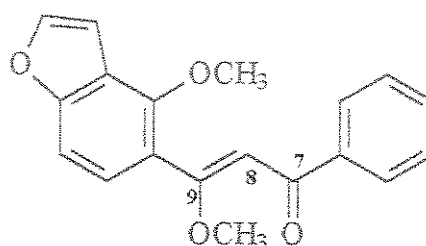
Pela integração dos sinais no espectro de RMN ¹H (Anexo D, Fig. 6, Pág. 68; Anexo C, Tab. 5, Pág. 59) sabemos que o composto **55** tem dez hidrogênios além dos seis hidrogênios dos grupos metoxilas (*s*, δ = 3,89 OCH₃ ; *s*, δ = 4,10 OCH₃). A análise do espectro indicou uma grande similaridade com o espectro da Derriobtusona A **53**, contendo também sinais dos hidrogênios do anel furano em δ 6,91 (1H, *dd*, $J_{7'-8'} = 2,1$ Hz e $J_{7'-5'} = 1$ Hz) e 7,57 (1H, *d*, $J_{8'-7'} = 2,1$ Hz), dois dubletes em δ 7,14 (1H, *d*, $J_{5'-6'} = 8,5$ Hz) e 7,49 (1H, *d*, $J_{6'-5'} = 8,5$ Hz) atribuídos a dois hidrogênios aromáticos acoplados em *orto* e os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 7,27-7,30 (3H, *m*) e 7,45 (2H, *m*) revelando um anel aromático monossustituído desprotegido. No espectro de RMN ¹³C (Anexo D, Fig. 7, Pág. 69 ; Anexo C, Tab. 6, Pág. 59) observou-se a presença de dois sinais muito importantes e diferentes do composto **53**, um sinal em δ 191,2 revelando um grupo carbonila e outro em δ 170,8 corresponde a um carbono quaternário desprotegido. Novamente os dados do espectro de massas (Anexo D, Fig.11, Pág. 73) foram

importantíssimos na elucidação estrutural, o íon molecular $M^{+•} = 308$ deu o peso molecular do composto **55** e o pico base em $m/z = 161$ (100 %) está de acordo com o regioisômero proposto nos levando mais uma vez a descartar **55b**. O Quadro 4 apresenta uma proposta do composto **55** no espectrômetro de massas. O hidrogênio H-8 foi observado no espectro de RMN 1H na forma de um singlete em δ 6.30 e no espectro RMN ^{13}C o sinal em δ 170,8 foi atribuído ao carbono C-7 ligado a um grupo metoxila. Constatamos na literatura estes compostos já tinham sido isolado de *Tephrosia purpurea* (Leguminosae)¹².

No começo do estudo do espectro de RMN 1H pensamos que tratava-se da mistura dos regioisômeros **55** e **55b**, o que foi logo descartado porque todos os sinais eram deslocados no mesmo sentido, ao contrário do esperado nestas estruturas¹².



(55)



(55b)

A análise do espectro DEPT (Anexo D, Fig. 8, Pág. 70), do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos CxH (HSQC) (Anexo D, Fig. 10, Pág. 72) e do espectro de correlação de deslocamentos químicos homonuclear HxH (COSY) (Anexo D, Fig. 9, Pág. 71 ; Anexo C, Tab. 7, Pág. 60) além dos dados da literatura^{13, 14 e 15} facilitaram a elucidação estrutural do composto **55** e por tanto identificado como (*E*)-7-OMe Pongamol¹⁶.

¹² KIUCHI, F., CHEN, X. & TSUDA, Y., Z-E Isomerization of β -Methoxychalcones: Preferred Existence of E-Isomers in Naturally Occurring β -Methoxychalcones, **Chem. Pharm. Bull.**, 38: (7) 1862-1871 1990.

¹³ DAGNE, E., DINKU, B., GRAY & WATERMAN, P.G., Pumilaisoflavones A and B from the seed pods of *Tephrosia pumila*, **Phytochemistry**, 27: (5) 1503-1505 1988.

¹⁴ VENKATARATNAM, G., RAO, E., V. & VILAIN, C., Flavonoids of *Tephrosia procumbens*-Revised Structure for Praecansone A and Conformation of Praecansone B, **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**, 2723- 2727 1987.

A configuração do isômero majoritário foi determinada como sendo *E* pelo experimento NOE (Anexo D, Fig. 8, Pág. 70), onde irradiando a metoxila em δ 3,88 observamos um aumento do sinal do H-8 em δ 6,3 (5,5 %).

No espectro UV (Anexo D, Fig. 12, Pág. 74) a banda II característico dos flavonóides absorve em 243 nm enquanto a banda I aparece em 296 nm sugerindo apenas o composto **55**, não detectando **55a**.

O espectro de IV (Anexo D, Fig. 12, Pág. 74) apresenta as bandas em 1 653, 1 600, 1 587, 1 560, 1 063 cm^{-1} atribuídas respectivamente a carbonila, anel aromático e metoxila.

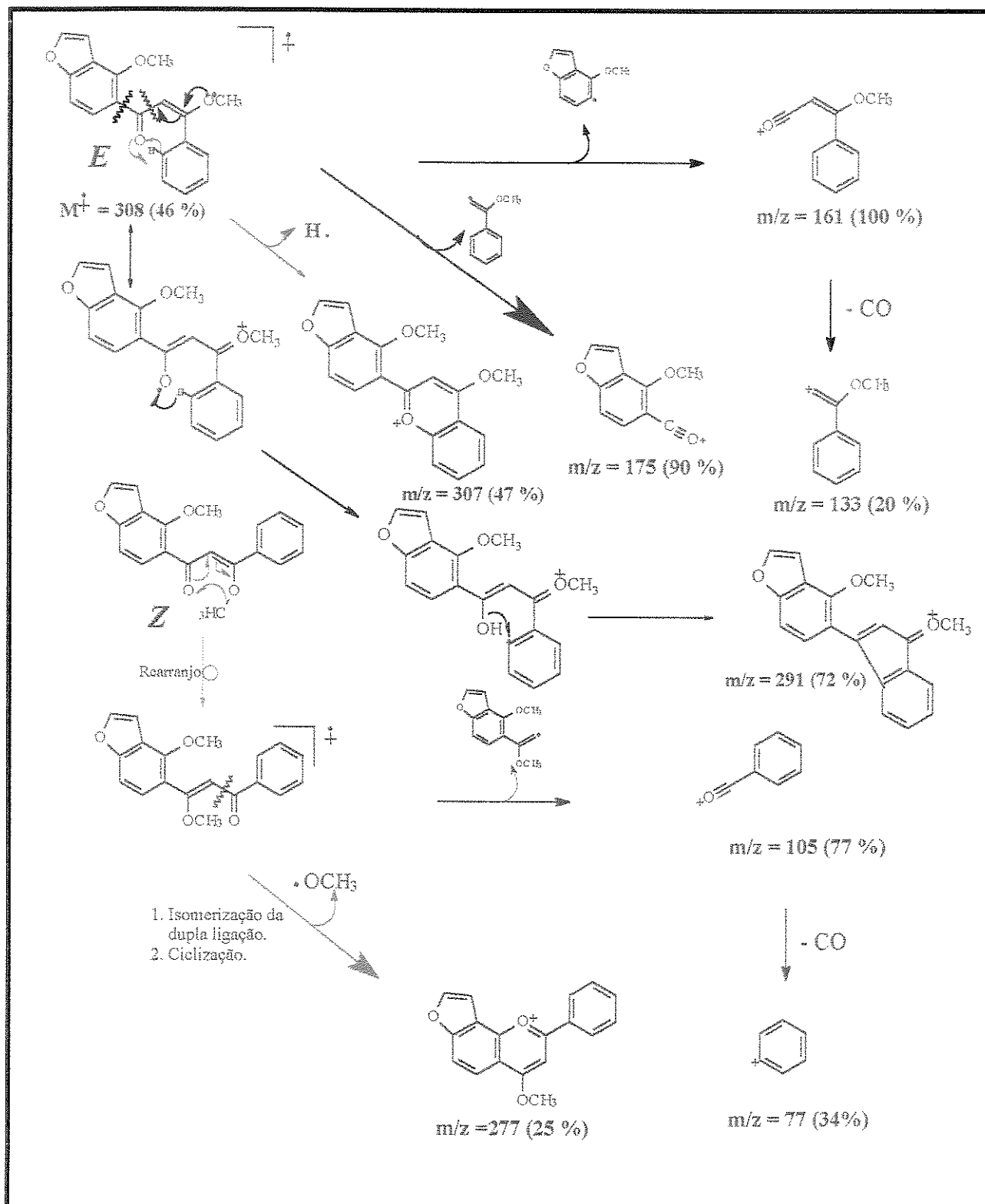
Segundo a literatura¹² os isômeros *Z* são termodinamicamente menos estáveis e isomerizam, seja em contato com sílica gel, em solventes polares ou expostos à luz, no isômero mais estável *E*. A razão do isômero *E* ser considerado o produto termodinâmico, pode ser explicado pela repulsão estérica mais acentuada quando a metoxila está do mesmo lado da carbonila (isômero *Z*) a quando está do lado oposto (isômero *E*). A metoxila deve procurar uma posição que minimize a repulsão entre os pares de elétrons livres dos oxigênios e a repulsão dipolo entre as duas funções oxigenadas, ocorrendo assim a isomerização de *Z* e *E*.

¹⁵ CAMELE, G., MONACHE, F.D., MONACHE, G. D., & BETTOLO, G.B.M. Three new Flavonoids from *Tephrosia praecans*, **Phytochemistry**, 19: 707-709 1980.

¹⁶ PELTER, A., WARD, R. S., RAO, E. V. & RAJU, N.R., 8-Substitued Flavonoids and 3'-substitued 7-Oxygenated Chalcones from *Tephrosia purpurea*, **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, 2491- 2498 1981.

¹² KIUCHI, F., CHEN, X. & TSUDA, Y., Z-E Isomerization of β -Methoxychalcones: Preferred Existence of E-Isomers in Naturally Occurring β -Methoxychalcones, **Chem. Pharm. Bull.**, 38: (7) 1862-1871 1990.

Quadro 4: Racionalização do Caminho de Fragmentação de (*E*)-7-OMe Pongamol **55** no Espectrômetro de Massas



3.3 Lanceolata B 56

O espectro de RMN ^1H do composto **56** (Anexo D, Fig. 13, Pág. 75 ; Anexo C, Tab. 9, Pág. 61) mostra um singleto intenso em δ 6,89 que pode ser atribuído tanto ao H-3 de uma flavona quanto ao H vinílico de uma aurona. O dubleto em δ 8,17 (1 H, *d*, $J = 9$ Hz) corresponde a absorção esperada para o hidrogênio H-5 acoplado ao H-6 do anel A. Os sinais dos dubletos em δ 7,78 (1 H, *d*, $J = 2,1$ Hz) e em δ 7,23 (1 H, *d*, $J = 1,8$ Hz) sugerem um anel furano ligado angularmente ao anel A. Já os sinais em δ 7,97 (2 H, *dd*, $J = 2$ e 9 Hz) e em δ 7,55-7,59 (4 H, *m*) revelam um anel B monosubstituído.

Os sinais em δ 162,83 (C_o), 108,09 (CH) e 178,45 (C_o) confirmam o esqueleto de uma flavona pois correspondem aos deslocamentos químicos esperados para os carbonos C-2; C-3 e C-4 respectivamente (Anexo D, Fig. 14, Pág. 76 ; Anexo C, Tab. 10, Pág. 61).

Outros dados vem a confirmar as observações já feitas no espectro de RMN ^1H , como por exemplo os sinais referentes ao anel B monosubstituído em δ 126,27 (2 CH), 129,21 (2 CH), 131,65 (1 CH) e 131,65 (1 C **quaternário**) para os carbonos: C-2' e C-6' ; C-3' e 5' ; C-4' e C-1' respectivamente. A presença do anel furano ligado angularmente ao anel A é confirmada pelos sinais em δ 145,92 (C-2'') e 104,23 (C-3''). Os sinais restantes são referentes ao anel A: 121,85 (C-5); 108,09 (C-6); 158,51 (C-7); 117,22 (C-8); 150,36 (C-9) e 119,43 (C-10). Esta atribuição foi baseada em vários modelos encontrados na literatura⁷.

No espectro de massas (Anexo D, Fig. 15, Pág. 77) observa-se as principais fragmentações correspondentes ao: íon molecular M^+ 262 (94%) e aos picos resultantes da clivagem RDA do anel C (confirmando mais uma vez que se trata de uma flavona contendo um anel B monosubstituído e um anel furano ligado ao anel A) com m/z 160 (100%) e m/z 102 (15%). No Quadro 5 se apresenta um caminho possível de fragmentação do composto **56** no espectrômetro de massas na obtenção dos principais picos.

No espectro de IV (Anexo D, Fig. 16, Pág. 78) a banda em 1640 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da carbonila e as bandas em 1607 e 1448 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento do anel aromático.

⁷ SALES, B.H.L.N. Flavonóides de *Lonchocarpus subglaucescens* (Benth) - Leguminosae e Síntese de β -hidroxichalconas - Campinas, 1994, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

O espectro UV (Anexo D, Fig. 16, Pág. 78) apresenta máximos de absorção em 264 e 298 nm referentes aos cromóforos benzoíla e cinamoíla.

O composto **56** foi identificado como Lanceolatina B que já foi isolada e identificada de *L. latifolius*⁹.

⁹ NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae - Isolamento, Determinação Estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal - Campinas, 1998, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

3.4 Medicarpina 57

No espectro de RMN ^1H do composto **57** (Anexo D, Fig. 17, Pág. 79; Anexo C, Tab. 11, Pág. 62) observamos: um multipeto em δ 3,42- 3,69 integrando 2H e um duplo dubleto em 4,23 ($J = 10,6$ e $5,1$ Hz) integrando 1H; assim também um dubleto com $J = 7$ Hz (1H) em δ 5,48 caracterizando um acoplamento vicinal. Um segundo multipeto é observado em δ 6,41- 6,47 (3H) enquanto que um típico acoplamento em *orto* e a longa-distância é revelado em δ 6,52 pelo duplo dubleto ($J = 8,5$ e 2 Hz) integrando 1H e pelo dubleto em δ 7,36 com $J = 8,5$ Hz integrando 1H. Outro típico acoplamento em *orto* denota-se pelo dubleto em δ 7,10 ($J = 9$ Hz). Finalmente, um intenso singlete em δ 3,76 integrando 3H sugere um grupo metoxila aromático. Só com estes dados sugerimos o esqueleto de um pterocarpano. Já com os dados dos espectros de RMN ^{13}C (Anexo D, Fig. 18, Pág. 80; Anexo C, Tab.12, Pág. 62) , espectro UV e dados da literatura¹⁷ (Anexo D, Fig.19, Pág. 81) confirmamos que o composto **57** trata-se da medicarpina, isolada e identificada anteriormente em nosso grupo de pesquisa^{9 e 11}

¹⁷ RALL, G.J.H. & OBERHOLZER, M.E. ^{13}C NMR of Pterocarpan. Tetrahedron, 33 : 135-137, 1977.

⁹ NOGUEIRA, M. A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae - Isolamento, Determinação Estrutural , Atividade Biológica e Análise Sazonal - Campinas, 1998, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

¹¹ FIRMINO, C.A. Estudo Fitoquímico das raízes de *Lonchocarpus campestris*-Tozzi- Campinas, 1998, Tese de Mestre em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

Quadro 5 : Racionalização do Caminho de Fragmentação de Lanceolatina B **56** no Espectrômetro de Massas

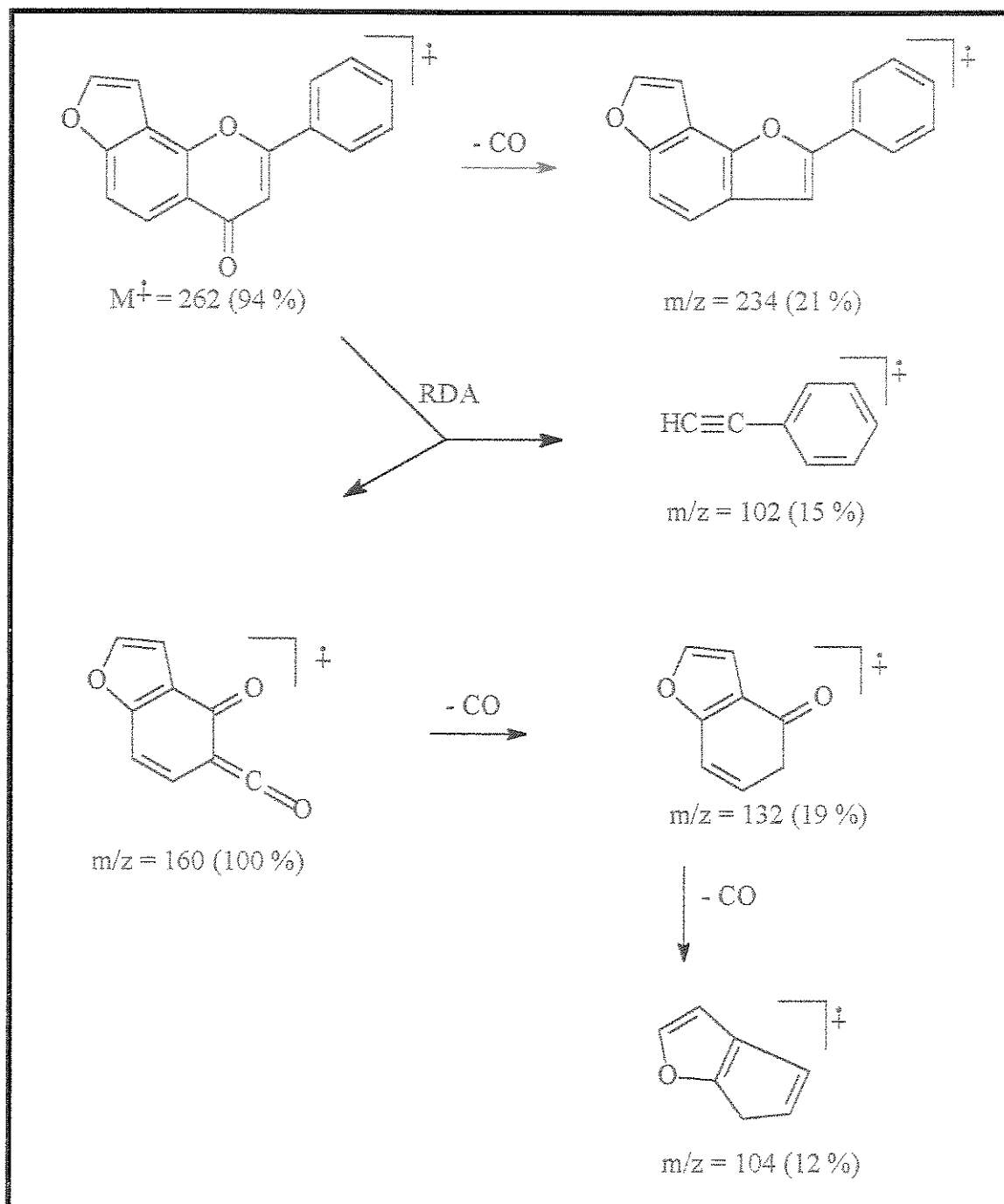
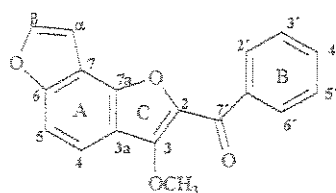


Tabela 1 : Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Derriobtusona A **53**

H	δ	multiplicidade e J (Hz)
4	7,71	1H, <i>d</i> , $J = 9$
5	7,52	1H, <i>d</i> , $J = 9$ e 1
α	7,11	1H, <i>dd</i> , $J = 2$ e 1
β	7,73	1H, <i>d</i> , $J = 2$
2' e 6'	8,03	2H, <i>dd</i> , $J = 8,25$ e 1
4'	7,62	3H, <i>tt</i> , $J = 7,5$; 2 e 1
3' e 5'	7,52-7,55	2H, <i>m</i>
3-OCH ₃	4,2	3H, <i>s</i>

Tabela 2: Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Derriobtusona A **53**

C	δ	C	δ
C-2 e C-1'	138,3	C-2' e 6'	129,6
C-3	151,6	C-3' e 5'	128,2
C-3a e C-4	116,9	C-4'	132,3
C-5	108,9	C- α	103,6
C-6	156,8	C- β	145,4
C-7	113,6	C ₀ -7'	183,8
C-7a	147,6	CH ₃ -O-3	61,7

Tabela 3: Correlações observadas no espectro de COSY (H-H) para Derriobtusona A **53**

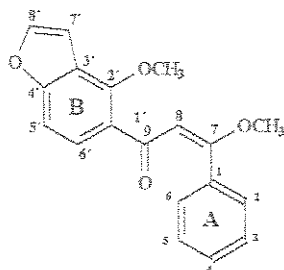
H (δ)	H (δ , J^H)
α (7,11)	5 (7,52) ; β (7,73)
5 (7,52)	4 (7,70) ; α (7,11)
3' e 5' (7,52-7,55)	2' e 6' (8,03) ; 4' (7,61)
4' (7,61)	3' e 5' (7,52-7,55) ; 2' e 6' (8,03)
4 (7,70)	5 (7,52)
β (7,73)	α (7,11) ; 5 (7,52)
2' e 6' (8,03)	3' e 5' (7,52-7,55) ; 4' (7,61)
H ₃ CO-3 (4,2)	-

Tabela 4: Correlações observadas nos espectros de HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^H) para Derriobtusona A **53**

H (δ)	C (δ , J^1)	C (δ , J^H)
α (7,11)	α (103,6)	6 (156,8), 7a (147,6)
5 (7,52)	5 (108,9)	3a (116,9)
3' e 5' (7,52-7,55)	3' e 5' (128,2)	1' (138,3)
4' (7,61)	4' (132,3)	-
4 (7,70)	4 (116,9)	3 (151,6), 6 (156,8), 7a (147,6)
β (7,73)	β (145,4)	7 (113,6)
2' e 6' (8,03)	2' e 6' (129,6)	183,8
H ₃ CO-3 (4,2)	3-OCH ₃ (61,7)	-

Anexo

C

Tabela 5: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de (*E*)-7-OMe Pongamol **55**

H	δ	Multiplicidade e J (Hz)
2 e 6	7,45	2H, <i>m</i>
3, 4, e 5	7,27 – 7,30	3H, <i>m</i>
8	6,30	1H, <i>s</i>
7'-OCH ₃	3,89	3H, <i>s</i>
2'-OCH ₃	4,10	3H, <i>s</i>
5'	7,14	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,7 e 1
6'	7,49	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4
7'	6,91	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,1 e 1
8'	7,57	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1

Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de (*E*)-7-OMe Pongamol **55**

C	δ	C	δ
C-1	135,6	C-2'	152,9
C-2 e C-6	128,6	C-4'	152,9
C-3, C-5 e C-1' ☺	127,8	C-5'	106,6
C-4	129,7	C-6'	126,9
C-7	170,8	C-7'	105,1
C-8	103,2	C-8'	144,7
C ₀ -9	191,2	CH ₃ -O-7	56,3
C-3' ☺	119,3	CH ₃ -O-2'	61,4

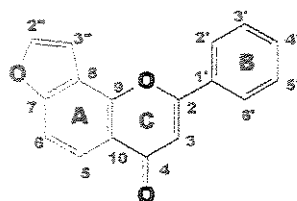
☺ Sinais intercambiáveis

Tabela 7: Correlações observadas no espectro de COSY (H-H) para (*E*)-7-OMe Pongamol **55**

H (δ)	H (δ'')
H ₃ CO-7' (3,89)	-
H ₃ CO-2' (4,10)	-
8 (6,3)	-
8' (7,57)	7' (6,91)
7' (6,91)	8' (7,57)
5' (7,14)	6' (7,49)
6' (7,49)	5' (7,14)
2 e 6 (7,45)	3,4 e 5 (7,27-7,3)
3,4 e 5 (7,27-7,3)	2 e 6 (7,45)

Tabela 8: Correlações observadas no espectro de HSQC (H-C, J¹) para (*E*)-7-OMe Pongamol **55**

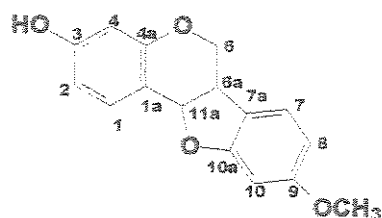
H (δ)	C (δ , J^1)
H ₃ CO-7' (3,89)	7' (56,3)
H ₃ CO-2' (4,10)	2'-OCH ₃ (61,4)
8 (6,3)	8 (103,2)
8' (7,57)	8' (144,7)
7' (6,91)	7' (105,1)
5' (7,14)	5' (106,6)
6' (7,49)	6' (126,9)
2 e 6 (7,45)	2 e 6 (128,6)
3,4 e 5 (7,27-7,3)	3, 4 e 5 (127,8 ; 129,7 e 127,8)

Tabela 9: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Lanceolatina B **56**

H	δ	Multiplicidade e J (Hz)
2''	7,78	1H, <i>d</i> , J = 2,1
3''	7,23	1H, <i>d</i> , J = 1,8
3	6,9	<i>s</i>
5	8,17	1 H, <i>d</i> , J = 9
2'e 6'	7,97	2 H, <i>dd</i> , J = 2 e 9
3', 4', 5' e 6	7,55-7,59	4 H, <i>m</i>

Tabela 10: Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Lanceolatina B **56**

C	δ	C	δ
C-2	162,83	C-10	119,43
C-3	108,09	C-1'	131,87
C-5	121,85	C-2'e 6'	126,27
C-6	108,09	C-3'e 5'	129,21
C-7	158,51	C-4'	131,65
C-8	117,22	C-2''	145,92
C-9	150,36	C-3''	104,23
C _o -4	178,45		

Tabela 11: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de Medicarpina **57**

H	δ	Multiplicidade e J (Hz)
6a e 6ax	3,42-3,69	2H, <i>m</i>
6 eq	4,23	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10 e 5
11a	5,48	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7
7	7,11	1 H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9
4, 8 e 10	6,41-6,47	3 H, <i>m</i>
1	7,36	1 H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5
2	6,52	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 2
9-OCH ₃	3,76	3H, <i>s</i>
3-OH	-	-

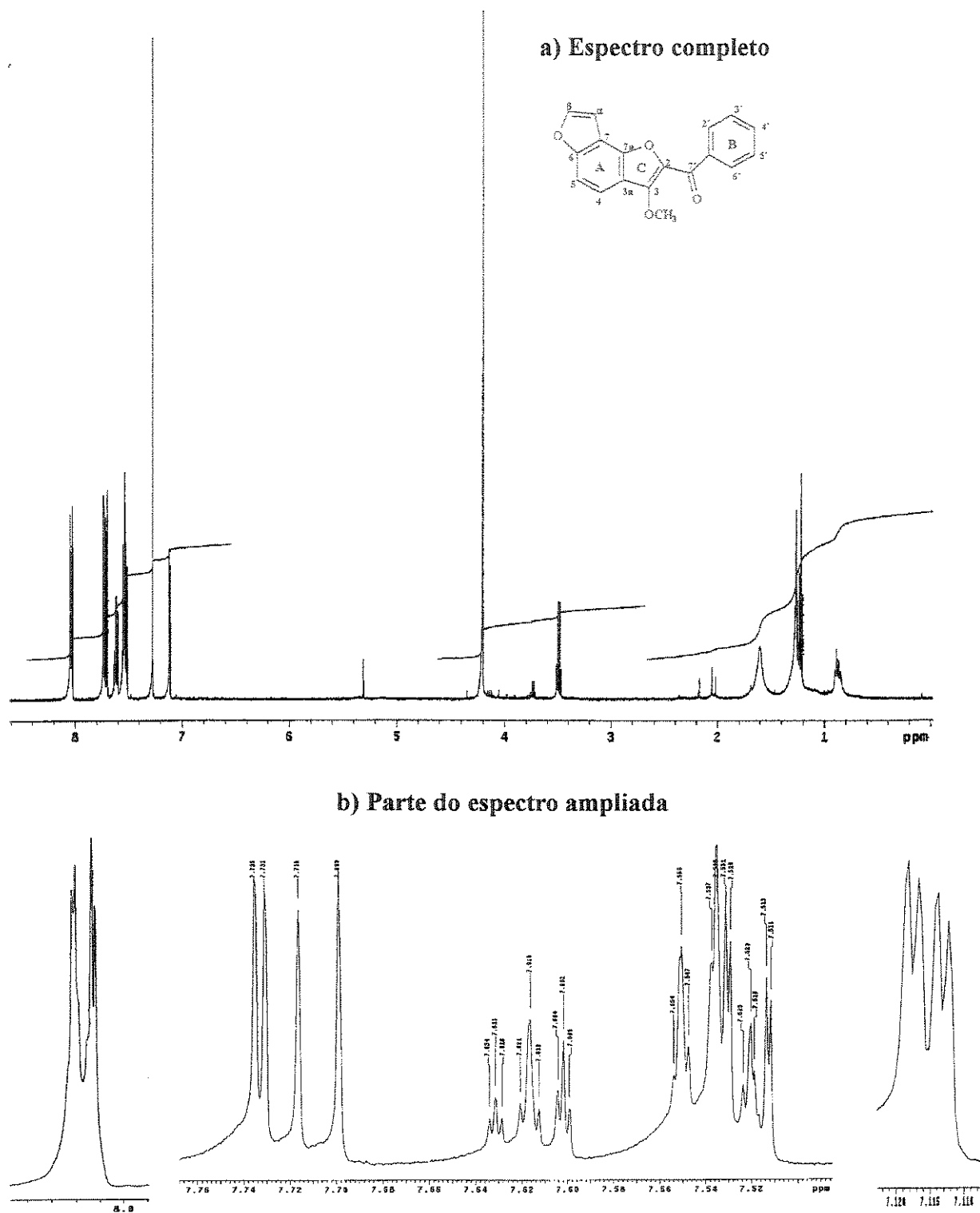
Tabela 12: Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de Medicarpina **57**

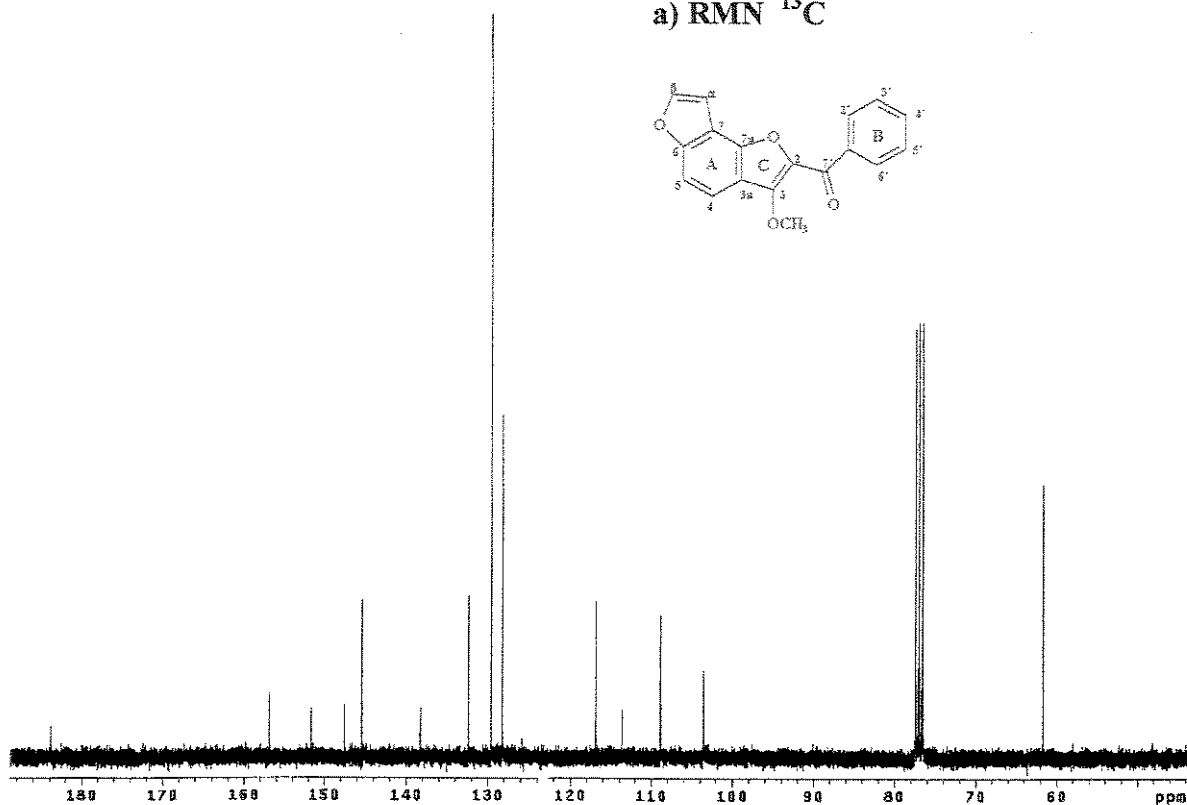
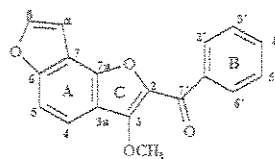
C	δ	C	δ
C-1	132,3	C-7	124,8
C-1a	112,6	C-7a	119,2
C-2	109,8	C-8	106,4
C-3	157,2	C-9	161,3☺
C-4	103,7	C-10	96,9
C-4a	156,8	C-10a	160,8☺
C-6	66,5	C-11a	78,5
C-6 ^a	39,4	CH ₃ -O-9	55,4

☺ Sinais intercambiáveis

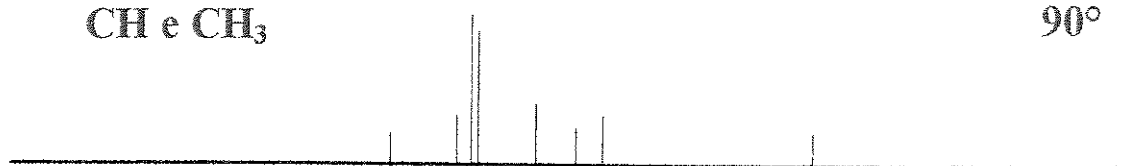
Anexo

D



a) RMN ^{13}C 

b) DEPT

CH e CH_3 90° 

CH

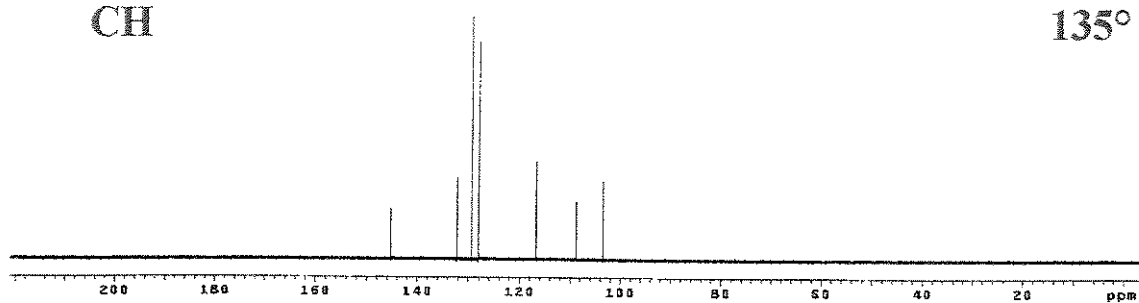
 135° 

Figura 2: RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (a) e DEPT (90 e 135°) (b) de Derriobtusona A 53

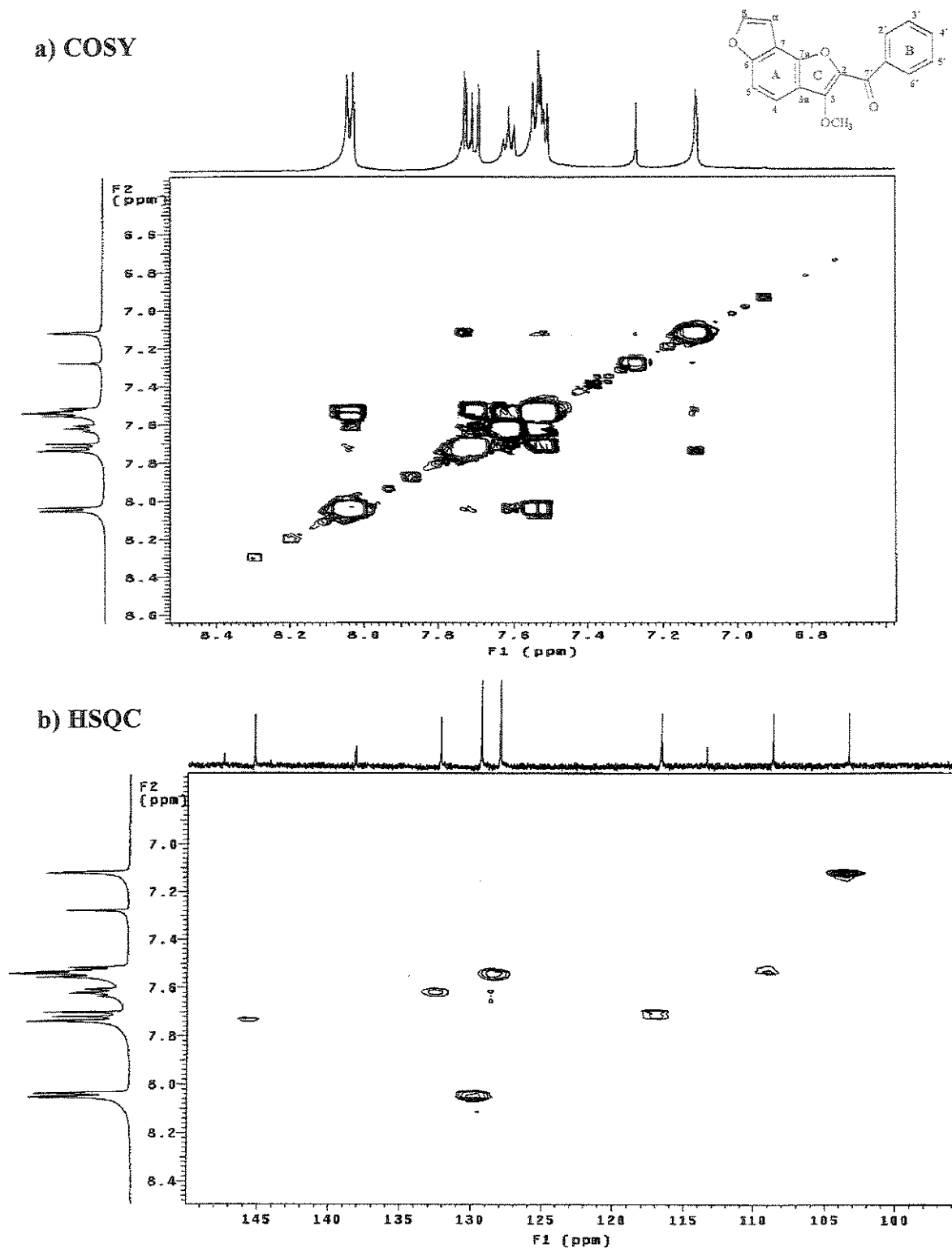
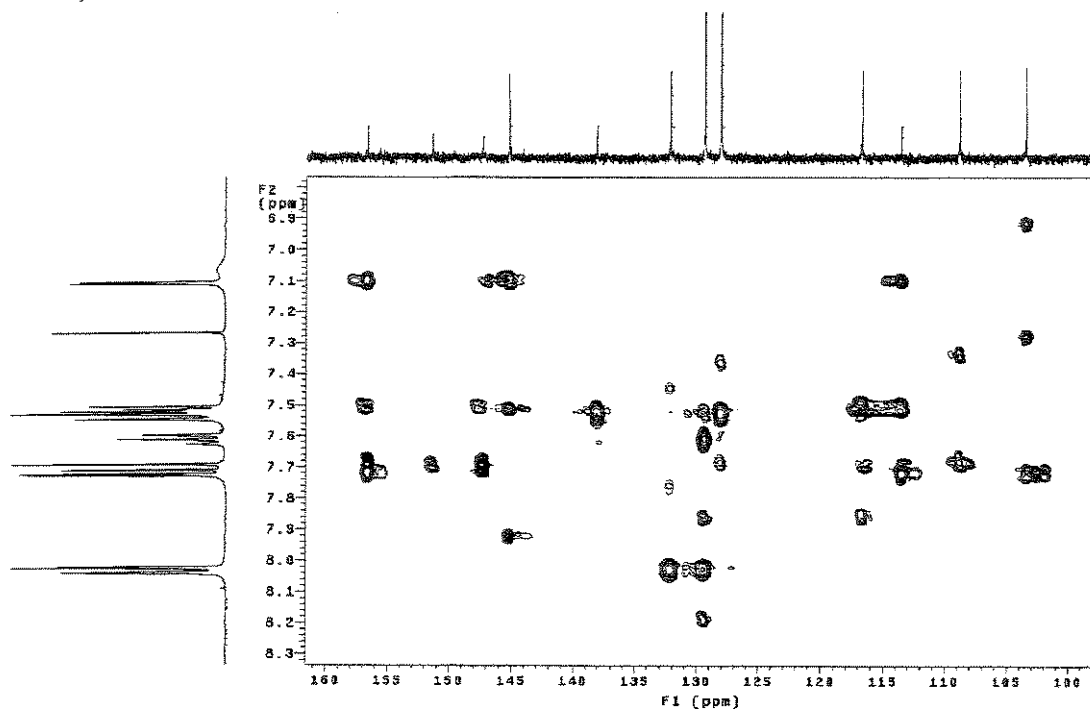


Figura 3: Gráficos de Contorno COSY (a) e HSQC (b) de Derriobusona A 53

a) HMBC



b) EM

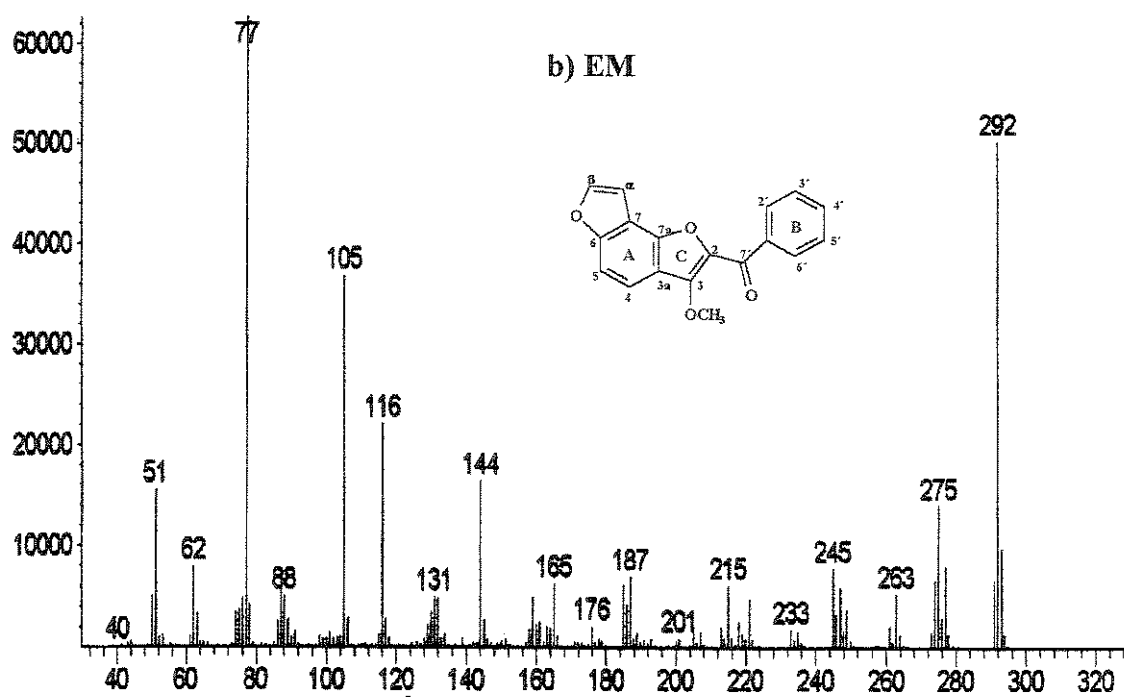
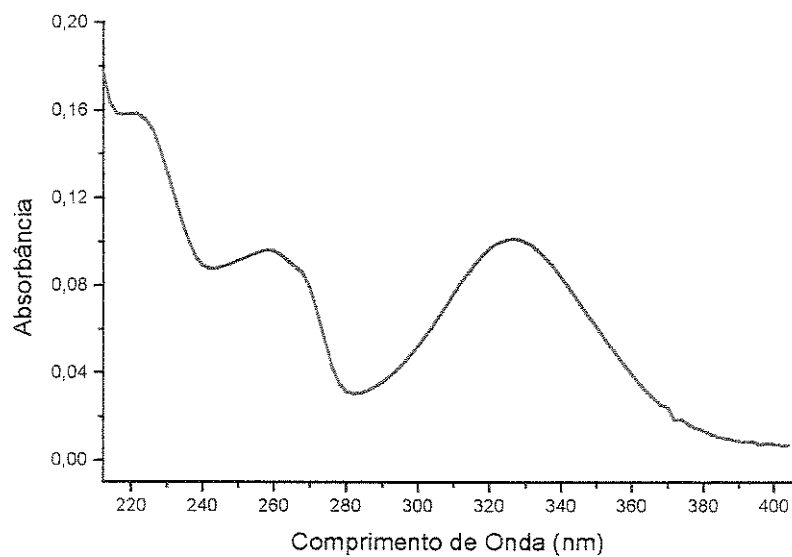


Figura 4: Gráfico de Contorno HMBC (a) e Espectro de Massas (IE, 70 eV) (b) de Derriobtusona A 53

a) UV



b) IV

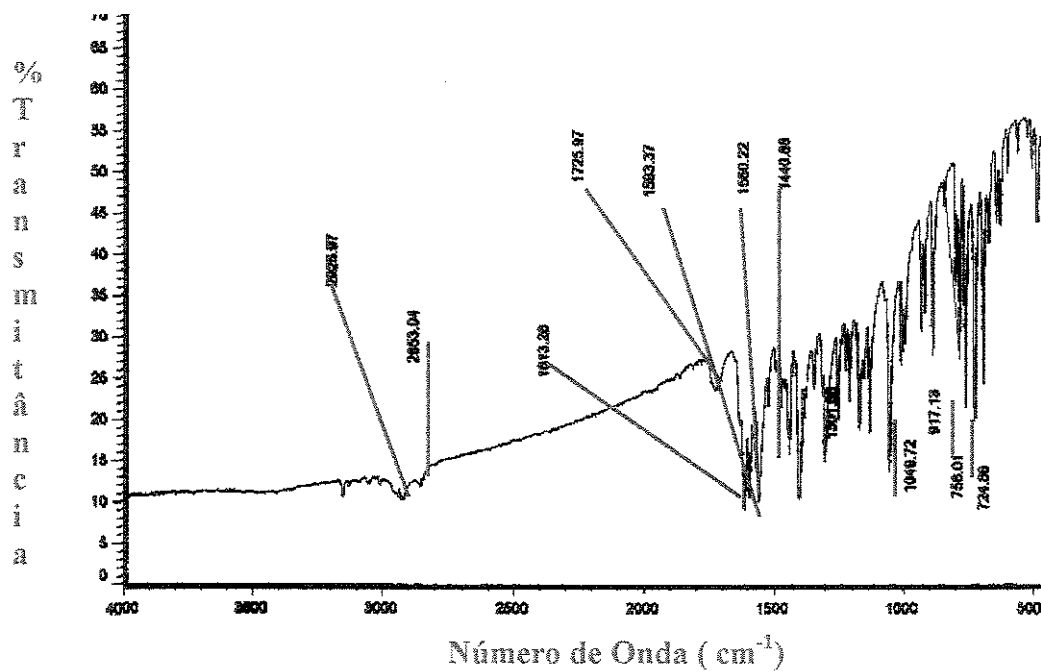
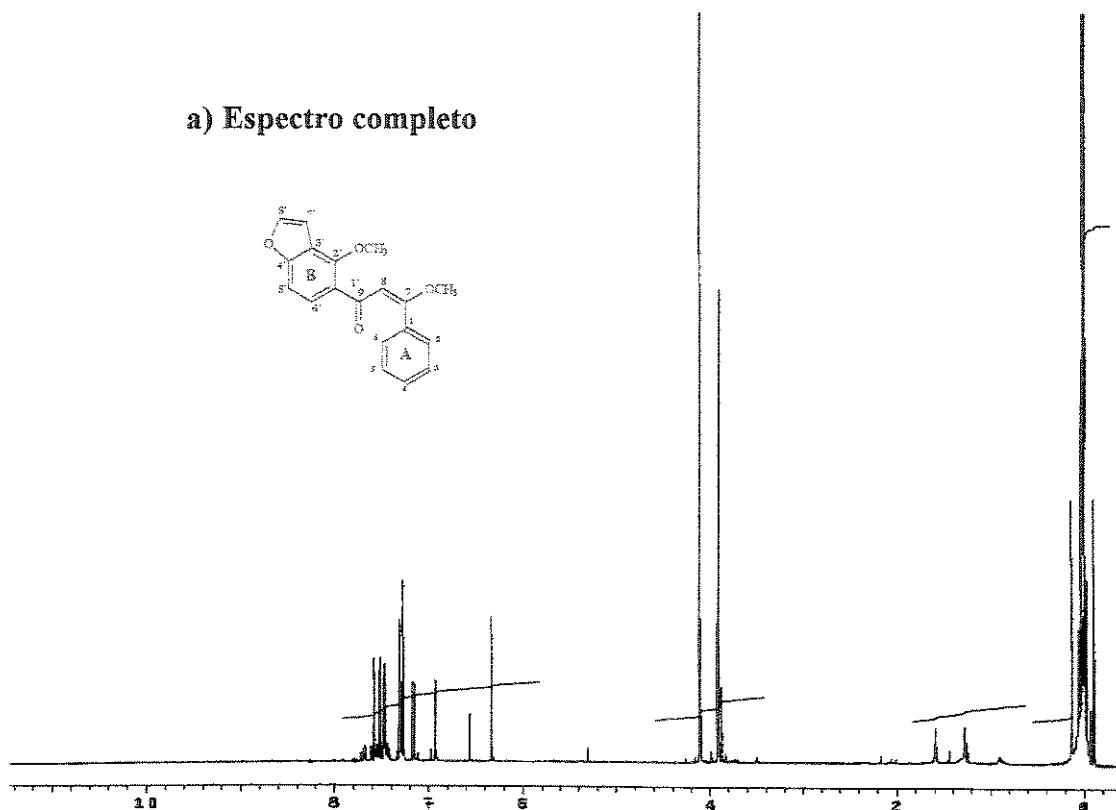


Figura 5: Espectro de UV (a) e Espectro de IV (b) de Derriobtusona A 53

a) Espectro completo



b) Parte do espectro ampliada

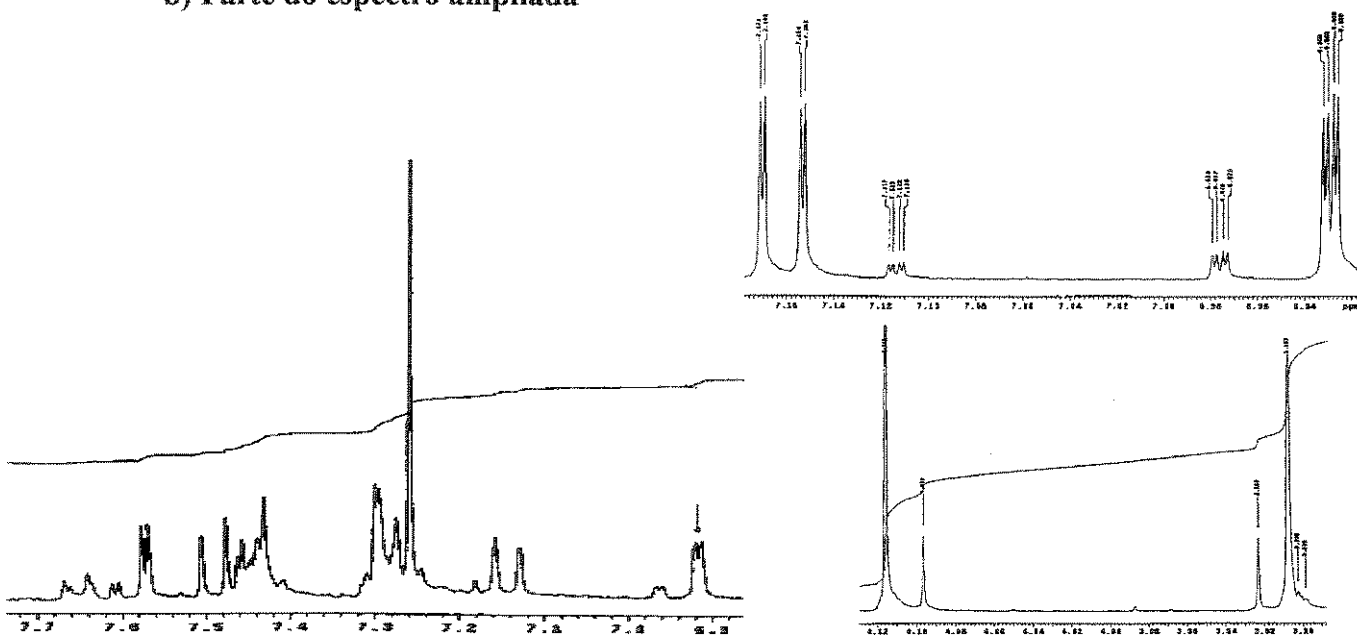
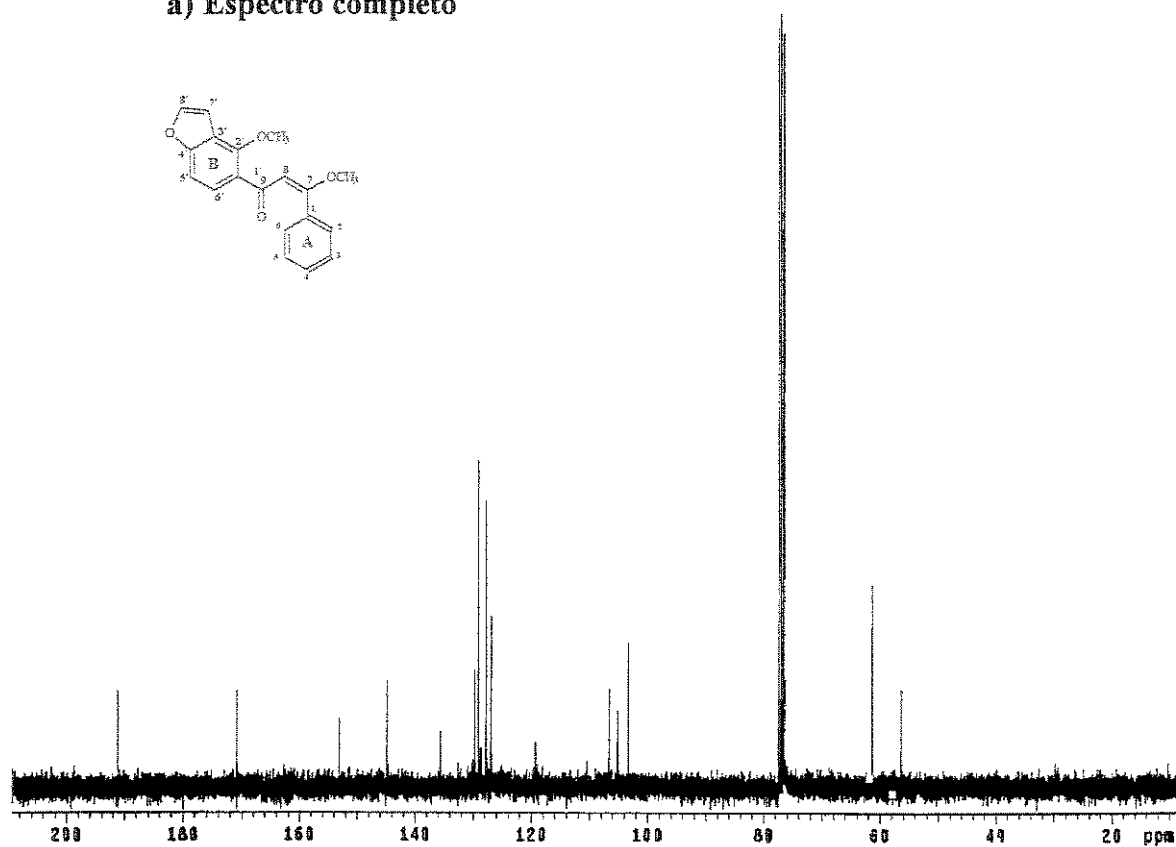
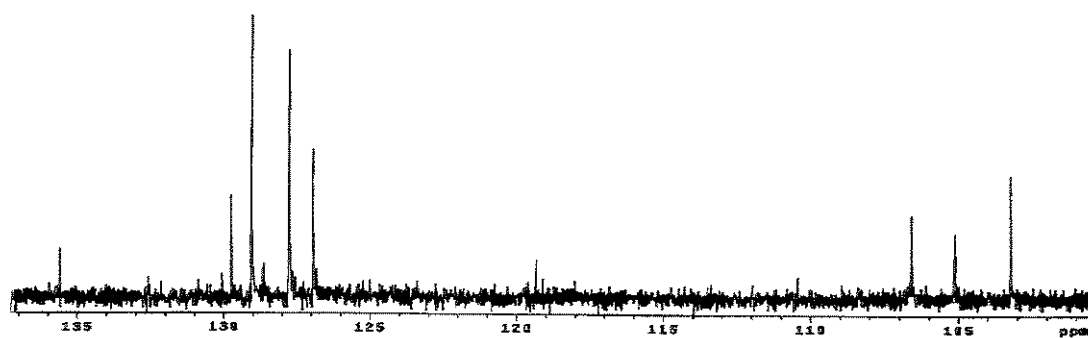


Figura 6: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de (*E*)-7-OMe Pongamol **55**

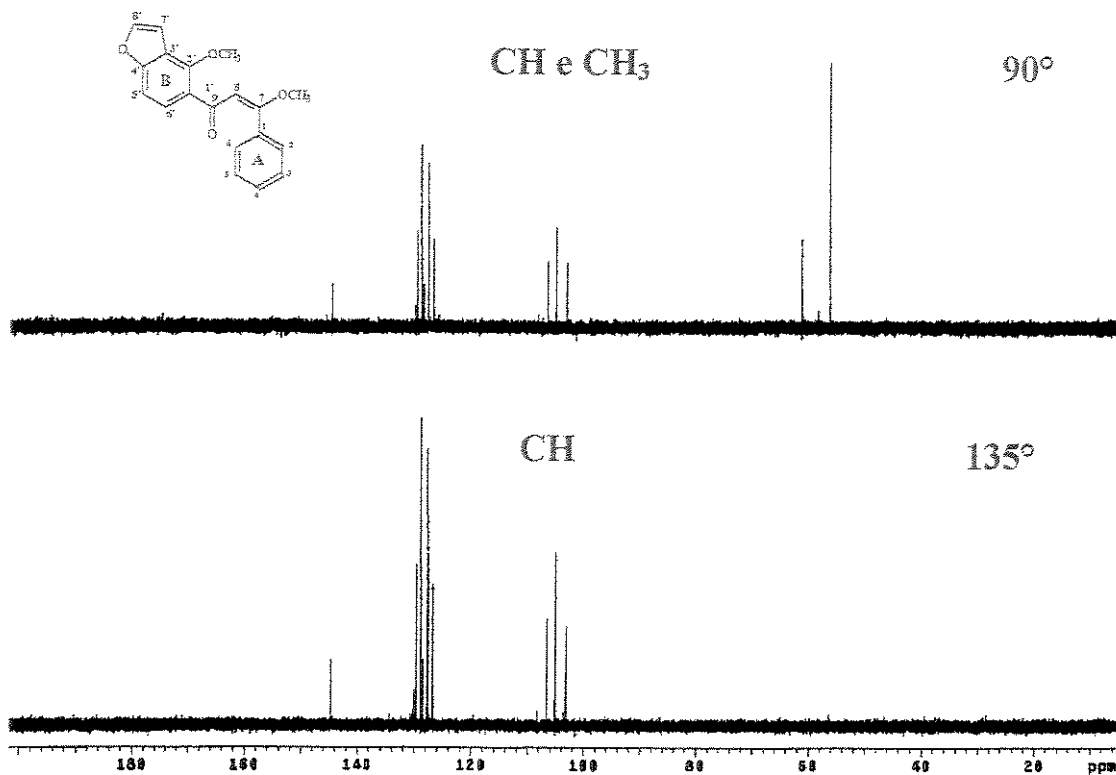
a) Espectro completo



b) Parte do espectro ampliada

Figura 7: RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de (E)-7-OMe Pongamol 55

a) DEPT



b) NOE

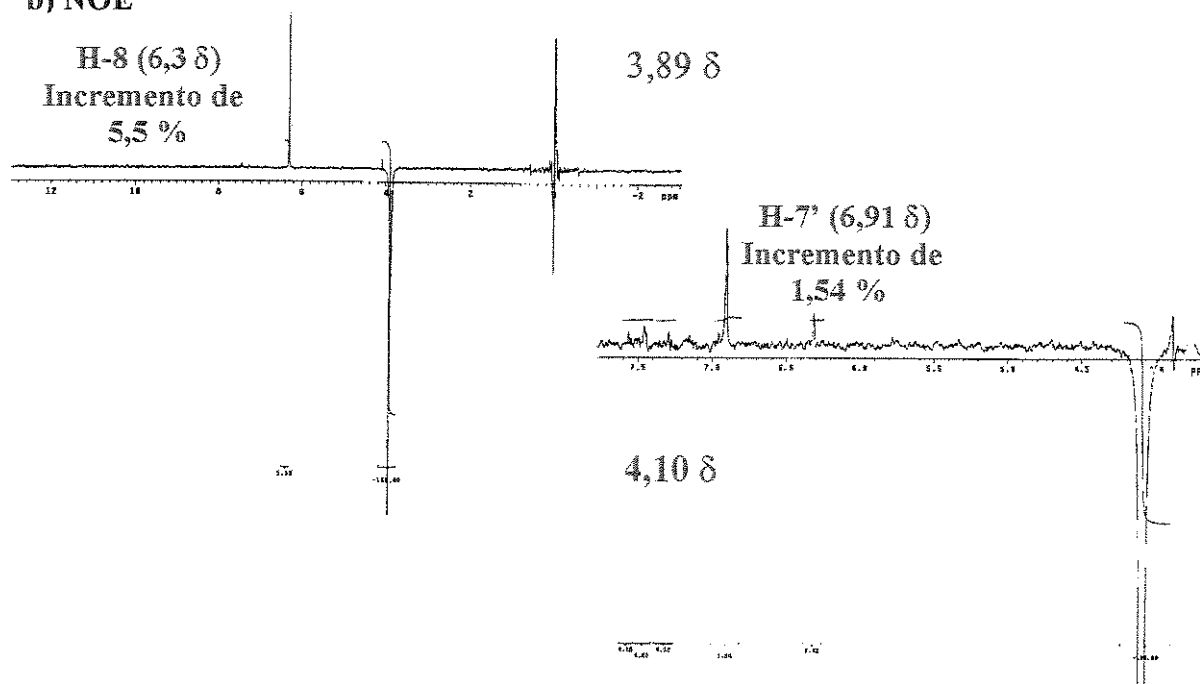
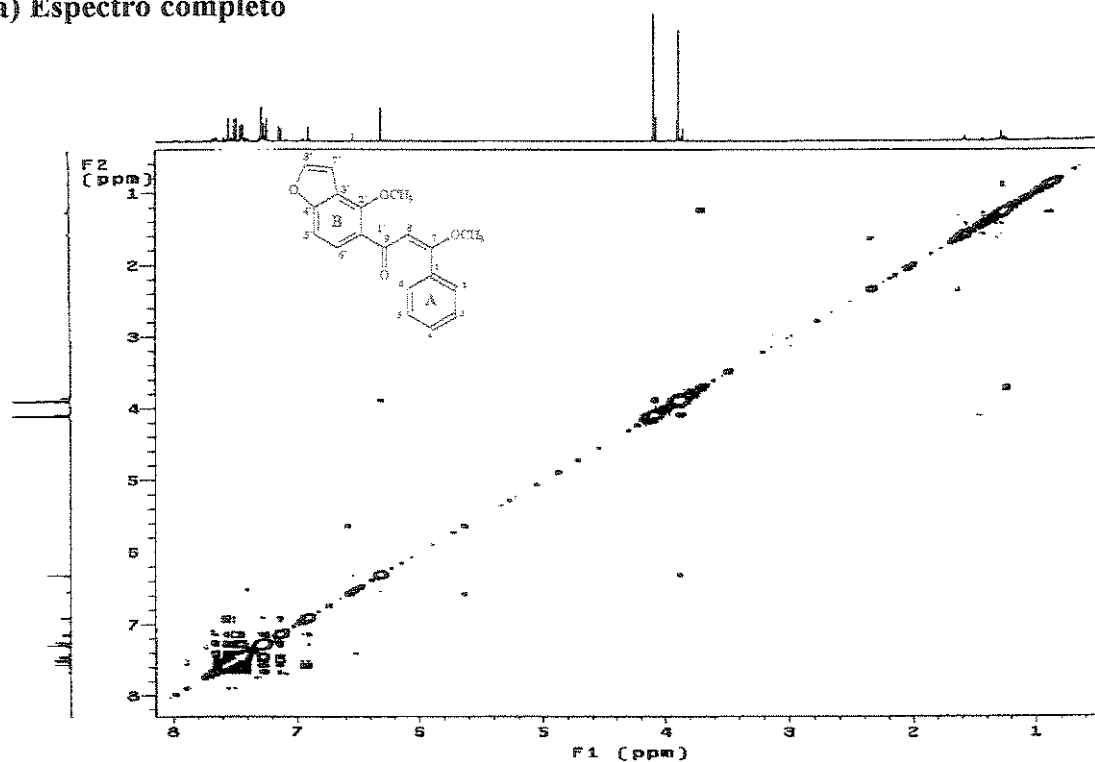


Figura 8: DEPT (a) e Diferença de NOE (b) de (*E*)-7-OMe Pongamol 55

a) Espectro completo



b) Parte do espectro ampliada

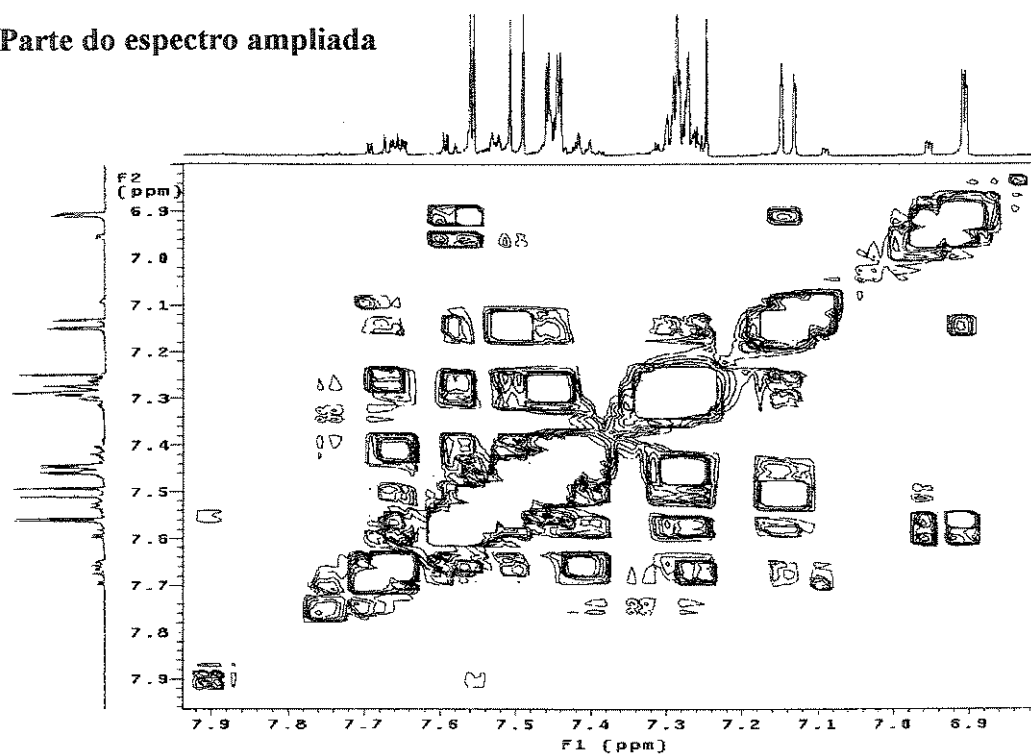
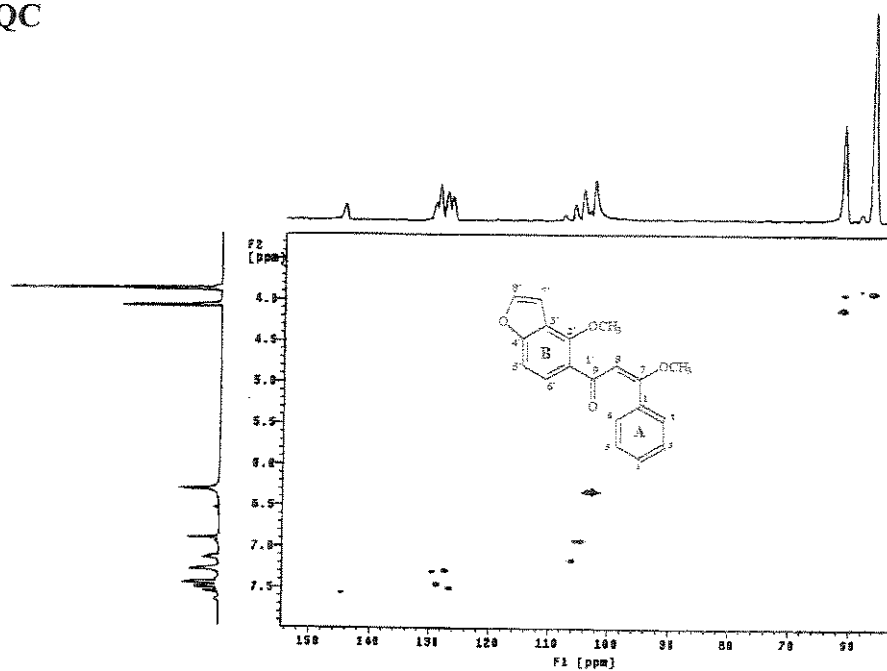


Figura 9 : Gráfica de Contorno COSY de (E)-7-OMe Pongamol 55

a) HSQC



b) HMBC

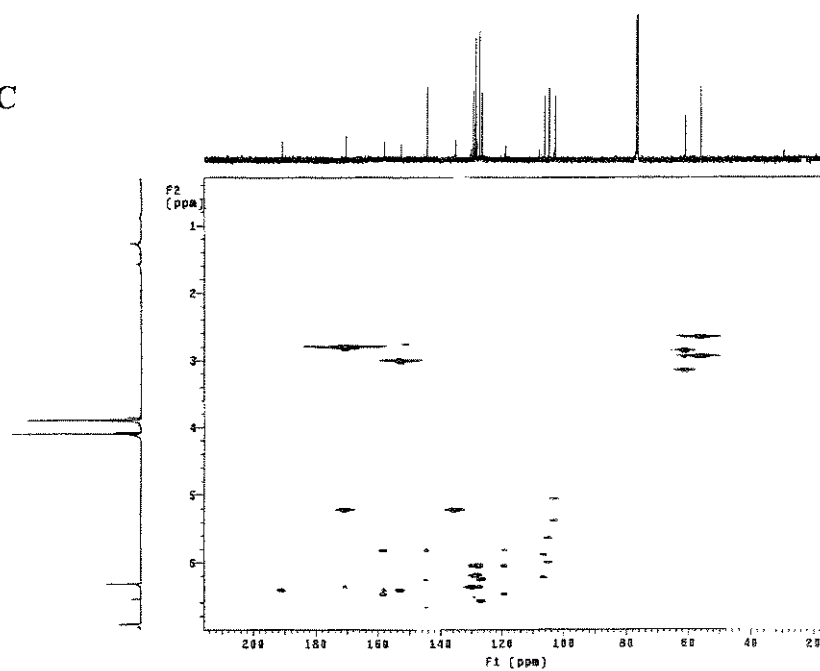


Figura 10: Gráfica de Contorno HSQC (a) e HMBC (b) de (E) (7)-OMe Pongamol 55

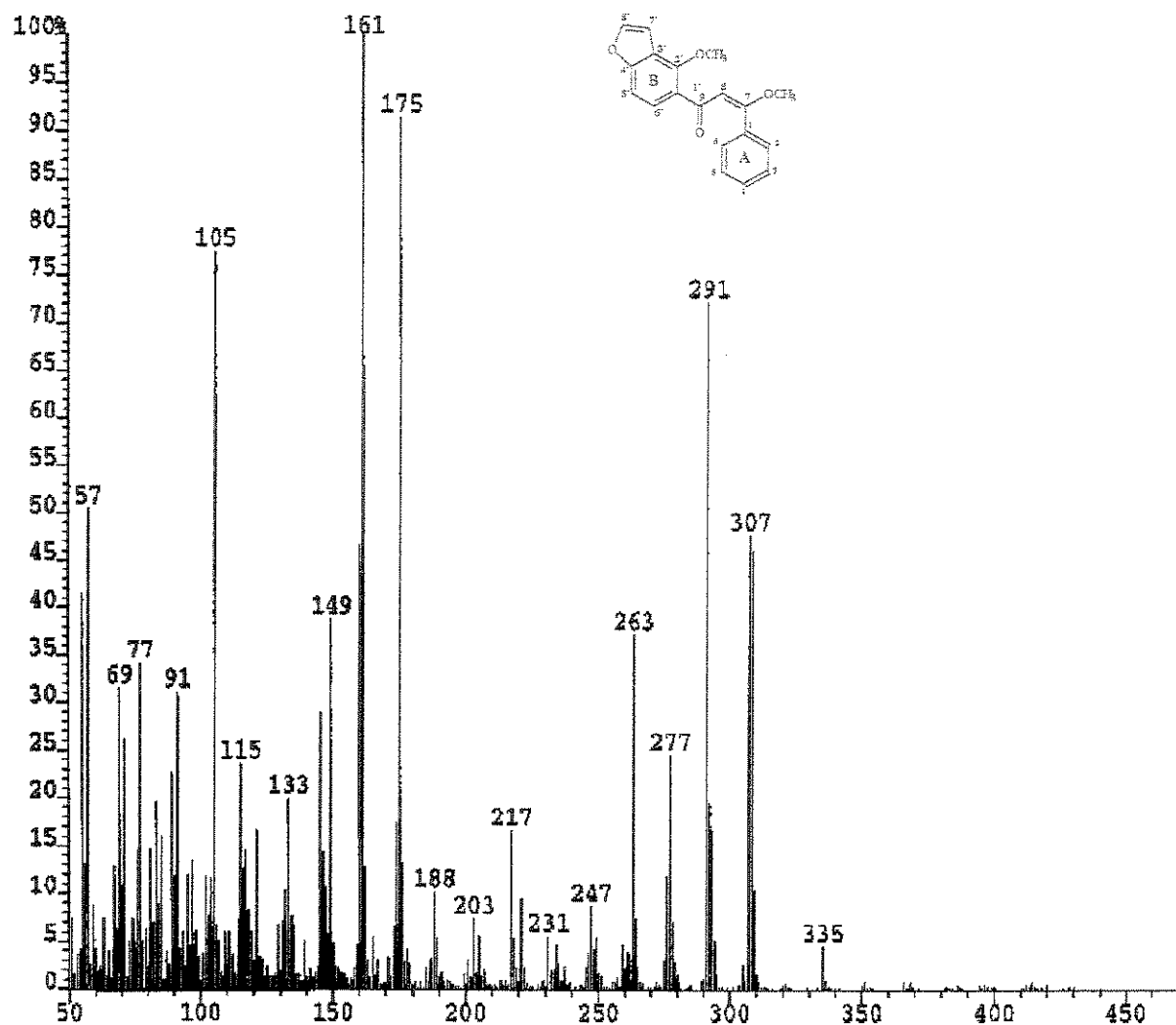
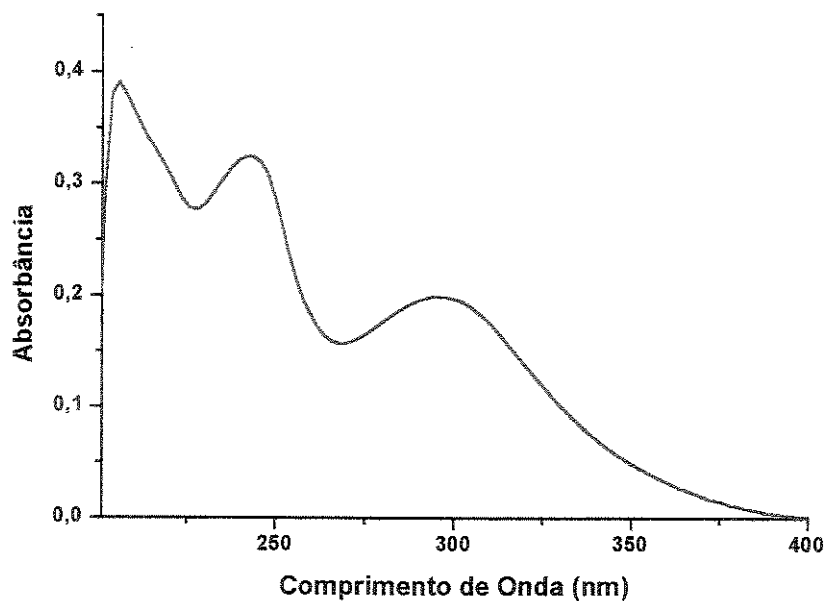
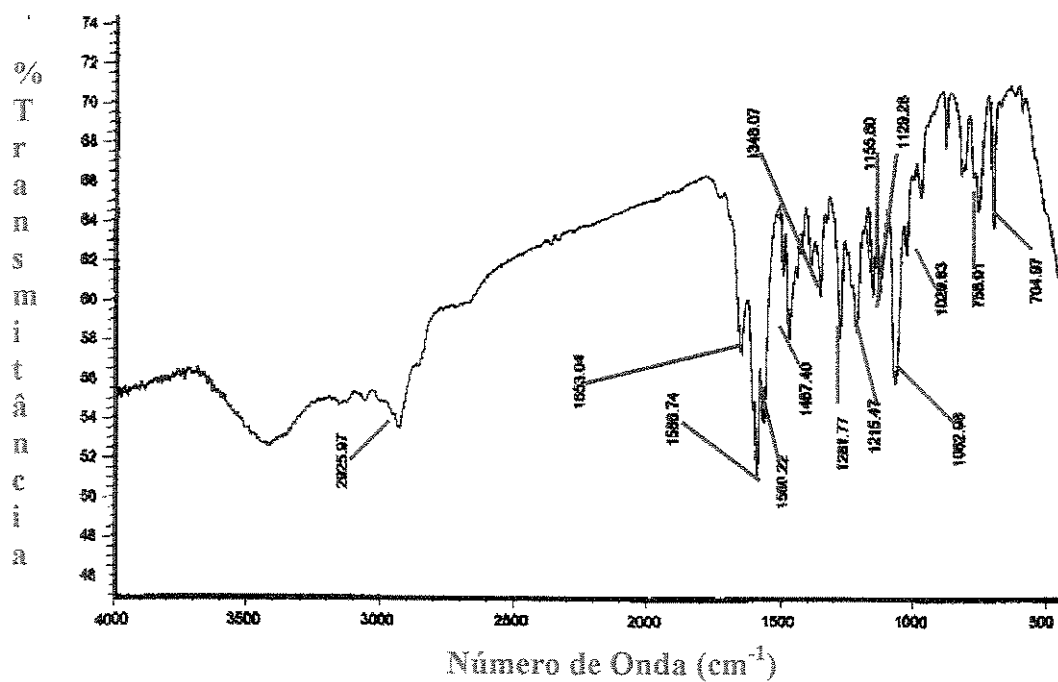


Figura 11: Espectro de Massas (IE, 70 eV) de (*E*)-7-OMe Pongamol 55

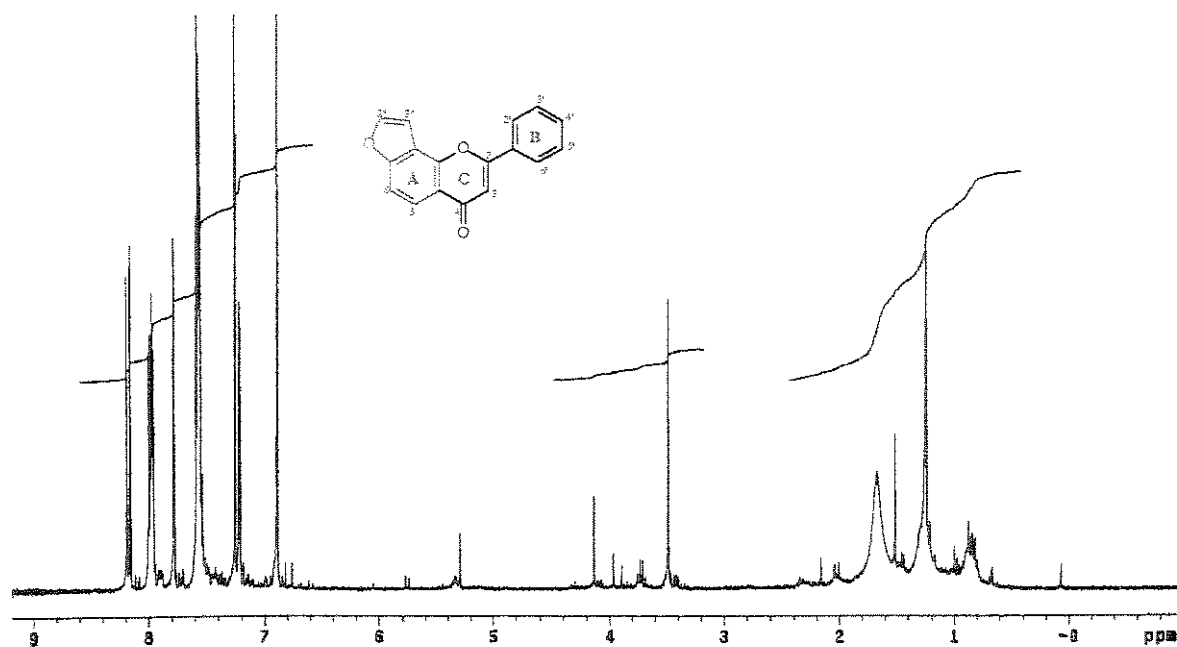
a) UV



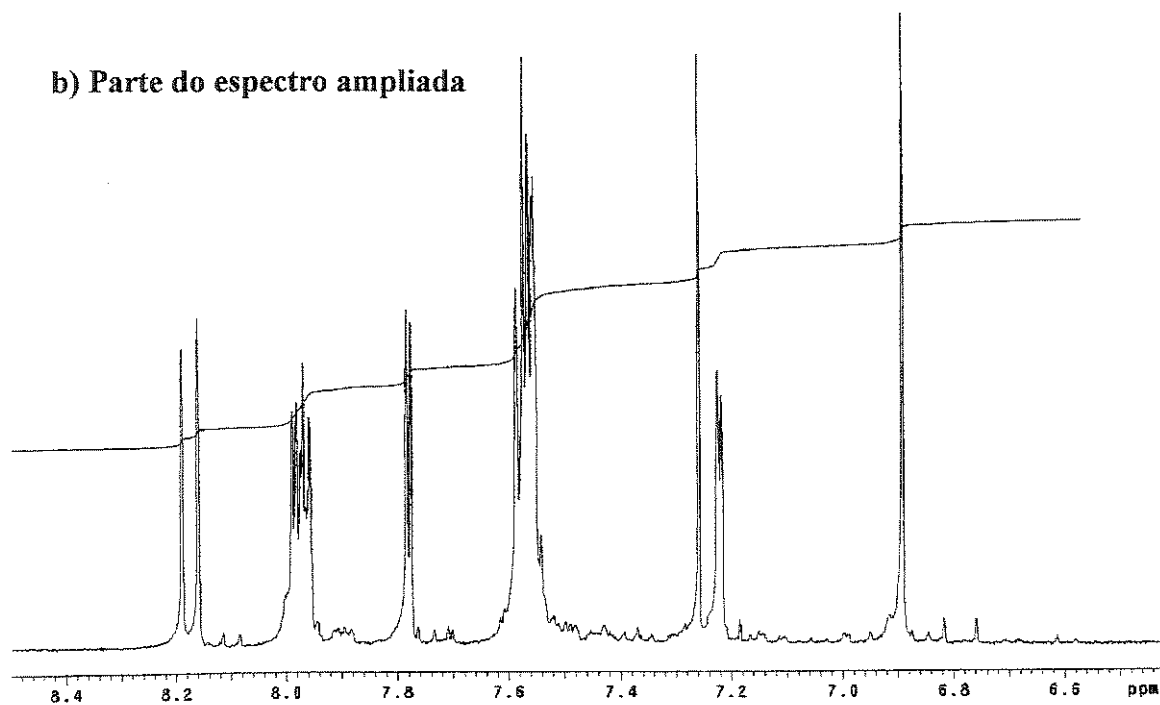
b) IV

Figura 12: Espectro de UV (a) e Espectro de IV (b) de (*E*)-7-OMe Pongamol 55

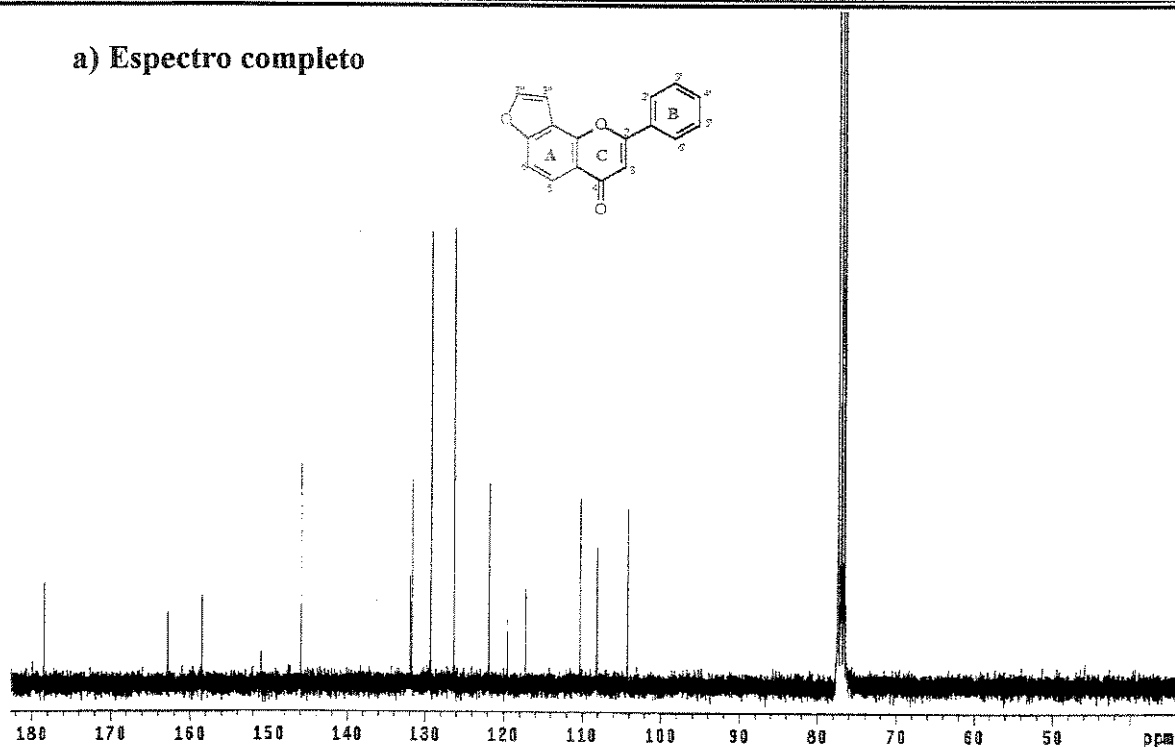
a) Espectro completo



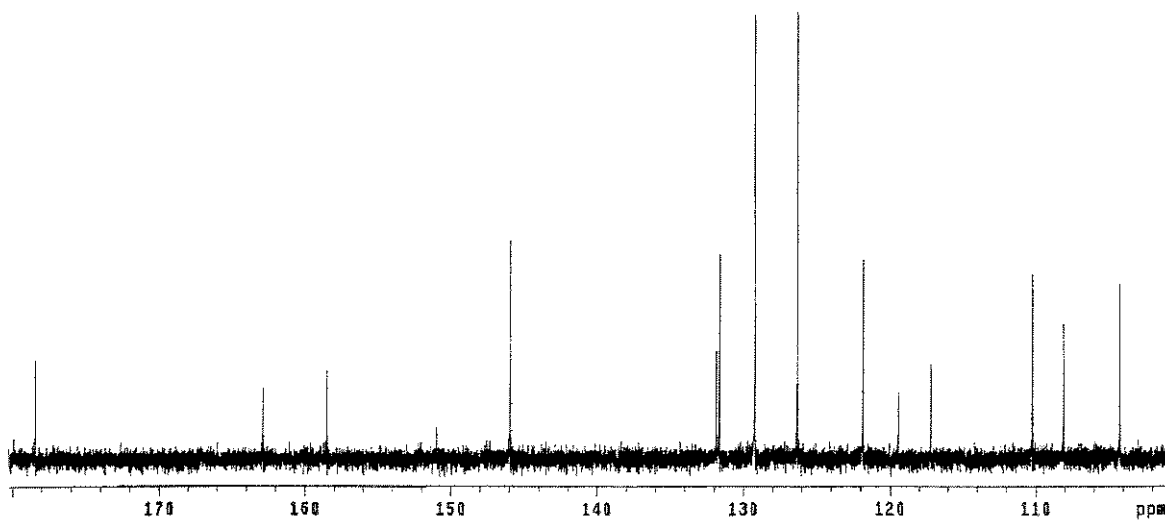
b) Parte do espectro ampliada

Figura 13: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Lanceolata B 56

a) Espectro completo



b) Parte do espectro ampliada

Figura 14: RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Lanceolata B 56

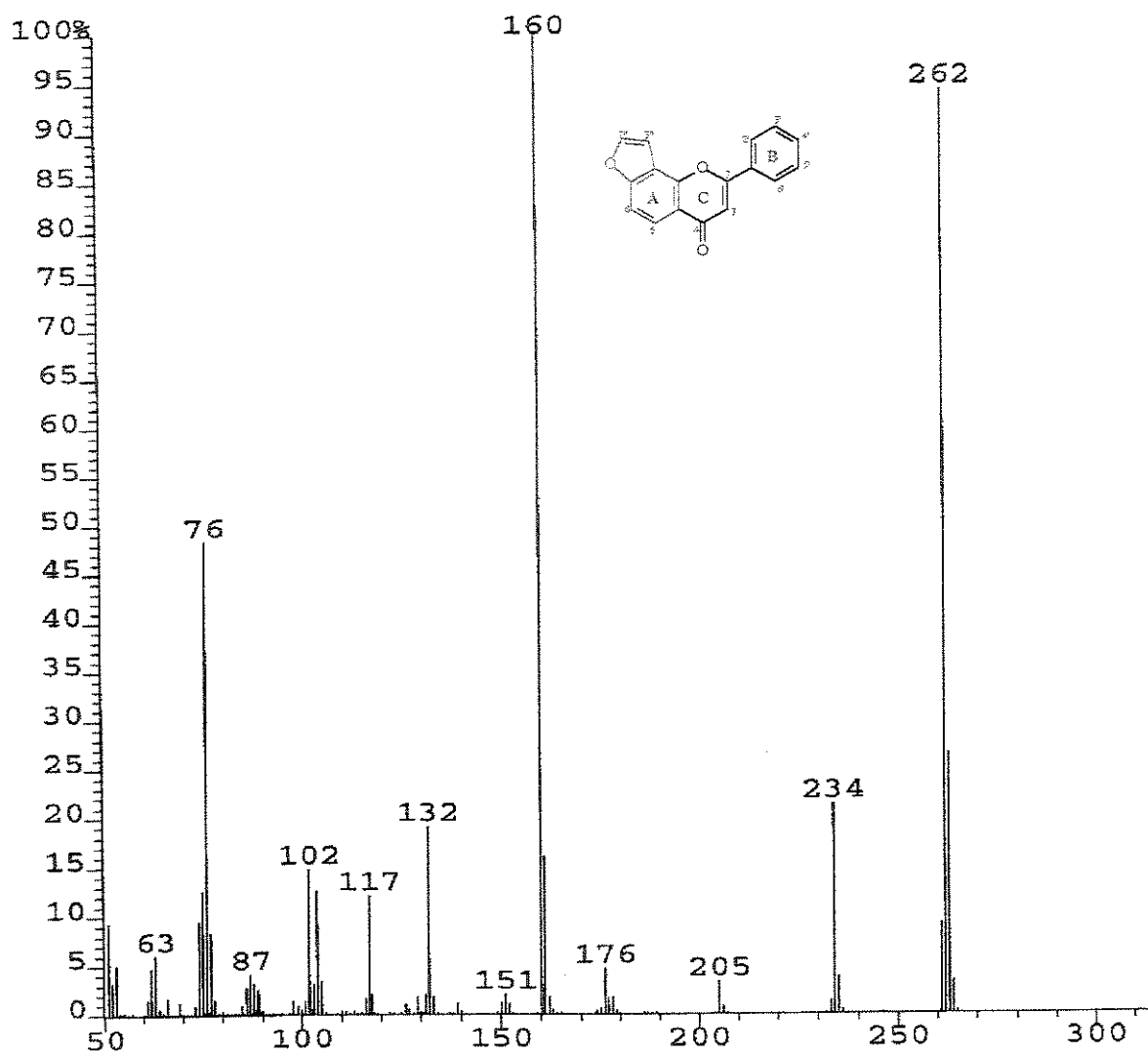
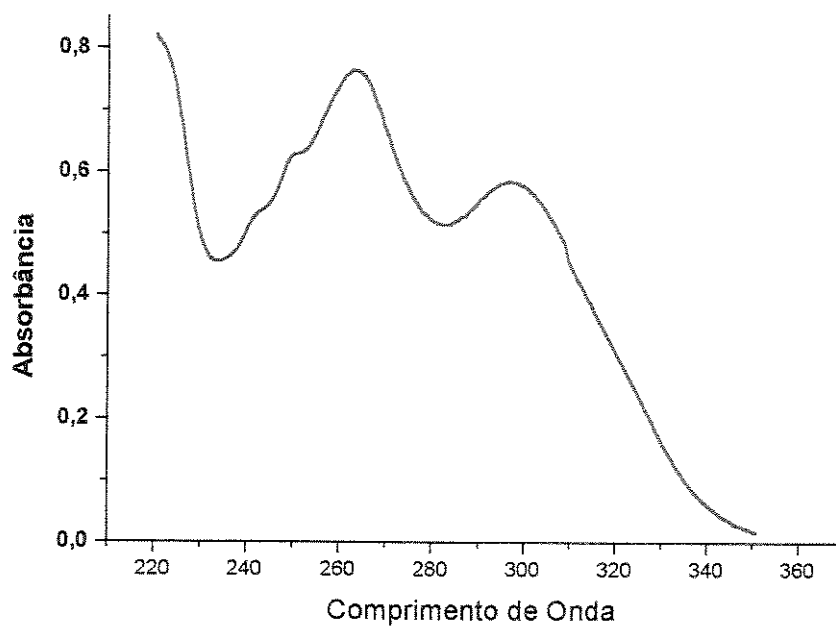


Figura 15 : Espectro de Massas (IE, 70 eV) de Lanceolatina B 56

a) UV



b) IV

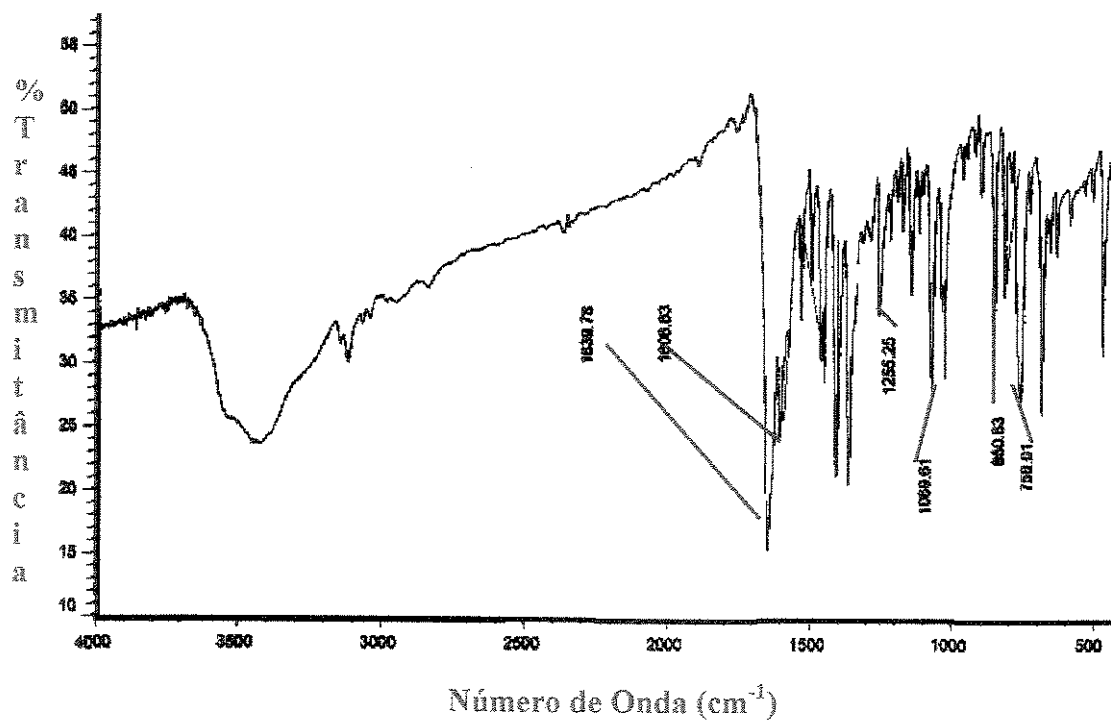
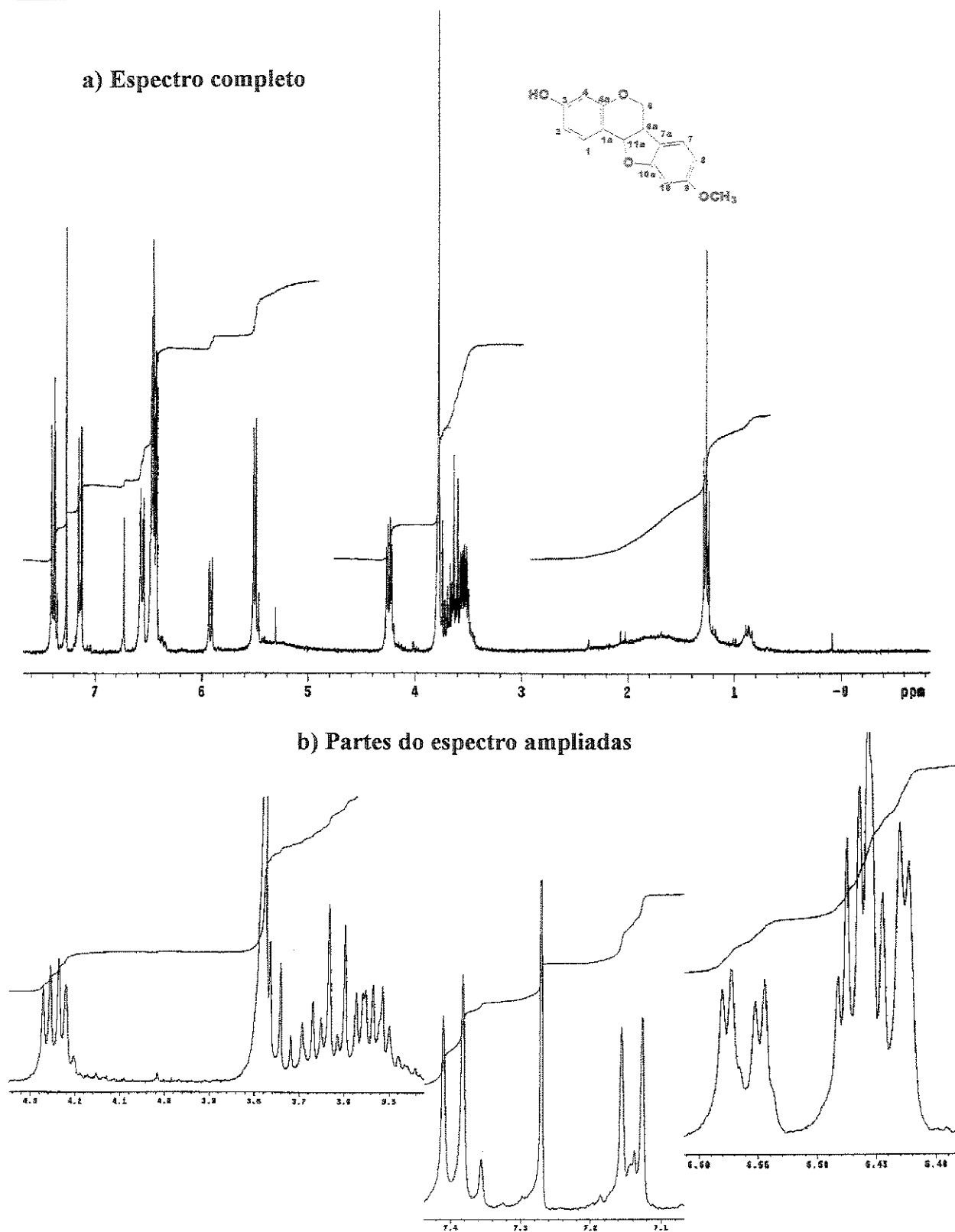
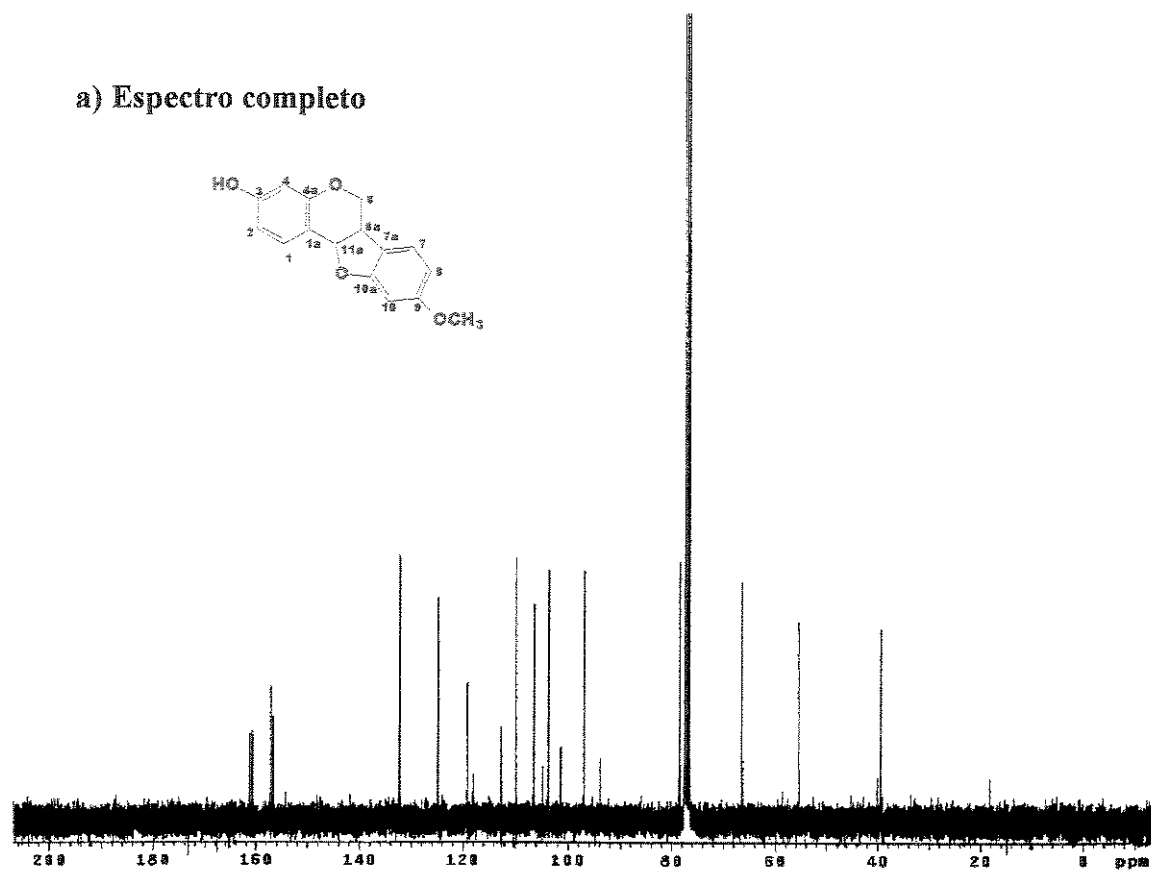


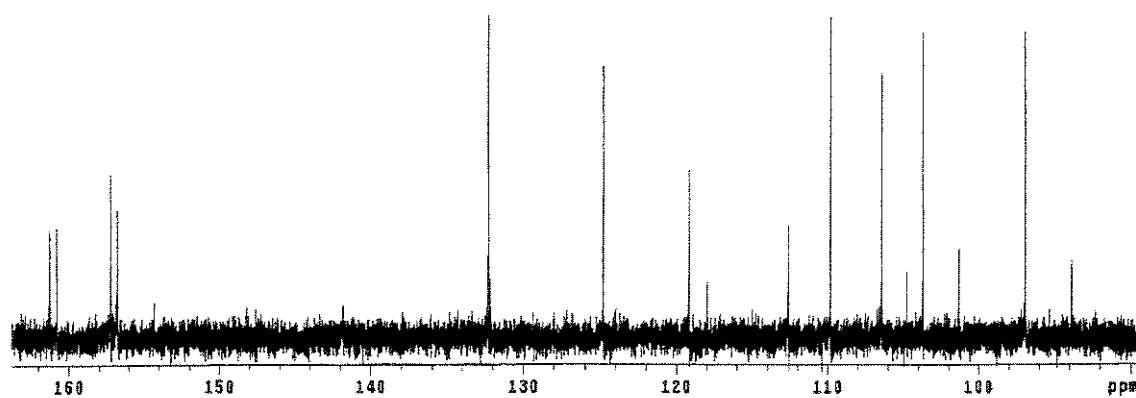
Figura 16: Espectro de UV (a) e Espectro IV (b) de Lanceolatina B 56



a) Espectro completo



b) Parte do espectro ampliada

Figura 18 : RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de Medicarpina 57

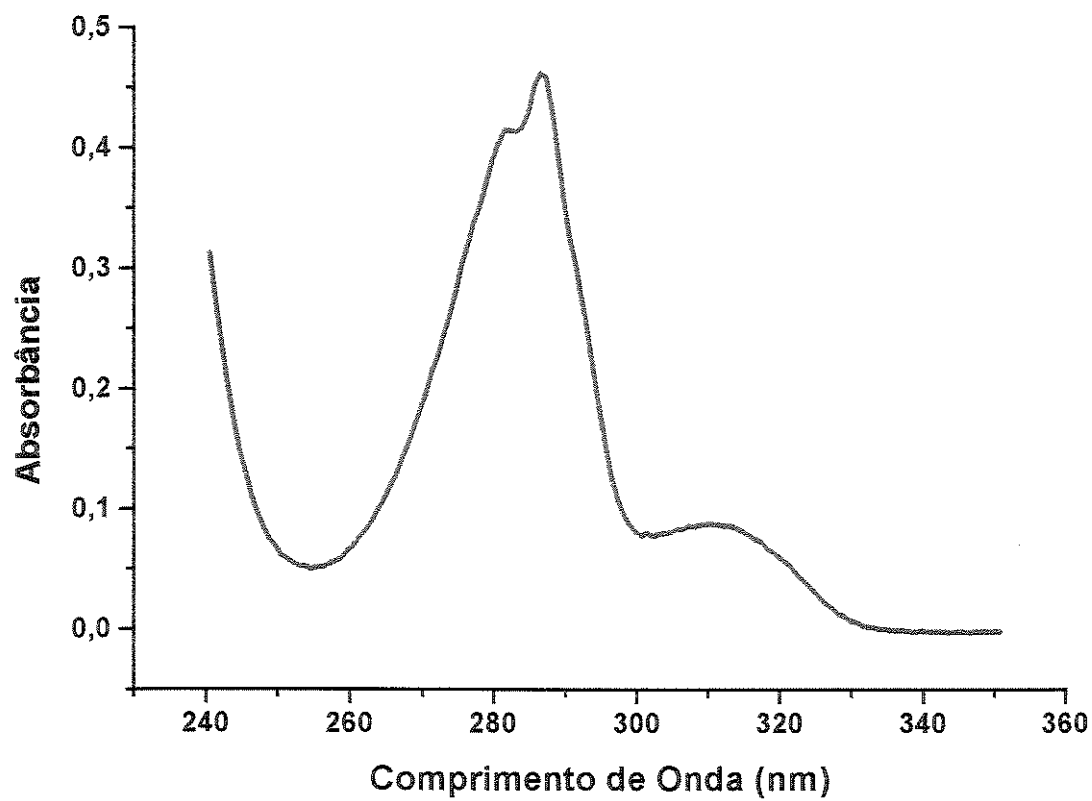


Figura 19 : Espectro de UV de Medicarpina 57

Capítulo

III

1. Introdução

A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e suas técnicas derivadas são ferramentas analíticas de grande relevância em análise química que vem sendo largamente empregada tanto nos laboratórios de pesquisa como na indústria destacando-se respectivamente os estudos sobre a composição dos alimentos e o monitoramento das drogas terapêuticas. A coluna é o coração do aparelho de CLAE e portanto essencial para o sucesso da análise. Comparado com a cromatografia de coluna clássica, onde as colunas são alimentadas pela gravidade e a separação leva horas ou dias, as análises por CLAE são muito rápidas (5 a 30 min) e algumas vezes comparáveis à CG. A sua aplicação na análise de extratos de plantas tornou-se uma rotina nos laboratórios de fitoquímica modernos¹.

Os flavonóides estão entre as classes de produtos naturais mais numerosas e difundidos no reino vegetal ocorrendo praticamente ao longo de todas as partes das plantas. Muitas plantas contêm misturas de flavonóides com estruturas semelhantes tornando a separação e purificação de cada um deles uma tarefa maçante e difícil, resultando na obtenção de apenas miligramas de cada um. Nestas circunstâncias as técnicas de CLAE acoplada à espectrômetria de massas ou com detetor UV são bastante adequadas para analisar o perfil flavonoidico de um determinado extrato, principalmente porque a literatura oferece toda a informação básica relativa às propriedades espectrais dos flavonóides em geral².

A eluição isocrática, de misturas complexas não é o método mais conveniente para separar os seus constituintes pois muitas vezes não se consegue uma fase móvel adequada. O problema pode ser resolvido usando eluição em gradiente, ou seja variando a composição da fase móvel durante a separação, usualmente misturando dois solventes com diferentes poderes de eluição em proporções continuamente alteradas³.

Uma serie de ácidos fenólicos, ácidos cinâmico e benzoico, e uma variedade de compostos flavonoídicos , incluindo flavonas, flavonóis e flavanonas assim como

¹ PRYDE, A. & GILBERT, M.T. Applications of High Performance Liquid Chromatography, Chapman and Hall, London, Cap. 17 e 18, 1980.

² CHAVES, N., RÍOS, J.J., GUTIERREZ, C., ESCUDERO, J.C & OLÍAS, J.M. Analysis of secret flavonoids of *Cistus ladanifer* L. by high performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 799 (1+2): 111-115 1998.

³ LINDSAY, S. Analytical Chemistry by Open Learning: High Performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons , Toronto, Cap. 4, 1990.

derivados de flavonas glicosiladas, foram separados por cromatografia em fase reversa usando uma mistura de fases móveis com água/ácido acético/metanol.

Na literatura encontram-se diversos exemplos do uso desta técnica para separação e quantificação de flavonóides^{4,5,6 e 7}.

Neste capítulo constam os resultados obtidos com o estudo dos extratos das raízes de *L. dipteroneurus* Pittier e *L. montanus* A.M.G.Azevedo através da análise por CLAE.

2. Materiais e Métodos

A análise qualitativa foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência HP 1090 série II/M com:

Detetor: espectrofotométrico UV/VIS arranjo de diodos

Coluna: HP de fase reversa C-18 Hypersil ODS (5µm, 100 x 4,6 mm)

A seguir encontra-se as condições de análise adotadas para cada extrato estudado:

Extrato éter de petróleo das raízes de *L. dipteroneurus* Pittier :

Fase Móvel Isocrática: MeOH, MeOH/H₂O 10%, 15%, 30% , 40 % , 50% e 60%.

Fase Móvel Gradiente: 70:30 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min.

Fluxo: 0,8 mL/min

Volume de injeção: 5µL

Detetor: 210, 230, 254, 270, 290, 310, 330 e 365

Temperatura: 40° C

Pressão: 400 (240 bar)

⁴ TOMÁS-BARBERAN, F.A., FERRERES, F., BLAZQUEZ, M.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. & TOMÁS-LORENTE, F. High performance liquid chromatography of honey flavonoids. *J. Chromatogr.* 634: 41-46, 1993.

⁵ CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M.E.J. & McDONALD, M.S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 761 (1+2): 315-321, 1997.

⁶ CONDE, E., CADAHIA, E. & GARCIAVALLEJO, M.C. High-performance liquid chromatography analysis of flavonoids and phenolic-acids and aldehydes in *Eucalytus* spp. *Chromatographia* 41 (11-12): 657-660, 1995.

⁷ JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P. & LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 799 (1+2): 101-110, 1998.

Extratos éter de petróleo e diclorometânico das raízes de *L. montanus* A.M.G.Azevedo :

Fase Móvel Isocrática: MeOH, MeOH/H₂O 20%, 30% , 40 % , 50% e 60%.

Fase Móvel Gradiente: 70:30 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min.

60:40 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min.

50:50 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min.

40:60 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min.

30:70 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min.

Fluxo: 0,8 mL/min

Volume de injeção: 5 µL

Detetor: 230, 254, 270, 290, 310, 330 e 365

Temperatura: 40° C

Pressão: 400 (240 bar)

Extrato diclorometânico das raízes de *L. montanus* A.M.G.Azevedo :

Fase Móvel Isocrática: ACN /H₂O 10%, 20% , 30 % , 40% e 50%.

Fase Móvel Gradiente: 90:10 (ACN/H₂O) – 100 (ACN) em 10 min

80:20 (ACN/H₂O) – 100 (ACN) em 10 min

70:30 (ACN/H₂O) – 100 (ACN) em 10 min

60:40 (ACN/H₂O) – 100 (ACN) em 10 min.

50:50 (ACN/H₂O) – 100 (ACN) em 10 min.

Fluxo: 0,8 mL/min

Volume de injeção: 5 µL

Detetor: 230, 254, 270, 290, 310, 330 e 365

Temperatura: 40° C

Pressão: 400 (70 bar)

Todas as amostras foram dissolvidas em solventes grau HPLC e filtradas em filtro tipo Millex®. A água usada é destilada e deionizada a uma concentração de 18,2 mΩ. Antes do início de cada análise, os solventes foram filtrados e degaseificados.

2.1 Análise Qualitativa

As análises foram feitas para mostrar os perfis cromatográficos dos extratos obtidos de *L. dipteroneurus* Pittier e *L. montanus* A.M.G.Azevedo.

A escolha da coluna e da fase móvel foi baseada na literatura⁸ e nas análises realizadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa⁹. Entretanto a escolha do comprimento de onda se baseou no comportamento dos flavonóides, que apresentam bandas de absorção relativas aos sistemas benzoila (banda II, 240-280 nm) e cinamoila (banda I, 300-380 nm).

3. Resultados e Discussões

3.1 *L. dipteroneurus* Pittier

Das várias tentativas de eluição do extrato éter de petróleo, tanto isocrática quanto em gradiente, a que proporcionou melhor separação foi a eluição gradiente partindo com a mistura MeOH/H₂O 70:30 aumentando gradativamente a proporção de MeOH até 100% durante 30 min (Fig. 1). O detetor foi ajustado para 254 e 270 nm, nos dois comprimentos de ondas que vem sendo usados para identificar flavonóides.

⁸ CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M.E.J. & McDONALD, M.S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 761 (1+2): 315-321, 1997.

⁹ NOGUEIRA, M.A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae – Isolamento, Determinação Estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal–Campinas, 1998, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

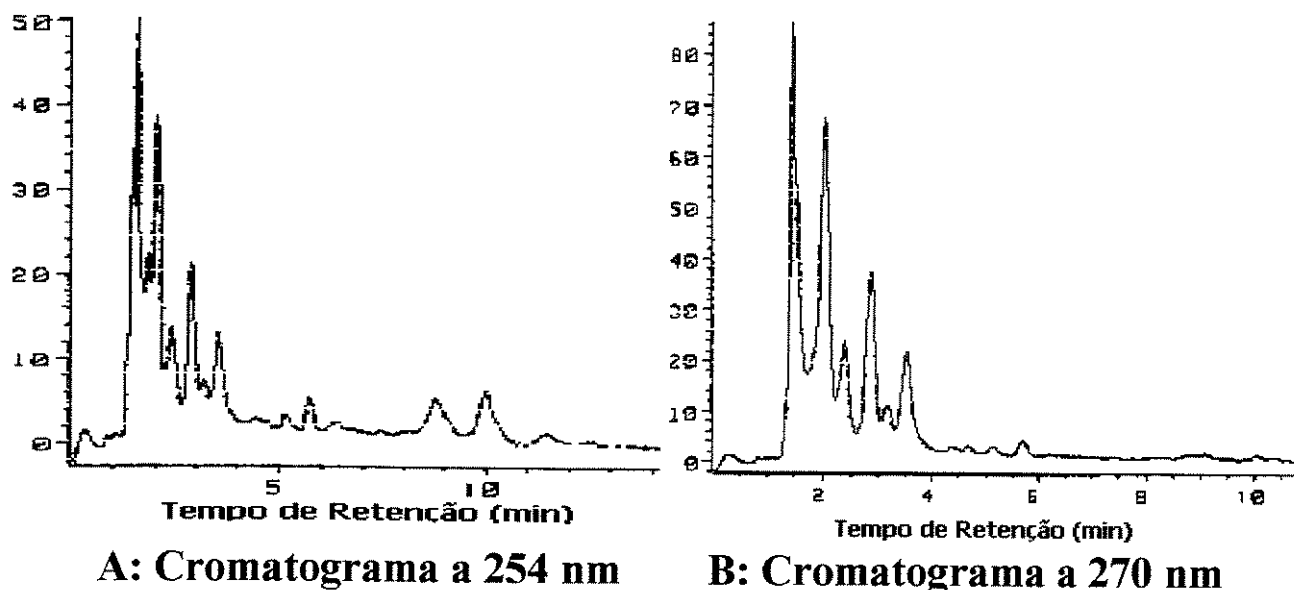


Figura 1: Cromatogramas do Ext. Éter de Petróleo das raízes de *L. dipteroneurus* Pittier

Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersyl 4,6 x 100 mm diâmetro interno, 5 μ m, fase móvel: 70:30 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min, volume de injeção: 10 μ L, fluxo: 0,8 mL/min e comprimento de onda: 254 nm (A) e 270 nm (B) .

Através da comparação dos cromatogramas dos extratos éter de petróleo de *L. dipteroneurus* Pittier com os de *L. atropurpureus* (pertencente ao mesmo subgênero *Lonchocarpus* e seção *Lonchocarpus*) observou-se que o cromatograma de *L. atropurpureus* apresentou um perfil esperado, isto é , picos correspondentes a compostos poucos polares (T_r maior) com espectros UV típicos para o esqueleto de flavanonas e flavanonóis (λ_{max} = 270 nm, banda II de flavonóides) o que foi comprovado após o isolamento de duas flavanonas e três flavanonóis ¹⁰, entretanto, o cromatograma do *L.*

¹⁰ RUIZ, A.L.T.G. Estudo Fitoquímico de *Poecilante parviflora* Benth e de *Lonchocarpus atropurpureus* Benth – Isolamento, Determinação estrutural e Atividade Biológica – Campinas, 1998, Tese de Mestre em Ciências, Instituto de Química, Unicamp.

dipteroneurus revelou a presença de compostos mais polares (T_r menor) com espectros UV apresentando máximos de absorção distintos dos esperados para os esqueletos flavonoídicos (Fig. 2 e Fig. 3).

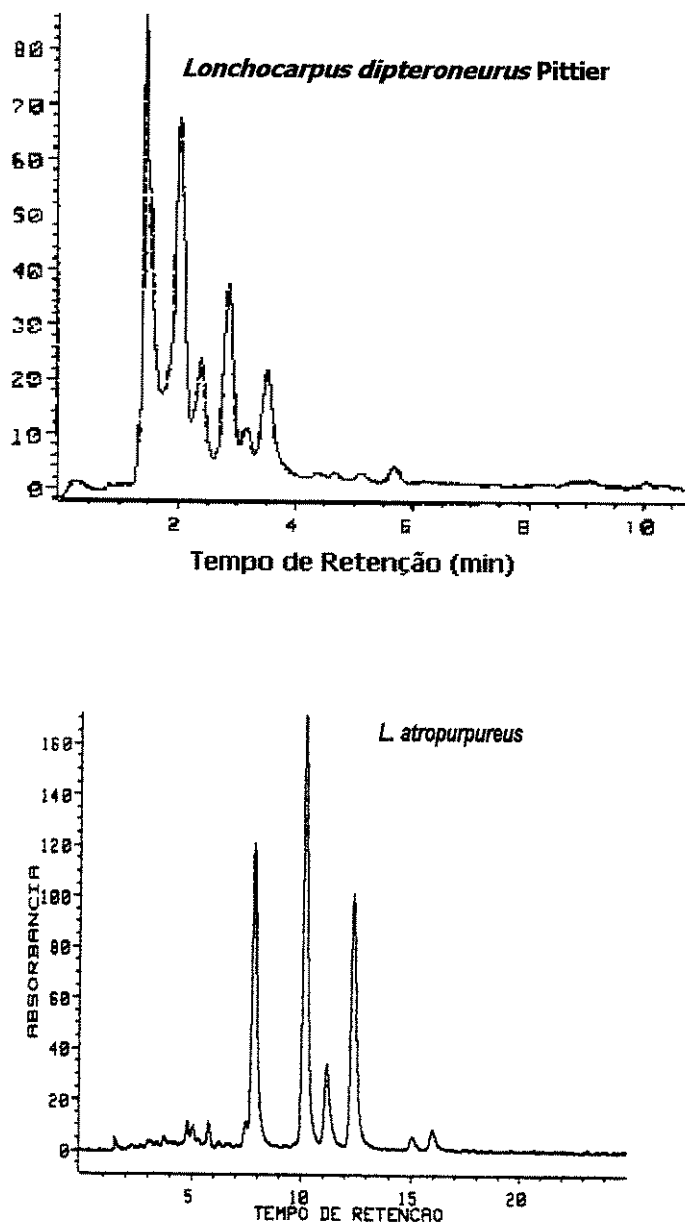


Figura 2: Cromatogramas dos Extratos de Eter de Petróleo de *L. dipteroneurus* e *L. atropurpureus*

Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersyl 4,6 x 100 mm diâmetro interno, 5 μ m, fase móvel: 70:30 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min, volume de injeção: 10 μ L, fluxo: 0,8 mL/min e comprimento de onda: 270 nm.

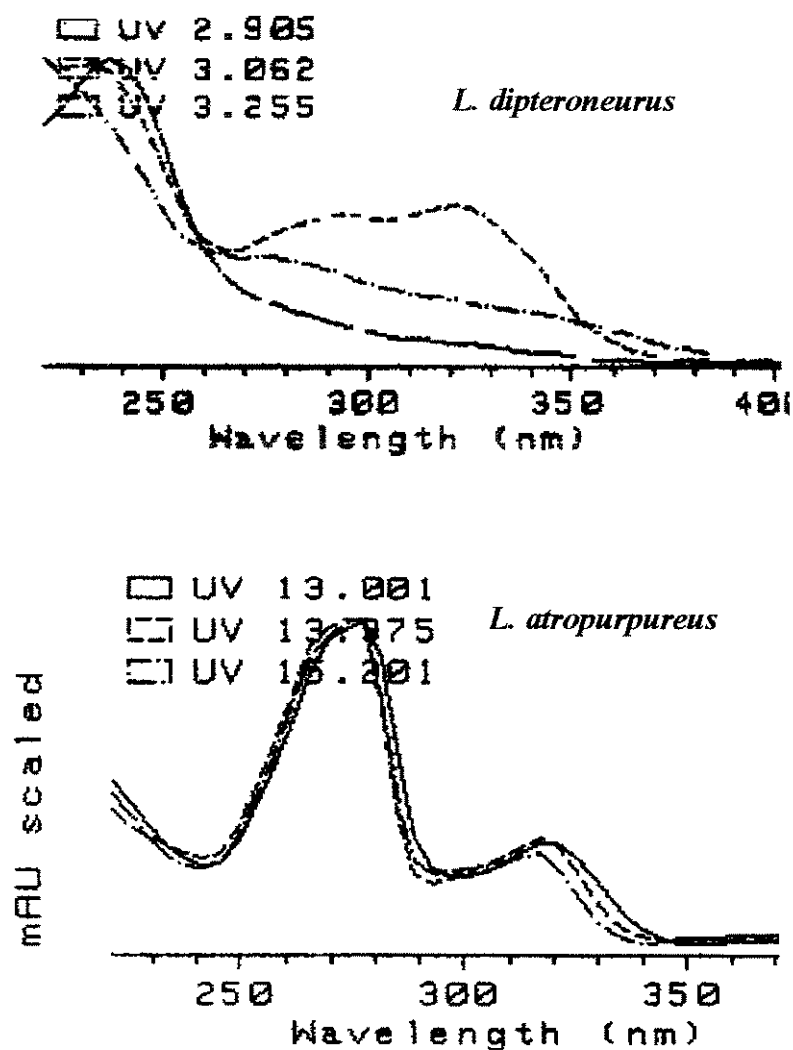


Figura 3: Espectros UV dos extratos Éter de Petróleo

L. dipteroneurus e *L. atropurpureus*

Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersyl 4,6 x 100 mm diâmetro interno, 5 μ m, fase móvel: 70:30 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min, volume de injeção: 10 μ L, fluxo: 0,8 mL/min e comprimento de onda: 270 nm.

A fim de obter maior quantidade de material vegetal em março de 1998 foi realizada uma nova coleta das raízes de *L. dipteroneurus* Pittier. O cromatograma obtido por CLAE, do extrato éter de petróleo desta nova coleta analisada sob as mesmas condições descritas anteriormente (Pág. 83) apresentou um perfil cromatográfico diferente da primeira coleta (Março de 1997, Fig. 4). Esta diferença levantou suspeita sobre a classificação botânica. Depois de um estudo extenso e minucioso a botânica A.M.G.Azevedo Tozzi corroborou que as duas raízes coletadas (uma em março de 1997 e a outra em março de 1998) são de plantas diferentes, e nenhuma pertence ao gênero *Lonchocarpus*. Este dado justifica o fato de não ter sido possível o isolamento de flavonóides da primeira raiz coletada.

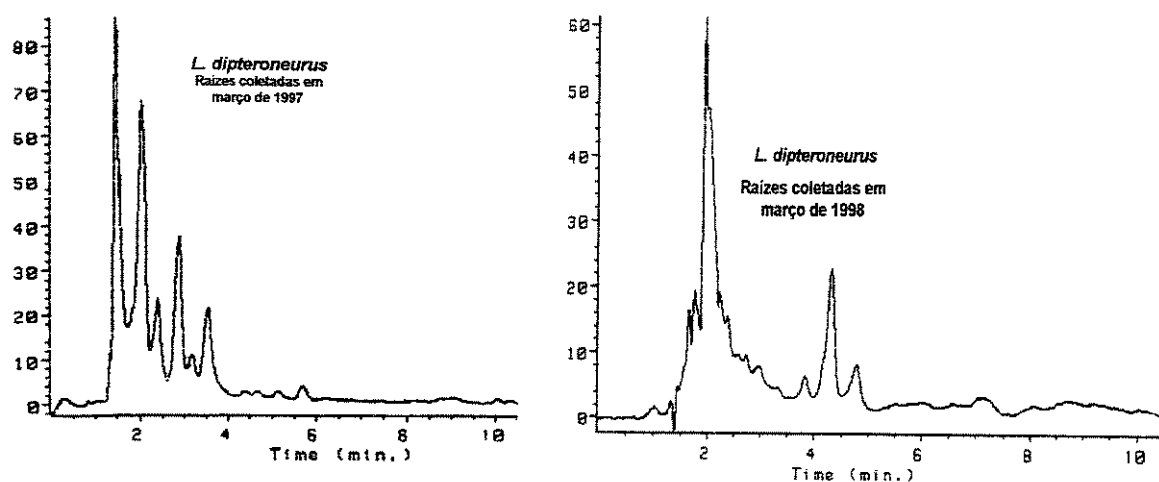


Figura 4 : Cromatogramas dos Extratos Éter de Petróleo de *L. dipteroneurus* Pittier
Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersyl 4,6 x 100 mm diâmetro interno, 5 µm, fase móvel: 70:30 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min, volume de injeção: 10 µL, fluxo: 0,8 mL/min e comprimento de onda: 270 nm.

Capítulo

IV

3.2 *L. montanus* A.M.G.Azevedo

Os extratos éter de petróleo e diclorometânico do *L. montanus* A.M.G.Azevedo possuem perfis cromatográficos muito semelhantes entretanto observamos que o extrato diclorometânico apresenta maior concentração de compostos mais polares (T_r menor) (Fig. 5).

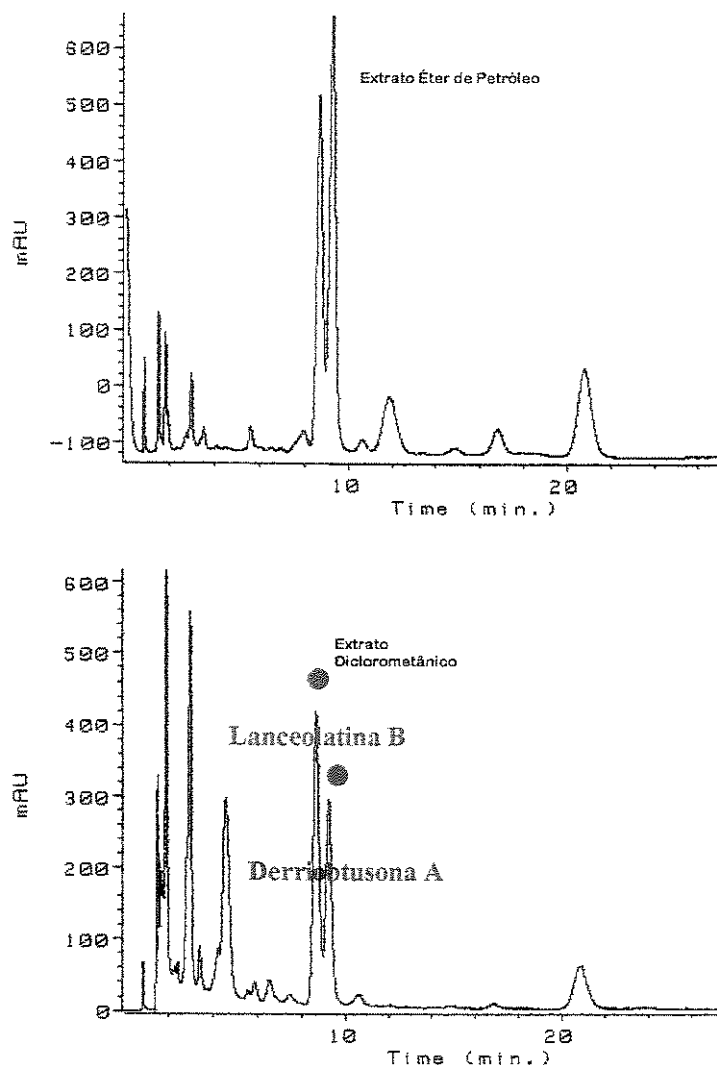


Figura 5 : Cromatograma dos extratos das raízes
de *L. montanus* A.M.G.Azevedo

Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersyl 4,6 x 100 mm diâmetro interno, 5 μ m, fase móvel: 70:30 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min, volume de injeção: 5 μ L, fluxo: 0,8 mL/min e comprimento de onda: 254 nm.

Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos até o momento pelo estudo dos dois extratos uma vez que estão fornecendo flavonóides diferentes. O extrato éter de petróleo está sendo analisado por Míriam Sanomiya, aluna de doutorado de nosso grupo de pesquisa.

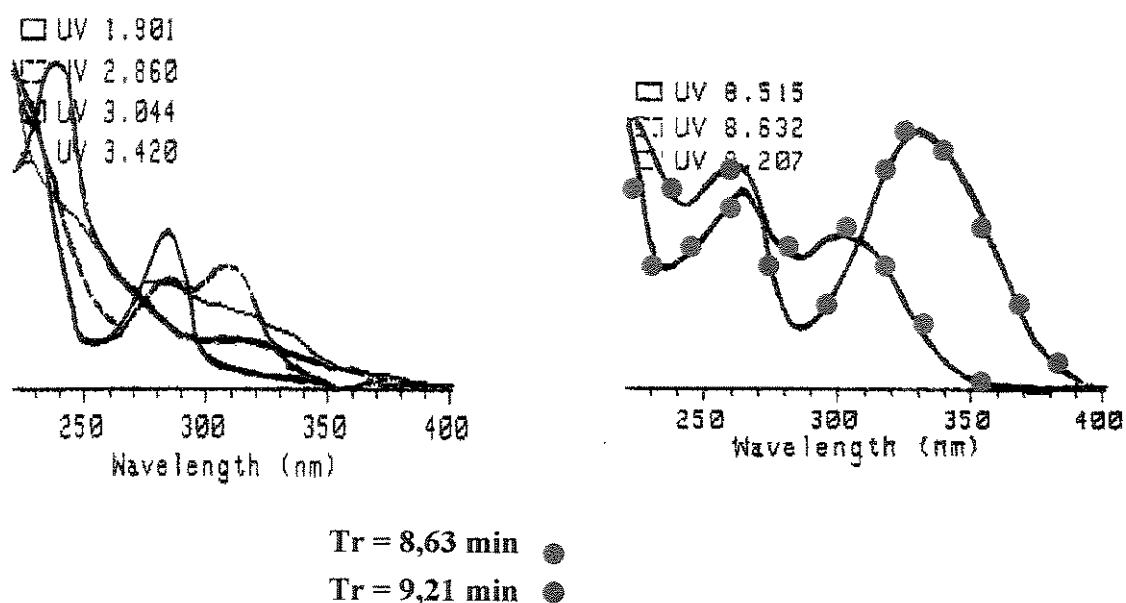


Figura 6: Espectros UV do extrato Diclorometânico das raízes de *L. montanus* A.M.G.Azevedo obtidos da análise por CLAE

Condições utilizadas: Coluna HP tipo ODS Hypersyl 4,6 x 100 mm diâmetro interno, 5 μ m, fase móvel: 70:30 (MeOH/H₂O) – 100 (MeOH) em 30 min, volume de injeção: 5 μ L, fluxo: 0,8 mL/min e comprimento de onda: 254 nm.

No cromatograma do extrato diclorometânico (Fig. 5) podemos ver que ele possui pelo menos seis compostos dos quais quatro já foram isolados e pelo espectro UV (Fig. 6) podemos sugerir que o composto com tempo de retenção $T_r = 8,6$ min seja a Lanceolatina B **56** e o composto com $T_r = 9,2$ min trata-se da Derriobtusona A **53**.

1. Introdução

A pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos vem crescendo cada vez mais, na busca da cura de muitos males tais como o câncer e diversas doenças infecciosas causadas por fungos e bactérias. Um número grande de bioensaios são utilizados para testar tanto extratos de plantas quanto os compostos isolados. Já que muitos deles são relativamente caros é necessário saber estabelecer o kit do ensaio, como realizar o teste, como interpretar os dados obtidos e quais são as limitações da metodologia escolhida¹. O estudo de extratos e compostos bioativos no laboratório de química exige a aplicação de bioensaios facilmente realizáveis. A metodologia aplicada aos bioensaios é bastante variada, por exemplo o uso de animais inteiros, tecidos isolados ou qualquer sistema bioquímico pode ser complicado e caro. Os efeitos biológicos e fisiológicos observados no screening são também críticos. Um dos ensaios biológicos mais simples de ser monitorado é a letalidade já que considera apenas um critério (morto ou vivo), além de apresentar resposta quantitativa e tratamento estatístico relativamente fáceis. Um método geral para screening de toxicidade de compostos consiste no Teste de Letalidade com *Artemia salina* Leach publicado pela primeira vez em 1956². Os bioensaios feitos com as larvas do crustáceo *Artemia salina* (MCLAUGHLIN, 1991), tem sido usados como indicador de toxicidade tanto para screening de compostos com atividade anti-tumoral, quanto para compostos com atividade pesticida. Também vem sendo aplicado no biomonitoramento para frações ativas de extratos vegetais. Este bioensaio apresenta uma correlação positiva com os ensaios sobre células 9kb (carcinoma nasofaríngeo humano $p = 0.036$ e $Kappa = 0,56$), onde os valores de ED_{50} para citotoxicidade são geralmente próximos a uma décima parte dos valores LC_{50} encontrados nos bioensaios com *Artemia salina*³.

¹ COLE, M.D. Key Antifungal, Antibacterial and Anti-insect Assay-a Critical Review, *Biochem Syst. Ecol.* 22 (8): 837-856, 1994

² COLEGATE, S.M. & MOLYNEUX, R.J. Bioactive Natural Product. Detection, Isolation and Structural Determination, CRC Press, USA, Cap. 18, 1993.

³ NOGUEIRA, M.A. Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae – Isolamento, Determinação Estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal – Campinas, 1998, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

Os testes de bioautografia, usados para avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana, constituem mais um exemplo de bioensaios simples, rápidos e relativamente baratos que demandam pequenas quantidades de amostra e portanto podem ser facilmente implantados num laboratório de fitoquímica¹ para realizar um “screening” dos extratos e das substâncias isoladas.

Um grupo grande de plantas ricas em polifenóis⁴ possuem propriedades anti-aterogênicas presumivelmente devido ao fato destes metabólitos atuarem como antioxidantes naturais. De todos os polifenóis de plantas, os flavonóides são de particular interesse por causa de sua alta concentração em alimentos tais como frutas, legumes, verduras e chás. Um estudo realizado na Finlândia⁴ sugere que a incidência de doenças cardíacas é inversamente proporcional à ingestão de alimentos ricos em flavonóides tais como a maçã e o alho. Embora, tenha se observado que uma dieta rica em frutas e legumes contribui para uma menor incidência de vários tipos de câncer, ainda não foi possível estabelecer uma correlação direta com flavonóides isolados. Estudos de cultura de células vegetal e animal sugerem no entanto que esses flavonóides podem ser protetores contra vários tipos de câncer. O número de flavonóides em plantas é grande e geralmente ocorrem em misturas complexas e muitas vezes estão glicosilados com diferentes açúcares tais como glucose, galactose, ramosa, arabinose, xilose e rutinose. A glicosilação aumenta a polaridade dos flavonóides e ainda a solubilidade em água viabilizando o armazenamento destes compostos nos vacuolos das plantas. Se acredita que as funções dos flavonóides em plantas sejam proteger contra radiação UV e contra o ataque de microrganismos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Bioensaio de Bioautografia

Este foi implantado em nosso laboratório pela Dra. Marisa Alves Nogueira³, ex-aluna de doutorado de nosso grupo de pesquisa, com algumas modificações introduzidas no

⁴ JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P. & LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, 799 (1+2): 101-110, 1998.

protocolo descrito por SAXENA⁵. Tanto os extratos éter de petróleo e diclorometânico quanto os compostos isolados **53**, **55**, **56** e **57** foram dissolvidos nos respectivos solventes na concentração de 2 mg/mL. Foram aplicadas em duas placas de CCD (Merck Silica gel GF₂₅₄, 6x6 cm) 10 µL de cada extrato (ou 5 µL do composto puro) e 1 µL de antibiótico (cloranfenicol para bactérias e ciclopirox olamina para os fungos) e desenvolvidas com CHCl₃ 100% para os extratos e o composto **53** e com CHCl₃ /MeOH 1% para os compostos puros **55**, **56** e **57**. Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Na placa controle as manchas que absorveram nestes comprimentos de onda foram marcadas. A outra placa de CCD foi colocada em uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro, na qual foi adicionada 20 mL de meio de cultura específico ao microrganismo testado; após solidificação do meio, inoculou-se 200 µL de suspensão do microrganismo contendo cerca de 10⁶ células/mL fazendo-se o espalhamento com auxílio de uma alça de Digralski. Foi preparado uma placa de Petri contendo apenas meio de cultura (branco) para avaliar o crescimento microbiano. Todas as placas foram incubadas (24 h para bactérias e 7 dias para fungo) em temperatura específica para cada microrganismo (por volta de 37 °C para bactérias e 25 °C para fungos), sendo ao final observados os halos de inibição e comparados com a placa de CCD controle previamente pulverizada com revelador específico (anisaldeído modificado) e aquecida revelando manchas coloridas.

Os meios de cultura utilizados foram: ★ **NA** (Agar Nutriente) para **bactérias**, constituído de peptona (5,0 g) + extrato de carne (3,0 g) + agar (15,0 g) + água destilada (1 L) e ★ **MA** (Agar Malte) para **fungos** constituído de extrato de malte (20,0 g) + agar (20,0 g). Foram testadas os seguintes microrganismos:

♀ Bactérias: <i>Escherichia coli</i> (gram -)	CCT 5050
<i>Rhodococcus equi</i> (gram +)	CCT 0541
<i>Bacillus subtilis</i> (gram +)	CCT 0089

⁵ SAXENA, G., FARNER, S., TOWERS, G. H., HANCOCK, R. E. W., *apud* NOGUEIRA, M. A. . Estudo Fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae – Isolamento, Determinação Estrutural, Atividade Biológica e Análise Sazonal – Campinas, 1998, Tese de Doutor em Ciências, Instituto de Química, UNICAMP.

<i>Salmonella typhimurium</i> (gram -)	CCT 0528
<i>Micrococcus luteus</i> (gram +)	CCT 2720
<i>Staphylococcus aureus</i> (gram +)	CCT 4295
<i>Salmonella typhimurium</i> (gram -)	CCT 0528

♀ **Fungos** : *Cladosporium cladosporioides* CCT 5039

♀ **Levedura:** *Candida albicans* CCT 0776

Tanto os microrganismos quanto os meios de cultura utilizados nestes bioensaios foram fornecidos pela Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”.

2.2. Bioensaio de Letalidade com *Artemia salina* (“Brine Shrimp Letality Test”)

O ensaio foi desenvolvido de acordo com a técnica proposta por McLaughlin⁶.

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

Tanto os extratos éter de petróleo e diclorometânico quanto os compostos isolados **53**, **55** e **56** foram pesados e diluídos nos respectivos solventes de acordo com a técnica sugerida por McLaughlin conforme mostrado na Fig. 1.

⁶ McLAUGHLIN, J. L., SAIZARBITORIA, T.C. & ANDERSON, J.E. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, 18 (4): 13-18, 1995.

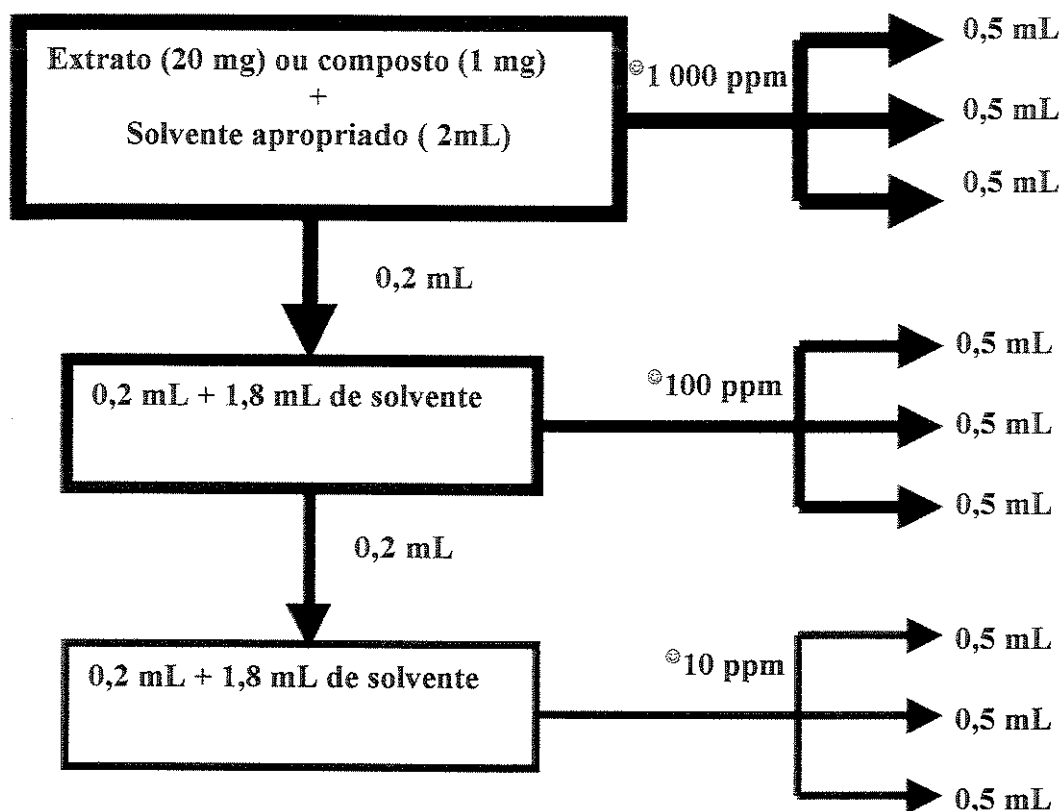


Figura 1 : Procedimento para diluição da amostra no Teste com *Artemia Salina*

⊗ As concentrações usadas para os compostos puros são: 50, 5 e 0,5 ppm respectivamente.

Após evaporação total do solvente a cada um dos nove frasquinhos se adicionou uma gota de dimetilsulfóxido (DMSO), cerca de 3mL de água salgada, 10 larvas de *Artemia salina* e se completou o volume para 5mL. Os frascos foram deixados descobertos e após 24 horas foram contados os sobreviventes. Os dados foram avaliados no programa FINNEY, para análise estatística e assim determinar os valores de DL_{50} .

3. Resultados e Discussões

3.1 Bioensaio de Bioautografia

Os extratos (éter de petróleo e diclorometânico) das raízes de *L. montanus* A.M.G.Azevedo e os flavonóides isolados do extrato diclorometânico mostraram-se ativos contra a bactéria *Staphilococcus aureus* (gram +).

3.2 Bioensaio de Letalidade com *Artemia salina* (“Brine Shrimp Letality Test”)

O resultado positivo deste bioensaio é um indicador de toxicidade tanto para screening de compostos com atividade antitumoral quanto para compostos com atividade pesticida⁶

Após análise estatística dos dados, constatou-se que o extrato éter de petróleo de *L. montanus* A.M.G.Azevedo é mais ativo que o diclorometânico e que Derriobtusona A **53** é mais ativo que (E)-7-O-Metil Pongamol **55** e este último mais ativo que a Lanceolatina B **56** (Tab. 1). As doses letais médias (ED₅₀) dos extratos e compostos isolados são as seguintes:

Tabela 1: Resultados do Teste com *Artemia salina* dos extratos e de alguns compostos isolados das raízes de *L. montanus* A.M.G. Azevedo

<i>Amostra Tratada</i>	<i>ED₅₀</i>	<i>G</i>
Derriobtusona A	1,6*	0,13
(E)-7-O-Metil Pongamol	4,4*	0,17
Lanceolatina B	5,8*	0,48
Extrato Éter de Petróleo	2,5**	0,45
Extrato Diclorometânico	20,3**	0,16

*Feito usando concentrações de 50, 5 e 0,5 ppm

**Feito usando concentrações de 1 000 , 100 e 10 ppm

⁶ McLAUGHLIN, J. L., SAIZARBITORIA, T.C. & ANDERSON, J.E. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, 18 (4): 13-18, 1995.

Capítulo

v

Considerações Finais

¶ O estudo fitoquímico do espécime coletado como *L. dipteroneurus* não levou ao isolamento de flavonóides e de fato foi posteriormente constatado pela Dra. A.M.G.Azevedo Tozzi que não se trata de um *Lonchocarpus*.

¶ As raízes de *L. montanus* possuem compostos flavonoídicos tal como vem sendo observado para as demais espécies *Lonchocarpus* investigadas até agora.

¶ O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico das raízes de *L. montanus* A.M.G.Azevedo resultou no isolamento de quatro flavonóides conhecidos, destacando-se a Derriobtusona A **53** pelo fato de pertencer a uma classe de flavonóides pouco freqüente na natureza e ter sido previamente isolado apenas de *L. obtusus*.

¶ A ocorrência de Derriobtusona A **53** nas raízes de *L. montanus* e de *L. obtusus* é mais uma evidência da forte afinidade entre estas espécies.

¶ Tanto os extratos éter de petróleo e diclorometânico quanto os flavonóides isolados das raízes de *L. montanus* foram ativos contra a bactéria *Staphilococcus aureus* CCT 4295 (gram +) nas condições empregadas; assim também como apresentaram resultados positivos no teste de letalidade com *Artemia salina* sugerindo uma possível atividade anti-tumoral ou pesticida.